

11662
1
rej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**COMPARACION DE METODOS PARA ESTIMAR LA
DISPONIBILIDAD DE AMINOACIDOS EN PASTAS DE
SOYA Y HARINAS DE PESCADO**

FALLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
ESPECIALIDAD EN NUTRICION ANIMAL
P R E S E N T A :
NORMA EDITH AVILA PORTILLO

Asesores: M.Sc. Irma Tejada de Hernández
M.Sc. Ernesto Avila González

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1991



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

Se utilizaron tres pastas de soya y tres harinas de pescado con el objeto de determinar la digestibilidad verdadera de sus aminoácidos (DVAA), la cual se correlacionó con dos métodos in vitro, y además se determinó lisina disponible utilizando 1 fluor 2,4 dinitrobenzenceno (FDNB).

Para determinar la digestibilidad verdadera total de AA se empleó la técnica de Sibbald (1976) usando gallos adultos de raza Leghorn, a los que se les administró 30 g de cada ingrediente y gallos control a los que no se les ofreció alimento con el fin de hacer las correcciones para aminoácidos (AA) de origen endógeno, metabólico y microbiano. El promedio de digestibilidad verdadera total de AA para las pastas de soya y las harinas de pescado fue de 88.24% y 88.92% respectivamente.

Las técnicas enzimáticas fueron denominadas digestibilidades in vitro 1 y 2. Con la técnica 1 se realizaron 5 experimentos previos, con el objeto de determinar la liberación de AA de la proteína, por las enzimas gastrointestinales pepsina y pancreatina, como estimador se midió el porcentaje de nitrógeno presente en el sobrenadante producido por estas enzimas para una pasta de soya y una harina de pescado. El mejor tiempo de incubación con pepsina fue encontrado a las 4 horas para ambos ingredientes, y con pancreatina a las 18 y 21 horas para la pasta de soya y harina de pescado respectivamente. No se pudo determinar ninguna correlación de este método con la digestibilidad verdadera total de AA debido a deficiencias de la técnica.

Para el método in vitro 2 se utilizaron las enzimas tripsina, quimotripsina y peptidasa con un tiempo de incubación del ingrediente por 10 minutos, partiendo de un pH inicial de 8.0 y midiéndose nuevamente al finalizar su incubación, tomando como control la caseína y asumiendo la disminución del pH de esta como una hidrólisis total de la proteína. Encontrando para las pastas de soya 1, 2 y 3 una digestión enzimática de 85.85%, 86.96% y 86.32% respectivamente y para las harinas de pescado 1, 2 y 3 de 85.05%, 85.05% y 84.10% respectivamente. La correlación de la digestibilidad verdadera total de AA con respecto a su pH en ambos ingredientes fue de 0.20 y 0.46 ($P < 0.05$) para la digestibilidad aparente de AA.

La técnica del FDNB para determinar lisina disponible y expresada como porcentaje del contenido total del ingrediente, para las pastas de soya 1, 2 y 3 fue de 106.18%, 117.63% y 132.21 respectivamente y para las harinas de pescado 1, 2 y 3 fue de 92.17%, 84.48% y 84.11% respectivamente. La correlación de la lisina disponible verdadera obtenida in vivo con FDNB fue de 0.20 ($P < 0.05$).

Los datos obtenidos en este estudio, indican que la utilización de pruebas in vivo para determinar digestibilidad de AA en ingredientes para alimentación animal constituyen probablemente la mejor opción; sin embargo, la prueba in vitro 2 parece ser una buena alternativa debido a que es un método sencillo, rápido y de bajo costo.

CONTENIDO

Página

Dedicatoria

Agradecimientos

Contenido

Indice de Cuadros

Indice de Gráficas

I.	Introducción	1
II	Objetivos	3
III	Revisión de Literatura	4
	Biodisponibilidad	5
	Algunos factores que afectan los AA disponibles en alimentos para pollos	6
	Métodos para medir aminoácidos disponibles en aves	8
	-Disponibilidad <u>in vivo</u>	8
	1. Pruebas de crecimiento en pollos	8
	2. Aminoácidos en plasma	10
	-Digestibilidad <u>in vivo</u> de AA	12
	1. Métodos de balance	12
	1.1 Ingrediente a ensayar	12
	1.2 Importancia de la fracción microbiana y metabólica en mediciones de digestibilidad	14
	1.3 Colección de excretas	19
	1.3.1 Utilización de aves intactas o convencionales	20
	1.3.2 Pollos colostomizados	21
	1.3.3 Pollos cecostomizados	21
	1.3.4 Métodos de colección ileal	23
	-Disponibilidad <u>in vitro</u>	24
	1. Métodos químicos	24
	Correlación entre métodos <u>in vivo</u> e <u>in vitro</u>	28
	2. Pruebas microbiológicas	31
	-Digestibilidad <u>in vitro</u>	31
	1. Digestión enzimática	31

IV	Materiales y Métodos	35
	1. Prueba <u>in vivo</u>	35
	2. Pruebas químicas	38
	2a Metodología <u>in vitro</u> 1	38
	2b Prueba <u>in vitro</u> 2	43
	2c Otros análisis	44
V	Resultados y Discusión	46
	Pruebas biológicas <u>in vivo</u>	46
	Digestion <u>in vitro</u> 1	59
	Digestion <u>in vitro</u> 2	67
	Lisina disponible	70
VI	Conclusiones	73
VII	Literatura citada	74

INDICE DE CUADROS

Cuadro No.		Página
5.1	Composición proximal de las 3 pastas de soya comerciales utilizadas. Resultados en porcentaje normalizados al 91% de materia seca	47
5.2	Composición proximal de las 3 harinas de pescado comerciales utilizadas. Resultados en porcentaje normalizados al 91% de materia seca	47
5.3	Composición porcentual de aminoácidos de las pastas de soya con base en el contenido de proteína cruda	48
5.4	Composición porcentual de aminoácidos de las harinas de pescado con base en el contenido de proteína cruda	49
5.5	Porcentaje de digestibilidad verdadera de aminoácidos en pastas de soya utilizando gallos adultos	50
5.6	Porcentaje de digestibilidad verdadera de aminoácidos en harinas de pescado utilizando gallos adultos	51
5.7	Análisis de varianza	53
5.8	Evaluación de la calidad en pastas de soya por dos métodos diferentes	54
5.9	Porcentaje del contenido de aminoácidos en pastas de soya con respecto a valores estimados de aminoácidos por ecuaciones de regresión	56
5.10	Porcentaje del contenido de aminoácidos en harinas de pescado con respecto a valores estimados de aminoácidos por ecuaciones de regresión	56
5.11	Digestibilidad verdadera de aminoácidos (%) de pastas de soya y harinas de pescado informadas por varios laboratorios	57

5.12	Limites (rangos) de digestibilidad verdadera de aminoácidos (%) entre muestras de pastas de soya y harinas de pescado	58
5.13	Efecto del tiempo de incubación, de pastas de soya y harinas de pescado, con pepsina y pancreatina sobre el pH de la mezcla	60
5.14	Porcentaje de hidrólisis de las proteínas de pastas de soya utilizando la digestión <u>in vitro</u> 1 (pepsina-pancreatina)	64
5.15	Porcentaje de hidrólisis de las proteínas de harinas de pescado utilizando la digestión <u>in vitro</u> 1 (pepsina-pancreatina)	65
5.16	Valores de digestibilidad total de aminoácidos utilizando la metodología <u>in vivo</u> y la digestibilidad <u>in vitro</u> 2	68
5.17	Comparación de diferentes métodos para determinar lisina disponible como porcentaje del contenido total del ingrediente	71

INDICE DE GRAFICAS

Grafica No.		Página
5.1	Lisina disponible (%) liberada durante la incubación con pancreatina a diferentes tiempos en PS-1 y HP-1	i
5.2	Nitrógeno liberado (%) durante la incubación con pepsina a diferentes tiempos en PS-1 v HP-1	ii
5.3	Nitrógeno liberado (%) durante la la incubación por 4 v 5 horas con pepsina para la PS-1 y HP-1 respectivamente seguida con pancreatina a diferentes tiempos	iii
5.4	Nitrogeno liberado (%) de PS-1 con diferente tratamiento térmico digerida con pepsina, precipitada con ATC con diferente periodo de reposo	iv
5.5	Nitrógeno liberado (%) durante la incubación en pasta de soya 1 con pepsina por 4 horas seguida de pancreatina a diferentes tiempos	v
....5.6	Nitrógeno liberado (%) durante la incubación en harina de pescado 1 con pepsina a diferentes tiempos seguida por 21 horas con pancreatina	vi

INTRODUCCION

La producción de proteína de origen animal para consumo humano a un menor costo se ha convertido en un reto para los nutriólogos, ya que el alimento representa entre el 60 y el 80% de los costos de producción de carne o huevo, por lo tanto, muchas técnicas se han implementado con el fin de poder conocer mejor las necesidades del animal y el aporte exacto en nutrimentos que un ingrediente puede ofrecer con el fin de obtener una mayor producción.

Sin embargo, esta tarea no ha sido fácil, pues la mayoría de las técnicas tienen sus propias limitaciones y cada día se trabaja más en el perfeccionamiento y generación de nuevos métodos.

Los investigadores dedicados a la avicultura, han enfocado sus trabajos a conocer, entre otros, la cantidad de aminoácidos (AA) disponibles en los ingredientes para los fines de mantenimiento, crecimiento y producción. Para este fin se han desarrollado métodos in vivo y, simulando a través de pruebas en el laboratorio el comportamiento fisiológico del animal, pruebas in vitro.

Con las técnicas in vivo, hay la necesidad de atender animales lo que resulta en una práctica lenta de realizar y más costosa que la implantación de técnicas in vitro, que son relativamente rápidas y sin los costos que implicaría el mantener animales.

Actualmente existen pocos estudios que hayan estimado una correlación alta entre los métodos enzimáticos in vitro que miden la biodisponibilidad de los AA en los alimentos y aquellos in vivo obtenidas con pollos en crecimiento o gallos adultos.

El encontrar correlaciones altas entre estas técnicas, permitirá elaborar en forma más rápida, con base en el conocimiento de la

disponibilidad de AA de los ingredientes. dietas más precisas y exactas logrando una disminución en los costos de producción.

Por lo anterior, en este estudio se investigó con gallos Leghorn adultos la relación entre la estimación de la biodisponibilidad de AA con un método in_vivo y, por otra parte, estudiar si existe correlación entre el método químico del fluorodinitrobenzenceno (FDNB) para determinar lisina disponible con las técnicas in_vivo e in_Vitro de lisina disponible.

II. OBJETIVOS

1. Estimar la biodisponibilidad de los AA de pastas de soya (PS) y harinas de pescado (HP) por el método in vivo de la "alimentación precisa".

1.1 Determinar el tiempo de incubación óptima de las PS y HP con soluciones de pepsina y pancreatina para lograr la hidrólisis de la proteína (técnica in vitro 1).

1.2 Estudiar si existe correlación entre los resultados de las técnicas in vivo e in vitro 1.

1.3 Estimar la correlación entre la disponibilidad de los AA por el método biológico y la obtenida por el método multienzimático (prueba in vitro 2.)

2 Comparar los resultados obtenidos en las técnicas in vivo e in vitro con los niveles de lisina disponible en la prueba del FDNB.

III. REVISION DE LITERATURA

La Avicultura es una de las empresas pecuarias que requiere una muy alta inversión inicial, debido a los altos costos de infraestructura necesarios para una buena producción; una vez instalada ésta, el mayor costo lo asume el alimento que se les proporciona, pues por su caracter de intensivo, demanda necesidades especiales tal como el suministro de alimentos balanceados.

Son muchos los ingredientes utilizados en la alimentación de aves, y debido a las propiedades particulares de cada uno, han sido clasificados en varios grupos, entre ellos especialmente encontramos los proteicos, energéticos, vitaminas, minerales y aditivos.

Las fuentes proteicas son llamadas así porque aportan en su composición un mayor porcentaje de aminoácidos (AA); las más utilizadas en la formulación de dietas para aves, son de origen animal y vegetal. Tienen como función esencial el aporte de los AA que los animales no pueden sintetizar y que en forma conjunta con los AA no esenciales ayudan a la formación, mantenimiento y desarrollo de tejidos en el hombre y los animales. Conocida la importancia de las proteínas, hace muchos años se investigó más a fondo su composición y fue así como se inició su descubrimiento, con el conocimiento que estaban formadas por cadenas de AA de diferente peso molecular; emprendiéndose de esta forma en 1806 el aislamiento del AA asparagina; aunque la historia hoy todavía no se ha concluido, se conoce que aproximadamente 20 AA son los que regularmente se encuentran en las proteínas y varían dentro de éstas en sus concentraciones (Lehninger, 1978). Algunos factores

contribuyen a estas modificaciones: por ejemplo, en granos las variaciones entre especies (McNab y Shanon, 1974) y dentro de éstas en genotipos (Salmon y Dunkelgod, 1974); la fertilidad del suelo (Rhodes y Mathers, 1974), diferentes fracciones de la planta (Rhodes y Gill, 1980) y en pastas de oleaginosas el proceso industrial aplicado para su obtención también contribuye a estos cambios.

En los ingredientes de origen animal mucha de la variación de la composición de AA, esta asociada con el tejido que contiene el ingrediente, por ejemplo, la harina de plumas y subproductos de aves son diferentes a la harina de carne o de sangre en las aves como también el proceso industrial aplicado (Sibbald, 1987).

La concentración de AA totales en alimentos para pollos, no suministra información necesaria acerca de los AA biológicamente disponibles para mantenimiento, ganancia de peso y producción (Coon, 1981).

BIODISPONIBILIDAD

La biodisponibilidad o disponibilidad biológica, es un concepto abstracto el cual puede ser definido pero no medido. Un nutriente es biodisponible si al entrar al tejido vivo, puede ser usado para las funciones metabólicas normales (Sibbald, 1987), mantenimiento, crecimiento y producción (Engster, 1986). Los nutrientes pueden entrar al tejido por otras rutas diferentes a la oral por ejemplo mediante infusión o vía intravenosa (Sibbald, 1987).

La absorción de una molécula del lumen del intestino, es prerequisite pero no una prueba de biodisponibilidad, ciertas

proteínas son absorbidas y luego excretadas por la orina (Bjarnason y Carpenter, 1969).

Idealmente, la biodisponibilidad de un nutriente debe ser característica del alimento e independiente del animal el cual se alimenta; sin embargo, en la práctica existe interacción animal por alimento, como ejemplo tenemos la gustocidad. También existe mucha variación de nutrientes biodisponibles causada especialmente por la actividad microbiana en el lumen del intestino (Sibbald, 1987).

Para propósitos prácticos es conveniente tener en cuenta algunos conceptos, como digestibilidad aparente de AA (DAAA), que es la diferencia entre el contenido de AA en la dieta y el contenido de AA en las heces o digesta ileal, dividido por la cantidad de AA consumidos en la dieta. La digestibilidad verdadera de AA (DVAA), es similar a la DAAA, excepto que las cantidades de AA endógenos han sido sustraídas de la cantidad total de AA de las heces o digesta ileal (Engster, 1986).

Absorción, es definida como el grado en el cual los AA son pasados a través de la pared intestinal. Disponibilidad como el grado en el cual los AA están presentes en forma adecuada para absorción, digestión y procesos metabólicos (Papadopolaus, 1985).

ALGUNOS FACTORES QUE AFECTAN LOS AA DISPONIBLES EN ALIMENTOS PARA POLLOS.

La concentración total y disponible de AA en los alimentos puede ser alterada por:

a) Los tratamientos con calor durante su procesamiento, que inactivan compuestos naturales, aunque no tóxicos, y que causan respuestas fisiológicas adversas en los animales (Liener, 1981).

Para el procesado es importante tener en cuenta la temperatura y el tiempo de exposición, pues son factores críticos que pueden ejercer efectos benéficos o detrimentales sobre los valores nutritivos del ingrediente (Sibbald, 1987). Entre los efectos benéficos están la eliminación de las bacterias como Salmonella, los inhibidores de proteasas (tripsina y quimotripsina) son desnaturalizados, algunos enlaces estructurales de las proteínas pueden ser alterados lo que aumenta su digestibilidad (Coon, 1981) y también elimina algunos otros factores como las fitohemaglutininas, antivitaminas y fitatos (Liener, 1981).

Como desventajas tenemos el sobrecalentamiento, que acelera la formación de enlaces químicos entre grupos aminos libres de las proteínas y grupos reductores de los carbohidratos; se incrementan los grupos carboxilos de las grasas oxidadas y proteínas. El grupo epsilon amino de la lisina, es el principal sitio de enlace para interactuar con azúcares reductores durante el calentamiento. Estos nuevos enlaces interfieren con su digestión proteolítica en el intestino delgado y también disminuyen la absorción de los AA (Carpenter, 1973), especialmente la disponibilidad de lisina, arginina e histidina es afectada (Sibbald, 1980).

Los tipos de compuestos que interfieren, y que son producidos durante el sobrecalentamiento de la proteína, varían dependiendo de la fuente del alimento ya sea animal o vegetal (Coon, 1981).

b) Los taninos: disminuyen la digestibilidad de las proteínas hasta un 10% según, ensayos hechos por Coon (1981), quien al adicionar taninos comerciales a una dieta que contenía sorgo bajo en taninos; observó una disminución en la digestibilidad de las proteínas

probablemente por el aumento en la pérdida endógena de proteínas del intestino y la formación del complejo tanino-proteína.

c) Las proteínas de pobre calidad no son aprovechadas en su totalidad según Soares et al. (1971), en un experimento realizado con harina de arenque de pobre calidad, los pollos excretaron más AA que aquellos alimentados con proteínas de buena calidad.

METODOS PARA MEDIR AMINOACIDOS DISPONIBLES EN AVES

Los requerimientos de AA, más que de proteína total, son la primera consideración de los nutriólogos en la formulación de raciones para aves; muchas publicaciones indican el contenido individual de AA de los ingredientes que han sido obtenidos por métodos de análisis químico. Sin embargo, estas determinaciones tienen valor limitado, por que no todos los AA presentes en la proteína son disponibles para el animal (Papadopoulos, 1985).

Varios métodos clasificados como in vivo o in vitro han sido sugeridos para evaluar la calidad de la proteína en el alimento. Sin embargo, existe escasa información sobre cuales métodos son más válidos. (Papadopoulos, 1985). En el presente trabajo se tomó en cuenta la clasificación realizada por el anterior autor.

Entre éstos los más utilizados en aves se encuentran:

DISPONIBILIDAD IN VIVO

1. PRUEBAS DE CRECIMIENTO EN POLLOS

Se ha utilizado esta prueba, con el objeto de investigar la eficiencia verdadera con la que un AA es utilizado e incorporado dentro de la proteína corporal o metabolizado para otros usos en el cuerpo. Las pruebas de crecimiento en pollos son un método usado comunmente para averiguar los coeficientes de disponibilidad de AA

específicos (Engster, 1986) en una proteína de la dieta (Papadopoulos, 1985); también es definido por Larbier (1985) como la habilidad de una proteína conocida en su composición de AA, para reemplazar un AA esencial de un alimento de la dieta.

Según Sibbald (1987), las pruebas de crecimiento básicas para determinar el nivel de un AA esencial comprenden varios pasos:

a. Una dieta basal deficiente en el AA de interés es suplementada con uno o más niveles de ese AA; se ofrecen a los animales, con el fin de establecer una relación entre la respuesta y el nivel del AA.

b. Simultáneamente la misma dieta basal es suplementada con uno o más niveles del ingrediente a ser probado, para comparar animales bajo las mismas condiciones.

c. El comportamiento en crecimiento, es comparado y se calcula la respuesta de los AA relacionados con la concentración de AA disponibles en el ingrediente probado.

Algunos criterios de respuesta incluyen; ganancia de peso corporal, ganancia:alimento, alimento:ganancia y retención de nitrógeno. Las variables independientes usadas para establecer una respuesta, incluyen concentración de AA en la dieta y consumo del AA (Sibbald, 1987). En pruebas de crecimiento en pollós la, respuesta medida no depende solamente de la disponibilidad de AA en la dieta, se deben considerar algunos factores como el porcentaje de consumo de alimento, el valor de la proteína de la dieta, la interacción entre los AA (Papadopoulos, 1985), las proteínas y los AA libres que puedan dar respuestas diferentes (Sibbald, 1987).

Esta prueba de crecimiento presenta varias limitantes, entre ellas se pueden citar; únicamente determina la disponibilidad de sólo un AA a un mismo tiempo (Coon, 1981; Bryden et al. 1988; Engster, 1986; Sibbald, 1987); los pollos son alimentados por un periodo de 2 a 3 semanas antes de que la disponibilidad pueda ser determinada; el costo de las dietas a ensayar, las dietas son semipurificadas, poco prácticas y con frecuencia la adición del alimento a ensayar crea un imbalance de AA; la respuesta da un crecimiento negativo con ciertos alimentos, resultante de un componente en el alimento que inhibe el crecimiento, y no como respuesta a un bajo nivel del AA disponible (Coon, 1981); existe variación entre animales y puede ser grande; por lo tanto se requiere varias réplicas para obtener un nivel satisfactorio de precisión; los datos tienen valores limitados, cuando forman las bases de extrapolación a otras muestras del mismo alimento o a muestras similares alimentando diferentes tipos de animales. Desafortunadamente esta prueba no es suficiente para conocer la biodisponibilidad de todos los AA y no es una prueba rápida, simple, y aditiva que produzca datos reproducibles, exactos y precisos (Sibbald, 1987).

2. AMINOACIDOS EN PLASMA

Debido a que una de las funciones de la sangre es transportar los productos de la digestión, muchos investigadores han desarrollado métodos para medir la disponibilidad de AA en un ingrediente proteico midiendo los AA libres en plasma (Papadopoulos, 1985).

Zimmerman y Scott (1965) informaron que existe una relación definida entre los niveles de los AA en plasma de pollos y el suministro de AA en la dieta; el primer AA limitante en un

ingrediente permanece en un nivel sanguíneo muy bajo después de ser ingerido; también demostraron que la presencia de un AA en la dieta requerido en exceso para la mayor ganancia de peso, resulta en una máxima acumulación de este AA en el plasma.

El empleo de AA libres en plasma para evaluar la concentración de éstos en alimentos, parece lógico aunque se reconoce que bajo ciertas condiciones los AA varían en su absorción (Sibbald, 1987), con el tiempo de consumo, sitio de la circulación sanguínea donde se toma la muestra, composición de AA de la proteína de la dieta, porcentaje de liberación de AA libres de la proteína digerida, porcentaje de absorción del tracto intestinal, metabolismo de los AA por el tejido intestinal y la incorporación de AA al plasma y a la síntesis de proteína tisular; todo esto afecta la respuesta de los animales en el ensayo (Papadopoulos, 1985), sin olvidar que el hígado altera el patrón de AA del ingrediente o dieta (Porter y Rolls, 1973).

Aunque la composición de AA es similar, la cantidad total de estos producidos en el intestino, es algunas veces mayor que la cantidad de proteínas ingeridas indicando una considerable degradación de proteínas endógenas en el intestino (Elwyn, 1968).

Sin embargo, la información sugiere que la prueba de los AA libres en plasma no es conveniente para realizar cuantitativamente estimaciones de AA biodisponibles en alimentos. Quizás su mayor aplicación sea estimar la eficiencia relativa de isómeros de AA y análogos (Sibbald, 1987).

DIGESTIBILIDAD IN_VIVO DE AA

Se han realizado muchos trabajos en aves con el objeto de implementar nuevas técnicas:

1. METODOS DE BALANCE.

El principio de estos métodos es medir la diferencia entre lo consumido y lo excretado por las aves, del ingrediente a ensayar. Esta diferencia puede ser un estimado del balance pero no es indicador satisfactorio de biodisponibilidad, pues, es necesario tener presente que las heces están compuestas por: una fracción derivada directamente del ingrediente a ensayar; una fracción metabólica que contiene células de descamación de la pared del intestino, moco, bilis y jugos digestivos y, una fracción que contiene células microbianas y detritus microbiano (Sibbald, 1987); como también la contribución de AA presentes en la orina que aportan al total de las excretas una pequeña cantidad que usualmente tienen un efecto mínimo sobre valores calculados de digestibilidad (Parsons, 1986). En este método, la medición de la fracción metabólica y la fracción microbiana ha dificultado obtener datos exactos.

1.1 INGREDIENTE A ENSAYAR

Cuando el ingrediente a ensayar ha sido seleccionado es necesario decidir como se va a ofrecer a los animales; existen varias opciones a considerar:

- a. sólo o único ingrediente
- b. como parte de una mezcla de varios ingredientes
- c. combinado con una dieta basal: ésta debe ser baja en el contenido de AA e ignorar dicho aporte.

d. una mezcla libre de AA como un suplemento constante para varios materiales a ensayar, este suplemento no es analizado

e. adicionar al material a ensayar en una dieta libre de AA semipurificada

En cualquiera de los casos, en el alimento se pueden utilizar marcadores como la homoarginina (Bryden et al. 1988); se puede dar seco o mezclado con agua.

Los ingredientes pueden ser presentados a los animales molidos, lo cual es una práctica común y contribuye a la homogenización del material, sin embargo cuando el tamaño de la partícula disminuye, la gustocidad y facilidad de recuperación pueden disminuir; o pastillado para mejorar su sabor, además tiene como beneficio que no permite la separación de sus componentes evitando de esta forma la selección cuando el consumo es voluntario (Sibbald, 1987). Cuando las aves consumen voluntariamente, tienden a desperdiciar alimento que debe ser recuperado si el balance está basado en la colección total de excretas; aún cuando se hayan usado marcadores, se presentan problemas si se mezcla alimento con las excretas. El almacenamiento del alimento y la ingestión selectiva pueden ser un problema especialmente si el material a ensayar está en harina (Sibbald, 1987).

La ingestión del alimento puede ser forzada, según la técnica implementada para determinar energía metabolizable por Sibbald (1976) y empleada por Likuski y Dorell (1978) para determinar la digestibilidad verdadera de AA, el material es colocado directamente dentro del buche en gallos adultos con ayuno previo de 24 horas. Esta técnica evita problemas asociados con baja

gustocidad, no hay desperdicio de alimento, es de corta duración, no se presenta selección del alimento por parte del ave y asegura la cantidad del ingrediente dado, que asciende hasta 50 g; pues concentraciones mayores como 90 g pueden causar impactación del buche y también aumentar el periodo de recolección de excretas (Sibbald y Morse 1982).

En esta técnica se debe medir el porcentaje de materia seca del ingrediente, pues, se pueden presentar variaciones que contribuyen significativamente a errores dentro del experimento si no es medido (Sibbald, 1986); sin embargo, la digestibilidad es mayor al dar el alimento bajo consumo voluntario que cuando los gallos son alimentados forzosamente (Picard y Uzu, citados por Larbier, 1985).

La práctica más utilizada, ha sido la de ofrecer el alimento forzosamente (Likuski y Dorell, 1978; Parsons *et al.* 1982 y 1983; Sibbald, 1979ab, 1981; Sibbald y Morse 1982; Sibbald y Wolynetz 1986).

Para medir la DVAA, es necesario utilizar gallos control a los cuales no se les administre alimento con el fin de medir la cantidad de secreciones endógenas y la actividad de la microflora bacteriana.

1.2 IMPORTANCIA DE LA FRACCION MICROBIANA Y METABOLICA EN MEDICIONES DE DIGESTIBILIDAD.

La importancia de la microflora en el tracto intestinal en aves con relación a digestión y absorción ha causado mucha controversia (Sibbald y Morse, 1982; Parsons *et al.* 1982); pues, generalmente se ha considerado tiene un efecto pequeño o no significativo por que

el porcentaje de pasaje de digesta es relativamente rápido y la capacidad del área del intestino grueso es pequeña, comparada con la de otros animales (Bryden et al. 1988). Sin embargo aunque se pueden encontrar microorganismos a través de todo el aparato digestivo, la mayor concentración se localiza en la porción distal del ileum y una parte muy importante en el ciego. Este toma la forma de dos sacos cerrados y es posible que mucho del residuo del alimento pase por ellos. En un trabajo realizado por Isshiki y Nakahiro en 1975 (citado por Sibbald, 1987), se sugiere que en aves adultas la proporción de heces que pasa por el ciego es pequeña. Hay que tener en cuenta que la microflora intestinal utiliza como sustrato secreciones digestivas e ingredientes no absorbidos, células de descamación de la pared del intestino, células microbianas, detritus y orina; algunos de estos compuestos son tomados o degradados por los microorganismos, para síntesis de proteína bacteriana alterando el patrón de AA consumidos en la dieta. Se han llevado a cabo varios procedimientos para evitar la participación de la microflora intestinal y poder conocer el verdadero porcentaje absorbido por el ave; entre ellos se encuentran:

a. El uso de animales libres de gérmenes o aves axénicas. En estudios comparativos con estas aves y aves convencionales se encontró que estas últimas pueden tener una disminución en la capacidad de absorción en el intestino. Es reconocido que la deaminación y proteólisis microbiana se efectúa en aves convencionales y todo el amonio liberado no está presente en la excreta, parece que los componentes nitrogenados en las heces por

aves libres de gérmenes son verdaderamente más representativos que residuos de digestión proteica (Salter y Coates, 1971) además, es difícil utilizar aves axénicas en forma rutinaria en el laboratorio debido a la dificultad de obtenerlas. (Parsons, 1986).

b. Consumo de antimicrobianos. La adición de antibióticos a la dieta mejora la absorción de nitrógeno y AAs en el intestino delgado y disminuye la actividad microbiana en el intestino grueso, o sea menor síntesis de proteína bacteriana (Larbier, 1985). Desafortunadamente no hay evidencia que los antimicrobianos reduzcan la actividad de la microflora intestinal a un nivel estándar y constante (Sibbald, 1987).

c. Intervenciones quirúrgicas: más adelante se mencionarán en los métodos de colección de excretas.

Parece que la microflora intestinal, tiene solamente un pequeño efecto sobre los productos de digestión de las proteínas en la parte alta del tracto alimenticio, pero tiene una mayor influencia en la parte baja del intestino y excreta. Aún cuando parte de la proteína de la dieta sea de pobre calidad, no hay evidencia que la acción microbial mejore la disponibilidad para el ave. Es probable que algo del amonio liberado por acción microbial es absorbido y sea utilizado por el ave para síntesis de AA no esenciales, tal efecto, si existe, no podría ser detectado con una buena dieta pero puede favorecer un consumo bajo de proteína, aún cuando se piensa que los productos de acción microbial pueden ser de poca consecuencia para el huésped, esto es importante en las pruebas biológicas donde la proporción de nitrógeno dietético es aparentemente retenido en la prueba (ej. diferencia entre lo

consumido y excretado) y usado para medir el valor nutritivo de la proteína (Salter y Coates, 1971). En un experimento realizado por Parsons et al. (1981) aislaron células microbiales a través de centrifugaciones realizadas con contenido fecal; observando que los AA que más se encuentran presentes son ácido aspártico, alanina y ácido glutámico; los AA menos abundantes tirosina, metionina, histidina y cistina. La proteína microbiana en general contiene significativamente más alanina y menos prolina y serina que las muestras de excreta endógena

Es de notar según Just (1983) que la composición de la digesta depende de la composición de la dieta del alimento consumido; la microflora es muy estable y esta influenciada solo por la composición de la dieta en donde el ayuno, la sobrealimentación y la administración de antibióticos puede causar disturbios en este balance microbial.

Parsons et al. (1982) buscando la importancia de la dieta sobre la microflora bacteriana, utilizaron varias fuentes proteicas como caseína, harina de plumas y gelatina; solas o como componentes de la ración en un 30%. Encontraron que la proteína de la dieta tiene un efecto sustancial sobre la composición de AA de la excreta en pollos; sugiriendo que cantidades significantes de AA dietéticos no digeridos se encuentran en el ciego y luego son metabolizados por la microflora del ciego. Según Parsons (1985) la proteólisis y deaminación de AA, ambos fueron primariamente el modo de metabolismo microbial.

Parsons et al. (1983) en sus investigaciones midieron la excreción de AA en gallos adultos alimentados con dietas libres de

nitrógeno y previo ayuno de 24 horas, para facilitar la limpieza del tracto digestivo, en varios tratamientos: 1. una dieta alta en fibra con gallos intactos 2. una dieta baja en fibra con gallos intactos 3. una dieta baja en fibra con gallos colectomizados (abocar el colon al abdomen) y cecotomizados (resección de ciegos) y 4. gallos a los que no se les dió ningún tipo de alimento.

En el primer tratamiento se observó la excreción aumentada de glucosamina y galactosamina; estas hexosaminas son componentes principales de mucinas de células intestinales y mucoproteínas, esto fue debido probablemente al aumento en el porcentaje de pasaje y en las células de descamación de la luz intestinal por la fibra; los niveles de alanina y ácido aspártico fueron mayores y el nivel de prolina menor que los encontrados en la digesta de los gallos modificados quirúrgicamente. La alanina y el ácido aspártico son los AA más abundantes en células microbiales de excretas de pollos, y la prolina es un AA abundante en la mucina intestinal y otras proteínas endógenas; éstas observaciones sugieren que una proporción sustancial de AA excretados por gallos alimentados con una dieta alta en fibra, fue asociada con residuos bacterianos. Sin embargo, la excreción de hexosaminas por los gallos modificados quirúrgicamente, fue dos veces mayor que la de los gallos intactos alimentados con la misma dieta, baja en fibra, y fue 10% más alta que los gallos intactos alimentados con una dieta alta en fibra, indicando una degradación sustancial de hexosaminas endógenas por la microflora intestinal en la parte más baja del intestino en aves.

Comparando el segundo, tercero y cuarto tratamientos la composición de AA en la excreta fue similar sugiriendo poca influencia microbiana sobre la excreción de AA; este resultado fue debido quizás a la escasez de carbohidratos fermentables en la parte baja del intestino. Además, altos niveles de glicina, serina, prolina y treonina y bajos niveles de alanina, ácido aspártico y glicina fueron observados en la digesta de los gallos modificados quirúrgicamente.

Sibbald (1980) encontró que la cantidad de AA valina, alanina, leucina, isoleucina excretada por gallos intactos alimentados con una dieta baja en fibra fue mayor a la de los gallos en ayuno. Raharjo y Farrell (1984) demostraron también, que la fibra modifica la excreción de AA.

Parsons (1985) demostró que 12 horas después de dar el alimento a los gallos, los AA presentes en el ciego son de origen dietético y a las 48 horas son de origen microbial.

1.3 COLECCION DE EXCRETAS

Debido a la acción de la microflora intestinal y a la unión común al excretar heces y orina en aves, se han utilizado varios métodos de colección de excretas con el fin de evitar la participación de los microorganismos intestinales y la fracción de la orina. El tiempo de colección de excretas varía de 24 a 48 horas de acuerdo al contenido de fibra y a la naturaleza de las proteínas (Larbier, 1985).

Entre los diferentes sistemas de colección de excretas se encuentran:

1.3.1. UTILIZACION DE AVES INTACTAS O CONVENCIONALES

La prueba de digestibilidad de AA utilizando colección total en aves intactas ha sido usada inicialmente por Sibbald (1976) para medir Energía Metabolizable Verdadera (EMV), usando aves en ayuno como control, y por Likuski y Dorrell (1978), quienes modificaron el tiempo de colección de 24 a 48 horas.

El método es simple, rápido, de bajo costo y la digestibilidad de todos los AA puede ser medida a un mismo tiempo (Engster, 1986); además, parece ser más práctico que otros métodos para análisis de rutina. La exactitud de este método ha sido investigada con el objeto de vencer algunas críticas asociadas con la cantidad de AA excretados que es afectada por la composición de la dieta y la duración cuantitativa de la colección de excretas. Esta técnica asume que las pérdidas de AA metabólicas urinarias de origen endógeno en aves alimentadas, son similares a las aves en ayuno, sin embargo falta información al respecto (Papadopoulos, 1985).

En trabajos realizados por Parsons et al. (1983) encontraron que la composición de AA endógenos es afectada por una dieta libre de nitrógeno y Papadopoulos (1985) asume que esta relacionado con la cantidad de materia seca consumida y no por la presencia de proteína en el alimento.

Engster et al. (1985) en un estudio realizado utilizando colección total de excretas en aves intactas, encontraron que la variación en este método fue debido más a resultados de laboratorio al analizar los AA que al método en sí.

Teniendo en cuenta sus ventajas, está creciendo el uso de este método debido a la facilidad de la técnica y a sus resultados prometedores e interesantes (Papadopoulcs, 1985).

1.3.2. POLLOS COLOSTOMIZADOS

Es una intervención quirúrgica, en donde se forma un ano artificial por aberturas del colon a la superficie del cuerpo; presenta como ventaja la determinación relativa de los constituyentes de orina y heces por separado y algunos inconvenientes fisiológicos como la reducción en la reabsorción de agua, modificaciones en la reabsorción de nutrientes en particular AA (Larbier, 1985) y una mayor atención a las aves para prevenir éstasis del contenido intestinal influyendo en la cantidad de materia seca excretada (Bragg et al. 1969).

1.3.3 POLLOS CECOSTOMIZADOS

Es una intervención quirúrgica donde se efectúa resección de ciegos, con el objeto de vencer la contribución de AA de la fracción microbiana de los ciegos al total de excretas. La diferencia entre aves cecostomizadas (CEC) y aves convencionales (CONV) se atribuye a la deaminación y proteólisis en la parte más baja del intestino (Engster, 1986).

En gallos CEC el tiempo de recolección de excretas es menor (30 horas) comparada con gallos CONV (48 horas) utilizando como alimento harina de pescado (Kessler y Thomas, 1981).

Utilizando una fuente proteica (Harina de carne), Parsons (1985) demostró que el metabolismo en los ciegos, es el responsable de las diferencias entre gallos CEC y gallos CONV dando una mayor digestibilidad los gallos CONV; demostrando que la influencia de

Los ciegos sobre los AA y la excreción de energía al utilizar aves CONV puede resultar en una sobreestimación de los AA disponibles; aunque, trabajos realizados por otros autores como Hirakawa y Baker, citado por Engster (1986) han encontrado estar de acuerdo entre los estimados de digestibilidad hecha con aves CONV y CEC.

Al determinar Parson (1985) la DVAA para aves CEC, observó que los valores usados para las pruebas de crecimiento estuvieron más de acuerdo con dichos valores que los usados con aves CONV; en donde se encontró que estos valores eran más altos que los de las pruebas de crecimiento; asumiendo, que la prueba de crecimiento es exacta, los valores de los gallos CONV sobreestiman los valores de AA y por otro lado los valores de gallos CEC y gallos CONV estuvieron altamente correlacionados ($r = 0.83$ $P < .01$); sugiriendo ésto que gallos CEC pueden ser usados para desarrollar factores de corrección con gallos CONV

También influye en la digestibilidad, la forma de dar el ingrediente; en un experimento realizado por Larbier (citados por Larbier, 1985) se determinó la digestibilidad de proteína en dietas con soya de diferente eficiencia nutricional, usando dos métodos de alimentación (voluntario y forzado) en gallos CONV y CEC. En la soya de mayor digestibilidad, encontraron que la DVAA fue siempre más alta que la DAAA y la digestibilidad fue mayor en gallos alimentados voluntariamente que la observada en gallos con consumo forzado. Las diferencias fueron menores para DVAA que DAAA.

Utilizando fuentes energéticas Green et al, (1987) encontraron que se presentaban diferencias significativas al medir DVAA entre gallos CONV y gallos CEC.

Según Engster (1986) la cecotomía puede tener mérito en medir digestibilidad de AA en forma más exacta para proteínas de pobre calidad o proteínas tratadas por calor.

1.3.4. METODOS DE COLECCION ILEAL

Algunos investigadores han tratado de explicar la contribución de la microflora intestinal sobre la digestibilidad de AA por medio de la colección de digesta en el ileum de pollos (Engster, 1986).

En un experimento realizado por Raharjo y Farrell (1984) tomaron muestras del ileum, porción terminal del ileum, después del ciego y porción terminal del recto; encontraron que las muestras de digesta de varias fuentes de proteína, deben ser tomadas de la porción terminal del ileum si se quieren obtener estimados confiables de digestibilidad de AA. En la mayoría de los casos, los valores de digestibilidad aparente fueron sustancialmente más altos que los obtenidos en el sitio posterior. En la parte terminal del ileum para la recolección de excretas utilizaron una canula simple en forma de T insertada a ese nivel.

Según Papadopoulos (1985); aunque esta técnica suministra algunas ventajas teóricas como nueva investigación, es difícil usarla en aplicaciones prácticas debido al posible rechazo al tipo de canula, al flujo deficiente del material a probar a través de la canula y el uso de un marcador apropiado.

La comparación entre gallos CEC y gallos con canula ileal para determinar si existe una diferencia significativa en estimaciones

de digestibilidad de AA, parece ser que cualquiera de estos métodos puede ser más exacto en términos de medir digestibilidad de AA en proteínas de pobre calidad o dañadas por el calor (Engster, 1986).

DISPONIBILIDAD IN_VITRO

1. METODOS QUIMICOS.

La deficiencia de lisina en la dieta, limita el crecimiento de animales. En general, lisina es limitante no solo por que cantidades relativamente pequeñas en los alimentos son incorporadas dentro de la proteína durante la biosíntesis, si no también, por cambios químicos secundarios debido a factores tales como luz, calor, álcali y azúcares reductores, que rinden lisina nutricionalmente indisponible (Holguín y Nakai, 1980).

Durante el procesamiento con calor aplicado, en la fabricación de harinas de carne y de pescado, el exceso reduce la calidad de la proteína por inducir pérdidas especialmente de lisina. Un calor moderado es generalmente necesario para mejorar la calidad nutricional de las harinas de semillas de oleaginosas, tal como la soya, para destruir enzimas o inhibidores de crecimiento, pero una temperatura muy alta es usualmente dañina (Roach et al. 1967).

El concepto de "disponible" como distintivo de los AA totales presentes en la proteína, es usado para diferenciar entre AA alterados por algún método durante la desnaturalización, con la consecuente pérdida del valor nutritivo, esto resulta importante ya que el conocer que los AA son disponibles nutricionalmente es una medida de su utilidad para procesos metabólicos.

La lisina es nutricionalmente disponible, cuando el grupo E (epsilon)-amino esta libre; si este es bloqueado por uniones

químicas, el segmento de proteína cercano al residuo de la lisina afectada no es digerido. Debido a la importancia de la lisina en la nutrición, al potencial de la proteína dañada y a la formación de uniones durante el procesamiento, varios métodos, han sido propuestos para estimar químicamente la lisina disponible.

El método que con más frecuencia es usado en el laboratorio es el de Carpenter (1960), el cual está basado en la medición del grupo E-amino por reacción con el 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (FDNB) en proteínas (Papadopoulos, 1985). El FDNB reacciona con el grupo E-amino libre de lisina, y después de una hidrólisis ácida, es liberado como Dinitrofenil lisina (DNPL) (Sibbald, 1987), los productos de la hidrólisis son extraídos con éter para remover el exceso de reactivo; el DNPL es medido colorimétricamente. Se asume implícitamente que el residuo de lisina, el cual no tiene un grupo E-amino, es biológicamente indisponible (Finley y Friedman, 1973). Una interferencia de compuestos coloreados puede ser producida cuando la prueba de FDNB es aplicada a productos vegetales. Existe una recuperación variable de DNPL cuando se utilizan compuestos ricos en carbohidratos (Batterham *et al.* 1984); la presencia de carbohidratos durante la hidrólisis causa la producción de un compuesto café oscuro, el cual es dependiente de la cantidad de carbohidratos y puede formar un compuesto denso y negro como una "caramelización" de éstos, adhiriéndose al DNPL que consecuentemente imparte un color medible a 415 nm..

Así mismo, el FDNB está sujeto a errores, aun cuando sea aplicado a productos de origen animal, por que el DNPL es en parte destruido durante la hidrólisis ácida; se ha demostrado que el DNPL producido

de la proteína, es destruido en una cantidad menor que el adicionado como estandar interno requiriendo modificaciones (Booth, 1971). Además, la formación de un derivado de histidina coloreado, interfiere en la lectura, esto fue modificado por Carpenter (1960) al adicionar DNPL como un estandar interno, inmediatamente antes de hidrolizar y corregido para los derivados de histidina; logrando leer la absorción de la solución final a dos longitudes de onda.

Rao et al. (1963) determinaron la lisina antes y después del tratamiento de una muestra con FDNB, la diferencia entre éstas representa lisina FDNB indisponible; este método llamado Silcock o TLMI, es más específico por que incluye lisina N-terminal y lisina libre, pero excluye todos los otros AA. Los carbohidratos no afectan los resultados, pero aparatos muy complejos son necesarios para la determinación, las columnas de cromatografía son difíciles de mantener y sus intervalos de operación requieren atención continua. El Silcock requiere lisina total y un estandar para ser corregido. El método de FDNB es más simple y barato. Se han hecho investigaciones para aplicar este método modificado a alimentos vegetales que contienen carbohidratos y la recuperación de DNPL ha sido más baja (60-85%) (Booth, 1971).

Otras pruebas químicas se han hecho para estimar lisina disponible. Kakade y Liener (1969) usaron el ácido 2,4,6-Trinitrobenceno sulfónico (TNBS) basados en el mismo principio que el del FDNB; se recupera cuantitativamente el E-Trinitrofenil-lisina (TNPL) en las proteínas sometidas a hidrólisis ácida (Sibbald, 1987). Este método cita que solamente una hora es necesaria para el análisis de

lisina en contraste con las 16 horas con FDNB (Hall y Henderson (1979).

Eklund (1976) examinó las condiciones de hidrolizado y encontró que a una temperatura de 110 C con HCl al 7.2 N por 90 minutos, se obtienen las mayores producciones de lisina; y también que utilizando 30 mg y no 10 mg como la técnica original, resulta en menor grado de variación en repetibilidad entre análisis del mismo material, esto es más bajo comparado con la variabilidad obtenida por el método de Kakade y Liener (1969).

Parece que el TNBS reacciona con compuestos de Maillard, que contienen lisina no disponible, lisina libre y algunas hexosaminas, por lo tanto, el procedimiento del TNBS en teoría podría indicar mayores valores de lisina que el método de FDNB (Nordheim y Coon, 1984). El TNBS produce más baja repetibilidad comparado con el FDNB y la digestión enzimática por pepsina más pancreatina (Holguin y Nakai 1980).

Hall y Henderson (1979) describen una modificación en el procedimiento estandar para la determinación de lisina disponible con TNBS, el cual remueve la mayoría de las dificultades con muestras de carbohidratos. Este consiste esencialmente en una clorinación para blanquear los productos que interfieren; al mismo tiempo, cambia la estructura química de los productos del TNP para hacer la aplicación del método más específico para lisina, y más versátil para una amplia variedad de muestras. Así mismo, han demostrado que varias aminas, tales como agmatina, espermina, espermidina, taurina, ornitina, hidroxilisina, galactosamina y glucosamina, reaccionan con TNBS y FDNB, midiéndose como lisina.

Durante este trabajo, fue observado que adicionalmente el hipoclorito cambia las propiedades físicas de los compuestos E-TNP-amino, formado de reactivos sintéticos y de muestras de plantas y animales; así el TNPL y algunos de los derivados del TNP, ya mencionados, favorecen la solubilidad en dietileter; TNP-agmantina y TNP-aurina permanecen en la fase acuosa, mientras que TNP-galactosamina y TNP-glucosamina fueron convertidos en productos menos coloreados. El tratamiento con hipoclorito puede hacer una diferenciación más exacta de lisina disponible en presencia de estas interferencias, especialmente en el análisis de harinas de pescado que contienen cantidades variables y significativas de taurina.

Finley y Friedman (1973) compararon FDNB, TNBS y un nuevo método basado en la alquilación del grupo E-amino-lisina por metil acrilato. En este estudio se trató caseína y gluten en presencia de grandes cantidades de carbohidratos reductores a tiempos de 0, 30 y 60 minutos a 205 C; como se esperaba, la lisina disponible disminuyó rápidamente cuando se aumentó el tiempo de tratamiento al calor y el total de lisina disminuyó mucho más lentamente. En resumen, esta nueva técnica parece ser representativa para estimar lisina disponible; por ejemplo en alimentos ricos en carbohidratos especialmente después del proceso por calor, teniendo un potencial para determinar lisina total y disponible en un alimento.

CORRELACION ENTRE METODOS IN VIVO E IN VITRO

Muchas comparaciones entre diferentes métodos químicos, han sido realizadas por diferentes investigadores con respecto a pruebas biológicas para determinar si existe una alta correlación entre

dichos ensayos y poder usar un método rápido, de menor costo y que ofrezca datos precisos.

Batterham et al. (1986) utilizaron harinas de carne y hueso sometidas a diferentes temperaturas y presiones, midiendo lisina disponible con: FDNB, colorante naranja ácido y evaluando la respuesta en pollos, cerdos y ratas con pruebas de crecimiento; encontrando que la presión y la temperatura tienen efectos considerables. Las especies animales presentaron diferencias, para cerdos la presión aplicada al ingrediente reduce la digestibilidad de los AA. En general los valores de FDNB fueron aproximadamente la mitad de los obtenidos en la digestibilidad biológica para los cerdos, ratas y pollos. Por lo tanto, la técnica del FDNB fue deficiente para estimar lisina disponible. Con el procedimiento del colorante naranja ácido, el efecto de la falta de sensibilidad al tratamiento, indica que la técnica tiene también sensibilidad para medir lisina disponible o determinar la calidad de la proteína de harinas de carne y hueso durante su procesamiento. También, se presentaron diferencias entre especies en respuesta a daño por calor.

En otro trabajo para comparar métodos Nordheim y Coon (1984), compararon dos pruebas químicas (FDNB y TNBS) con una de crecimiento en pollos para lisina disponible y el método usado por Sibbald (1976), modificando el tiempo de colección de excretas a 36 horas. Encontraron que las pruebas químicas daban valores altos de lisina debido a que estos reactivos se unen a otros compuestos diferentes a lisina en harinas de pescado, y carne. Concluyendo que la determinación biológica de lisina disponible por la prueba

de Sibbald, (1976) se correlacionó mejor con las pruebas de crecimiento para cada tipo de harina de proteína animal y también este método es una alternativa mejor que las pruebas de crecimiento en pollos y los métodos químicos para determinar lisina disponible en muestras de proteína animal por que es simple, menos costosa, más rápida que las pruebas de crecimiento y más exacta que los métodos químicos.

Las diferencias entre los métodos químicos y biológicos para determinar disponibilidad pueden además estar dadas por:

a. La lisina puede estar protegida en la proteína, lo cual la hace difícil de hidrolizar o no es hidrolizada por todas las proteasas animales; sin embargo, tal lisina puede o no aparecer disponible químicamente por métodos de hidrólisis y si ser indisponible del todo nutricionalmente.

b. La lisina puede estar unida a través de enlaces a un residuo de aspartil o glutamil, a otra proteína o a la misma molécula de proteína, aunque las uniones tengan una unión peptídica normal no es hidrolizada por las proteasas del intestino. El aspartil o glutamil lisina permanecen después de la proteólisis y aparecen como nutricionalmente indisponibles; pero, esta si es rota durante la hidrólisis ácida produciéndose lisina y ácido aspártico o glutámico. Otra reacción de la lisina es con uniones o enlaces con residuos de dehidroalanina, ésta es formada con serina o cistina al calor, bajo condiciones alcalinas. La hidroalanina así formada reacciona con el grupo E-amino para formar lisinoalanina.

2. PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS.

Han sido usados ciertos microorganismos como Streptococo zimógenes por su considerable acción proteolítica, ofreciendo interés en determinar la disponibilidad de ciertos AA y protozoarios como la Tetrahymena pyriformis para estimar disponibilidad de lisina, metionina, arginina e histidina; este microorganismo digiere proteínas y requiere los mismos AA que las ratas (Papadopoulos, 1985).

Las pruebas microbiológicas pueden ser usadas para determinar el contenido disponible y el total de proteínas, necesitando una predigestión con enzimas apropiadas y condiciones que se deben escoger para que los resultados de los ensayos microbiológicos estén de acuerdo con las pruebas biológicas (Porter y Rolls, 1973).

Esta prueba en esencia compara el crecimiento de microorganismos alimentados con niveles graduados del producto a ensayar, con organismos similares alimentados con niveles graduados del AA establecido; algunas especies de bacterias son hábiles para usar péptidos. Si estos péptidos son disponibles para mamíferos y aves es cuestionable, lo que origina dudas acerca de si tales pruebas son para producir valores de biodisponibilidad (Sibbald, 1987).

DIGESTIBILIDAD IN_VITRO.

1. DIGESTION ENZIMÁTICA.

Por algunos años los nutricionistas han desarrollado métodos in vitro para determinar la digestibilidad de la proteína; debido, a que la calidad nutricional de las proteínas está relacionada con su

contenido de AA y la capacidad de las enzimas digestivas para liberarlos (Gauthier et al. 1982).

Varios métodos usando digestión enzimática han sido probados; algunos autores usaron un sistema enzimático simple como pepsina (Sheffner et al. 1956), tripsina o papaína (Gauthier et al. 1982), una simple enzima que ataca uniones de péptidos específicos. Debido a esto, puede dar resultados diferentes para proteínas que contienen diferentes concentraciones de los AA específicos (Hsü et al. 1977), como ejemplo los valores bajos con digestión de pepsina en harina de carne ($\bar{X}=71.9\%$) no se pueden comparar con las harinas de pescado ($\bar{X}=89.3$) (Johnston y Coon, 1979); pero es un procedimiento usual para estimar la calidad nutricional de proteínas. Por lo tanto, por razones físicas y químicas, la proteína debe ser hidrolizada por diferentes enzimas, por que cada una de ellas tiene una acción específica en diferentes partes de la proteína aumentando la extensión de la proteólisis (Gauthier et al. 1982).

La técnica multienzimática más usada ha sido la digestión del ingrediente con pepsina seguida de pancreatina (Akeson y Stahmann, 1964; Cave, 1988; Gauthier et al. 1982; Sheffner et al. 1956); generalmente esta digestión in vitro se hace en un sistema cerrado y la reacción es detenida por la mezcla de la digestión a punto de ebullición, seguida por una filtración; por precipitación de la proteína con un ácido fuerte y centrifugación o ultrafiltración (Cave, 1988); o por centrifugación y separación de fracciones por filtración. La determinación de la digestibilidad de la proteína en estos métodos, es usualmente determinado por análisis de

nitrógeno o AA de las diferentes fracciones de digestión, además en tales métodos el porcentaje de proteólisis medido varía de acuerdo al procedimiento usado (Gauthier et al. 1982). Estos mismos autores adoptaron un sistema de hidrólisis con pepsina más pancreatina y simultánea diálisis de productos digeridos lo cual permite la salida de péptidos con peso molecular inferior a 1.000 daltons, permitiendo la separación de los productos de proteólisis de la mezcla durante la digestión, y además reduce la posibilidad de inhibir la reacción debido a la saturación con productos finales. Un porcentaje casi lineal de proteólisis es obtenida por continuos reemplazos del buffer durante la digestión; la técnica es automatizada para llevar a cabo varios análisis simultaneos siendo capaz de detectar el deterioro de los ingredientes por calor y álcalis.

Cave (1988), utilizó en su trabajo las enzimas pepsina y pancreatina, y observó que la selección de péptidos absorbibles y no absorbibles por el organismo del animal, no puede realmente ser hecha por centrifugación o por precipitación con ácido tricloroacético, el cual separa nitrógeno no proteico de proteínas de peso molecular mayor a 25.000 daltons. Resultados obtenidos comparando los métodos de precipitación con ácido tricloroacético y ultrafiltración con poros de diferente tamaño, demuestran que la separación de los productos de hidrólisis de acuerdo al tamaño molecular mejora esta prueba in vitro.

En un trabajo realizado por Hsú et al. (1977) donde utilizaron 23 fuentes de proteína sometidas a una digestión con tripsina, quimotripsina y peptidasas, encontraron que la digestibilidad

El método de AA in vivo en ratas, da una alta correlación con la disminución del pH a los 10 minutos después de adicionar las enzimas ($r=.90$). La ventaja de este método para predecir digestibilidad de la proteína, es que puede realizarse en un periodo comprendido de una hora con un alto grado de sensibilidad. Sin embargo, el uso de métodos in vitro para estimar AA biodisponibles, depende de la habilidad para predecir digestión y absorción de los componentes de los AA cuando son consumidos por un animal (Cave, 1988). Aunque la técnica multienzimática está lejos de reproducir perfectamente las condiciones fisiológicas de la digestión, puede servir como un estimador de digestibilidad (Larbier, 1985); suministrando una mayor información acerca del valor nutricional de los ingredientes dando una mayor correlación con los análisis in vivo (Splitter y Shipe, 1976).

IV. MATERIALES Y METODOS

Se comparó un método biológico con tres métodos químicos para la determinación de los AA disponibles a muestras comerciales de tres pastas de soya y tres harinas de pescado.

1. PRUEBA IN VIVO

Se usó la técnica desarrollada por Sibbald (1976), modificada por Likuski y Dorell (1978) para estimar el contenido de AA disponibles en los ingredientes. se utilizaron seis gallos blancos Leghorn de cresta simple con 25 semanas de edad y un peso promedio de 1570 ± 122 g. Los gallos se alojaron en jaulas individuales de acero inoxidable; se colocó debajo de cada jaula una charola forrada con plástico para coleccionar las excretas. Antes de iniciarse la prueba los animales fueron sometidos a un ayuno de alimento por 24 horas, finalizado éste, se les administraron exactamente, por consumo forzado, 30 g del ingrediente previamente asignado. Pasadas 48 horas las bandejas de colección se retiraron y se situaron en un horno a 30 C por cinco días para su secado; las muestras secas se coleccionaron, pesaron y unieron las excretas de dos gallos por ingrediente, dejándose a temperatura ambiente para su equilibrio en humedad y se procedió a sus correspondientes análisis.

Para el ensayo se utilizó el diseño de bloques al azar, siendo el efecto a medir biodisponibilidad de AA del ingrediente. Los ingredientes comerciales, gentilmente proporcionados por la fábrica de alimentos balanceados Flagasa S.A. de C.V, fueron los siguientes:.

- Pasta de soya de la Industria aceitera (S1).
- Pasta de soya aceitera el Paraiso (S2).
- Pasta de soya aceitera la Corona (S3).
- Harina de pescado de importación (HP1).
- Harina de pescado de Industrializadora Nacional de Productos Marinos (HP2).
- Harina de pescado de Topolobambo (HP3).

Los cuales se distribuyeron en tres bloques al azar para las pastas de soya y tres para las harinas de pescado; con seis observaciones en cada bloque, siendo la unidad experimental la mezcla de excretas de dos gallos por ingrediente.

El experimento se inició con las tres pastas de soya, cada ingrediente se ofreció por duplicado; se recolectaron las excretas a las 48 horas. Pasado este tiempo, se dejó a los animales descansar por un periodo de 12 días consumiendo una dieta sorgo más soya en forma voluntaria. Este mismo ensayo se realizó por tres veces para las pastas de soya, así mismo para las harinas de pescado. Esta diferencia en tiempo se uso como criterio de bloques.

Para medir los AA endógenos se utilizaron los mismos gallos, los cuales fueron privados de alimento durante 72 horas, recogándose las excretas las últimas 48 horas; todo con el fin de hacer las correcciones de excreción endógena de AA y de esta manera conocer la disponibilidad verdadera de los AA, donde:

$$DVAA = \frac{AA \text{ consumidos} - (AA \text{ excretados} - AA \text{ ex. endógena})}{AA \text{ consumidos}}$$

Likuski y Dorell (1978).

Este estudio se llevó a cabo en la Unidad Experimental avícola del INIFAP en el Centro de Investigaciones Forestales y Agropecuarias del Estado de México, con una temperatura aproximada de 27 C, a nivel de caseta de 21 C y 14 horas diarias de luz natural.

-Análisis de Aminoácidos

El procedimiento para el análisis de AA de los ingredientes y las excretas de los gallos fue realizado por Degussa, S.A. quienes utilizaron, oxidación e hidrólisis ácida de los AA azufrados e hidrólisis ácida para el resto de AA; no se efectuó hidrólisis alcalina para la determinación de triptófano. La siguiente técnica fue empleada:

Para la oxidación e hidrólisis se molieron finamente las muestras (0.25mm), se pesaron en matraces de fondo redondo muestras equivalentes a 10 mg de N en cada una. Para los AA azufrados, se introdujo un agitador magnético en el matraz con la muestra y se colocó en un baño con hielo, luego se le adicionó a la muestra 5 ml de una solución de ácido per fórmico: 25 mg de fenol se mezclan con 0.5 ml de peróxido de hidrógeno al 30% y 4.5 ml de ácido fórmico, ésta mezcla se dejó en reposo por 30 minutos y después se colocó en un baño con hielo por 15 minutos para ser usada inmediatamente; se agitó el contenido del matraz aproximadamente por 15 minutos y luego se refrigeró en un baño con hielo por 16 horas.

El exceso de ácido per fórmico fue destruido con 0.7 ml de ácido bromhídrico al 48%, colocandose gota a gota con una pipeta de 1 ml mientras se agitaban las muestras; luego, se continuó agitando la mezcla por media hora más con los frascos abiertos para que los

vapores escaparan. El exceso de ácido fue evaporado en un rotaevaporador a 60 C.

Para la hidrólisis ácida, se utilizó el residuo de la oxidación, a cada una se le agregaron 50 mg de fenol y 50 ml de HCl 6 Normal, esta mezcla fue agitada con agitador magnético y colocada por 24 horas en reflujo. Posteriormente se filtró y se adicionaron 20 ml de un estándar interno de norleucina; la solución con el estándar se colocó en un rotaevaporador a una temperatura máxima de 60 C se lavó cinco veces con 20 ml de agua destilada, evaporando cada vez. Al residuo se le adicionaron 50 ml de un buffer de citrato de sodio pH 2.2, se tomó una muestra representativa de 20 ml y se congeló hasta su análisis.

Cuatro a cinco ml de esta solución se filtraron, se diluyeron con 50 ml de buffer de citrato de sodio pH 2.2, y se inyectaron 200 microlitros de esta solución diluida al aminoanalizador.

2. PRUEBAS QUIMICAS

2a. Metodología in vitro 1

Tomando como referencia la técnica multienzimática usada por Cave (1988), se realizaron cinco pruebas preliminares para determinar el tiempo óptimo de incubación y concentración enzimática. Cada ingrediente se analizó por duplicado. Se pesaron muestras con un contenido de 0.015 g de nitrógeno (N). Las enzimas que se utilizaron fueron:

- Pepsina (Calbiochem No.516360 de 5.000.000 de unidades). Esta se preparó en una solución de ácido clorhídrico (HCl) 0.075N; a cada muestra se le colocaron 8 ml de esta solución conteniendo 5250

unidades de pepsina. Dicha cantidad se utilizó en todas las pruebas.

- Pancreatina (Sigma No.P1500): un gramo de esta enzima, se disolvió en 100 ml de buffer de fosfato de sodio 0.2 Molar (M), ajustando el pH a 8.0. Se centrifugó a 2000 G por 10 minutos y se utilizó la fracción sobrenadante. Colocando a cada muestra dos ml de esta solución. Tal cantidad se utilizó en las cuatro primeras pruebas.

A continuación se describen estos ensayos:

Prueba 1.- Se buscó el tiempo de incubación que presentara una mayor liberación de lisina con la enzima pancreatina. Para este fin, las muestras se incubaron por tres horas y media con una solución de pepsina en un baño maria a 39 C con agitación constante, seguidamente se ajustó el pH a 8.0 con diferentes concentraciones de hidróxido de sodio (NaOH) y HCl. Al término de la digestión con pepsina, se incubó con pancreatina bajo las mismas condiciones por diferentes periodos: de 18:30, 24:30 y 44:00 horas; una vez terminado cada período de incubación, se midió el pH y se paró la reacción adicionándole a cada muestra 2.5 ml de una solución de ácido tricloroacético (ATC) al 5%; luego se centrifugó a 1200 G por una hora separándose la fracción sobrenadante y determinando en ésta la lisina disponible por el método sugerido por Kakade y Liener (citado por Tejada, 1985).

Prueba 2.- Con el fin de encontrar el mejor comportamiento de la pepsina, se sometieron las muestras a una incubación con la solución de esta enzima, en baño maria a 39 C con agitación constante, por diferentes periodos a 3, 4 y 5 horas. Terminado

Después de estos tiempos se le adicionaron 2.5 ml de ATC al 5% a cada muestra, se dejaron en reposo por 20 minutos y luego se centrifugaron a 3300 G por 1 hora. Las muestras de soya se filtraron después de ser centrifugadas en papel Whatman No.42 con objeto de separar la fracción sobrenadante para su inmediata determinación del porcentaje de N total.

Prueba 3.- En esta prueba se incubaron muestras de pasta de soya 1 y harina de pescado 1, por periodos de 4 y 5 horas respectivamente con la solución de pepsina; en un baño maría a 39 C con agitación constante. Al término de la incubación se ajustó el pH a 8.0 con soluciones de NaOH. y HCl, inmediatamente se agregó a cada muestra la solución de pancreatina para continuar su incubación por 18, 21 y 24 horas. A todas las muestras, al terminar su último periodo de incubación, se les adicionaron 2.5 ml de una solución de ATC al 5% dejándolas en reposo por 20 minutos, luego se centrifugaron a 3300 G por 1 hora y se retiró el sobrenadante para su posterior determinación de N total.

Prueba 4.- Buscando un método eficiente para precipitar la proteína de la pasta de soya, se diseñó este experimento donde se tomaron cuatro muestras de soya sobrecalentadas y seis sin tratar; estas muestras se sobrecalentaron en un horno a 110 C por 5 horas y en unión con las demás muestras, se incubaron con pepsina en un baño maría a 39 C con agitación constante por periodos de 3 horas. Finalizado este tiempo se fraccionaron en tres grupos:

- primer grupo, incluía dos muestras sobrecalentadas y dos sin tratar; a este grupo se le adicionó, al término de su incubación con pepsina, 2.5 ml de una solución de ATC al 5% por muestra.

dejándolas en refrigeración por 20 minutos y luego centrifugando a 3300 G por 1 hora.

- segundo grupo, incluía también dos muestras sobrecalentadas y dos sin tratar, se le adicionaron, terminado su periodo de incubación, 2.5 ml de una solución de ATC al 5% por muestra y se dejaron en reposo por tres horas en refrigeración, después se centrifugó a 3300 G por 1 hora.

- tercer grupo, después del tiempo de incubación se les adicionaron 2 ml de una solución de ATC al 20% y se dejaron 14 horas en refrigeración.

Todas las muestras de los diferentes grupos se filtraron a través de papel Whatman No.3, antes de determinar la cantidad de N total presente en el filtrado de cada muestra.

Prueba 5.- Para la realización de este experimento se determinó la actividad inhibidora de tripsina en las pastas de soja según el método de Kakade et al. (1974); en este ensayo se utilizó doble cantidad de pancreatina, las muestras se dividieron en dos grupos:

- En el primer grupo se utilizaron únicamente cuatro muestras de HP1, las cuales dos se sometieron a incubación con pepsina en baño maria a 39 C con agitación constante por un periodo de 4 horas, y dos por 5 horas; posteriormente se ajustó el pH a 8.0 con solución de NaOH y HCl para continuar de la misma forma la incubación con la enzima pancreatina por un lapso de 21 horas; finalizada la incubación, a cada muestra, se le adicionaron 2.5 ml de una solución de ATC al 5% y se dejaron reposar en refrigeración por 20 minutos. Luego se centrifugaron por 20 minutos a 3300 G para su posterior determinación de N total en el sobrenadante.

- En el segundo grupo se trabajaron seis muestras de pasta de soya; las cuales, se sometieron a incubación con pepsina por 4 horas en un baño maria a 39 C con agitación constante; seguidamente, se ajustó el pH a 8.0 con NaOH y HCl para continuar la incubación con la solución de pancreatina por un periodo de 16, 18 y 21 horas. Finalizado cada periodo, se adicionó a cada muestra 2.5 ml de una solución de ATC al 5%, se dejó en refrigeración por 20 minutos, posteriormente se filtró a través de papel Whatman No.3 y se determinó el N presente en dicho filtrado.

Continuando con los métodos químicos y tomando en cuenta las pruebas preliminares se realizó la prueba final denominada digestión in vitro 1

Se pesaron 0.015 g de N de cada ingrediente (HP1, HP2, HP3, S1, S2, S3) con su respectivo duplicado y un control para las harinas de pescado y otro para las pastas de soya, conteniendo las dos últimas únicamente las soluciones enzimáticas. A cada muestra se le agregaron 8 ml de una solución de pepsina (5250 unidades por muestra), se incubaron las harinas de pescado y las pastas de soya por 4 horas, en un baño de agua con agitación constante a 39 C; finalizado este tiempo, se ajustó cada muestra y su control a un pH 8.0 con NaOH y HCl para continuar su incubación con una solución de 2 ml de la enzima pancreatina (40 mg de la enzima por muestra), por un periodo de 18 horas para las pastas de soya y 21 horas para las harinas de pescado. Finalizada la incubación, se detuvo la reacción enzimática con la adición de 2.5 ml de una solución de ATC al 5% por muestra y se dejó en refrigeración por 20 minutos; después las pastas de soya se filtraron con papel Whatman No.3 y

las muestras de harina de pescado se centrifugaron por 20 minutos a 3300 G. El sobrenadante de las harinas de pescado y el filtrado de las pastas de soya se aforaron a 25 ml con una solución de ácido clorhídrico 0.075 N para su posterior análisis de AAS por cromatografía de columna.

2b. Prueba in vitro 2

El método usado fue el empleado por Hsü et al. (1977). Para este sistema multienzimático se utilizaron las siguientes enzimas:

- Tripsina de pancreas porcino (Sigma No.T0134) con 16000 B.A.E.E. unidades de la enzima por mg.
- Quimotripsina de páncreas bovino (Sigma No.C4129) con 46 unidades de la enzima por mg.
- Peptidasa de mucosa intestinal de porcino (Sigma No.P500) con 115 unidades de la enzima por g.

A todos los ingredientes (pastas de soya y harinas de pescado) se les determinó la humedad para el cálculo del peso de la muestra con base en el contenido de nitrógeno.

Las muestras fueron finamente molidas (0.25mm), colocándose cada una en un matraz con 50 ml de agua destilada y 6.25 mg del ingrediente de proteína por ml, formando una suspensión de proteína acuosa del ingrediente, luego ésta fue ajustada a pH 8.0 con 0.1 N de HCl y/o NaOH al 0.1 N, mientras la suspensión se agitaba a 37 C en baño maría. Posteriormente se le adicionó a cada muestra la solución multienzimática, preparada el mismo día, que contenía por muestra 7.095 mg de tripsina, 20.215 mg de quimotripsina y 2.605 mg de peptidasa disueltos en 5 ml de agua destilada a la que se le ajustó el pH a 8.0 con 0.1N de HCl y/o 0.1N de NaOH. Se continuó

la incubación de la solución proteica con la solución multienzimática por 10 minutos y se le midió el pH. Se utilizó como control caseína con una digestibilidad aparente de AA conocida en ratas.

2c. Otros análisis.

- Análisis químico proximal a todos los ingredientes (métodos descritos por la A.O.A.C. 1975):
 - a. humedad por estufa de secado (método 14.004)
 - b. cenizas por incineración (método 14.006)
 - c. proteína cruda por el método Kjeldahl (método 2.049)
 - d. extracto etéreo por extracción con éter etílico (método 7.045)
 - e. fibra cruda por hidrólisis ácida y alcalina (método 7.054)
 - f. extracto libre de nitrógeno por diferencia a cien de la suma de los porcentajes obtenidos en las determinaciones anteriores
- Inhibidor de tripsina a las pastas de soya (técnica de Kakade et al. 1974).
- Actividad ureásica a las pastas de soya por el método de AOCS (citado por Tejada, 1985).
- Determinación de nitrógeno no protéico de todos los ingredientes y las excretas de los gallos por el método de Lacoles (citado por Tejada, 1985).
- Lisina disponible en pastas de soya y harinas de pescado por el método de Carpenter (1969)

Estadísticamente se utilizó para la digestibilidad in vivo, un diseño de bloques al azar para pastas de soya y otro para harinas de pescado, se compararon medias a través de la prueba de Student-

Newman-Keuls, (Steel y Torrie, 1985). Para determinar las correlaciones en las pruebas químicas y biológicas se utilizó la prueba de Kendall de libre distribución para pruebas de independencia y para la pendiente la prueba de Theil de libre distribución para pendientes (Hollander y Wolse, 1976).

V. RESULTADOS Y DISCUSION

PRUEBA BIOLOGICA IN VIVO

Los resultados de la composición bromatológica de los ingredientes utilizados, pastas de soya y harinas de pescado, figuran en los cuadros 5.1 y 5.2; como también, su composición de AA en los cuadros 5.3 y 5.4 respectivamente. Los valores tanto de composición bromatológica, como de AA esenciales para las pastas de soya caen dentro de lo informado para estos ingredientes por el NRC (1984).

Se puede observar en el cuadro 5.1 que las pastas de soya fueron de diferente contenido proteico, lo que se tradujo en un mayor contenido de AA (cuadro 5.3) a medida, que fue más alto su contenido de proteína. Por lo que respecta a las harinas de pescado en el cuadro 5.2 se puede ver que la harina de pescado 1 de origen importado tuvo mayor contenido de proteína que las harinas de pescado 2 y 3 nacionales. Este efecto también es evidente en el aminograma (cuadro 5.4).

Los valores de digestibilidad verdadera total y de cada aminoácido en las pastas de soya y harinas de pescado se presentan en los cuadros 5.5 y 5.6 respectivamente. Los valores de digestibilidad verdadera total de los AA fueron obtenidos en forma aditiva según la técnica de Sibbald (1976) modificada por Likuski y Dorell (1978). La pasta de soya 3, que fue la de menor contenido proteico, con respecto a las demás pastas de soya presentó un mayor

CUADRO 5.1 COMPOSICION PROXIMAL DE LAS 3 PASTAS DE SOYA
COMERCIALES UTILIZADAS. RESULTADOS EN PORCENTAJE
NORMALIZADOS AL 91% DE MATERIA SECA.

FRACCION	SOYA 1	SOYA 2	SOYA 3
PROTEINA CRUDA	48.29	46.84	44.77
EXTRACTO ETereo	1.65	1.88	1.52
FIBRA CRUDA	7.65	5.40	5.70
MINERALES TOTALES	7.20	6.80	5.78
E.L.N.	26.21	30.08	33.23

CUADRO 5.2 COMPOSICION PROXIMAL DE LAS TRES HARINAS DE PESCADO
COMERCIALES UTILIZADAS. RESULTADOS EN PORCENTAJE
NORMALIZADOS AL 91% DE MATERIA SECA.

FRACCION	HP 1	HP 2	HP 3
PROTEINA CRUDA	62.90	60.50	60.40
EXTRACTO ETereo	7.40	15.00	16.27
FIBRA CRUDA	0.60	1.25	0.80
MINERALES TOTALES	18.55	13.12	11.08
E.L.N.	1.55	1.13	2.45

CUADRO 5.3 COMPOSICION PORCENTUAL DE AMINOACIDOS DE LAS PASTAS DE SOYA CON BASE EN EL CONTENIDO DE PROTEINA CRUDA¹.

AMINOACIDOS	PASTAS DE SOYA		
	1	2	3
METIONINA	0.75	0.72	0.69.
CISTEINA	0.80	0.74	0.71
METIONINA + CISTINA	1.54	1.46	1.41
LISINA	3.07	2.95	2.98
THREONINA	1.95	1.96	1.87
ARGININA	3.58	3.38	3.35
VALINA	2.23	2.19	2.14
PROLINA	3.00	2.90	2.85
LEUCINA	3.70	3.65	3.53
ISOLEUCINA	2.18	2.09	2.04
ASPARTATO	5.96	5.84	5.60
GLUTAMATO	9.09	8.87	8.54
ALANINA	2.04	2.03	1.92
GLICINA	2.07	2.01	1.95
SERINA	2.62	2.58	2.47
NH ₃	1.19	1.26	1.17
TOTAL (SIN NH ₃)	42.07	41.96	40.68
TOTAL	44.28	43.22	41.84
PROTEINA CRUDA (%)	48.29	46.84	44.77

¹ resultados normalizados al 91% de materia seca

CUADRO 5.3 COMPOSICION PORCENTUAL DE AMINOACIDOS DE LAS PASTAS DE SOYA CON BASE EN EL CONTENIDO DE PROTEINA CRUDA^a.

AMINOACIDOS	PASTAS DE SOYA		
	1	2	3
METIONINA	0.75	0.72	0.69
CISTEINA	0.80	0.74	0.71
METIONINA + CISTINA	1.54	1.46	1.41
LISINA	3.07	2.95	2.98
THREONINA	1.95	1.96	1.87
ARGININA	3.58	3.38	3.35
VALINA	2.23	2.19	2.14
PROLINA	3.00	2.90	2.85
LEUCINA	3.70	3.65	3.53
ISOLEUCINA	2.18	2.09	2.04
ASPARTATO	5.96	5.84	5.60
GLUTAMATO	9.09	8.87	8.54
ALANINA	2.04	2.03	1.92
GLICINA	2.07	2.01	1.95
SERINA	2.62	2.58	2.47
NH ₃	1.19	1.26	1.17
TOTAL (SIN NH ₃)	43.07	41.96	40.68
TOTAL	44.28	43.22	41.84
PROTEINA CRUDA (%)	48.29	46.84	44.77

^a resultados normalizados al 91% de materia seca

CUADRO 5.4 COMPOSICION PORCENTUAL DE AMINOACIDOS DE LAS HARINAS DE PESCADO CON BASE EN EL CONTENIDO DE PROTEINA CRUDA¹.

AMINOACIDOS	HP-1	HP-2	HP-3
METIONINA	1.94	1.88	1.92
CISTINA	0.60	0.64	0.62
METIONINA + CISTINA	2.55	2.52	2.54
LISINA	5.37	5.09	5.10
TREONINA	2.86	2.76	2.74
ARGININA	3.96	2.62	3.51
VALINA	3.04	3.14	3.19
PROLINA	3.71	3.20	3.12
LEUCINA	4.74	4.69	4.71
ISOLEUCINA	2.57	2.61	2.64
ASPARTATO	6.46	6.18	6.15
GLUTAMICO	8.96	8.43	8.32
ALANINA	4.03	3.78	3.68
GLICINA	4.39	3.68	3.52
SERINA	2.61	2.54	2.54
TAURINA	0.18	0.33	0.25
NH3	1.49	1.44	1.34
TOTAL (SIN NH3)	55.42	52.58	52.11
TOTAL	56.91	54.02	53.45
PROTEINA CRUDA (%)	62.90	60.50	60.40

¹ resultados normalizados al 91% de materia seca

CUADRO 5.5 PORCENTAJE DE DIGESTIBILIDAD VERDADERA DE AMINOACIDOS¹
EN PASTAS DE SOYA UTILIZANDO GALLOS ADULTOS

AMINOACIDOS	SOYA 1 X ² ± s ³	SOYA 2 X ± s	SOYA 3 X ± s
METIONINA	91.63±1.39	94.09±1.21	95.87±2.60
CISIINA	76.21±2.38	76.33±2.61	82.10±2.63
METIONINA + CIST	82.90±1.38	84.19±0.36	89.09±2.51
LISINA	86.63±1.47	89.85±0.02	92.62±1.45
TREONINA	85.22±0.48	86.60±1.62	89.03±0.12
ARGININA	90.38±1.83	90.40±1.62	89.87±2.96
VALINA	87.00±0.62	86.85±0.61	92.52±1.69
PROLINA	89.52±1.50	90.92±3.87	92.19±2.40
LEUCINA	88.75±0.51	89.21±0.06	92.98±1.30
ISOLEUCINA	88.37±1.03	89.53±0.36	92.47±0.21
ASPARTATO	88.22±0.94	87.84±0.35	92.14±0.72
GLUTAMATO	88.96±0.88	89.11±0.30	93.44±0.64
ALANINA	81.90±1.52	82.45±4.29	88.69±1.82
GLICINA	82.00±1.29	87.27±3.53	87.50±2.71
SERINA	87.37±1.15	88.86±0.19	92.14±0.99
DIGESTIBILIDAD TOTAL	86.33±4.06 ^a	87.56±4.17 ^a	90.83±3.27 ^b

¹ Digestibilidad Verdadera de AA= AA consumidos - (AA excretados - AA excretados por aves control)/AA consumidos X 100.

² Los datos son el promedio de 3 análisis y dos muestras por análisis.

³ Desviación estandar.

^{a, b} valores con diferente literal indican diferencia (P<0.01)

CUADRO 5.6 PORCENTAJE DE DIGESTIBILIDAD VERDADERA DE AMINOACIDOS¹
EN HARINAS DE PESCADO UTILIZANDO GALLOS ADULTOS

AMINOACIDOS	HP-1	HP-2	HP-3
	X ² ± s ²	X ± s	X ± s
METEONINA	93.12±1.48	94.14±0.89	93.67±1.89
CISTINA	78.45±1.75	81.14±1.77	80.41±4.01
METIONINA+CIST	87.94±3.06	90.24±0.70	89.84±2.31
LISINA	86.98±3.80	88.57±1.41	88.91±1.30
TREONINA	90.91±1.32	92.14±0.86	90.79±2.30
ARGININA	85.58±2.27	87.47±2.92	86.64±1.51
VALINA	92.27±1.98	93.98±0.79	92.22±1.44
PROLINA	79.75±3.14	87.91±1.73	93.12±3.35
LEUCINA	93.78±0.44	93.71±0.42	92.19±1.64
ISOLEUCINA	93.04±0.31	93.05±0.48	91.71±1.70
ASPARTATO	90.02±1.82	91.63±0.67	90.23±2.04
GLUTAMATO	91.14±1.31	92.76±0.79	91.75±1.13
ALANINA	87.66±3.35	91.82±0.42	90.25±1.16
GLICINA	76.49±6.14	84.49±0.73	82.58±1.08
SERINA	88.56±2.22	89.73±0.87	88.82±1.97
DIGESTIBILIDAD TOTAL	87.72±6.65 ^a	90.18±5.19 ^a	88.87±5.57 ^a

¹ Digestibilidad verdadera de AA = AA consumidos - (AA excretados - AA excretas de aves control)/AA consumidos X 100.

² Los datos son el promedio de tres análisis y dos muestras por análisis.

³ Desviación estandar.

^a valores con el mismo literal indican comportamiento similar (P<0.05)

porcentaje estadísticamente significativo ($P \leq 0.01$) de digestibilidad verdadera total de los AA y entre las harinas de pescado nacionales y de importación, su comportamiento fue similar ($P > 0.05$).

Fue muy similar el promedio de digestibilidad verdadera total de AA en las pastas de soya de 88.24%: con respecto a las harinas de pescado de 88.92% indicando la buena calidad de ambas fuentes proteicas. Cabe señalar que se detectaron diferencias estadísticas ($P \leq 0.01$) entre pastas de soya, aunque fueron similares ($P > 0.05$) las harinas de pescado (cuadro 5.7). Las diferencias encontradas en las pastas de soya, probablemente no se deban a la cantidad presente del inhibidor de tripsina, pues, la mayor digestibilidad verdadera total de AA se encontró en la pasta de soya 3 la cual contenía 2.1 mg del inhibidor por gramo de muestra (cuadro 5.8). Probablemente ese nivel no afecta la digestibilidad de los AA. Tampoco se encontró una relación entre el contenido de proteína cruda de las pastas de soya con respecto a su digestibilidad verdadera total de AA. El bajo número de muestras investigadas no permite hacer conclusiones definitivas.

Al comparar el contenido de AA de los ingredientes determinado en el laboratorio con los resultados obtenidos por cálculo como lo señala Ward (1989), mediante ecuaciones de regresión obtenidas a través de 175 muestras de pasta de soya y 282 muestras de harinas de pescado, con base en el contenido de proteína cruda del ingrediente, se observa para las pastas de soya y harinas de

CUADRO 5.7 ANALISIS DE VARIANZA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F
<u>PASTAS DE SOYA</u>				
BLOQUES	2	5.49	2.74	
TRATAMIENTOS	2	32.45	16.22	21.2**
ERROR	4	3.06	0.76	
TOTAL	8	41.00		
<u>HARINAS DE PESCADO</u>				
BLOQUES	2	10.54	5.27	
TRATAMIENTOS	2	9.09	4.54	2.07NS
ERROR	4	8.74	2.18	
TOTAL	8	28.37		

** significativo ($P \leq 0.01$). Para esta diferencia se elaboró una prueba de Student-Newman-Keuls
 NS no significativo.

CUADRO 5.8. EVALUACION DE LA CALIDAD EN PASTAS DE SOYA POR DOS METODOS DIFERENTES

PASTA DE SOYA	STANLEY'S ¹	HAMERSTRAND ²
1	SUBCOCIDA	2.10 mg/g
2	APROPIADA	APROPIADA
3	SUBCOCIDA	2.10 mg/g

¹ Actividad ureásica (Tejada, 1985)

² Inhibidor de tripsina (Hamerstrand et al., 1981)

pescado (cuadros 5.9 y 5.10) una predicción de los porcentajes en todos los casos por encima del 90%; comprendiendo el rango de 90.9% para cistina hasta 106.5% para valina en las pastas de soya (cuadro 5.9) y de 81.8 para lisina hasta 116.6 para cistina en las harinas de pescado (cuadro 5.10); debido a que en la elaboración de harinas de pescado el material empleado es más heterogéneo. Esta información indica que el porcentaje de exactitud en cada AA es generalmente muy cercano en la pasta de soya en cuanto a su valor determinado en el laboratorio.

Una comparación de DVAA en diferentes estudios para pastas de soya y harinas de pescado (los más críticos desde el punto de vista de alimentación) se presentan en el cuadro 5.11. En estos estudios se utilizó la metodología de alimentación forzada con gallos adultos con un periodo de ayuno de 24 a 48 horas, consumo forzado de 30 a 50 g del ingrediente a ensayar, seguido por la colección de excretas por 48 horas utilizando aves cecostomizadas e intactas o convencionales. Se observa que los valores de DVAA pueden variar probablemente en parte, como lo menciona Parsons (1990), en diferentes muestras de un ingrediente y por métodos de laboratorio como también lo demostró Engster *et al.* (1985).

Los valores obtenidos en este experimento de DVAA, para algunos AA, en las pastas de soya y harinas de pescado caen dentro de los rangos determinados por el estudio de Parsons (1990), cuadro 5.12

CUADRO 5.9 PORCENTAJE DEL CONTENIDO DE AMINOACIDOS EN PASTAS DE SOYA CON RESPECTO A VALORES ESTIMADOS DE AMINOACIDOS POR ECUACIONES DE REGRESION.

	SOYA-1			SOYA-2			SOYA-3		
	CALC ¹	REAL ²	% ³	CALC.	REAL	%	CALC.	REAL	%
METIONINA	0.72	0.73	98.6	0.70	0.70	100.0	0.68	0.67	101.5
CISTINA	0.70	0.77	90.9	0.70	0.72	97.2	0.68	0.69	98.5
MET+CIST	1.42	1.49	95.3	1.40	1.42	98.6	1.36	1.36	100.0
LISINA	3.09	2.97	104.0	3.01	2.86	105.2	2.89	2.89	100.0
ARGININA	3.53	3.46	102.0	3.42	3.27	104.6	3.25	3.24	100.3
VALINA	2.30	2.16	106.5	2.24	2.12	105.7	2.15	2.07	103.9
ISOLEUCINA	2.12	2.11	100.5	2.06	2.03	101.5	1.98	1.97	100.5
TREONINA	1.91	1.89	100.0	1.86	1.90	97.9	1.80	1.81	99.4
LEUCINA	3.76	3.58	105.0	3.65	3.53	103.4	3.50	3.41	102.6

¹ Calc.- calculado de las ecuaciones de regresión sugeridas por Ward (1989) con base en el porcentaje de proteína cruda).

² Real- porcentaje del AA determinado

³ Calculado/real X 100.

CUADRO 5.10 PORCENTAJE DEL CONTENIDO DE AMINOACIDOS EN HARINAS DE PESCADO CON RESPECTO A VALORES ESTIMADOS DE AMINOACIDOS POR ECUACIONES DE REGRESION¹.

	HP-1			HP-2			HP-3		
	CALC ¹	REAL ²	% ³	CALC.	REAL	%	CALC.	REAL	%
METIONINA	1.69	1.94	87.1	1.59	1.88	84.6	1.59	1.92	82.8
CISTINA	0.70	0.60	116.6	0.69	0.64	107.8	0.69	0.62	111.3
MET + CIST	2.39	2.55	93.7	2.28	2.52	90.5	2.28	2.54	89.8
LISINA	4.45	5.37	82.9	4.18	5.09	82.1	4.17	5.10	81.8
ARGININA	3.61	3.96	91.1	3.44	3.63	94.8	3.43	3.51	97.7
VALINA	3.02	3.04	99.3	2.89	3.14	92.0	2.89	3.19	90.6
ISOLEUCINA	2.41	2.57	93.8	2.29	2.61	87.7	2.28	2.64	86.4
TREONINA	2.57	2.86	89.9	2.44	2.76	88.4	2.43	2.74	88.7
LEUCINA	4.63	4.74	97.7	4.41	4.69	94.0	4.40	4.71	93.4

¹ Calc.- calculado de las ecuaciones de regresión sugeridas por Ward (1989) con base en el porcentaje de proteína cruda).

² Real- porcentaje del AA determinado

³ Calculado/real X 100.

CUADRO 5.11 DIGESTIBILIDAD VERDADERA DE AMINOACIDOS (%) DE PASTAS DE SOYA Y HARINAS DE PESCADO INFORMADAS POR VARIOS LABORATORIOS.

	AMINOACIDOS				
	LIS	MET	CIST	TREO	ARG
<u>PASTAS DE SOYA</u>					
PARSONS, SIBBALD Y GREEN (1990) ¹	90	91	83	89	92
LIKUSKI Y DORELL (1978)	94	94	92	93	93
MUZTAR ET AL. (1980)	94	94	80	--	93
CAVE (1988)	90	93	--	91	93
LOS AUTORES (1990) ²	90	94	78	87	90
<u>HARINAS DE PESCADO</u>					
PARSONS, SIBBALD Y GREEN (1990)	88	91	78	86	93
LOS AUTORES (1990)	88	94	80	91	87

¹ Promedio de 34 muestras de los diferentes laboratorios citado por Parsons (1990).

² Promedio de 3 observaciones y dos muestras por observación conducido en este trabajo.

CUADRO 5.12 LIMITES (RANGOS) DE DIGESTIBILIDAD VERDADERA DE AMINOACIDOS (%) ENTRE MUESTRAS DE PASTAS DE SOYA Y HARINAS DE PESCADO¹.

INGREDIENTE	LIS	AMINOACIDOS		TREC
		MET	CIST	
PASTAS DE SOYA	85-93(90) ²	90-95(94)	75-92(79)	79-92(87)
HARINAS PESCADO	83-94(88)	86-95(94)	60-85(80)	85-93(91)

¹ Parsons (1990)

² Los valores en parentesis representan el promedio de tres observaciones y dos muestras por observación conducido en este trabajo.

DIGESTION IN VITRO 1

Los resultados de los ensayos preliminares (pruebas 1, 2, 3, 4 y 5) de la digestión in vitro 1 se muestran en las gráficas 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5 y 5.6.

En la gráfica 5.1 se observa que el mayor porcentaje de lisina disponible, se obtuvo a las 44 horas de incubación con pancreatina en la pasta de soya 1 y la HP-1. El mayor porcentaje de liberación de lisina, fue observado en la pasta de soya, notándose que la separación del sobrenadante en ésta no se efectuó; la HP-1 presentó un mejor comportamiento de separación del sobrenadante con respecto a la pasta de soya, probablemente por que la estructura de la proteína en las harinas de pescado permite una mejor disposición para ser hidrolizada, pues en la pasta de soya el sobrenadante siempre estuvo mezclado con partículas del ingrediente. Aun mejorando factores como la velocidad de centrifugación en cada periodo. Se obtuvo un mejor precipitado a 3300 G por una hora. Sin embargo como no se demostró si la porción del ingrediente presente en el sobrenadante era fracción proteica o carbohidratos solubles, ésta pudo interferir en el porcentaje de lisina disponible obtenida.

como dato complementario, se midió el pH durante los diferentes periodos de incubación (Cuadro 5.13) mostrando una tendencia general a disminuir el pH terminada cada incubación con respecto al pH inicial entre los diferentes periodos de incubación. En la HP-1 y en la pasta de soya a primera vista se observa una mayor

CUADRO 5.13 EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION, DE PASTAS DE SOYA Y HARINAS DE PESCADO, CON PEPSINA Y PANCREATINA SOBRE EL PH DE LA MEZCLA.

INGREDIENTES	TIEMPO DE INCUBACION (HORAS)					
	0	18	0	24	0	44
HP-1	8.0	- 6.8	8.1	- 6.7	7.9	- 6.7
HP-1	8.0	- 6.8	8.1	- 6.8	7.9	- 6.7
PS-1	8.1	- 7.4	8.0	- 6.9	8.2	- 6.5
PS-1	8.2	- 7.2	8.1	- 6.7	8.2	- 6.5
CONTROL	7.9	- 7.5	8.2	- 7.3	8.2	- 7.1

disminución del pH a las 44 horas que a las 18 horas, sin embargo sucede lo mismo con el control, de modo que al corregir ambos valores (18 y 44 horas) son iguales.

Un factor importante a tener en cuenta es la descomposición de los ingredientes, siendo más notoria en la HP-1, debido al largo periodo de incubación y a una probable contaminación.

En la gráfica 5.2 se observa el porcentaje de nitrógeno liberado en la pasta de soya 1 y HP-1 con un periodo de incubación con pepsina de 3, 4 y 5 horas. El mayor porcentaje de nitrógeno liberado se presentó en la HP-1 con respecto a la pasta de soya, debido probablemente a la mayor concentración de proteína cruda de la HP-1 y a la especificidad de la enzima pepsina para hidrolizar la proteína en determinadas uniones peptídicas adyacentes a ciertos AA como leucina, valina, isoleucina (Lenninger, 1978) presentes en mayor cantidad en la harina de pescado (cuadro 5.4); Algunos trabajos (Sheffner *et al.* 1956; Johnston y Coon, 1979) han sido desarrollados utilizando pepsina en la digestión, para el análisis

del ingrediente como control de calidad calculando el porcentaje de liberación de AA. En este trabajo se evaluó el porcentaje de nitrógeno liberado, por estar muy relacionado con porcentaje de liberación de AA y debido al alto costo que implicaría el determinar en cada prueba un análisis del perfil de AA.

En la gráfica 5.3 se observa la digestión de HP-1 y pasta de soya 1 con la enzima pepsina y diferentes periodos de incubación con pancreatina; mostrando que la mayor hidrólisis en la pasta de soya 1 y la HP-1 se encuentra a las 4 horas de incubación con pepsina para ambos ingredientes y 18 y 21 horas de incubación con pancreatina respectivamente.

La disminución observada en el porcentaje de nitrógeno liberado despues de las 21 horas en ambos ingredientes quizás se deba a que los productos amoniacales reaccionan con ácidos como el ácido clorhídrico formando sales (Morrison y Boyd, 1976).

En la gráfica 5.4 se muestra la digestión con pepsina para la pasta de soya 1 con diferente tratamiento térmico; observándose que terminado su período de incubación con pepsina y seguido de la dición de una misma concentración de ácido tricloroacético, reposo de 20 minutos en refrigeración y posterior centrifugación a 3300 G, tanto en la soya sobrecalentada como en la sin tratamiento adicional, no se observó incremento en el material precipitado quedando éste presente en la suspensión. El mismo comportamiento se presentó con un periodo de reposo de 3 horas.

Con un lapso de reposo de 24 horas de refrigeración y aumentando la concentración del 5% de ácido tricloroacético al 20%, reemplazando la centrifugación por el filtrado; ofreció los mismos resultados

que la soya sin tratamiento térmico.

Las diferencias presentes entre los grupos sin tratamiento y sobrecalentada, ambos con centrifugación, no muestran diferencias en la cantidad de nitrógeno liberado. Con base en lo anterior, la centrifugación, el aumento en la concentración de ácido tricloroacético y el aumento en el tiempo de reposo, aparentemente no influyen en el método para separar los AA libres de la proteína no hidrolizada en pastas de soya debido a que la proteína de la soya después de ser extraída de la planta necesita precipitarse con agua pura (Scott et al. 1982).

Con la soya no tratada y sobrecalentada fueron similares, debido a que el tratamiento térmico aplicado para la soya sobrecalentada no fue lo suficientemente agresivo. Según Batterham et al. (1982), una temperatura de 125 C por 4 horas tiene poco efecto sobre la disponibilidad de AA, y el tratamiento utilizado en este experimento fue menor.

En la gráfica 5.5 se observa que la mayor liberación de AA para la pasta de soya 1 se detectó a las 4 horas de incubación con pepsina y 18 horas de incubación con pancreatina; en la gráfica 5.6 se ve que el mayor porcentaje de liberación de nitrógeno se obtiene a las 4 horas de incubación con pepsina y 21 horas con pancreatina.

Es de notar que el mayor porcentaje de nitrógeno para ambos ingredientes (graficas 5.5 y 5.6) con respecto a la gráfica 5.3 se debe posiblemente al incremento al doble, en la concentración de la pancreatina, usada en la prueba 5, con el objeto de inhibir la presencia del factor antitripsinico (cuadro 5.8) dando como resultado valores bajos en las pastas de soya 1 y 3.

Los resultados finales en este experimento se encuentran en los cuadros 5.14 y 5.15, donde aparece el porcentaje de hidrólisis en las pastas de soya y harinas de pescado respectivamente utilizando la técnica de digestión in vitro 1. Los AA presentes en los cuadros antes mencionados son los únicos que se lograron determinar con exactitud, ya que hubo problemas en su determinación cuantitativa.

En el cuadro 5.14 no se detalla el análisis del hidrolizado en la pasta de soya 3 debido a que esa muestra se contaminó con hongos. Cave (1988) trabajó esta técnica con fuentes energéticas y proteicas utilizando durante su incubación 3 horas con pepsina y 18 horas con pancreatina, con posterior precipitación de proteínas mediante la adición de ATC, analizando el hidrolizado alcanzado en ésta forma y también el obtenido después de ultrafiltraciones terminal, continua y con membranas de Millipore; encontrando un porcentaje de separación de AA totales en fuentes energéticas de 12.1%, 2.4%, 3.2% y 5.3% respectivamente con las diferentes técnicas y ofreciendo datos muy bajos al igual que los encontrados en este experimento para las fuentes proteicas investigadas. Las harinas de pescado presentaron un mayor porcentaje de hidrólisis, con respecto a las pastas de soya probablemente por la diferencia en la solubilidad de la proteína, lo que facilitó el ataque por las enzimas utilizadas.

CUADRO 5.14 PORCENTAJE DE HIDROLISIS DE LAS PROTEINAS DE PASTAS DE SOYA UTILIZANDO LA DIGESTION IN_VITRO 1 (PEPSINA - PANCREATINA)².

	SOYA-1			SOYA-2		
	VITR ² .	ING ³ .	V/I ⁴	VITR.	ING.	V/I
METIONINA	0.14	0.75	18.6	0.10	0.72	13.9
LISINA	0.64	3.07	20.8	0.43	2.95	14.6
VALINA	0.45	2.23	20.2	0.23	2.19	10.5
LEUCINA	0.34	3.70	9.2	0.19	3.65	5.2
ALANINA	0.39	2.00	20.0	0.22	2.00	11.0

¹ Resultados normalizados al 91% de materia seca.

² Contenido en AA de la digestión in vitro 1, exento de los AA de las enzimas.

³ Contenido de AA del ingrediente.

⁴ Relación del contenido de AA de la digestión in vitro 1, con respecto al contenido de AA del ingrediente.

CUADRO 5.15 PORCENTAJE DE HIDROLISIS DE LAS PROTEINAS DE HARINAS DE PESCADO UTILIZANDO LA DIGESTION IN_VITRO 1 (PEPSINA-PANCREATINA).

	HP - 1			HP -2			HP - 3		
	VITR.	ING	V/I	VITR.	ING	V/I	VITR.	ING	V/I
METIONINA	0.94	1.94	48.4	0.62	1.88	32.9	0.63	1.92	32.8
LISINA	2.40	5.37	44.7	2.50	5.09	49.1	1.94	5.10	38.8
VALINA	1.32	3.04	43.4	1.19	3.14	37.9	0.48	3.19	15.0
LEUCINA	2.79	4.74	58.9	2.49	4.69	53.1	2.38	4.71	50.5
ALANINA	1.05	4.03	26.1	1.04	3.78	27.5	0.40	3.68	10.8

¹ Resultados normalizados al 91% de materia seca.

² Contenido en AA de la digestión in_vitro 1, exento de los AA de las enzimas.

³ Contenido de AA del ingrediente.

⁴ Relación del contenido de AA de la digestión in_vitro 1, con respecto al contenido de AA del ingrediente.

La técnica empleada fue de difícil estandarización aumentando el error la falta de información para la preparación del hidrolizado antes de su determinación con el aminoanalizador.

Aun perfeccionada, la técnica tiene quizás como limitante para su uso rutinario, el alto costo del análisis de AA y su dificultad en estandarizarla lo que no permite establecer una relación con ningún otro parámetro con menor grado de dificultad por ejemplo el porcentaje de nitrógeno liberado.

DIGESTION IN VITRO 2

En el cuadro 5.16, se observa la disminución del pH de las pastas de soya y las harinas de pescado con respecto a su pH inicial (8.0) utilizando la técnica multienzimática de Hsú et al. (1977); como también un estimado del porcentaje de digestión in vitro, donde se asume que la disminución del pH de la caseína equivale a un 100% de hidrólisis total. Se puede notar que en las pastas de soya se presentó una disminución del pH mayor con respecto a las harinas de pescado; probablemente las enzimas actúan en forma diferente con diferente patrón de AA.

En trabajos presentados por Bellavier (1989) y Hsú et al. (1977), observaron un promedio en la disminución del pH mayor en las pastas de soya, de 6.51 y 6.73 respectivamente, con respecto a los valores promedio encontrados en este trabajo, de 7.15; esto debe ser ocasionado por la diferencia entre muestras de un mismo ingrediente. Sin embargo al comparar el porcentaje de digestión in vitro tomando el promedio de las pastas de soya estudiadas por Hsú et al. (1977), de 87.65%; de Bellavier (1989), de 84.58 y los datos del presente trabajo en promedio obtenido de 86.37, como se puede ver en el cuadro 5.16, muestra una diferencia menor al comparar porcentajes en lugar de pH.

Debido a que esta técnica multienzimática utiliza tripsina, la cantidad empleada en ésta, probablemente puede ser tomada por la presencia del inhibidor de esta enzima, presente en las soyas 1 y 3

CUADRO 5.16 VALORES DE DIGESTIBILIDAD TOTAL DE AMINOACIDOS UTILIZANDO LA METODOLOGIA IN VIVO Y LA DIGESTIBILIDAD IN VITRO 2

	pH ¹ s ²	DAAA ³ (%) ± s	DVAA ³ (%) ± s	DENZIM ⁴ (%) ± s
SOYA 1	7.18±0.00	78.89±5.48	86.33±4.06	85.85±0.11
SOYA 2	7.11±0.00	79.87±5.35	87.56±4.17	86.96±0.00
SOYA 3	7.15±0.01	83.01±4.74	90.83±3.27	86.32±0.22
HP-1	7.23±0.07	82.38±6.65	87.72±6.65	85.05±1.99
HP-2	7.23±0.01	84.66±5.19	90.18±5.19	85.05±0.22
HP-3	7.29±0.00	83.21±5.17	88.87±5.57	84.10±0.00
CASEINA	6.29±0.01			

¹ método multienzimático, pH inicial 8.0

² digestibilidad aparente de AA= AA consumidos - AA excretados/AA consumidos X 100. promedio de tres análisis y dos observaciones por análisis.

³ Digestibilidad verdadera de AA = AA consumidos - (AA excretados - AA endógenos)/AA consumidos X 100. promedio de tres análisis y dos observaciones por análisis.

⁴ Digestibilidad in vitro (Hsú, 1977)= 100 - ((pH del ingrediente - pH de la caseína/pH de la caseína) X 100). los datos son el promedio de dos replicas.

⁵ desviación estandar

ocasionando una menor hidrólisis; no obstante en la prueba in vivo la DVAA no fue afectada, quizás por que en el intestino delgado hay una mayor presencia de tripsina como respuesta compensatoria del páncreas impidiendo que la hidrólisis sea afectada. En trabajos de Bellavier (1989) la soya sobrecalentada presentó una menor hidrólisis (pH 6.54) con respecto a la soya con adecuado tratamiento (pH 6.48) indicando una probable eficiencia como método in vitro para control de calidad.

Por otro lado los valores de digestión enzimática para las harinas de pescado fueron bastantes similares en las tres muestras.

La correlación lineal obtenida del pH con respecto a la digestibilidad verdadera total de AA fue de 0.20 ($P < 0.05$) y la digestibilidad aparente total de AA fue de 0.46 ($P < 0.05$) diferente a la encontrada por Hsú et al. (1977) para la digestibilidad aparente total de AA de 0.90. los anteriores autores no determinaron la digestibilidad verdadera total de AA. Debido al menor número de muestras empleadas en este estudio no se pueden establecer comparaciones a través de una misma prueba estadística. Pocos trabajos se han publicado al respecto donde se comparen con un mayor número de ingredientes proteicos la digestibilidad verdadera total de AA en diferentes especies con respecto a la disminución del pH utilizando este método.

LISINA DISPONIBLE

Los resultados obtenidos de lisina disponible por métodos químicos y su comparación con los valores obtenidos de digestibilidad de lisina tanto verdadera como multienzimática, figuran en el cuadro 5.17.

Los porcentajes promedio de las determinaciones de lisina disponible en las harinas de pescado con el método de Carpenter (1960) hallados por Roach et al. (1967), de 85.68% son similares a los encontrados en este trabajo, de 86.92%; apoyando la teoría que el método de Carpenter (1960) puede ser utilizado para medir lisina disponible en fuentes proteicas de origen animal. Mientras que los resultados encontrados para las pastas de soya sobreestiman la disponibilidad de lisina, confirmando lo aseverado por los autores antes citados, que esta técnica es difícil aplicarla a productos vegetales por la formación de productos coloreados durante la hidrólisis, en presencia de carbohidratos y grupos amino de origen no proteico que son medibles coloriméricamente.

Batterham et al. (1984) han encontrado al utilizar esta técnica en pastas de soya, valores inferiores a los hallados en este trabajo; y con grandes variaciones dentro de un mismo ingrediente, reflejando la variación que puede haber dentro de un mismo laboratorio y confirmando lo establecido por autores como Batterham et al. (1986) que la técnica del FDNB no es conveniente para probar lisina disponible en fuentes vegetales.

CUADRO 5.17 COMPARACION DE DIFERENTES METODOS PARA DETERMINAR LISINA DISPONIBLE COMO PORCENTAJE DEL CONTENIDO TOTAL DEL INGREDIENTE.

	FDNB ¹ (%)	DVLIS ² (%) ± s ⁴	DENZI ³ (%) ± s
SOYA 1	106.18	86.63±1.47	85.85±0.11
SOYA 2	117.63	89.85±0.02	86.96±0.00
SOYA 3	132.21	92.62±1.45	86.32±0.22
HP-1	92.17	86.98±3.80	85.05±1.99
HP-2	84.48	88.57±1.41	85.05±0.22
HP-3	84.11	88.91±1.30	84.10±0.00

¹ fluoro, 2-4 dinitrobenceno, técnica de Carpenter (1960). los datos son promedio de dos réplicas.

² Digestibilidad verdadera de lisina= lisina consumida - (lisina excretada - lisina excretada en animales control) / lisina consumida X 100. los datos son el promedio de tres análisis y dos observaciones por análisis.

³ Digestión enzimática= 100 - ((pH del ingrediente - pH de la caseína/pH de la caseína) X 100).

⁴ Desviación estandar

Al comparar la técnica de Carpenter (1960) con los valores de digestibilidad de lisina verdadera promedio para pastas de soya y harinas de pescado, se encontró una correlación de .20 ($P < 0.05$), datos que están de acuerdo con Nordheim y Coon (1984) quienes concluyeron que la determinación biológica de lisina digerible por el método de Sibbald (1976) es una mejor alternativa para determinar este AA.

También es de notar, que la digestibilidad in vitro 2 usada para AA totales, ofrece datos similares a la digestibilidad verdadera de lisina al igual que lo encontrado por Bellaver (1989); siendo esta técnica enzimática más sencilla que la utilizada in vivo, ofreciendo una alternativa a considerar para futuros estudios con otras fuentes de proteína tanto de origen animal como vegetal diferentes a las ya estudiadas.

VI. CONCLUSIONES

- La utilización de pruebas in vivo para la determinación de AA disponibles constituye la prueba más eficiente; sin embargo, por lo dispendiosa el reemplazo de ésta por métodos del laboratorio constituye una buena alternativa.

- La metodología empleada por Cave (1988), quien usó las enzimas pepsina y pancreatina con análisis del perfil de AA en el sobrenadante es un método que proporciona resultados variables y muy bajos, en pastas de soya y harinas de pescado, contra los obtenidos en la digestibilidad in vivo debido a la dificultad en estandarizar esta técnica.

- La metodología usada por Hsü et al. (1977) por ser sencilla, rápida y obtener resultados similares a los in vivo, aparentemente constituye una buena opción como técnica de laboratorio. Sin embargo, en este estudio la poca cantidad de muestras no permitió establecer una comparación a través de una misma prueba estadística con otros trabajos.

- La técnica del FDNB, para conocer lisina disponible, es una medida eficiente para conocer rápidamente la calidad del procesado en fuentes de origen animal.

LITERATURA CITADA

- A.O.A.C., 1975. Official methods of analysis. 14th. ed. association of official analytical chemists. Washington, D.C.
- Akeson, W. R. and Stahmann, M.a., 1964. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. J. Nutr., 83:257.
- Batterham, E. S., Murison, R. D. and Andersen, L. M., 1984. Availability of lysine in vegetable protein concentrates as determined by the slope-ratio assay with growing pigs and rats and by chemical techniques. Br. J. nutr., 51:85.
- Batherham, E. S., Darnell, R. E., Herbert, L. S. and Major, E. J., 1982. Effect of pressure and temperature on the availability of lysine in meat and bone meal as determined by slope-ratio assays with growing pigs, rats and chicks and by chemical techniques. Br. J. Nutr., 55:441.
- Bellaver, C., 1989. Estimation of amino acids digestibility and its usefulness in swine feed formulation. Thesis ph.D. The Graduate College, university of Illinois at Urbana -Champaign, Urbana, Illinois.
- Bjarnason, J. and Carpenter, K. J., 1969. Mechanisms of heat damage in proteins. 1 Models with acylated lysine units. Br. J. Nutr., 23:859.
- Booth, V. H., 1971. Problems in determination of FDNB-available lysine. J. Sci. Fd Agric., 22:658.
- Bragg, D. B., Ivy, C. A. and Stephenson, E. L., 1969. Method for determining amino acid availability of feeds. Poul. Sci., 48:2135.
- Bryden, W. L., Siriwan, P. and Annison, E. F., 1988. Amino acid digestion and availability. Proceedings Symposium: Poultry Research Foundation within the university of Sydney., p.98.
- Carpenter, K. J., 1960. The estimation of the available lysine in animal protein foods. Biochem. J., 77:604.
- Carpenter, K. J., 1973. Damage to lysine in food processing: its measurement and its significance. Nutr. Abstr. Rev., 43:423.
- Cave, N. A., 1988. Bioavailability of amino acids in plant feedstuffs determined by in vitro digestion, chick growth assay and true aminoacid availability methods. Poul. Sci., 67:7
- Coon, C. N., 1981. The availability of amino acids in poultry feeds. Official proc., 16th Ann. Pacific Northwest Animal. Nutr. Conf., Boise, Idaho, p.68.
- Eklund, A., 1976. On the determination of available lysine in

- casein and rapeseed protein concentrates using 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS) as a reagent for free epsilon amino group of lysine. Anal. Biochem., 70:434.
- Elwyn, D. H., 1968. Modification of plasma amino acid patterns by the liver. Protein nutrition and free amino acid patterns. James H. Leatham Rutgers university press, New Brunswick, N.J
- Engster, H. M., 1986. Update on amino acid availability in poultry. Proceedings Georgia nutrition conference for the feed industry., p.121.
- Engster, H. M., Cave, N. A., Likuski, H., McNab, J. M., Parsons, C. A. and Pfaff, F. E., 1985. A collaborative study to evaluate a precision-fed rooster assay for true amino acid availability in feed ingredients. Poul. Sci., 64:487.
- Finley, J. W. and Friedman, M. 1973. Chemical methods for available lysine 50:101.
- Gauthier, S. F., Vachon, C., Jones, J. D. and Savoie, L., 1982. Assessment of protein digestibility by in vitro enzymatic hidrolysis with simultaneous dialysis. J. Nutr., 112:1718.
- Green, S., Solange, L., Bertrand, Madeleine, J. C., Duron, J. C. and Maillard, R., 1987. Digestibilities of amino acids in soyabeen, sunflower and groundnut meals, determined with intact and caectomised cockerels. Br. Poul. Sci., 28:643.
- Hall, R. J. and Henderson, K., 1979. An improvement in the determination of available lysine in carbohydrate-rich samples. Analyst., 104:1007.
- Hamerstrand, G. E., Black, L. T. and Glover, J. D., 1981. Trypsin inhibitors in soy products: modification of the standar analitical procedure. Cer. Chem., 58:45.
- Holguin, M. and Nakai, S., 1980. Accuracy and specificity of the dinitrobenzenesulfonate methods for available lysine in proteins. J. Food Sci., 45:1218.
- Hollander, M. and Wolse, D., 1976. Nonparametric statistical methods. 1a. ed. Library of congress cataloging in publication data. U.S.A. p.201.
- Hsú, H. W., Vavak, L. D., Satterlee and Miller, G. A., 1977. A multienzyme technique for estimating protein digestibility. J. Food Sci., 42:1273.
- Johnston, J. and Coon, C. N., 1979. A comparison of six protein quality assays using comercially available protein meals. Poul. Sci., 58:919.
- Just, A., 1983. The role of the large intestine in the digestion

of nutrients and amino acid utilization in monogastrics: IVth. int. symp. protein metabolism and nutrition, Ed. NRA Clermont-Ferrand (France), p.289.

Kakade, M. L. and Liener, I. E., 1969. Determination of available lysine in proteins. *Anal. Biochem.*, 27:273.

Kakade, M. L., Rackis, J. J., McGhee, J. E. and Fuski, G., 1974. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. *Cer. Chem.*, 51:376.

Kessler, J. W. and Thomas, O. P., 1981. The effect of cecectomy and extension of the collection period on the true metabolizable energy values of soybean meal, feather meal, fish meal, and blood meal. *Poult. Sci.*, 60:2639.

Lehninger, L. A., 1978. *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular.* 2a. ed. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, España.

Larbier, M., 1985. Concepts and measurement of amino acid availability in chickens. *Proceeding symposium: poultry husbandry research foundation within the university of sydney.* p.99.

Liener, I. E., 1981. Factors affecting the nutritional quality of soya products. *World conference on soya processing and utilization, JAOCS,* p.406.

Likuski, H. J. A. and Dorell, H. G., 1978. A bioassay for rapid determination of amino acid availability values. *Poult. Sci.*, 57:1658.

McNab, J. M. and Shanon, D. W. F., 1974. The nutritive value of barley, maize, oats and wheat for poultry., *Br. Poult. Sci.*, 15:561

Morrison, R. T. y Boyd, R. N., 1976. *Química orgánica.* 1a. ed. en español, 3a. ed. en inglés. Fondo Educativo Interamericano, S. A., E.U.A.

Muztar, A. J., Slinger, S. J., Likuski, H. J. A. and Dorell, H. G., 1980. True amino acid availability values for soybean meal and tower and candle rapeseed meal determined in two laboratories. *Poult. Sci.* 59:605.

Nordheim, J. P. and Coon, C. N., 1984. A comparison of four methods for determining available lysine in animal protein meals. *Poult. Sci.*, 63:1040.

N.R.C., 1984. *National Research Council. Nutrient requirements of poultry.* 8th ed. National Academic Press, Whashington, D.C.

- Papadopoulos, M. C., 1985. Estimations of amino acid digestibility and availability in feedstuffs for poultry. *World's Poultr. Sci. J.*, 41:64.
- Parsons, C. M., 1985. Influence of caeectomy on digestibility of amino acid by roosters fed distillers' dried grains with solubles. *J. Agric. Sci.*, 104:469.
- Parsons, C. M., 1986. Determination of digestible and available amino acid in meat meal using conventional and caeectomized cockerls or chick growth assays. *Br. J. Nutr.*, 56:227.
- Parsons, C. M., 1990. Digestibility of amino acids in feedstuffs for poultry. Proceeding Maryland nutrition conference for feed manufacturers. University of Maryland. p.22.
- Parsons, C. M., Potter, L. M. and Brown, R. D., Jr., 1981. True metabolizable energy and aminoacid digestibility of dehulled soybeans meal. *Poult. Sci.*, 60:2687.
- Parsons, C. M., Potter, L. M. and Brown, R. D., Jr., 1982. Effects of dietary protein and intestinal microflora on excretion of amino acids in poultry. *Poult. Sci.*, 61:939.
- Parsons, C. M., Potter, L. M. and Brown, R. D., Jr., 1983. Effects of dietary carbohydrate and of intestinal microflora on excretion of endogenous amino acid by poultry. *Poult. Sci.*, 62:483.
- Porter, J. W. and Rolls, B. a., 1973. Plasma urea levels as indicators of dietary protein quality. *Proteins in human nutrition*. Academic press inc. (London) ltd.
- Raharjo, Y. and Farrell, D. J., 1984. A new biological method for determining amino acid digestibility in poultry feedstuffs using a simple cannula and the influence of dietary fibre on endogenous amino acid output. *Anim. Feed Sci. and Tecnology.*, 12:29.
- Rao, S. R., Carter, F. L. and Frampton, V. L., 1963. Determination of available lysine in oilseed meal proteins. *Anal. Chem.*, 35:1927.
- Rhodes, A. P. and Gill, A. A., 1980. Fractionation and amino acid analysis of the salt-soluble protein fractions of normal and high-lysine barleys. *J. Sci. Food Agric.*, 31:467
- Rhodes, A. P. and Mathers, J. C., 1974. Varietal differences in the amino acids composition of barley grain during development and under varying nitrogen supply. *J. Sci. Food Agric.*, 25:963
- Roach, A. G. Sanderson, P. and Williams, D. R., 1967. Comparison of methods for the determination of available lysine value in animal and vegetable protein source. *J. Sci. Fd Agric.*, 18:274.

- Salmon, R. E. and Dunkelgod, K. E., 1974. Nutritive and economic evaluation of wheat cultivars with varying protein levels: amino and fatty acid composition and performance in chick and poult diets. *Can. J. Anim. Sci.*, 54:619.
- Salter, D. N. and Coates, M. E., 1971. The influence of the microflora of the alimentary tract on protein digestion in the chick. *Br. J. Nutr.* 26:55.
- Sheffner, L., Adachi, R. R. and Spector, H., 1956. Measurement of the net utilization of heat-processed proteins by means of the pepsin digest-residue (PDR) amino acid index. *J. Nutr.*, 60:507.
- Sibbald, I. R., 1976. A bioassay for true metabolizable energy in feedingstuffs. *Poult. Sci.*, 55:303.
- Sibbald, I. R., 1979a. A bioassay for available aminoacids and true metabolizable energy in feedingstuffs. *Poult. Sci.*, 58:668.
- Sibbald, I. R., 1979b. Bioavailable amino acids and true metabolizable energy of cereal grains. *Poult. Sci.*, 58:934.
- Sibbald, I. R., 1980. The effect of heat on the clearance time, true metabolizable energy, and true available amino acids of raw soybean flakes. *Poult. Sci.*, 59:2358.
- Sibbald, I. R., 1981. Metabolic plus endogenous energy and nitrogen losses of adult cockerels: the correction used in the bioassay for true metabolizable energy. *Poult. Sci.*, 60:805.
- Sibbald, I. R., 1987. Bioavailable amino acid estimation. *Can. J. Anim. Sci.*, 67:222.
- Sibbald, I. R. and Morse, P. M., 1982. Effects of the nitrogen correction and of feed intake on true metabolizable energy values. *Poult. Sci.*, 62:138.
- Sibbald, I. R. and Wolynetz, M. S., 1986. Variation in dietary dry matter and the effects on accuracy of feed intake related data. *Poult. Sci.*, 65:1220.
- Scott, M., Nesheim, M. and Young, R., 1982. Nutrition of the chicken. 3th ed. M.L. Scott & Associates, Ithaca, New York. p.61.
- Soares, J. H., Jr., Miller, D., Fitz, N. and Sanders, M., 1971. Some factors affecting the biological availability of amino acids in fish protein. *Poult. Sci.*, 50:1134.
- Splitter, J. and Shipe, W. F., 1976. Enzymatic hidrolisis and role bioassay for estimation of the nutritive quality of maize. *J.*

Food Sci., 41:1387.

Stell, G. D. R. y Torrie, H. J., 1985. Bioestadística. 1a. ed. en español, 2a. ed. en Inglés, McGraw-Hill, Colombia, p.188.

Tejada, H. I., 1985. Manual de laboratorio para análisis de ingredientes utilizados en la alimentación animal. Patronato de apoyo a la investigación y experimentación pecuaria en México, A.C., Palepene, INIF-SARH.

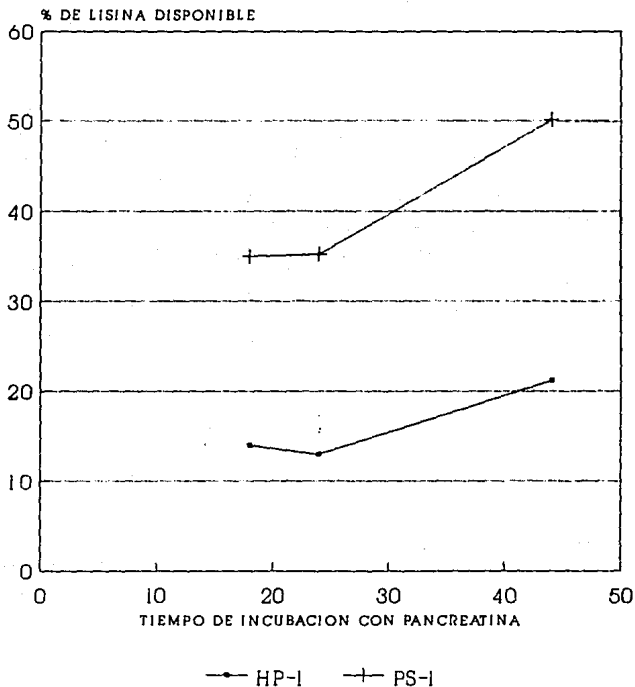
Ward, N. 1989. Regresion estimates of amino acids in ingredients. Degussa Corporation.

Zimmerman, R. A. and Scott, H. M., 1965. Interrelationship of plasma amino acid levels and weight gain in the chick as influenced by suboptimal and superoptimal dietary amino acid concentrations of single amino acids. J. Nutr. 87:13.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

**LISINA DISPONIBLE (%) LIBERADA DURANTE
LA INCUBACION CON PANCREATINA A
DIFERENTES TIEMPOS EN PS-I Y HP-I**

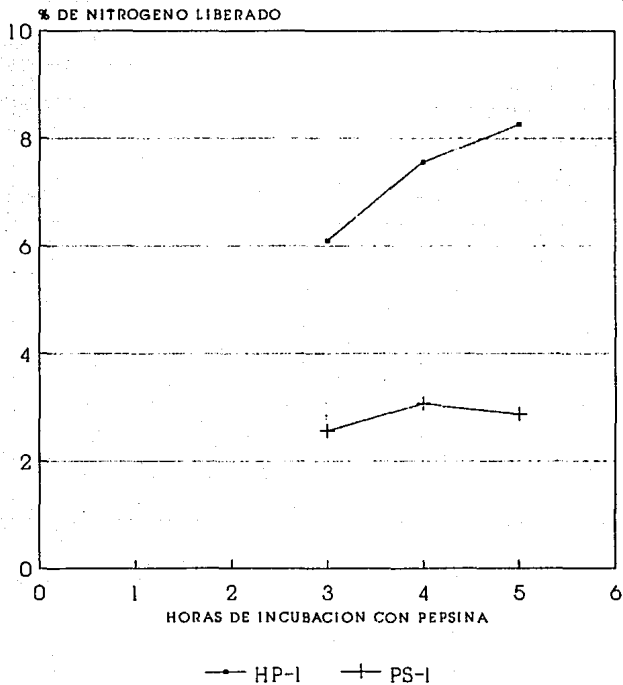
1



GRAFICA 5.1

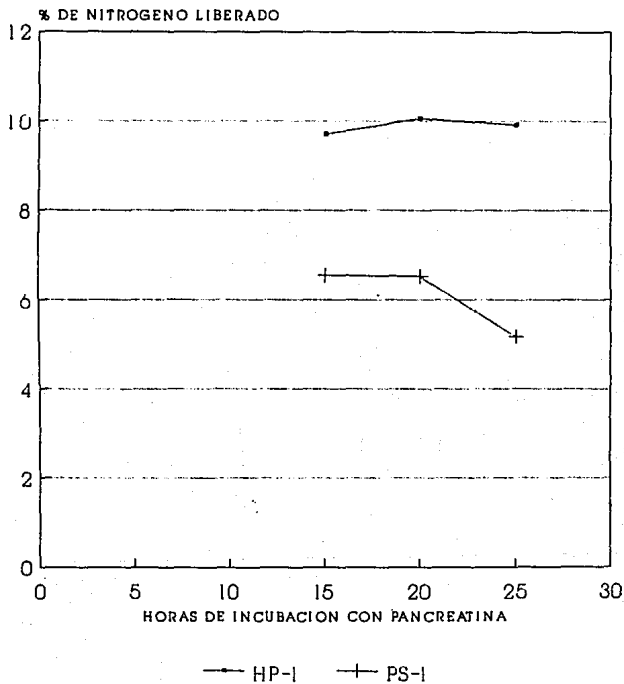
**NITROGENO LIBERADO (%) DURANTE LA
INCUBACION CON PEPSINA A DIFERENTES
TIEMPOS EN PS-1 Y HP-1**

11



GRAFICA 5.2

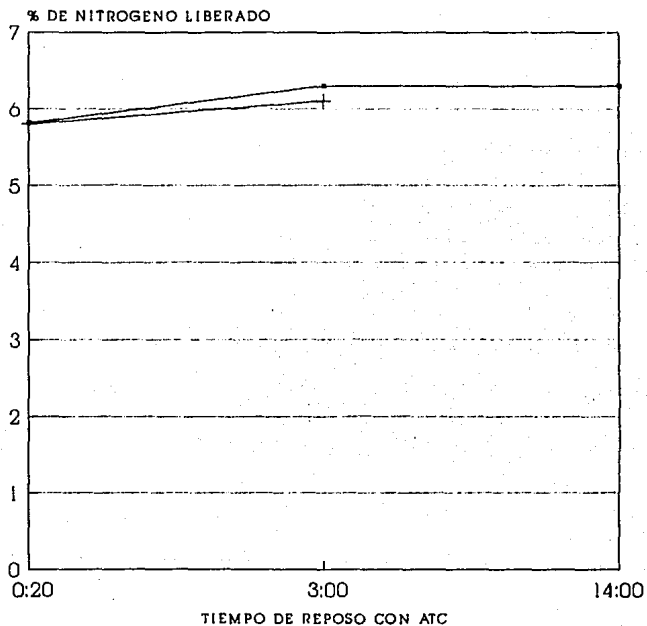
**NITROGENO LIBERADO (%) DURANTE LA
INCUBACION POR 4 Y 5 HORAS CON PEPSINA
PARA LA PS-1 Y HP-1 RESPECTIVAMENTE;
SEGUIDA CON PANCREATINA A DIFERENTES TIEMPOS**



GRAFICA 5.3

**NITROGENO LIBERADO (%) DE PS-1 CON
DIFERENTE TRATAMIENTO TERMICO DIGERIDA
CON PEPSINA, PRECIPITADA CON ATC CON
DIFERENTE PERIODO DE REPOSO**

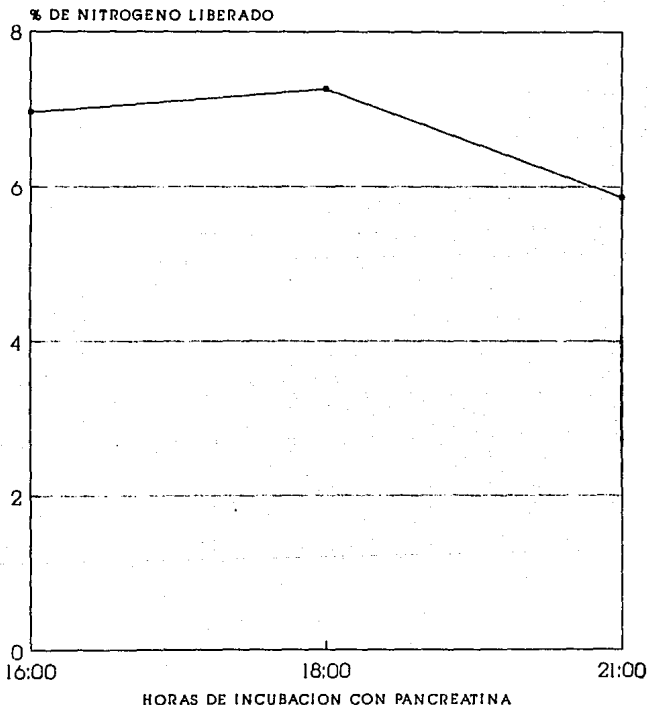
iv



—●— SIN TRATAMIENTO —+— SOBRECALENTADA

GRAFICA 5.4

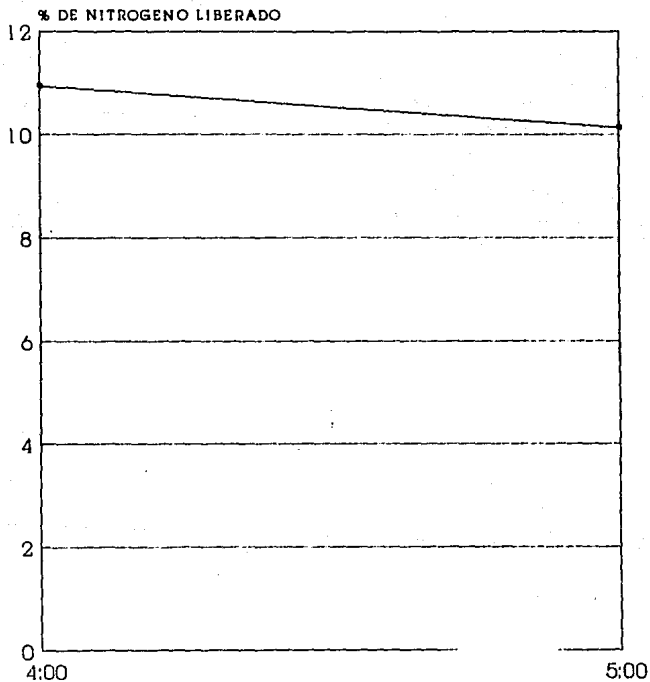
**NITROGENO LIBERADO (%) DURANTE LA
INCUBACION EN PASTA DE SOYA I
CON PEPSINA POR 4 HORAS SEGUIDA DE
PANCREATINA A DIFERENTES TIEMPOS**



GRAFICA 5.5

**NITROGENO LIBERADO(%) DURANTE LA
INCUBACION EN HARINA DE PESCADO 1 CON
PEPSINA. A DIFERENTES TIEMPOS, SEGUIDA
POR 21 HORAS CON PANCREATINA.**

vi



GRAFICA 5.6