



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION BIOLOGICA DE LA CALIDAD
PROTEINICA DE HARINA Y ENSILADO DE
PESCADO SIERRA (*Scomberomorus sierra*).

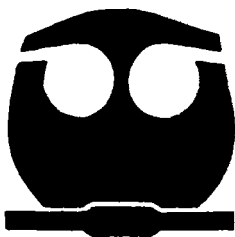
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

MIREYA MEDEROS MICHEL



MEXICO, D. F. EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2005

m340797



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recopilational.
NOMBRE: MEDEROS MICHEL MIREYA

JURADO ASIGNADO:

FECHA: 07-02-05

FIRMA: 

PRESIDENTE: **Profra. Ángela Sotelo López**
VOCAL: **Prof. Bernardo Lucas Florentino**
SECRETARIO: **Profra. Lucía Gabriela Bascuñán Termini**
1er. SUPLENTE: **Profra. Lucía Cornejo Barrera**
2do. SUPLENTE: **Profra. Gabriela López Velasco**

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio 111 del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. ÁNGELA SOTELO LÓPEZ




SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. ROSA MARIA ARGOTE ESPINOSA



SUSTENTANTE:

MIREYA MEDEROS MICHEL





*Para mis padres:
Manuel y Gloria*

*Para mis hermanos:
Mario y Miguel.*





Con Dios, por mostrarme siempre el camino; por el entorno y la familia que me dio.

A mis padres Manuel y Gloria. Esto es por ustedes; por su amor, paciencia y respeto; por corregirme e inculcarme valores que me hicieron tener la capacidad de actuar productivamente, porque me guiaron en la solución de mis problemas y porque crecí con seguridad hasta este gran paso de mi vida. Los amo por ser mi motivo.

A mis hermanos Mario y Miguel, les dedico también este trabajo, pues siempre mostraron solidaridad conmigo; mis caídas las sufrí con ustedes, pero mis triunfos también son suyos. Gracias por su ayuda, sus desveladas, sus corajes, sus consejos y por ser como son. Soy afortunada por tener un ejemplo y un sentido, simplemente al pensar en ustedes. Los quiero.

A Gaby, por esa "chispa" que traes a esta familia, por tu cariño, tu comprensión, las pláticas juntas y por confiar en mí.

Gracias a la UNAM descubrí mi gusto y aptitud por la Química, permitiéndome también realizar uno de mis mayores sueños.

A la Maestra Ángela Sotelo, pues fue por ella que conocí el área que más me apasiona: la Nutrición. Maestra, le agradezco de corazón la oportunidad brindada y su trabajo para formarme como profesionista.

Agradezco también el ejemplo, el esfuerzo y las valiosas aportaciones brindadas por mis maestros y miembros del jurado, Bernardo Lucas y Lucía Bascuñán.

A mis profesores de la Facultad, especialmente a la maestra Ma. Del Carmen Parra, pues me hizo ver que no hay que desanimarse en los momentos difíciles, hay que esforzarse y ser perseverante.

A mis maestros y compañeros del laboratorio 111: la maestra Rosita, Lety, Iliana, Arge, Fabiola y Héctor, por su gran ayuda durante la realización de este trabajo, por los momentos amenos, por su ejemplo, pero principalmente por su amistad.
A la Sra. Vicky por sus sabios consejos, su alegría, su optimismo y por recordarme que la familia y una mente saludable son lo más importante en la vida.





A mis tíos Mario, Gerardo, Anita, Bety, Raúl, Malena, María y Martín;
por sus atenciones, porque siempre he contado con su apoyo
y porque sé que siempre estarán ahí cuando los necesite.

A mis amigos de la facultad: Faby, Karina, Cecy, Armando, Maribel, Luis, Paco y Karinita,
porque ustedes son parte de este logro. Me echaron la mano cuando más lo necesité, me
escucharon, se rieron y sufrieron conmigo; en mí hay algo de cada uno
de ustedes que me hará tenerlos siempre presentes.

A mis compañeros Raúl Ortega, Gaby Albarrán, Elizabeth Brindis, Vanessa Ortiz, Jesús
Gamboa, Ana Lilia, Karina Galicia, Ana Laura, Anahí Soria, Jorge Hernández y Eduardo
Calderón, porque la amistad es algo que se puede expresar con una sola palabra:
Gratitud.

A la familia Méndez Pérez, por todo su apoyo, su cariño y porque sé que cuento
con ustedes para lo que sea; especialmente a la Sra. Susana
por tratarme como un miembro más de su familia.

A Paco, porque solo tú has logrado descubrirme, por tu amor, tu paciencia y
porque simplemente mucho de este trabajo te lo debo a ti. Me enseñaste a confiar en
mis capacidades; contigo fui uno solo, pero a su vez cada uno era una entidad diferente,
lo que me enseñó a ser más fuerte para soportar este trabajo de años.
Por ser mi cómplice... te amo.

*“Los que sueñan de día son conscientes de muchas cosas
que escapan a los que sueñan sólo de noche...”*

Edgar A. Poe





Índice

TEMA	PÁGINA
RESUMEN	1
ANTECEDENTES	3
Características del Pez Sierra	4
Ensilado	5
Importancia del ensilado	5
Elaboración del ensilado	6
<i>Ensilado ácido</i>	6
<i>Ensilado biológico</i>	7
<i>Ensilado alcalino</i>	8
Composición química del ensilado de pescado	9
Cambios químicos en el ensilado	12
Ventajas en la obtención del ensilado de pescado	13
Desventajas	13
Factores que condicionan el valor proteínico	15
Determinación del valor proteínico de un alimento	17
Métodos biológicos	17
<i>Relación de Eficiencia Proteínica (REP)</i>	18
<i>Relación de Proteína Neta (RPN)</i>	19
<i>Digestibilidad de las proteínas (D)</i>	19
<i>Utilización Proteínica Neta (UPN)</i>	20
Métodos químicos	21
<i>Calificación Química</i>	21
Métodos enzimáticos y microbiológicos	22
OBJETIVOS	24





TEMA	PÁGINA
METODOLOGÍA	26
Diagrama general de la investigación	27
Materias primas	28
Harina de ensilado de pescado sierra	28
Harina de pescado sierra	28
Harina de maíz	29
Harina de sorgo	29
Análisis proximal	30
Determinación de humedad, método por secado	30
Determinación de cenizas totales	31
Determinación de proteína cruda, método Kjeldahl	32
Determinación de grasa, método Goldfisch	34
Determinación de carbohidratos totales	34
Prueba biológica de PER (Protein Efficiency Ratio)	36
Digestibilidad "in vivo"	41
Análisis estadístico	42
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
Composición proximal de las materias primas	44
Curva de crecimiento	47
Conversión alimenticia	49
Relación de Eficiencia Proteínica (REP)	50
Digestibilidad (D)	52
CONCLUSIONES	54
ANEXO	56
Anexo A	57
Anexo B	60
Anexo C	62
BIBLIOGRAFÍA	64





RESUMEN





El ensilado de pescado es un producto líquido, elaborado del animal entero o partes del mismo en el que se lleva a cabo la licuefacción de la masa por acción de enzimas proteolíticas presentes en él, con ayuda del ácido añadido, mismo que contribuye también a la degradación del hueso y a evitar el desarrollo microbiano. El ensilaje ofrece la ventaja de ser un método sencillo y barato de aprovechar los desperdicios y recortes de pescado en la industria, mediante el cual se obtiene un alimento para animales con una prolongada vida de anaquel.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la calidad proteínica de un ensilado de pescado sierra (*Scomberomorus sierra*), que es un pescado comercial muy barato, para conocer si ésta se había afectado significativamente durante la elaboración y el procesamiento, realizando la comparación con la harina del propio pescado y con mezclas del ensilado con harina de maíz y harina de sorgo, haciendo uso de la prueba biológica de REP (Relación de Eficiencia Proteínica). Además se determinó la digestibilidad "in vivo" de cada fuente proteínica, como otro indicador de su calidad.

Los resultados obtenidos mostraron que la calidad proteínica del ensilado se afectó negativamente en comparación con la harina de pescado, sin embargo, se presentó una mejora en la misma al suplementar el ensilado con sorgo y con maíz; por otro lado, la calidad proteínica de la mezcla de ensilado con sorgo fue mejor a la del ensilado con maíz, debido a que este último es deficiente en triptofano mientras que el sorgo tiene una importante cantidad de este aminoácido. Por esta razón se debe considerar al ensilado ácido de pescado como un producto de alta calidad nutrimental al mezclarlo con cereales que suplementen la deficiencia de triptofano del mismo; además es un producto económico, fácil de elaborar, con una buena estabilidad microbiana e inocuo para la alimentación animal.





ANTECEDENTES





CARACTERÍSTICAS DEL PEZ SIERRA

Es un pez muy abundante en las costas del Pacífico y del Golfo de México, lo que lo convierte en un pescado comercial de bajo costo; por este motivo se escogió para la elaboración del ensilado.

Nombre científico: (*Scomberomorus sierra*)₍₁₎.

Otros nombres: Sierra, sierra del Pacífico, serrucho, carite sierra, macarela sierra

Familia: *Scombridae*

Orden: *Perciformes*

Clase: Actinopterygii

Máximo tamaño: 99.0cm; máx. peso: 8,160g

Ambiente: Pelágico; marino; rango de profundidad: 0-12m

Clima: Tropical; 35°N-25°S

Importancia: Pesca comercial

Distribución: Pacífico Central Este: Océano Pacífico y Golfo de México, la Joya en sureste de California, USA a las Galápagos, la Isla Paita en Perú; recientemente reportados en Antofagasta, Chile.

Morfología: Espinas dorsales (total): 15-18; rayos dorsales (total):16-19; rayos terminales: 16-21; vértebras: 46-49. Proceso intrapelvico pequeño y bifido. Línea lateral gradualmente curva hacia abajo. Lados plateados con numerosos puntos cafés (naranjas en vida).

Biología: Aparece cerca de la superficie en aguas costales hasta los fondos de placa continental. Los adultos se alimentan de peces pequeños particularmente las anchoas. Es el pez más abundante en las costas del Pacífico de México y Centroamérica₍₁₎.





ENSILADO

En términos generales el ensilado se define como un proceso de preservación de forrajes húmedos, residuos agrícolas o subproductos de origen animal. Dicho proceso se lleva a cabo mediante la aplicación directa de ácidos o bien, por la producción de los mismos durante la fermentación y por la degradación debida a enzimas propias del material; de esta manera se cuenta con un buen número de productos empleados para la elaboración de ensilados, entre ellos el ensilado de pescado.

El ensilado de pescado es un producto líquido, elaborado de pescado entero, de fragmentos o desechos del mismo, donde se lleva a cabo la licuefacción de la masa por la acción de enzimas presentes en él, debido a la adición de ácido, el cual contribuye a la degradación del hueso y disminuye el pH entre 2 y 4, valor óptimo para la actividad enzimática de la pepsina del pescado y de otras enzimas proteolíticas; el producto resultante es un alimento para animales con una prolongada vida de anaquel, ya que si la acidificación es correcta, se almacena hasta por dos años sin putrefacción en un cuarto a temperatura ambiente⁽²⁻⁵⁾.

Importancia del ensilado de pescado

Una de las finalidades del ensilado de pescado es evitar los gastos de combustible, energía, maquinaria y equipo que requiere la producción de harina de pescado, convirtiéndose así en una solución en países donde las condiciones económicas y/o técnicas no permiten la implantación de opciones complejas. Es importante señalar que la elaboración de harina de pescado, aún cuando se realice en condiciones adecuadas, provoca una ligera pérdida de la calidad proteínica del pescado debido al calor utilizado en la desecación, situación que no se presenta con la elaboración del ensilado ya que no se aplican altas temperaturas.

Actualmente la conversión de desperdicios de pescado en ensilado líquido mediante la acidificación y autodigestión está logrando una producción comercial, especialmente en Dinamarca y Polonia^(3, 6).





Elaboración del ensilado

Ensilado ácido

Antes de la adición de ácidos las partes de pescado a utilizar deben molerse lo más fino posible, con la finalidad de que la distribución de las enzimas y del ácido sea homogénea, de lo contrario, se puede producir putrefacción en ciertas zonas si el pH no es lo suficientemente bajo para inhibir el crecimiento de microorganismos. Posteriormente se continúa con la adición de ácido para mantener el pH bajo. Si se utiliza un ácido inorgánico, como el clorhídrico o el sulfúrico, es necesario añadir suficiente cantidad para que el pH descienda a 2.0-2.5; si se usan ácidos orgánicos, como el ácido fórmico, el láctico o el acético, el pH desciende a 4.0-4.5. La mezcla se agita en forma periódica para acelerar la licuefacción y se mantiene a 37°C ya que a esa temperatura las enzimas proteolíticas funcionan más eficientemente y a temperaturas menores la hidrólisis es más lenta. La elección del ácido a emplear (inorgánico, orgánico o mezclas) dependerá de la disponibilidad, del costo y de las condiciones bajo las cuales se prepara el producto.

Si se utiliza pescado aceitoso, se debe separar el aceite a fin de evitar la posibilidad de olores desagradables en la carne de los animales que fueron alimentados con este ensilado. La separación del aceite puede realizarse después de la hidrólisis, calentando el ensilado a temperaturas de 65 a 70°C, realizando una decantación y posteriormente sometiéndolo a una centrifugación^(3, 6-9).

Finalmente el ensilado se debe conservar en recipientes que resistan la elevada acidez, también se debe eliminar todo el aire que sea posible, antes de cerrar herméticamente los recipientes, para evitar el enranciamiento. Este producto se mantiene en buen estado durante muchos meses, si la acidificación se realiza correctamente puede almacenarse a temperatura ambiente hasta por dos años.

La calidad del ensilado va a depender de la calidad de la materia prima y el grado de hidrólisis depende del tipo de materia prima, de su grado de frescura y de la temperatura del proceso^(2, 3, 6, 10).





El ensilado de pescado también se puede hacer mediante la adición de enzimas proteolíticas, generalmente de origen vegetal, principalmente bromelina (de piña) o papaína (de papaya); sin embargo, este proceso es más caro y complejo, por lo que se prefiere usar ácido y las enzimas digestivas del propio pez⁽³⁾.

Además del ensilado ácido, existen el ensilado biológico y el ensilado alcalino. La diferencia entre estos tres se basa en la técnica utilizada para realizar la hidrólisis de las proteínas (sobre todo el tipo de reactivo empleado).

Ensilado biológico

Es aquel que requiere la adición de una fuente de carbohidratos y un almacenamiento en condiciones anaerobias, el ácido que propicia la actividad enzimática es el ácido láctico producido durante la fermentación por bacterias previamente inoculadas⁽¹¹⁾.

Para lograr la fermentación microbiana, el material se conserva herméticamente, se adiciona una fuente externa de carbohidratos (ya que el contenido de éstos en el pescado es muy bajo) y se inocula la mezcla con el cultivo bacteriano. Además de servir como fuente de carbono, los carbohidratos actúan como fuente de energía y de algunos lactobacilos, sin embargo, en ocasiones es necesaria la adición de microorganismos específicos⁽³⁾.

Mediante este proceso ciertas bacterias fermentan los carbohidratos y producen el ácido láctico, que es el responsable de la conservación del producto, al disminuir el pH. Se han empleado muchos tipos de carbohidratos: salvado de arroz, patatas, yuca, melaza, harina de maíz.

Cuando sólo se emplea almidón, puede añadirse una enzima que lo convierta en monosacáridos, como ocurre con la amilasa de la malta.

Este proceso bacteriano es más difícil de controlar que el simple tratamiento de acidificación y en manos inexpertas puede dar lugar a la obtención de productos putrefactos^(6, 12).





Ensilado alcalino

Aunque el ensilado ácido ha sido el más común, se han tratado de desarrollar otros métodos con algunas variantes, en Islandia se ha intentado preservar la víscera del pescado bajo condiciones alcalinas utilizando amoniaco obteniendo buenos resultados, sin embargo, al igual que con el ensilado ácido, existe la posibilidad de que se dañen importantes aminoácidos, disminuyendo su calidad nutritiva; además es peligroso por la formación de lisinoalanina, un aminoácido que resulta tóxico en animales^(3, 10, 13).





Composición química del ensilado de pescado

El ensilado tiene similar composición y contenido de materia seca que el pescado del que procede. Se espera que el contenido de nitrógeno total, grasa y humedad sean iguales, pero si se utilizan ácidos inorgánicos el contenido de cenizas debe aumentar. En el ensilado se hace presente la trimetilamina (TMA), producto de la degradación bacteriana y enzimática del óxido de trimetilamina que contiene el pez vivo. El contenido de nitrógeno no proteínico (NNP) aumenta en el ensilado, debido principalmente a la presencia de aminoácidos libres, TMA y amoníaco.

Se ha demostrado que el ensilado de pescado puede ser una buena fuente de proteína (aminoácidos) y que su valor nutritivo es comparable al de la harina de pescado^(7, 8).

La carne de pescado se compone, principalmente, de agua, proteína y grasa. También se constituye por otros componentes minoritarios como son: bases nitrogenadas, aminoácidos libres, azúcares, minerales y vitaminas. El contenido de cada uno de ellos dentro de una misma especie de pescado puede variar debido a la edad y tipo de alimentación del pescado, a diferencias estacionales, a la temperatura del agua, y a otros factores^(6, 14).

Agua. El porcentaje de agua es bastante constante en los peces magros, alcanzando por término medio un 80%, pero llega también al 83% en peces de estructura particularmente blanda. En los peces grasos las cifras son más variables. El pescado sierra tiene en promedio un contenido de humedad de 74.7%^(14, 15).

Proteínas. Estas son proteínas de alto valor biológico, comparables a las de la leche y el huevo, lo que las convierte en el componente más importante del pescado. Las proteínas del pescado no solo están bien proporcionadas en la





mayoría de los aminoácidos esenciales, sino que además son de fácil digestión y proporcionan elevadas cantidades de lisina y de triptofano, que está deficiente en la mayoría de los cereales. Las proteínas se hallan contenidas en la carne de pescado en un 17-20%. El pescado sierra tiene en promedio un contenido de proteína bruta de 19.43%₍₁₄₋₁₆₎.

Grasa. Este es el componente más variable en el pescado, tanto, que resulta necesario hacer una distinción entre pescados magros y pescados grasos. Lo que varía es la cantidad y tipo de depósito en el cuerpo, siendo una buena fuente de ácidos grasos Ω -3 y Ω -6. La elevada proporción de ácidos grasos insaturados supone una gran ventaja desde el punto de vista nutritivo, pero tiene el inconveniente de perjudicar la capacidad de conservación, puesto que todos los aceites de pescado tienden al enranciamiento. El pescado sierra tiene en promedio un contenido de extracto etéreo de 3.43%_(14, 15).

Componentes minoritarios:

Bases nitrogenadas. Estos compuestos pueden considerarse químicamente emparentados con el amoníaco. Dos de estos compuestos nitrogenados son el *óxido de trimetilamina* y la *urea*. Ambos son sólidos incoloros, el óxido de trimetilamina casi carece de olor y la urea carece totalmente. Las enzimas de ciertas bacterias convierten el óxido de trimetilamina en trimetilamina y producen amoníaco a partir de la urea, ambos de olor desagradable. La medición de trimetilamina (TMA) es un índice para conocer el grado de descomposición por bacterias₍₆₎.

Aminoácidos libres. Algunos aminoácidos se encuentran en forma de péptidos, en los que solo participan dos o tres moléculas de aminoácido en cada molécula del compuesto. Estos compuestos simples pueden considerarse conjuntamente con los aminoácidos libres. Entre los aminoácidos libres ocupan lugar preponderante la *glicina* y *β -alanina*. Dos compuestos que forman





proporciones importantes de los aminoácidos libres totales son la *taurina* y *creatina*; estas sustancias no intervienen en la constitución de las proteínas, sin embargo la *taurina* se halla estrechamente emparentada con la *cisteína*, que forma parte de las proteínas_(6, 14).

Carbohidratos. El contenido de hidratos de carbono es tan bajo que se puede despreciar en la composición del pescado. El principal azúcar libre de la carne de pescado es la *glucosa*. Esta participa en la reacción de pardeamiento, conocida como reacción de Maillard, en la que se produce un color oscuro y un aroma desagradable y si la reacción está suficientemente avanzada, los productos se hacen insolubles en agua. Esta reacción se lleva a cabo al calentar soluciones acuosas de aminoácidos y azúcares reductores. El aminoácido más afectado por esta reacción parece ser la *lisina*, ya que el grupo épsilon $-NH_2$ libre de la *lisina* reacciona selectivamente. La *ribosa*, se encuentra también en el pescado y es un agente de pardeamiento particularmente reactivo_(6, 17, 18).

Minerales. En general puede decirse que la carne de pescado se parece a la carne de mamíferos y aves en lo que se refiere a su contenido en minerales útiles. Los minerales contenidos en el pescado son: potasio, sodio, calcio, magnesio, hierro, cobre, manganeso, zinc, cobalto, fósforo, azufre, cloro y yodo. Algunos de estos elementos son tan abundantes en la mayoría de las dietas que su cantidad en el pescado apenas tiene interés₍₆₎.

Vitaminas. Todas las vitaminas necesarias para el hombre se hallan en el pescado, aunque su distribución en los diversos tejidos es muy irregular. El aceite de pescado es rico en las vitaminas liposolubles A y D. El hígado de pescado es más rico en vitaminas que el resto del organismo_(6, 14).





Cambios químicos en el ensilado

El ensilado ácido de pescado es un producto relativamente estable desde el punto de vista microbiológico, sin embargo las enzimas presentes en el material producen ciertos cambios cuando la autólisis se deja continuar; el porcentaje de nitrógeno de los aminoácidos libres aumenta mientras que el de los polipéptidos disminuye; una posterior degradación de los aminoácidos produce amoniaco ocasionando pérdidas de aminoácidos_(8, 19).

La autólisis no parece alterar la composición de aminoácidos de manera significativa; sin embargo hay informes de que el triptofano, por ser inestable en condiciones ácidas, constituye el primer aminoácido limitante en el ensilado de pescado, problema que se puede solucionar si se le mezcla con cereales ricos en este aminoácido, como el mijo y el sorgo, o una leguminosa como la soya; no con maíz, pues también es escaso en triptofano_(8, 20).

El material lipídico del pescado constituye una fuente concentrada de energía y contribuye además a los requerimientos esenciales de ácidos grasos. Sin embargo se pueden llevar a cabo procesos oxidativos, que son de gran importancia por los efectos antinutrimientales y la toxicidad de los hidroperóxidos que son altamente reactivos₍₁₆₎.

Algunos antioxidantes como el etoxiquín, el butilhidroxitolueno (BHT) y butilhidroxianisol (BHA) pueden ser utilizados para evitar la oxidación, sin embargo, permanece el riesgo de que la carne del animal se impregne de sabor. También se ha utilizado formaldehído para mantener la calidad del aceite dentro de rangos aceptables₍₂₁₎.

Los principales cambios que ocurren en ensilados de pescado son la oxidación de lípidos y la proteólisis enzimática, lo cual puede afectar su utilidad como fuente de alimento para animales₍₂₂₎.





Ventajas en la obtención de ensilado de pescado:

- Los costos de producción de ensilado de pescado a escala industrial resultan menores a los costos de producción de harina de pescado.
- En el proceso de elaboración de harina de pescado se presenta más fácilmente la contaminación bacteriana y posible presencia de toxinas.
- El ensilado de pescado puede utilizarse para aprovechar los desperdicios de pescado, ya que la carne utilizada para consumo humano representa alrededor del 40%, lo que significa que aproximadamente un 60% constituye un subproducto que puede ser utilizado en los ensilados como fuente de proteína para alimentación animal, evitando también la contaminación ambiental.

Desventajas:

- La elaboración de harina de pescado es bien conocida y existe una metodología bien establecida. La elaboración de ensilado, por el contrario, se está introduciendo apenas y no es ampliamente conocida.
- El ensilado líquido de pescado es 4-5 veces más voluminoso que la harina, lo que hace más cara cada unidad de proteína, ya que esta se encuentra diluida a diferencia de la harina, en la que se ha eliminado el agua.
- El gran contenido de agua en el producto plantea también un problema en la preparación de la ración.
- El ensilado líquido no puede distribuirse en sacos, por lo que el almacenamiento y transporte son más costosos, necesiéndose envases más caros que los utilizados en la harina^(2, 6, 9).





Aunque la principal desventaja en el ensilado es su alto contenido de agua, se puede solucionar secando el producto mediante la incorporación de una fuente energética, como son los cereales, a la vez que la dieta se hace más eficiente, pues las proteínas del pescado suplen las de los cereales. De este modo eliminamos todas aquellas desventajas asociadas con el alto volumen, facilitando el manejo, transporte y almacenamiento del ensilado.

En países como México, con frecuencia se encuentran productos agrícolas ricos en carbohidratos a precios relativamente bajos y que pueden mezclarse con el ensilado de pescado, ejemplos de estos son las harinas de trigo, maíz, arroz, sorgo, avena, cebada y centeno o la yuca y papa deshidratadas; empleando en el proceso un equipo simple y requiriendo una demanda tecnológica baja⁽³⁾.





FACTORES QUE CONDICIONAN EL VALOR PROTEÍNIC⁽²³⁾.

El valor nutritivo de un alimento está ligado a su contenido de aminoácidos esenciales.

Se sabe que las necesidades exactas de aminoácidos varían con la especie animal; mientras que el adulto humano requiere 8 aminoácidos (Ile, Leu, Lis, Fen, Met, Tre, Tri y Val), la rata requiere 10 (Ile, Leu, Lis, Tir, Cis, Tre, Tri, Val, His, Arg). Otros aminoácidos, aunque también sean esenciales para el animal, pueden ser sintetizados mediante interconversiones del aporte total de aminoácidos.

El valor proteínico de un alimento corresponde a su capacidad para satisfacer las necesidades del consumidor en nitrógeno y aminoácidos y asegurar así un crecimiento y mantenimiento convenientes. Esto depende de varios factores^(6, 23-26):

Calidad de las proteínas. La "calidad" de una proteína alimenticia depende de la naturaleza y cantidades de aminoácidos esenciales que contiene, lo que representa una medida de la eficacia de como el organismo puede utilizar esa proteína. Una proteína "equilibrada" o de "alta calidad", contiene los aminoácidos esenciales o indispensables en proporciones correspondientes a las necesidades del organismo.

Disponibilidad de aminoácidos. Los aminoácidos presentes en las proteínas de los alimentos no están siempre "disponibles" de forma total, porque la digestión de la proteína o la absorción de los aminoácidos puede ser incompleta. Generalmente, los aminoácidos de las proteínas animales se digieren y absorben en una proporción del 90%, mientras que los de algunas proteínas vegetales sólo pueden ser liberados y absorbidos en un 60-70%. Esta deficiente utilización de ciertas proteínas puede deberse a varios factores:





- 1) *La conformación de la proteína*; las proteasas atacan más lentamente a las proteínas insolubles que a las solubles. Sin embargo, frecuentemente, la desnaturalización proteínica por medio de un calentamiento moderado aumenta la digestión.
- 2) *La fijación* a las proteínas de metales, lípidos, ácidos nucleicos, celulosas y otros polisacáridos pueden disminuir parcialmente la digestión.
- 3) *La presencia de factores antinutrimientales*, tales como los inhibidores de tripsina y quimiotripsicos que pueden disminuir la digestión de las proteínas. Así mismo otros inhibidores alteran la absorción de los aminoácidos.
- 4) *El tamaño y la extensión de la superficie* de las partículas proteínicas ingeridas pueden influir en la digestibilidad. Por ejemplo, una fina molturación de la harina tiende a mejorar la digestibilidad de las proteínas de los cereales.
- 5) *Los tratamientos térmicos* a alta temperatura o a pH alcalinos/ácidos o en presencia de glúcidos reductores, bajan, frecuentemente, la digestibilidad proteínica y disponibilidad biológica de algunos aminoácidos, especialmente la lisina.
- 6) *Las diferencias biológicas* existentes entre individuos pueden afectar a su capacidad para digerir las proteínas y absorber los aminoácidos⁽²³⁾.





DETERMINACIÓN DEL VALOR PROTEÍNICAMENTE DE UN ALIMENTO

Para determinar el valor nutritivo de las proteínas se utilizan varios métodos biológicos o químicos, una vez valorada la proteína problema, resulta necesario compararla con un estándar o patrón^(23, 27).

En el presente escrito sólo se describen algunos de estos métodos:

Métodos biológicos.

Los ensayos biológicos se basan en medir el crecimiento o la retención de nitrógeno en animales experimentales (tales como las ratas) o en el hombre, en función del aporte proteínico. Para que la precisión sea satisfactoria y los datos significativos, hay que utilizar varios animales para cada ensayo e interpretar los resultados estadísticamente, normalizando las condiciones experimentales. Generalmente se mantiene bajo el nivel proteínico de la ración (alrededor del 10% en la dieta), de forma que el aporte proteínico resulte inferior a las necesidades. También tiene que ser apropiado el suministro de energía y de los restantes nutrimentos. En esas condiciones, la proteína se utiliza eficazmente y los resultados experimentales señalan las diferencias de valor nutritivo de las proteínas estudiadas reflejando el máximo valor de cada una de ellas⁽²³⁾.

Dentro de las ventajas del uso de animales de laboratorio se encuentra que la metodología es más flexible que la que se puede utilizar con los humanos, ya que se logra tener control sobre la dieta cuantitativamente. Además la genética y el ambiente son controlables, permitiendo la evaluación de variables específicas^(28,29).

Existen factores que ejercen influencia sobre los resultados de los bioensayos como son⁽³⁰⁾:

- Edad y sexo del animal
- Cepa





- La calidad y cantidad de proteína
- Tiempo de experimentación
- Condiciones ambientales

Relación de Eficiencia Proteínica (REP)

En 1919, Osborne, Mendel y Ferry introdujeron el concepto de Relación de Eficiencia Proteínica; este procedimiento, con ligeras modificaciones, es el más utilizado dentro de las pruebas biológicas en la evaluación de una fuente de proteína. Consiste en controlar el crecimiento de ratas jóvenes, alimentadas con la proteína problema bajo condiciones estandarizadas y se calcula como la ganancia en peso (gramos) de los animales por gramo de proteína ingerida. Los autores recomendaban administrar cada proteína a su concentración óptima en la dieta, pero como esta concentración varía de una proteína a otra (el nivel será más bajo, cuanto mejor sea la calidad), por convención internacional, para evitar ensayos previos, las proteínas se ensayan a una concentración de 10% en la dieta. El experimento se realiza con ratas de alrededor de 21-23 días de edad, manteniéndolas en jaulas individuales y el ensayo dura 3-4 semanas. Las condiciones para la determinación de la REP fueron reportadas por la AOAC (Association of Official Analytical Chemist) e incluyen el empleo de dietas, animales y duración de la prueba estandarizados^(27, 30-33).

El método tiene como ventajas: 1) necesita poco trabajo analítico: la única determinación que se requiere es la del nitrógeno en la dieta; 2) se puede aplicar cálculo estadístico, por trabajar con jaulas individuales; 3) puede ensayarse en cualquier organismo en crecimiento, incluso en niños menores, esto cuando se usan alimentos convencionales⁽²⁷⁾.

Las principales desventajas son: 1) no siempre el peso ganado es fiel reflejo de la proteína depositada; determinadas dietas pueden provocar retención de agua y/o depósito exagerado de lípidos; 2) algunas proteínas administradas al 10% no producen crecimiento e incluso pueden condicionar descenso del peso; en estos casos el numerador es cero o negativo y después de cuatro semanas de





experimentación no se obtiene ningún resultado; 3) los resultados se ven influenciados por la cantidad de dieta ingerida y, por lo tanto, la palatabilidad incide en forma importante⁽²⁷⁾.

Para reducir el error experimental al mínimo es necesario una estricta estandarización del procedimiento, las condiciones climáticas son de las más importantes. La temperatura del cuarto debe estar entre 22 y 24°C, la humedad relativa entre 50 y 65%. El peso, la cepa y el sexo de los animales experimentales deben ser estandarizados, teniendo como prerequisite utilizar animales sanos. El rango en el peso inicial de los animales no debe variar en más de 10g⁽³⁰⁾.

Este método es el más simple para evaluar la calidad de una proteína, se calcula al final del bioensayo y se define como:

$$\text{REP} = \text{ganancia en peso (g)} / \text{proteína ingerida (g)}$$

Relación de Proteína Neta

Cuando se incluye en el cálculo del REP la pérdida de peso de un grupo de ratas alimentadas con un régimen exento de proteínas, éstas últimas pueden valorarse por su capacidad para el mantenimiento y crecimiento con lo que nos dan un valor conocido bajo el término de **RPN** (Relación de Proteína Neta). En este ensayo se asume que la proteína requerida para prevenir la pérdida de peso de las ratas alimentadas con la dieta exenta de proteínas, es equivalente a las necesidades proteínicas para su mantenimiento. Este estudio solo requiere de 10 días de experimentación⁽²³⁾.

Digestibilidad de las proteínas

La digestibilidad (**D**) es un dato biológico y no es por sí solo un índice de calidad, es sólo uno de los factores condicionantes de ella. La digestibilidad es la fracción de nitrógeno ingerido que el animal absorbe. En general se sabe que los alimentos de origen animal son más digeribles que los de origen vegetal, lo anterior se atribuye a que tienen un menor contenido de fibra y como





consecuencia, hay una menor velocidad de tránsito en el tracto intestinal, que provoca una mayor absorción de nutrimentos^(27,34). La digestibilidad se expresa porcentualmente:

$$D = \frac{A}{I} \times 100, \text{ donde}$$

A = nitrógeno absorbido

I = nitrógeno ingerido

El nitrógeno absorbido se calcula por la diferencia del nitrógeno ingerido menos el nitrógeno fecal del individuo de experimentación. Sin embargo, en las heces siempre se está eliminando una cantidad de nitrógeno que no proviene de la dieta, sino de la descamación del tubo digestivo, de los jugos y secreciones y de la flora intestinal, que constituye una pérdida inevitable de nitrógeno, para eliminar este error se determina el nitrógeno fecal de animales alimentados con una dieta libre de nitrógeno⁽²⁷⁾.

Utilización Proteínica Neta

El método de utilización proteínica neta, **UPN** es original de Miller y Bender⁽³⁵⁾ y consiste en medir el porcentaje de nitrógeno retenido en el organismo (R), que el animal ingiere (I):

$$UPN = R/I \times 100$$

I = nitrógeno ingerido

R = nitrógeno retenido

Se puede realizar el cálculo del nitrógeno retenido como la diferencia entre el nitrógeno corporal alcanzado al final del ensayo menos el nitrógeno corporal que había al inicio del mismo, lo que de hecho no es posible en las mismas ratas; además, habría que considerarse el nitrógeno endógeno excretado. Una manera más práctica sería plantear la diferencia entre el nitrógeno corporal de ratas alimentadas con la dieta en ensayo menos el nitrógeno corporal de ratas alimentadas durante el tiempo con una dieta apteica (libre de nitrógeno). Pero determinar nitrógeno corporal es más complicado^(27, 35).





Métodos químicos.

En la mayoría de los métodos químicos, el valor nutritivo de una proteína se determina sobre la base de su contenido en aminoácidos esenciales con relación a las necesidades humanas de los mismos⁽²³⁾.

Calificación Química

La Calificación Química (**CQ**) o índice químico de una proteína consiste en confrontar su composición de aminoácidos con la de una proteína patrón. En 1955 un Comité de Expertos de la FAO diseñó una proteína teórica, inexistente, constituida por una mezcla de aminoácidos esenciales en proporciones que, a la luz de los conocimientos habidos hasta ese momento parecía óptima como proteína patrón, se supuso que esta proteína teórica tenía una utilización de 100%. Se ha propuesto el uso de otros patrones: proteína de leche humana, de leche de vaca, de huevo entero de gallina, y en 1971, FAO lanzó otro estándar teórico, basado en las necesidades del preescolar. Pueden emplearse también los requerimientos de aminoácidos esenciales de la especie con la cual se trabaja en lugar de usar como patrón una proteína.

Con este método se observa cual de los aminoácidos de la proteína problema está más deficiente respecto al contenido del mismo aminoácido en la proteína patrón y se expresa porcentualmente, el aminoácido que es más deficiente que el resto de los aminoácidos recibe el nombre de limitante. El porcentaje más bajo define el grado de limitación y recibe el nombre de calificación química⁽²⁷⁾.

Para determinar la deficiencia de cada aminoácido, expresada en porcentaje se realiza el cálculo siguiente:

$$CQ = [(aa_{muestra}/total\ aa_{muestra}) / (aa_{patrón}/total\ aa_{patrón})] * 100$$

Los resultados se expresan como g de aminoácido / 16g nitrógeno que es equivalente a 100g de proteína.





El aminoácido que arroje el valor más pequeño será el aminoácido limitante y ese valor corresponderá a la calificación química.

Frente a los ensayos biológicos, esta calificación, en general, tiene un valor predictivo. La correlación entre los resultados de los ensayos biológicos y los índices químicos mejora cuando estos se corrigen según la "digestibilidad proteínica global", que puede determinarse por métodos enzimáticos rápidos *in vitro*^(23, 27).

Métodos enzimáticos y microbiológicos.

Los métodos enzimáticos empleados para evaluar la calidad proteínica, se basan en medir la liberación de aminoácidos esenciales después de la exposición de la proteína a la acción de una o varias proteasas bajo condiciones normalizadas; es decir, mediante una digestión enzimática *in vitro*, tratando de imitar la acción del sistema digestivo de mamíferos monogástricos.

Uno de estos métodos es el que utiliza la enzima lisina-d Descarboxilasa, ya que ésta es específica para L-lisina, la enzima empleada proviene de *Bacterium cadaveris* y al descarboxilar éste aminoácido produce CO₂ y cadaverina, ambos productos son fáciles de medir, por lo que su monitoreo permite determinar el contenido de lisina de un hidrolizado proteínico; para llevar a cabo esta medición se fija la enzima en la superficie de un electrodo específico de CO₂, cuantificando así este compuesto y considerándolo como una medida de la lisina disponible⁽³⁶⁾.

Satterlee⁽³⁷⁾ reportó un método en el que se utilizan las enzimas proteolíticas tripsina, quimotripsina y amino-peptidasa aunadas a la adición de una proteasa bacteriana, conocido como el método de las cuatro enzimas para estimar la digestibilidad de la proteína *in vitro*, el cual es una modificación de la técnica empleada por Hsu⁽³⁸⁾; la determinación de la digestibilidad se hace mediante una ecuación, donde se incluye el valor de pH de la muestra luego de cierto tiempo de iniciar la hidrólisis.





Por lo tanto, estos métodos permiten estimar la digestibilidad proteínica, el valor proteínico y/o la disponibilidad biológica de algunos aminoácidos y su empleo resulta muy interesante para una valoración rápida de los daños sufridos por las proteínas presentes en los alimentos durante los tratamientos industriales y su almacenamiento⁽³⁹⁾.

Algunos microorganismos tienen una necesidad en aminoácidos esenciales próxima a las del hombre o la rata y poseen a su vez sus propias enzimas proteolíticas, por lo que su crecimiento sobre las proteínas a estudiar puede utilizarse como un índice de calidad proteínica o de disponibilidad biológica de un aminoácido.

Ford⁽⁴⁰⁾ propuso la utilización de *Streptococcus zymogenes* para evaluar la disponibilidad de arginina, histidina, leucina, isoleucina, valina, metionina y triptofano, mediante su crecimiento, ya que es un microorganismo con un considerable poder proteolítico y requiere los mismos aminoácidos que son esenciales para el hombre, excepto la lisina. Este microorganismo puede hidrolizar proteínas mediante sus propias enzimas, pero el proceso es relativamente lento, por lo que el ensayo puede ser mejorado si las proteínas son sometidas previamente a un tratamiento con papaína.

Otro microorganismo útil en este tipo de estudios es el protozoo ciliado *Tetrahymena pyriformis* W., mediante el cual se evalúa la disponibilidad de lisina y de metionina puesto que requiere los mismos diez aminoácidos esenciales que el crecimiento de la rata, incluida la lisina, lo que le ofrece una ventaja sobre *S. zymogenes*⁽⁴¹⁾.

Otro uso de los métodos enzimáticos y microbiológicos es un ensayo propuesto por Satterlee⁽³⁷⁾, mediante el cual se determina la Relación de la Eficiencia Proteínica (REP) de una proteína alimentaria; para ello utilizan una ecuación que incluye los resultados del crecimiento de *T. pyriformis* bajo determinadas condiciones y los resultados de digestibilidad de la proteína de estudio obtenidos con el método de las cuatro enzimas.





OBJETIVOS





Objetivo General:

Determinar la calidad proteínica de harina y ensilado de pescado sierra (*Scomberomorus sierra*) mediante la prueba biológica de REP, así como de mezclas del ensilado con maíz y con sorgo.

Objetivos particulares:

1. Realizar el análisis proximal de la harina de pescado sierra y la harina del ensilado para elaborar las dietas a utilizar en la prueba biológica.
2. A cada una de las fuentes de proteína, determinar el valor de digestibilidad, como otro posible indicador de su calidad proteínica.
3. Determinar si la calidad proteínica del ensilado de pescado sierra se ve afectada por el proceso de ensilaje.
4. Conocer si la calidad proteínica del ensilado se mejora por la adición de maíz y de sorgo.



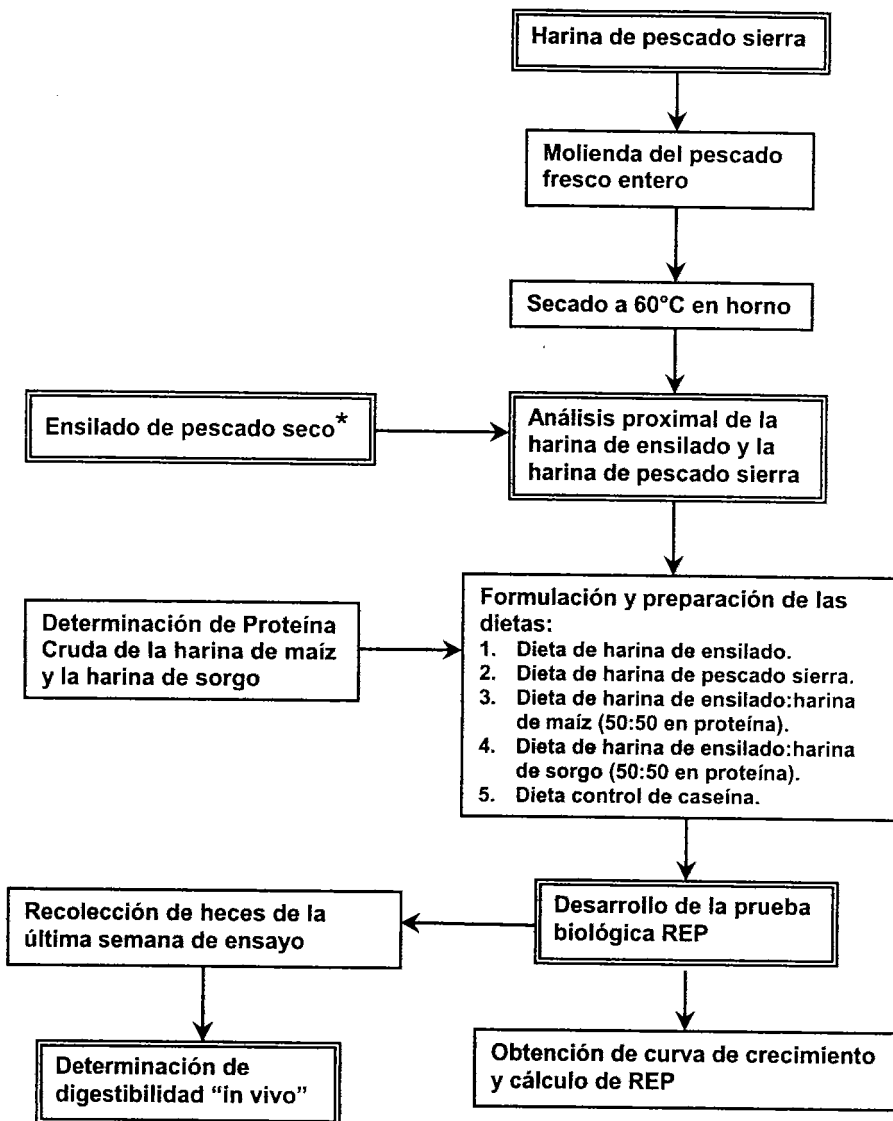


METODOLOGÍA





DIAGRAMA GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN



*El ensilado de pescado fue elaborado por el M. en C. Héctor Santana D., con adición de H_2SO_4 , pH=2.0-3.5 y a 37°C, cuyo procedimiento se describe a continuación⁽⁴²⁾.





PROCEDIMIENTO:

MATERIAS PRIMAS

♦ *Harina de Ensilado de Pescado Sierra*

El ensilado fue elaborado en el laboratorio 111 del Conjunto E de la Facultad de Química por el M. en C. Héctor Santana Delgado⁽⁴²⁾.

Preparación:

El producto fue preparado a partir de pescado sierra completo (vísceras, carne, piel y huesos).

Santana⁽⁴²⁾ realizó la hidrólisis con adición de ácido sulfúrico, a un pH de 2.0-3.5 a 37°C, alcanzando un grado de hidrólisis de 87.49% de NNP (nitrógeno no proteínico) y utilizando como antioxidante Terbutilhidroxiquinona (TBHQ).

El secado del ensilado lo realizó al sol durante 72 horas, a cielo abierto durante el día y con cubierta por la noche.

Molió el ensilado seco en un molino Thomas-Wiley, Mod. No. 4, hasta obtener una harina homogénea con tamaño de partícula máximo de 1mm de diámetro.

La harina fue envasada en frascos de vidrio color ámbar y almacenada en refrigeración.

Se midió el porcentaje de proteína en esta harina para la preparación de las dietas.

♦ *Harina de Pescado Sierra*

Preparación:

Se utilizó pescado sierra fresco, completo (*Scomberomorus sierra*).

El pescado fresco se cortó en trozos pequeños y posteriormente se licuó en un homogeneizador de alto torque marca MOMAT L-10, hasta obtener una pasta homogénea.





Enseguida se extendió sobre charolas de aluminio y se secó a 60°C en un horno FELISA Mod. 293A, volteando y mezclando con una pala de madera el producto aproximadamente cada 20 min, hasta que se obtuvo el producto deseado. Finalmente se molió en un molino Thomas-Wiley, Mod. No. 4, hasta obtener una harina homogénea con tamaño de partícula máximo de 1mm de diámetro. Se determinó el porcentaje de proteína en ésta para preparar la dieta.

◆ *Harina de Maíz*

Preparación:

Se utilizó maíz pozolero (*Zea mays* L.) seco.

Se molió en un molino Thomas-Wiley, Mod. No. 4, hasta obtener una harina homogénea con tamaño de partícula máximo de 1mm de diámetro.

◆ *Harina de Sorgo*

Preparación:

Se utilizó sorgo entero seco (*Sorghum vulgare*).

Se molió en el molino Thomas-Wiley, Mod. No. 4, hasta obtener una harina homogénea con tamaño de partícula máximo de 1mm de diámetro.

El objetivo de utilizar ambos cereales está relacionado con el triptofano, pues según los trabajos de Santana⁽⁴³⁾, este aminoácido es el limitante en el ensilado de pescado sierra utilizado. El sorgo contiene triptofano en cantidad importante, de modo que su utilización permitió conocer si existía algún tipo de suplementación de las proteínas de éste cereal con las del ensilado; por otro lado, el maíz es deficiente en triptofano, lo cual permitiría comprobar la deficiencia de este aminoácido en el ensilado al hacerlo todavía más limitante; por lo que, además de cumplir con las anteriores características, se eligieron estos cereales por ser productos comerciales de bajo costo, de uso común en nuestro país y porque se tenían a la mano. La utilización del maíz pozolero en particular, fue porque éste y el maíz palomero eran los únicos disponibles en el lugar de su adquisición y frente al palomero se tuvo preferencia por el primero.





ANÁLISIS PROXIMAL

Para que fuera posible ajustar las dietas de ensayo isocalóricas e isoproteínicas con respecto a la dieta control de caseína fue necesario contar con el análisis proximal de las materias primas.

El análisis proximal sólo se determinó en la harina de ensilado y en la harina de pescado. Para el caso de la harina de maíz y la harina de sorgo los valores fueron tomados de tablas de composición de los alimentos⁽¹⁵⁾, puesto que, por cuestiones de tiempo, no fue posible realizarles el análisis antes de iniciar la prueba biológica, solamente se les determinó el contenido de proteína cruda.

◆ *Determinación de Humedad, método por secado*⁽³³⁾:

Material y Reactivos

Balanza Analítica Sartorius

Desecador

Pesafiltros o charolas de aluminio

Estufa con corriente forzada BLUE-M. Mod. SW-17TA

Procedimiento

Primero se pusieron a peso constante las charolas de aluminio (de 2 a 4 horas) y se registró el peso de las charolas secas.

Posteriormente se adicionaron 2 gramos de muestra y se introdujeron las charolas con muestra en la estufa a 90-100°C. Se realizaron varias pesadas hasta comprobar que se eliminó toda el agua de las muestras, es decir, hasta que las muestras estuvieron a peso constante.

Cálculos

$$\% \text{ Humedad} = [(P_i - P_f) / m] 100$$

Donde:

P_i = peso charola con muestra antes de secada (en gramos)

P_f = peso charola con muestra después de secada (en gramos)

m = peso de muestra (en gramos)





♦ *Determinación de Cenizas totales*₍₃₃₎:

Fundamento

Las cenizas de los productos alimentarios están constituidas por el residuo inorgánico que queda después de que la materia orgánica se ha quemado. Las cenizas obtenidas no tienen necesariamente la misma composición que la materia mineral presente en el alimento original, ya que puede haber pérdidas por volatilización o alguna interacción entre los constituyentes.

Material y Reactivos

Mufla THERMOLYNE. Mod. 1500

Balanza analítica Sartorius

Mechero Bunsen

Crisoles de porcelana

Desecador

Procedimiento

Los crisoles se pusieron previamente a peso constante, colocándolos en una mufla a una temperatura de 600°C.

Se colocaron de 2-3 gramos de muestra molida en cada crisol y se pusieron a carbonizar a la flama del mechero, bajo una campana y con cuidado, ya que se desprendía una gran cantidad de humo. Cuando ya no se presentó desprendimiento de humo se introdujeron los crisoles a la mufla, la cual se encontraba entre 500-550°C. Se mantuvieron los crisoles en esas condiciones hasta obtener las cenizas. Por último se pesaron los crisoles fríos y secos con las cenizas, para calcular el % de cenizas totales.

Cálculos

El cálculo de cenizas en términos de porcentaje es el siguiente:

$$\% \text{cenizas totales} = \frac{\text{Pf} - \text{Po}}{m} \times 100$$

Donde,

Pf = peso del crisol con la muestra después de incineración (en gramos)

Po = peso del crisol a peso constante (en gramos)

m = peso de la muestra (en gramos)





♦ *Determinación de Proteína Cruda, método Kjeldahl*₍₃₃₎:

Antes de realizar la formulación de las dietas y ajustarlas al 10% de proteína con respecto a la dieta de referencia fue necesario determinar el contenido de proteína de todas las harinas y de la caseína utilizada en la dieta control.

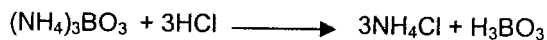
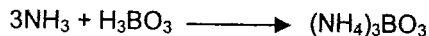
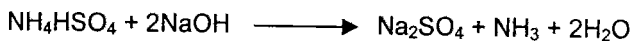
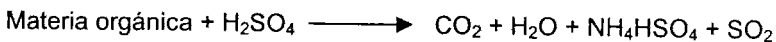
También se determinó el contenido de nitrógeno total en las dietas ya preparadas, para incluir estos valores en los cálculos de digestibilidad.

Fundamento

Este método en realidad determina el nitrógeno total contenido en una matriz alimenticia y se basa en la combustión en húmedo de la muestra por calentamiento con ácido sulfúrico concentrado en presencia de catalizadores metálicos y de otro tipo para reducir el nitrógeno orgánico de la muestra hasta nitrógeno inorgánico en forma de sal de amonio, el cual queda en solución en forma de sulfato ácido de amonio. El producto de la digestión, una vez alcalinizado, se destila directamente o por arrastre con vapor para desprender el amoniaco, el cual es atrapado en una solución de ácido bórico y posteriormente titulado₍₄₃₎.

El contenido de proteína es 6.25 veces el contenido de nitrógeno, ya que, por lo general, las proteínas contienen 16% de nitrógeno.

Las reacciones antes descritas se muestran a continuación:



Material y Reactivos

Digestor TECATOR, Mod. Ab-20/40

Equipo de microdestilación Kjeltex Auto Analyzer TECATOR Mod 1030

Tubos de digestión TECATOR de 75mL

Mezcla digestiva (3 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 50 mL de H_3PO_4 y 430 mL de H_2SO_4 conc)

Peróxido de hidrógeno al 30%

Sulfato de potasio (R.A.)





Solución de NaOH al 40%

Solución de ácido bórico con indicadores (ácido bórico 1%, rojo de metilo 0.0007% y 0.001% de verde de bromocresol)

Solución del HCl 0.01N valorada hasta la 4ª cifra decimal

Procedimiento

El contenido de proteína se determinó mediante el método 955.04 del AOAC, 1990, con las siguientes modificaciones:

Se colocaron aproximadamente 20 mg de las muestras de caseína, de harina de ensilado y de harina de pescado y aproximadamente 80mg de las muestras de harina de sorgo y de maíz (la cantidad a pesar depende del contenido de proteína) en los tubos de digestión y se adicionaron 0.5g de K₂SO₄ y 3mL de mezcla digestiva. Se colocaron en el digestor a una temperatura de 340°C. Después de 15 minutos en el digestor se sacaron los tubos y se mantuvieron a temperatura ambiente de 5-10 minutos, hasta que se enfriaron. Se adicionaron 1.5mL de H₂O₂ al 30% y se colocaron de nuevo en el digestor a 370°C, hasta que la mezcla de digestión fue transparente, con una coloración verdosa (aproximadamente 1.5 horas después). Se realizó la destilación del amoníaco liberado, recibiendo en ácido bórico con indicadores y valorando con HCl 0.01N valorado. Se utilizó como blanco dextrosa, la cual se sometió al mismo tratamiento que las muestras. Esta determinación se realizó por triplicado.

Cálculos

$$\% N_2 = \frac{(P - B) \times N \times \text{meq}}{m} \times 100$$

$$\% \text{ Proteína} = \% N_2 \times F$$

Donde:

%N₂ = porcentaje de nitrógeno

m = peso de la muestra (en gramos)

P = mL de la titulación de la muestra

F = factor de conversión (6.25)

B = mL de la titulación del blanco

N = normalidad de la solución de HCl

meq = miliequivalentes de nitrógeno (0.014)





◆ *Determinación de Grasa, método de Goldfisch*₍₃₃₎:

Fundamento:

La determinación del extracto etéreo incluye una gran variedad de compuestos orgánicos no polares; aquellos que se encuentran en gran cantidad incluyen la grasa verdadera, ácidos grasos y sus ésteres, vitaminas liposolubles y provitaminas, tales como son los carotenoides.

Al escoger el solvente de extracción (éter etílico, éter de petróleo o hexano), se deben tomar sus ventajas y desventajas para una buena elección. El éter etílico es el solvente más eficaz y se utiliza en el establecimiento de las normas existentes. La desventaja es que el material debe estar libre de agua o alcohol, ya que el éter húmedo disuelve el azúcar y algunos otros hidratos de carbono; por lo cual es indispensable que la muestra se encuentre seca.

Material / reactivos

Aparato de extracción Goldfisch, LABCONCO

Cartuchos de celulosa de 22x80mm

Portadadales

Tubos colectores

Anillos metálicos con rosca

Estufa de vacío LAB-LINE, mod. 3620

Vasos de borde esmerilado KIMAX

Éter etílico (anhidro)

Balanza analítica

Procedimiento:

Se utilizó la muestra previamente secada. Dentro de un cartucho de celulosa se colocaron de 2-5 gramos de muestra (dependiendo del contenido de grasa), y se envolvieron en papel delgado. El cartucho de celulosa se colocó en el portadadal y éste a su vez en el seguro metálico del aparato. A continuación se colocaron aproximadamente 50mL de éter etílico sobre el vaso de borde esmerilado, el cual estaba a peso constante y se aseguró este vaso al aparato de extracción. Para el calentamiento en el aparato se subió la parrilla hasta que estuviera en contacto



con el vaso y se abrió la llave del agua para que esta circulara sobre los refrigerantes. Se calentó hasta la extracción completa de la grasa.

Para verificar que se había extraído toda la grasa, se dejó caer una gota de la descarga sobre papel filtro y al evaporarse el éter este no dejaba residuo de grasa en el papel. Al finalizar se cambió el portadetal por un tubo colector y se calentó nuevamente para recuperar el éter del vaso en el tubo colector. Finalmente se colocó el matraz en la estufa de vacío para la completa eliminación de solvente y humedad, con el fin de obtener únicamente el peso de la fracción lipóide. Se pesó el vaso para medir la cantidad de extracto etéreo en la muestra.

Cálculos;

$$\% \text{ grasa total} = \frac{Pf - Po}{m} \times 100$$

Donde:

Pf = peso del vaso después de la extracción, sin disolvente y con grasa extraída (en gramos).

Po = peso del vaso vacío antes de la extracción (en gramos).

m = peso de la muestra seca (en gramos).

◆ *Determinación de Carbohidratos totales:*

Se sabe que el contenido de hidratos de carbono en el pescado es tan pequeño que resulta casi despreciable, por lo que éstos se determinaron por diferencia, mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Hidratos de carbono (\%)} = (\% \text{ humedad} + \% \text{ proteína} + \% \text{ grasa} + \% \text{ cenizas}) - 100$$





PRUEBA BIOLÓGICA DE RELACIÓN DE EFICIENCIA PROTEÍNICAS (REP)

Fundamento

Este método biológico es utilizado para evaluar la calidad de una fuente proteínica y se acepta que el incremento en peso de ratas destetadas alimentadas con una dieta, bajo condiciones estandarizadas, provee una medida confiable del valor nutritivo de la proteína, ya que si la dieta a probar es insuficiente en uno o más aminoácidos, el crecimiento puede ser reducido o detenido.

Para que la precisión sea satisfactoria y los datos significativos se trabaja bajo condiciones estandarizadas, en las cuales se deben utilizar varios animales para cada ensayo e interpretar los resultados estadísticamente, normalizando las condiciones experimentales (sexo y edad de los animales, periodo del ensayo, cantidad de proteína, condiciones ambientales, entre otros). El nivel de proteína debe suministrarse en un 10% del total de los ingredientes de la dieta y el suministro de energía y de los nutrimentos restantes tiene que ser en cantidad suficiente. El coeficiente REP se calcula como la ganancia en peso (gramos) obtenido por las ratas por gramo de proteína ingerida⁽²⁷⁾.

Material y Reactivos

Balanza granataria SAUTER (capacidad de 2kg con definición de 0.1g)

Mezcladora mecánica HOBART modelo N-50 o equivalente

Balanza para pesar animales de laboratorio

Parrilla de calentamiento

Vasos de precipitado de 250mL

Agitador de vidrio

Pipeta graduada de 5mL

Recipiente de plástico (30x40x20cm)

Tamizador o coladera con malla de acero inoxidable

Mortero con pistilo

Comedero para rata

Bebedero completo con su respectivo dispositivo de sujeción

Jaulas individuales para ratas





Caseína (De leche bovina. SIGMA C-3400)
 Glucosa (grado técnico)
 Dextrina (grado técnico)
 Sacarosa (grado técnico)
 Aceite de maíz (comercial)
 Manteca vegetal (comercial)
 Mezcla de sales (ICN Pharmaceuticals. No. Cat. 170760)
 Mezcla de vitaminas (ICN Pharmaceuticals. No. Cat. 904654)
 Celulosa en polvo (grado técnico)
 Fuentes de proteína (harina y ensilado de pescado, harina de sorgo
 y harina de maíz)
 Ratas macho recién destetadas cepa Wistar (20-23 días)

Procedimiento

Preparación de las dietas:

Las dietas de estudio fueron isoproteínicas e isocalóricas, guardando la misma proporción de ingredientes respecto a la dieta de referencia.

Para la formulación de las dietas de estudio fue indispensable contar con el análisis proximal de nuestras fuentes de proteína, de modo que se pudieran ajustar a nuestra dieta de referencia.

Las dietas que se utilizaron en el bioensayo fueron las siguientes:

- Dieta control de caseína (10% proteína).
- Dieta de harina de ensilado de pescado Sierra (10% proteína).
- Dieta de harina de pescado Sierra (10% proteína).
- Dieta de ensilado de pescado Sierra más harina de sorgo (10% proteína, 50:50).
- Dieta de ensilado de pescado Sierra más harina de maíz (10% proteína, 50:50).

En la tabla A se muestra la formulación de cada una de las dietas:





Tabla A. Contenido de ingredientes en cada dieta (% p/p)

INGREDIENTE	DIETAS				
	Control de Caseína	Harina de Pescado	Harina de Ensilado	Harina de Ensilado:harina de Maíz	Harina de Ensilado:harina de Sorgo
Caseína (89.19%)	11.21	--	--	--	--
Harina de Pescado	--	17.14	--	--	--
Harina de Ensilado	--	--	16.50	8.25	8.25
Harina de Maíz	--	--	--	67.66	--
Harina de Sorgo	--	--	--	--	48.45
Glucosa	20.10	20.02	20.01	3.20	8.66
Sacarosa	19.00	18.92	18.91	2.98	8.19
Dextrina	25.00	24.89	24.88	4.07	10.77
Aceite vegetal	6.00	3.74	4.38	3.94	4.58
Manteca vegetal	8.00	4.98	5.83	5.25	6.11
Mezcla de sales	4.00	2.73	2.70	2.66	2.67
Mezcla de vitaminas	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Celulosa	4.69	5.58	4.79	0.00	0.32

La fuente de proteína se homogeneizó en la mezcladora junto con todos los ingredientes sólidos excepto las vitaminas, posteriormente se adicionó la mezcla de lípidos (aceite y manteca fundida) y por último se adicionó la mezcla de vitaminas junto con la solución de colina. Una vez lista la dieta, se pasó por un tamiz o una coladera, para deshacer los grumos. Las dietas se pasaron a recipientes de plástico ámbar, se rotularon y se almacenaron en refrigeración durante todo el estudio.

Distribución de animales:

Se utilizaron 35 ratas macho, cepa Wistar, recién destetadas (edad de 20-23 días), y con un peso inicial de 40g con un rango de $\pm 10g$.





Al inicio del experimento las ratas se pesaron en forma individual, cuyo dato correspondió al peso inicial (Pi). Los animales se distribuyeron en cinco lotes de 7 ratas cada uno, mediante el método de "culebra japonesa", que consiste en que una vez que se ordenan los pesos de las ratas de menor a mayor, se distribuyen en zigzag entre los lotes. La diferencia de peso promedio entre los lotes no fue mayor a 1g.

Desarrollo del bioensayo:

Los animales se mantuvieron en jaulas individuales dentro del bioterio, con ciclos de luz/obscuridad de 12horas/12 horas, con temperatura controlada de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ y se colocó una charola de papel debajo de cada jaula para recuperar el alimento que desperdiciaban los animales.

Una vez que se organizaron los diferentes lotes, se les colocó a cada animal su respectiva dieta y agua *ad libitum*, manteniendo siempre estas condiciones.

El ensayo se mantuvo por espacio de 21 días y se registró el peso de los animales y del alimento ingerido tres veces por semana. Las pesadas se realizaron en el mismo horario, para obtener una menor variación en los resultados.

El peso de los animales registrado en el último día del ensayo correspondió al peso final (Pf).

Cálculos

Se elaboró la curva de crecimiento, la cual se obtuvo al graficar el promedio del incremento de peso acumulativo (peso del animal en cada día menos su peso inicial, en gramos) vs el tiempo de experimentación (en días) y se trazó en la gráfica el rango de variación de la ordenada, calculando el error estándar de la media (ESM); a continuación se muestran las fórmulas para su cálculo:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad s^2 = \frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n-1} \quad \sigma = \sqrt{s^2} \quad \text{ESM} = \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}}$$

Donde:

X = valor de la variable (variable=incremento de peso)

\bar{X} = valor promedio de la variable

σ = desviación estándar

s^2 = varianza

n = número de datos de la muestra





Se realizó el cálculo de conversión alimenticia, dividiendo los gramos de alimento ingerido entre el peso del animal del último día de ensayo, en gramos.

Para obtener el valor de REP se realizó el siguiente cálculo:

$$\text{REP} = \frac{\text{incremento de peso (en g)}}{\text{Proteína ingerida (en g)}} = \frac{\text{incremento de peso (en g)}}{\text{(alimento ingerido)(f) (en g)}}$$

f = contenido de proteína en la dieta problema (10%), expresado en fracción decimal = 0.1

Con cada uno de los valores individuales se calculó el REP promedio de cada lote en estudio, manejando solamente aquellos que dieran un coeficiente de variación, CV < 15%.

$$\text{C.V.} = \frac{\sigma}{\text{REP}} \times 100$$

σ = desviación estándar

También se calcularon los valores del REP ajustado, tomando como referencia el valor de 2.5 para la dieta de caseína.

$$\text{REP ajustado} = \text{REP (dieta estudio)} \times \frac{\text{REP CASEINA (Ref)}}{\text{REP CASEINA (Control)}}$$

REP CASEINA (Ref) = 2.5





DIGESTIBILIDAD "IN VIVO"

Fundamento

La digestibilidad de las proteínas se considera como un indicador de la biodisponibilidad de los aminoácidos, y es definida como la cantidad de los aminoácidos constituyentes de las proteínas, que son absorbidos por el organismo⁽³⁴⁾. Se considera que el contenido de nitrógeno absorbido equivale a la cantidad de aminoácidos absorbidos.

Material y Reactivos

Estufa con corriente forzada LAB-LINE, Mod. IMPERIAL III

Balanza analítica Sartorius

Mortero con pistilo

Digestor TECATOR, Mod. Ab-20/40

Equipo de microdestilación Kjeltac Auto Analyzer TECATOR Mod 1030

Tubos de digestión TECATOR de 75mL

Mezcla digestiva (3 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 50 mL de H_3PO_4 y 430 mL de H_2SO_4 conc)

Peróxido de hidrógeno al 30%

Sulfato de potasio (R.A.)

Solución de NaOH al 40%

Solución de ácido bórico con indicadores (ácido bórico 1%, rojo de metilo 0.0007% y 0.001% de verde de bromocresol)

Solución del HCl 0.01N valorada hasta la 4ª cifra decimal

Procedimiento

Se trabajó con las heces de los días 15 al 18 del ensayo REP y se registró el peso del alimento ingerido en ese período.

Las heces se recuperaron de las charolas de papel colocadas debajo de cada jaula y se separaron del alimento desperdiciado mediante una coladera.

Una vez colectadas las heces se secaron en una estufa a temperatura de $50 \pm 5^\circ\text{C}$.

Posteriormente se pesaron y molieron finamente en un mortero.

Las heces de cada una de las ratas se almacenaron en frascos de plástico por separado, para determinar la cantidad de nitrógeno en las heces.





Se determinó el nitrógeno total en heces mediante el método de Kjeldahl, anteriormente descrito, para cada una de las ratas de los diferentes lotes. Para el análisis se pesaron de 70-90mg de heces.

Para poder calcular la digestibilidad también se determinaron el contenido de nitrógeno total en la dieta, la cantidad de alimento ingerido por cada rata en ese periodo de recolección y el peso de las heces.

Cálculos

La digestibilidad (D) se expresa porcentualmente:

$$\text{Digestibilidad} = D = \frac{(\text{NI}-\text{NF})}{\text{NI}} \times 100$$

Donde:

NI = nitrógeno ingerido

NF = nitrógeno fecal

NI-NF = nitrógeno absorbido

El nitrógeno ingerido se calcula de la siguiente manera:

$$\text{NI} = \frac{(\text{g de nitrógeno de la dieta})(\text{peso alimento ingerido, en g})}{100\text{g de dieta}}$$

Y el cálculo para determinar el nitrógeno fecal es el siguiente:

$$\text{NF} = \frac{(\text{g de nitrógeno en heces})(\text{peso de las heces, en g})}{100\text{g de heces}}$$

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se empleó la prueba ANOVA de una vía con prueba de rangos múltiples de Turkey, con una probabilidad $p < 0.05$. El objetivo de utilizar esta prueba fue para determinar si existían diferencias significativas entre los valores de REP promedio y de digestibilidad promedio de cada dieta. Esta prueba se realizó empleando el programa estadístico Minitab® Release versión 14.12.





RESULTADOS Y
DISCUSIÓN





El análisis proximal realizado a la harina de pescado sierra y al ensilado de pescado se muestra en la Tabla I, en esta tabla también se muestra la composición proximal teórica de las harinas de sorgo y maíz.

TABLA I. Composición proximal de cada una de las fuentes de proteína (g/100g muestra) en base húmeda.

COMPONENTE	Harina de pescado Sierra ^a (<i>Scomberomorus sierra</i>)	Harina de ensilado ^a de pescado sierra	Harina de maíz pozolero ^b (<i>Zea mays</i> L.)	Harina de sorgo ^b (<i>Sorghum vulgare</i>)
Humedad	1.80 ± 0.08	6.72 ± 0.57	9.75	8.80
Proteína	58.34 ± 1.06	60.59 ± 0.53	7.39	10.32
Grasa	30.83 ± 0.43	23.03 ± 0.69	4.30	2.90
Hidratos de carbono*	1.60	1.77	75.66	74.98
Fibra	ND	ND	1.90	1.60
Cenizas	7.43 ± 0.15	7.89 ± 0.05	1.00	1.40

a. Promedio de triplicado ± desviación estándar; C.V. < 4%.

b. Obtenidos de Tablas de Composición de Alimentos (INNSZ, 1996) y expresados en g/100g de porción comestible.

* Determinado por diferencia; este valor puede corresponder también a remanentes de fibra, pues se utilizó el pescado entero.

ND = no detectado.

Para poder comparar el contenido de macronutrientes entre cada una de las fuentes proteínicas, resulta necesario obtener estos valores en base seca, los cuales se muestran en la Tabla II.





TABLA II. Composición proximal de las fuentes de proteína
(g/100g muestra) en base seca.

COMPONENTE	Harina de pescado Sierra ^a (<i>Scomberomorus sierra</i>)	Harina de ensilado ^a de pescado sierra	Harina de maíz pozolero ^b (<i>Zea mays</i> L.)	Harina de sorgo ^b (<i>Sorghum vulgare</i>)
Proteína	59.41 ± 1.08	64.95 ± 0.57	8.19	11.32
Grasa	31.40 ± 0.44	24.69 ± 0.46	4.76	3.18
Hidratos de carbono*	1.62	1.90	83.83	82.22
Fibra	ND	ND	2.10	1.75
Cenizas	7.57 ± 0.15	8.46 ± 0.05	1.11	1.53

a. Promedio de triplicado ± desviación estándar; C.V. < 4%.

b. Obtenidos de Tablas de Composición de Alimentos (INNSZ, 1996) y expresados en g/100g de porción comestible.

* Determinado por diferencia; este valor puede corresponder también a remanentes de fibra, pues se utilizó el pescado entero.

ND = no detectado.

Sabemos que la composición del ensilado debe ser muy similar que la del pescado del que procede, sin embargo, el pescado empleado en la elaboración del ensilado no fue del mismo lote que el de la harina, pues el primero se había obtenido con anterioridad, de modo que la composición proximal de ambos productos no fue la misma.

A pesar de que el pescado utilizado en la harina y el utilizado en el ensilado eran del mismo género y especie (ambos *Scomberomorus sierra*), las diferencias en su composición pudieron deberse a variaciones estacionales (época del año, ubicación geográfica, etc.) y a variaciones individuales como edad y tipo de alimentación del pez.

Se observó una diferencia en el contenido de humedad del ensilado y la harina de pescado, que se debió principalmente a que el ensilado se secó al sol y la harina en estufa a 60°C, por lo que la eliminación de agua fue mayor cuando se aplicó más calor. Sin embargo, la humedad en ambos casos es menor a 10%, como es de esperarse en una harina.





El contenido de proteína en base seca de la harina de pescado fue menor que la del ensilado, esto se asoció al gran contenido de grasa de la misma.

Observamos que el contenido de proteína de los dos cereales fue muy bajo, por lo que se tuvieron que adicionar grandes cantidades de éstos en las dietas para proporcionar el 50% de la proteína. En el caso de los hidratos de carbono se observó lo contrario, es decir, un alto contenido para ambos cereales.

Finalmente, observamos que el contenido de cenizas fue mayor en la harina de pescado y en el ensilado, en comparación con los cereales, debido a que son alimentos de origen marino y a que se utilizaron los huesos para su elaboración.

En el Gráfico 1 podemos observar las diferencias en el crecimiento de los animales a lo largo del bioensayo. La evolución del incremento de peso que tuvieron los animales en cada día se observa en la Tabla III.

TABLA III. Incremento de peso en gramos de las ratas alimentadas con cada una de las dietas.

Tiempo (días)	Promedio de incremento de peso* (g) ± E.S.M.				
	Control Caseína	Harina de pescado	Ensilado de pescado	Ensilado + maíz	Ensilado + sorgo
0	0	0	0	0	0
2	3.28 ± 1.27	-0.50 ± 0.65	-0.30 ± 0.90	-0.97 ± 0.63	-2.00 ± 0.59
4	12.13 ± 0.80	11.07 ± 0.49	5.38 ± 1.86	6.02 ± 0.36	6.25 ± 0.39
7	23.54 ± 1.38	25.04 ± 1.42	17.57 ± 1.73	15.55 ± 0.86	17.25 ± 0.69
9	29.44 ± 1.61	33.07 ± 1.91	24.85 ± 1.87	20.52 ± 0.79	23.82 ± 0.95
11	34.26 ± 1.78	39.74 ± 1.64	31.38 ± 1.76	26.22 ± 1.37	30.73 ± 1.56
14	39.50 ± 2.63	48.27 ± 2.14	39.98 ± 1.75	34.35 ± 2.16	40.38 ± 1.97
16	46.57 ± 2.60	56.87 ± 2.13	46.50 ± 1.85	39.80 ± 2.83	47.23 ± 2.48
18	52.16 ± 2.86	65.80 ± 2.42	52.22 ± 1.77	45.30 ± 3.02	53.15 ± 2.91
21	65.41 ± 3.13	79.39 ± 3.67	61.68 ± 1.82	54.05 ± 3.93	65.45 ± 3.49

Numero de animales por dieta, n=7.

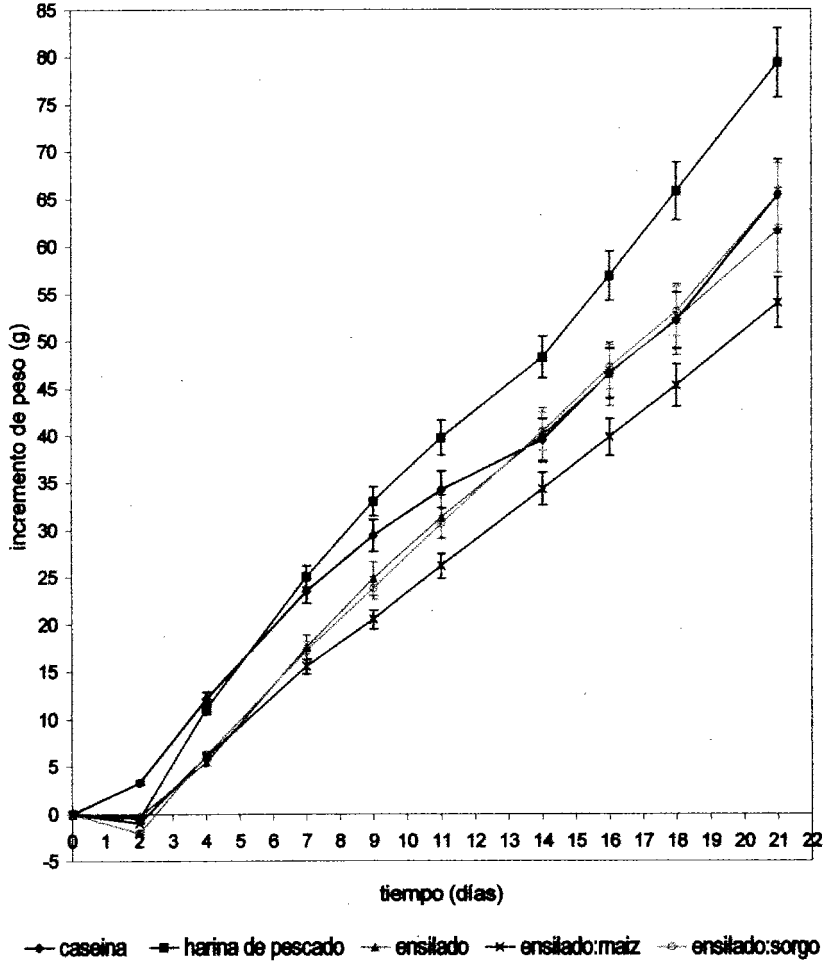
C.V. < 9, excepto en el día 2 (>29%), pues algunos animales perdieron peso.

E.S.M. = error estándar de la media.





Gráfico 1. Curva de Crecimiento de las ratas alimentadas con las cuatro dietas de estudio y la dieta control



I E.S.M.

Nota: Se eliminaron los datos de una rata en la dieta de ensilado, en la dieta de ensilado+maíz y en la dieta de ensilado+sorgo, debido a que perdieron peso aparentemente por estar enfermas. En los cálculos se consideró el número de individuos correspondiente a cada lote (dieta).





En los primeros dos días del experimento se observó que los animales de las todas las dietas, excepto los de caseína, perdieron peso en lugar de crecer, esto se atribuyó principalmente a que no aceptaron bien la dieta, ya que eran animales recién destetados; por lo que este efecto no se debió a la calidad de la proteína ni tampoco se consideró un problema, pues el experimento se mantuvo por un periodo de tiempo lo suficientemente largo para que el peso de los animales se ajustara en los primeros días. La dieta que mejor se adaptó al gusto de los animales fue la de caseína, con la que mostraron un buen crecimiento desde el principio.

De modo general, todas las dietas ofrecieron un contenido de proteína suficiente para el crecimiento y mantenimiento de los animales, pues en todos los casos se observó un aumento de peso conforme transcurrió el tiempo. En la curva correspondiente a la dieta de caseína se observó una disminución en la pendiente del día 11 al 14, lo cual se debió a que una rata se quedó sin agua en este periodo y perdió un poco de peso, que difícilmente pudo recuperar, puesto que el peso promedio disminuyó a pesar de que la pendiente volvió a aumentar.

El orden de las dietas, según el crecimiento de los animales, del mayor al menor fue el siguiente: dieta de harina de pescado, dieta de caseína, dieta de ensilado+sorgo (50:50 en proteína), dieta de ensilado de pescado y con el menor crecimiento, dieta de ensilado+maíz (50:50 en proteína). Las ratas de la dieta de ensilado+sorgo mostraron un comportamiento muy similar a las de ensilado.

El coeficiente de variación entre los valores del incremento de peso no fue muy grande, en todos los casos representó menos del 9% del valor promedio, excepto en los primeros 2 días, puesto que algunos animales perdieron peso.

Es importante mencionar que el crecimiento observado en esta gráfica no indicó la calidad nutricional de las dietas, pues para determinarla habría que saber cuánto alimento y cuánta proteína consumieron los animales. Para ello se realizó el cálculo de Conversión Alimenticia y el cálculo de REP.





En la Tabla IV se muestran los valores de Conversión Alimenticia, los cuales nos indicaron la cantidad de alimento que las ratas consumieron al final del bioensayo para incrementar un gramo de su peso, de modo que se pudo saber con cual dieta se obtuvo un mejor crecimiento.

TABLA IV. Valores de Conversión Alimenticia para cada dieta (día 21)
(alimento ingerido / incremento de peso, en g)*

No. De Rata	Control Caseína	Harina de pescado	Ensilado de pescado	Ensilado + maíz	Ensilado + sorgo
1	3.21	2.86	3.81	3.68	3.74
2	3.35	3.06	3.81	3.77	3.63
3	3.43	2.93	3.98	3.30	3.64
4	3.16	3.08	3.89	3.48	3.64
5	3.01	2.88	3.73	3.72	3.18
6	3.18	2.81	3.74	4.08	3.45
7	3.21	3.03	3.38	3.41	**
Conver. Alimen promedio ± desv. est.	3.22 ± 0.14 ^b	2.95 ± 0.11 ^a	3.76 ± 0.19 ^c	3.63 ± 0.26 ^c	3.55 ± 0.20 ^c

Coefficiente de Variación, C.V. < 7%.

Nota: diferente letra en las hileras de Conversión Alimenticia promedio indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

* Los valores individuales de peso y alimento ingerido se muestran en el Anexo B.

**La rata 7 de la dieta de ensilado + sorgo se perdió desde el segundo día.

La Conversión Alimenticia se calculó al dividir el alimento ingerido, durante los 21 días del experimento, entre el peso ganado de los animales. Es decir, nos indicó la cantidad promedio de alimento que el animal debió consumir para subir 1 gramo de peso.

La dieta de mejor calidad nutrimental fue aquella con el menor valor de Conversión Alimenticia, pues los animales requerían consumir menos alimento para poder aumentar 1g de su peso; de acuerdo a lo anterior, la dieta de harina de pescado fue significativamente la de mejor calidad ($p < 0.05$) (Ver Anexo A); seguida de la dieta de caseína, también con una diferencia significativa respecto a las otras dietas.





La dieta de ensilado+sorgo (50:50 en proteína) fue de mejor calidad que la de ensilado+maíz (50:50 en proteína) y a su vez esta última fue mejor que la de ensilado, sin embargo no existió diferencia significativa entre ellas.

Como todas las dietas estaban preparadas con el mismo contenido de proteína (10%), se esperaba el mismo comportamiento entre los valores de Conversión Alimenticia y los del REP.

Los valores de REP individuales y promedio de cada dieta se muestran en la Tabla V, éstos nos indicaron cuantos gramos de peso aumentaron las ratas por cada gramo de proteína ingerida. En la misma tabla se muestran los valores del REP ajustado.

TABLA V. Valores REP promedio* y REP ajustado de cada dieta (a los 21 días).

No. De Rata	Control Caseína	Harina de pescado	Ensilado de pescado	Ensilado + maíz	Ensilado + sorgo
1	3.11	3.49	2.62	2.72	2.68
2	2.98	3.26	2.63	2.66	2.75
3	2.91	3.42	2.51	3.03	2.75
4	3.16	3.25	2.57	2.87	2.75
5	3.33	3.47	2.68	2.69	3.14
6	3.14	3.56	2.68	2.42	2.89
7	3.12	3.30	2.95	2.93	**
REP promedio ± desv. est.	3.11 ± 0.13 ^b	3.39 ± 0.12 ^a	2.66 ± 0.14 ^c	2.76 ± 0.20 ^c	2.83 ± 0.17 ^c
REP ajustado	2.50	2.73	2.14	2.22	2.27

Coefficiente de Variación, C.V. < 7%.

Nota: diferente letra en las hileras del REP promedio indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

* Los datos individuales de incremento de peso y alimento ingerido al final del bioensayo se muestran en el Anexo B.

**La rata 7 de la dieta de ensilado + sorgo se perdió desde el segundo día.

Efectivamente se observó el mismo comportamiento entre los valores de Conversión Alimenticia y los del REP:





La dieta de harina de pescado tuvo significativamente la mejor calidad proteínica ($p < 0.05$) (Ver Anexo A), es decir, el mayor valor REP. La dieta de caseína tuvo un REP significativamente menor que el de la harina de pescado, pero significativamente mayor que el de las tres dietas de ensilados. Estas últimas, al igual que en la Conversión Alimenticia, no tuvieron diferencia significativa entre sí y fueron las de menor calidad proteínica, sin embargo, se observó una tendencia mayor en la calidad de la dieta de ensilado+sorgo (50:50 en proteína) sobre la dietas de ensilado+maíz (50:50 en proteína) y a su vez, la calidad de la dieta de ensilado+maíz tuvo una tendencia mayor sobre la de ensilado; el REP de ensilado+sorgo fue ligeramente más alto que el de ensilado+maíz porque el maíz es deficiente en triptofano y el ensilado pierde parte de este aminoácido durante el proceso⁽⁴²⁾ lográndose una suplementación con sorgo, pues este cereal contiene cantidades importantes del aminoácido; de este modo se confirman los hallazgos realizados por Vizcarra⁽²²⁾ y Santana⁽⁴²⁾, quienes encontraron que la calidad de la proteína de pescado se afecta en el proceso de ensilaje porque el tratamiento ácido destruye parte del triptofano provocando que este aminoácido sea el limitante en este tipo de ensilados.

A pesar de que las proteínas de los cereales son deficientes en algunos aminoácidos esenciales, estas se complementaron con las del ensilado y viceversa, fue por ello que la calidad proteínica de las dos dietas con cereales fue mejor que la del ensilado de pescado solo.

El C.V. $< 7\%$ nos indicó que existió poca variabilidad en los resultados.

El valor de REP ajustado sirvió para expresar los valores de las proteínas de estudio en proporción a los obtenidos con la proteína caseína, de este modo los valores obtenidos son comparables con los encontrados en la bibliografía.





En la Tabla VI se muestran los valores de digestibilidad "in vivo" individuales y promedio de cada dieta. Este parámetro indicó qué tanto de la proteína ingerida fue absorbido por las ratas.

TABLA VI. Valores de porcentaje de Digestibilidad promedio* de cada dieta (días 15-18).

No. Rata	Control Caseína	Harina de pescado	Ensilado de pescado	Ensilado + maíz	Ensilado + sorgo
1	92.97	91.20	90.51	90.61	84.35
2	92.94	92.49	89.11	92.23	85.36
3	91.22	92.00	90.51	85.98	87.02
4	91.84	91.13	91.47	89.04	88.63
5	91.67	91.07	89.97	89.09	85.60
6	92.13	91.14	89.25	91.03	85.82
7	91.18	91.12	90.12	89.08	**
%Digestibil promedio ± desv.est.	91.99 ± 0.74 ^a	91.45 ± 0.56 ^{ab}	90.13 ± 0.81 ^b	89.58 ± 2.00 ^b	86.13 ± 1.50 ^c

Coefficiente de Variación, C.V. < 2%.

Nota: diferente letra en las hileras del porcentaje de digestibilidad promedio indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

* Los datos utilizados para realizar los cálculos de digestibilidad se muestran en el Anexo C.

**La rata 7 de la dieta de ensilado + sorgo se perdió desde el segundo día.

La dieta de caseína fue la del porcentaje de digestibilidad mayor, a pesar de ello, este valor no tuvo diferencia significativa respecto a la dieta de harina de pescado, pero sí con respecto a las dietas restantes ($p < 0.05$, Anexo A); a su vez, la dieta de harina de pescado tuvo una mayor digestibilidad que la dieta de ensilado y esta última mayor que la de ensilado+maíz (50:50 en proteína), sin embargo no existió diferencia estadísticamente significativa entre las tres.

La dieta de ensilado+sorgo (50:50 en proteína) fue la que mostró el menor valor de digestibilidad, siendo también significativamente diferente a todas las demás dietas.





Como era de esperarse, las dietas de origen animal (caseína, harina de pescado y ensilado de pescado) tuvieron mayor digestibilidad que las que tuvieron fuentes de proteína de origen vegetal, debido al contenido de fibra de los cereales.

La baja disponibilidad de aminoácidos de unas dietas respecto a otras también pudo deberse a otros factores como conformación de la proteína, de modo que una baja digestibilidad no indicaba necesariamente que la proteína fuera de mala calidad, pues pudo ser que sí tuviera aminoácidos esenciales en cantidad adecuada a pesar de su baja disponibilidad. Por lo tanto, la digestibilidad no está en función de la calidad proteínica.

El error estándar fue muy pequeño, pues se obtuvo un C.V. < 2%.





CONCLUSIONES





- El ensayo biológico de REP permitió evaluar la calidad proteínica de harina y ensilado de pescado sierra, así como de mezclas entre el ensilado con dos cereales; la cual está en función de su contenido de aminoácidos esenciales.
- La dieta de harina de pescado sierra elaborada en el laboratorio tuvo la mejor digestibilidad y fue la de mejor calidad proteínica, al obtener el mayor valor REP; aunque en el presente trabajo no se hizo la medición, en la harina comercial se espera una menor calidad, pues esta sufre daños en el secado por temperaturas elevadas, ya que alcanza los 100°C y sufre daño microbiano.
- La calidad proteínica del ensilado de pescado fue la más baja, pues tuvo un valor de REP menor que el resto de las dietas, sin embargo tuvo una digestibilidad muy similar a la de la harina de pescado, con lo que se demostró que la digestibilidad no está en función de la calidad proteínica.
- A pesar de que la calidad proteínica del ensilado de pescado sierra se afectó negativamente debido a las condiciones de procesamiento del mismo, esto se corrige al realizar mezclas del ensilado con cereales como el sorgo, que contiene cantidades importantes de triptofano, aminoácido que se pierde durante el tratamiento ácido del ensilaje, obteniendo así un producto con una mejor calidad.
- Mediante este trabajo se comprobó además que la harina de maíz pozolero no es adecuada para mezclarse con el ensilado, desde el punto de vista nutricional, pues dicho cereal también es escaso en triptofano.
- Por lo tanto el ensilado de pescado es un producto adecuado e inocuo para alimentación animal, económico, de buena calidad nutricional y con una prolongada vida de anaquel, ya que la naturaleza ácida del mismo impide su contaminación.





ANEXO





ANEXO A

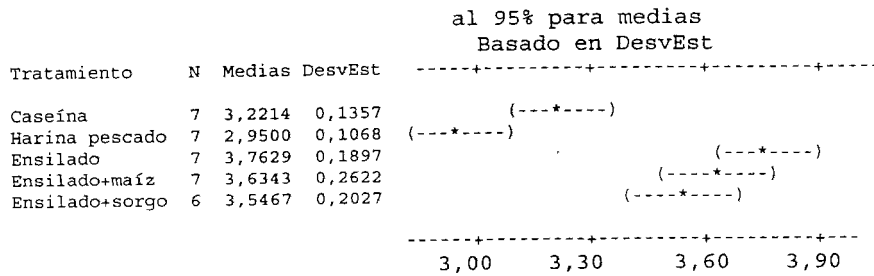
**Análisis estadístico del ensayo biológico
con ratas macho recién destetadas,**

**Conversión Alimenticia (alimento acumulativo/incremento de peso)
Día 21**

Análisis de Varianza

Fuente	DF	SS	MS	F	P
DIETAS	4	3,0629	0,7657	21,93	0,000
Error	29	1,0127	0,0349		
Total	33	4,0756			

Basado en DesvEst = 0,1869



**Valor REP de cada dieta**

Día 21

Análisis de varianza

Fuente	DF	SS	MS	F	P
DIETAS	4	2,4856	0,6214	25,45	0,000
Error	29	0,7080	0,0244		
Total	33	3,1936			

Basado en DesvEst = 0.1562

al 95 % para medias
Basado en DesvEst

Tratamiento	N	Medias	DesvEst	-----+-----+-----+-----+-----+
Caseína	7	3,1100	0,1306	(---*---)
Harina pescado	7	3,3971	0,1213	(----*----)
Ensilado	7	2,6643	0,1436	(---*---)
Ensilado+maíz	7	2,7600	0,2025	(---*---)
Ensilado+sorgo	6	2,8317	0,1717	(----*----)
				-----+-----+-----+-----+-----+
				2.75 3.00 3.25 3.50



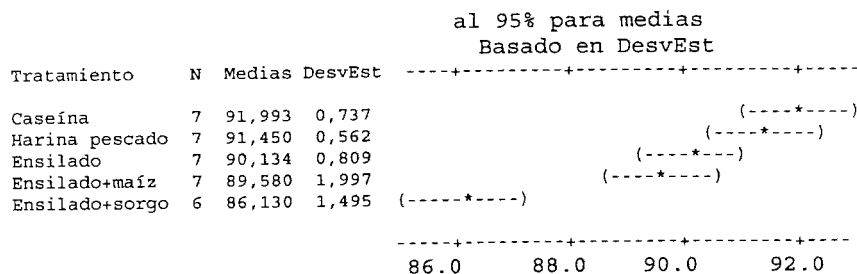


% Digestibilidad de cada dieta
Días 15-18

Análisis de Varianza

Fuente	DF	SS	MS	F	P
DIETAS	4	133,70	33,43	21,94	0,000
Error	29	44,19	1,52		
Total	33	177,89			

Basado en DesvEst = 1.234





ANEXO B

Tabla B. Peso inicial de los animales, Pi (g).

RATA No.	DIETAS				
	Control caseína	Harina de pescado	Ensilado	Ensilado + maíz	Ensilado + sorgo
1	49.1	48.6	50.0	49.8	48.7
2	47.6	48.0	47.4	47.5	47.7
3	45.6	45.1	46.3	46.2	45.4
4	44.0	45.0	43.2	43.2	44.5
5	42.7	42.5	43.2	42.9	42.6
6	41.8	42.1	41.6	41.6	42.0
7	39.8	38.8	40.2	40.1	39.0
Promedio	44.4	44.3	44.6	44.5	44.3
Desv. Est	3.3	3.5	3.5	3.5	3.4

C.V. < 8%

Tabla C. Peso de los animales en el día 21, Pf (g).

RATA No.	DIETAS				
	Control caseína	Harina de pescado	Ensilado	Ensilado + maíz	Ensilado + sorgo
1	123.8	145.3	106.5	110.4	112.0
2	107.3	116.2	107.3	90.1	114.7
3	110.0	121.3	105.5	109.3	110.2
4	111.8	122.8	94.9	103.7	98.7
5	118.0	125.8	104.7	87.6	121.1
6	103.0	121.8	108.4	81.5	106.9
7	94.6	112.6	106.4	92.9	--
Promedio	109.8	123.7	104.8	96.5	110.6
Desv. Est	9.6	10.5	4.5	11.3	7.5

C.V. < 11%

Tabla D. Incremento de peso de los animales en el día 21, Pf-Pi (g).

RATA No.	DIETAS				
	Control caseína	Harina de pescado	Ensilado	Ensilado + maíz	Ensilado + sorgo
1	74.7	96.7	56.5	60.6	63.3
2	59.7	68.2	59.9	42.6	67.0
3	64.4	76.2	59.2	63.1	64.8
4	67.8	77.8	51.7	60.5	54.2
5	75.3	83.3	61.5	44.7	78.5
6	61.2	79.7	66.8	39.9	64.9
7	54.8	73.8	66.2	52.8	--
Promedio	65.4	79.4	60.3	52.0	65.5
Desv. Est	7.7	9.0	5.3	9.6	7.8

C.V. < 18%





Tabla E. Alimento ingerido en el día 21(g).

RATA No.	DIETAS				
	Control caseína	Harina de pescado	Ensilado	Ensilado+ maíz	Ensilado+ sorgo
1	239.9	276.6	215.5	223.0	236.5
2	199.7	208.9	228.0	160.4	243.2
3	220.8	223.0	235.5	208.2	235.7
4	214.5	239.6	200.9	210.6	197.1
5	226.3	240.2	229.2	166.1	249.6
6	194.8	223.6	249.5	162.6	224.1
7	175.7	223.3	224.0	180.1	—
Promedio	210.2	233.6	226.1	187.3	231.0
Desv. Est	21.6	21.8	15.3	26.1	18.7

C.V. < 10%

Nota: Se perdió la rata 7 de la dieta ensilado:sorgo.





ANEXO C

Tabla F. Cantidad de alimento consumido por las ratas en los días 15-18 (g).

RATA No.	DIETAS				
	Control caseína	Harina de pescado	Ensilado	Ensilado + maíz	Ensilado + sorgo
1	54.3	60.1	49.3	49.1	50.4
2	42.7	46.7	51.8	31.9	51.4
3	45.9	52.4	52.8	45.8	50.9
4	44.3	56.6	45.4	48.4	40.4
5	49.3	58.5	47.2	35.7	56.6
6	39.6	53.2	57.7	33.5	48.5
7	39.8	53.3	47.2	36.8	--

Tabla G. Peso de las heces de cada rata en los días 15-18 (g).

RATA No.	DIETAS				
	Control caseína	Harina de pescado	Ensilado	Ensilado + maíz	Ensilado + sorgo
1	4.29	4.99	4.38	2.84	4.01
2	3.34	3.41	4.58	1.55	4.34
3	3.55	4.14	4.61	3.24	3.75
4	3.55	4.87	3.85	3.51	2.76
5	4.28	5.02	4.07	2.27	4.48
6	3.06	4.46	4.94	1.92	3.52
7	3.02	4.84	4.28	2.42	--

Tabla H. Valores del porcentaje de nitrógeno en cada dieta.

RATA No.	DIETAS				
	Control caseína	Harina de pescado	Ensilado	Ensilado + maíz	Ensilado + sorgo
% Nitrog	1.59	1.60	1.62	1.63	1.63

Tabla I. Valores del porcentaje de nitrógeno en las heces de las ratas de los días 15-18 (g).

RATA No.	DIETAS				
	Control caseína	Harina de pescado	Ensilado	Ensilado + maíz	Ensilado + sorgo
1	1.42	1.70	1.73	2.66	3.22
2	1.44	1.65	2.00	2.62	2.84
3	1.81	1.62	1.76	3.24	2.88
4	1.63	1.65	1.63	2.47	2.72
5	1.53	1.67	1.89	2.81	2.98
6	1.63	1.69	2.04	2.56	3.20
7	1.86	1.57	1.77	2.72	--





ANEXO C

Tabla J. Valores de nitrógeno ingerido (NI) por las ratas en los días 15-18.

RATA No.	DIETAS				
	Control caseína	Harina de pescado	Ensilado	Ensilado + maíz	Ensilado + sorgo
1	0.87	0.96	0.80	0.80	0.82
2	0.68	0.75	0.84	0.52	0.84
3	0.73	0.84	0.85	0.75	0.83
4	0.71	0.91	0.73	0.79	0.66
5	0.79	0.94	0.76	0.58	0.92
6	0.63	0.85	0.93	0.55	0.79
7	0.63	0.85	0.76	0.60	--

Tabla K. Valores de nitrógeno fecal (NF) de las ratas en los días 15-18.

RATA No.	DIETAS				
	Control caseína	Harina de pescado	Ensilado	Ensilado + maíz	Ensilado + sorgo
1	0.06	0.08	0.08	0.08	0.13
2	0.05	0.06	0.09	0.04	0.12
3	0.06	0.07	0.08	0.10	0.11
4	0.06	0.08	0.06	0.09	0.07
5	0.06	0.08	0.08	0.06	0.13
6	0.05	0.07	0.10	0.05	0.11
7	0.06	0.08	0.07	0.07	--

Nota: Se perdió la rata 7 de la dieta ensilado:sorgo.





BIBLIOGRAFÍA





1. **Jordan, D.S. and Starks.** (1895). The fishes of Sinaloa. *Proc. Calif. Acad Sci.* (Ser. 2) 5: 377-514. Pls. 26-55.
2. **Tatterson, I.N. and Windsor, M.L.** (1974). Fish silage. *J. Sci. Food Agric.* 25: 369-379.
3. **Neave, V.H.** (1986). Introducción a la tecnología de productos pesqueros. México, D.F. Ed. CECOSA. Pp. 304-310.
4. **Gildberg, A.** (1993). Review: Enzymic processing of marine raw materials. *Proc. Biochemistry.* 28: 1-15.
5. **Stradine, G.A., Beames, R.M., Fisher, L.J. and Jones, Y.M.** (1988). An assessment of ensiling the processing wastes from dogfish to produce a protein feed for monogastrics animals. *Can. J. Anim. Sci.* 68: 873-880.
6. **Torry, R.** (1987). El pescado y las industrias derivadas de la pesca. Zaragoza. Ed. Acribia. 2ª reimpresión. Pp. 262-263, 315-325.
7. **Peterson, H.** (1953). Fisheries bull. FAO. 6: 18.
8. **Aranson, S.** (1994). Production of fish silage. *In: Fisheries processing: biotechnological applications.* Martín, A.M., Chapman & Hall. London. Pp. 245-271.
9. **Pérez, R.** (1995). Fish silages for feeding livestock. *World Animal Rev.* 82: 34-42.
10. **Raa, J. and Gildberg, A.** (1982). Fish silage: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition,* Pp. 383-347.
11. **Strom, T. and Raa, J.** (1992). Ensiling of fish by acid lactic bacterial fermentation for feed production. *FAO Fisheries Report.* Supl. Roma. FAO. 470: 142-147.
12. **Nilson, R. and Rydin, C.** (1965). *Enzymology.* 29 (3-5): 126.
13. **Belitz, H.D.** (1988). Química de los alimentos. Zaragoza. Ed. Acribia. Pp. 491-502.
14. **Ludorff, W.** (1973). El pescado y los productos de la pesca. Zaragoza. Ed. Acribia. 2ª edición. Pp. 74-91.





15. **INNSZ.** (1996). Tablas de composición de alimentos. México, D.F. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. Pp. 3,4,11,12,166,167.
16. **Macrae, R.K., Robinson, M.J., Sadler.** (1993). Encyclopaedia of food science, technology and nutrition. London. *Academic Press*. Pp. 1826-1903.
17. **Loncin, O., Joaqmain, A.M. Tutundjian-provost, Lenges J.P., Bimbinet, J.J.** (1965). Influence de l'eau sur les reactions de Maillard. *C.R. Acad. Sci.* 260: 3208.
18. **Folk, J.E.** (1956). The influence of the lysine-glucose reaction on enzymatic digestion. *Arch. Biochem. Biophys.* 64:6.
19. **Haaland, H. and Njaa, L.R.** (1989). Total volatile nitrogen-a quality criterion for fish silage?. *Aquaculture.* 79: 311-316.
20. **Backhoff, H.P.** (1976). Some chemical changes in fish silage. *J. Food Technology.* 11:353-356.
21. **Haard, N.F., Kariel, N., Herzberg, G., Woodrow, L.A. and Winter, K.** (1985). Stabilization of protein and oil in fish silage for use as a ruminant feed supplement. *J. Sci. Food Agric.* 36:229-241.
22. **Vizcarra, L.** (1998). Desarrollo de un alimento para aves a base del ensilaje de desperdicio de atuneras. Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos. Facultad de Química. UNAM. Pp. 58-115.
23. **Cheftel, J.C.** (1989). Proteínas alimentarias. Zaragoza. Ed. Acribia. Pp. 115-124.
24. **Mc. Donald, E., Greenhalgh, M.** (1999). Nutrición animal. Zaragoza. Ed. Acribia. 5ª edición. Pp. 498-501.
25. **Hegsted, D.M.** (1963). Variations in requirements of nutrients. Aminoacids. *Fed. Proc.* 22:124.
26. **National Research Council.** (1972). Nutrient requirements of domestic animals. No.10. Nutrient requirement of laboratory animals. Washington, D.C. National Academy of Sciences / National Research Council.
27. **Tagle, M.A.** (1980). Nutrición. Santiago de Chile. Ed. Andrés Bello. 2ª edición. Pp. 49-90.





28. **Beal, V.** (1994). Nutrición en el ciclo de vida. México, D.F. Ed. Limusa. Pp. 16-29.
29. **Lloyd, L., Mc.Donald, B., Crampton, E.** (1982). Fundamentos de nutrición. Zaragoza. Ed. Acribia. Pp. 360-383.
30. **Hirata, K.N.** (2003). Influencia de la vitamina A y del hierro en la prueba biológica de la calidad de la proteína. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. Pp. 30-32.
31. **Osborne, T.B., Mendel, L.B. and Ferry, E.L.** (1919). A method of expressing numerically the growth promoting value of proteins. *J. Biol. Chem.* 37:223-229.
32. **Campbell, J.A.** (1960). Evaluation of protein in foods for regulatory purposes. *Agric. Food. Chem.* 8: 323.
33. **AOAC.** (1990). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. Helrich, K. Washington, D.C. 15th edition. Vol. I y II. Pp. 17-18, 1095-1098.
34. **Pellet, P.L. and Young, V.R.** (1980). Nutritional evaluation of protein foods. The United Nations University. Tokio. Pp. 1-6,27-54.
35. **Miller, D.S. and Bender, A.E.** (1955). The determination of the net utilization of protein by a shortened method. *Brit. J. Nutr.* 9:382.
36. **White, W.C. and Guilbault, G.G.** (1978). Lysine Specific Enzyme Electrode for Determination of Lysine in Grains and Foodstuffs. *Analyt. Chem.* 50: 1481-1486.
37. **Satterlee, L.D., Marshall, H.F. and Tennyson, J.M.** (1979). Measuring Protein Quality. *Oil Chem. Soc. J. Amer.* 56: 103-109.
38. **Hsu, H.W., Sutton, N.E., Banjo, M.O., Satterlee, L.D. and Kendrick, J.G.** (1978). The C-PER and T-PER Assays for Protein Quality. *Fd. Technol.* 32 (12): 69-73.
39. **Mauron, J.** (1970). Nutritional Evaluation of Proteins by Enzymic Methods. In: A.E. Bender, ea., Evaluation of Novel Protein Products. *Int. Bio. Prog.* Wenner-Grem Symposium 1968. Pergamon Press. Oxford. Pp. 211 -234.





40. **Ford, J.E.** (1962). A Microbiological Method for Assessing the Nutritional Value of Proteins. Measurement of Available Methionine, Leucine, Isoleucine, Arginine, Histidine, Tryptophan and Valine. *Brit. J. Nutr.* 16: 409-425.
41. **Shorrock, C.** (1976). An Improved Procedure for the Determination of Available Lysine and Methionine in Feedstuffs Using *Tetrahymena pyriformis* W. *Br. J. Nutr.* 35: 333-341.
42. **Santana, D.H.** (2004). Desarrollo de un alimento para pollos de engorda a partir de ensilaje de pescado sierra (*Scomberomorus maculatus*). Tesis de Maestría en Ciencias de los Alimentos. Facultad de Química. UNAM. Pp.28-31.
43. **Kirk, R.S., Sawyer, R. and Eagan, H.** (1996). Composición y análisis de alimentos de Pearson. México, D.F. Ed. CECSA. 2ª edición. Pp. 199.

