

LISINA TOTAL, DIGESTIBLE Y REACTIVA DIGESTIBLE EN HARINA DE PESCADO.

Total, Digestible and Digestible Reactive Lysine Contents in Fishmeal.

Lourdes Gutiérrez-Coronado^{*}, Leticia García-Rico, Francisco Vázquez-Ortiz, Karla Preciado-Huguez, Renato Figueroa-García y Yolanda López-Franco

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera a la Victoria Km. 0.6. Apartado Postal 1735 Hermosillo, Sonora, México. C.P. 83000. * Tel (662) 2 89 24 00 ext. 292, Fax (662) 2 50 80 00. E-mail: lulu@cascabel.ciad.mx.

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar y comparar lisina total, lisina reactiva, lisina total digestible y lisina reactiva digestible en harina de pescado peletizada (HPP) y extrusionada (HPE), ésta última como indicador de disponibilidad de lisina, la cual puede afectarse por almacenamiento prolongado o por procesamiento térmico inadecuado. Se utilizaron 29 ratas Sprague-Dawley (*Rattus norvegicus*) de 100 ± 5 g de peso promedio, alojadas individualmente bajo condiciones controladas. Nueve ratas se alimentaron con una dieta a base de caseína hidrolizada enzimáticamente (CHE); las 20 ratas restantes se dividieron en dos grupos de diez y se alimentaron durante 16 días, con una dieta a base de HPP y HPE, respectivamente, con óxido de cromo como marcador indigestible. Las ratas se sacrificaron con cloroformo confinadas en un desecador y en cada una se retiró una porción de 20 cm del íleon por perfusión intraluminal con agua destilada. En HPP y HPE, en las dietas y en las digestas se determinó cromo por absorción atómica, mientras que lisina total y lisina reactiva, después de la reacción con O-metilisourea para formar homocisteína, por cromatografía líquida de alta resolución. La digestibilidad ileal verdadera de lisina reactiva fue determinada después de corregir por pérdida endógena de lisina de las ratas alimentadas con CHE seguida por ultrafiltración de la digesta (10,000 Da). El contenido de lisina total para HPP y HPE fue de 5,7 y 5,5% y de lisina reactiva 5,1 y 4,4%, respectivamente. El contenido de lisina digestible fue de 5,5% y 5,1% y de lisina reactiva digestible de 4,5 y 3,8%, respectivamente. La lisina digestible sobreestimó el contenido de lisina en un 22,2% para HPP y en un 34,2% para HPE. El valor de lisina reactiva digestible de HPP fue similar al de lisina disponible reportado de 4,2 y 4,3%. La determinación de lisina reactiva digestible es un indicador confiable de su disponibilidad.

Palabras clave: Lisina total, lisina digestible, lisina reactiva digestible, harina de pescado, ratas.

ABSTRACT

The aim of the study was to determine and compare total, reactive, digestible and digestible reactive lysine contents in pelletized (PF) and extruded fishmeal (EF), the latest as an indicator of available lysine, which could be affected by prolonged storage or inadequate thermal processing. Twenty nine Sprague-Dawley male rats with an average initial weight of 100 ± 5 g divided into three groups were used, which were individually allocated under control conditions. Nine rats were fed with a diet based in enzymically hydrolyzed casein to determine endogenous ileal aminoacid flow. The another twenty rats were divided into two groups of ten rats and were fed with PF and EF base diets containing chromic oxide as indigestible marker for sixteen days. The rats were sacrificed to remove 20 cm of the terminal ileum. In PF and PE, diets and ileal digests, chromic oxide was determined by atomic absorption, total and reactive lysine after reaction of these materials with O-methylisourea to form homocysteine by high pressure liquid chromatography. True reactive lysine digestibility was determined after correcting for endogenous lysine loss at the terminal ileum of rats fed an enzyme hydrolyzed casein-based diet, followed by ultrafiltration of the digest (10,000 Da). Total and reactive lysine contents for PF and EF were 5.7 and 5.5%; 5.1 and 4.4% respectively. Digestible lysine and digestible reactive lysine were 5.5 and 5.1%; 4.5 and 3.8% respectively. Digestible lysine overestimates lysine contents in 22.2% for PF and 34.2% for EF. Digestible reactive lysine value for PF was similar to available lysine values reported in literature of 4.2 and 4.3%. Digestible reactive lysine could be considered as a good indicator of lysine availability.

Key words: Total lysine, digestible lysine, digestible reactive lysine, fishmeal, rats.

INTRODUCCIÓN

La lisina, es el primer aminoácido limitante en dietas para cerdos y pollos. Por esta razón, es de gran relevancia tener información precisa del contenido de lisina de los ingredientes, así como de la digestibilidad y disponibilidad de la lisina dietaria. La harina de pescado es un ingrediente frecuentemente empleado en dietas para cerdos, principalmente como una fuente concentrada de proteína (60-72%), altamente digestible y con un balance ideal en términos de aminoácidos esenciales, en especial de lisina. Sin embargo, su calidad se puede ver afectada por la forma en que la harina es preparada, tecnológicamente tratada y almacenada [5, 9].

La estimación de lisina en alimentos puede involucrar la determinación de lisina digestible total o disponible. La lisina total es determinada después de una hidrólisis ácida y no necesariamente refleja la cantidad que está nutricionalmente disponible. En alimentos donde no ha ocurrido reacción de Maillard, el valor de lisina digestible total puede ser muy cercano al valor de lisina disponible [14]. Para los alimentos que han sido procesados o almacenados por periodos largos, la lisina puede perder su valor nutricional, principalmente por efecto de la reacción de Maillard, la cual involucra la interacción de un azúcar reductor con el grupo ϵ -amino de la lisina. Esta lisina que reaccionó no es susceptible al ataque enzimático quedando nutricionalmente no disponible [8, 12].

Existe un renovado interés en los efectos del procesado de los alimentos sobre la disponibilidad de la lisina, debido a que los métodos convencionales para determinar lisina digestible y lisina reactiva, la lisina cuyo grupo ϵ -amino está todavía libre para reaccionar con el reactivo de prueba, no describen adecuadamente los efectos del procesado en la biodisponibilidad de la lisina [3, 4, 8, 25]. La lisina dañada, se revierte a lisina durante la hidrólisis ácida requerida para el análisis de amino ácidos, sobreestimándose el contenido de lisina disponible [12].

El método propuesto por Moughan y Rutherford [11], para determinar lisina reactiva digestible en alimentos procesados y que no ha sido probado en harina de pescado, involucra la reacción de guanidinación, la cual convierte la lisina químicamente reactiva a homoarginina (ácido 2-amino-6-guanidinohexanoico), por la reacción con o-metilisourea bajo condiciones alcalinas, un derivado estable en condiciones ácidas. La reacción de guanidinación es altamente específica para el grupo ϵ -amino de la lisina y es muy dependiente del pH, ya que el grupo ϵ -amino debe de ser deprotonado para reaccionar con la o-metilisourea. La técnica de digestibilidad ileal verdadera también es llevada a cabo y el método de guanidinación es utilizado para determinar el contenido de lisina reactiva tanto en la dieta experimental, como en la digesta ileal de los animales alimentados con esa dieta. Se puede calcular el coeficiente de digestibilidad ileal verdadera de lisina reactiva y así determinar lisina reactiva digestible [10].

El objetivo del estudio fue determinar y comparar el contenido de lisina total, lisina reactiva, lisina digestible y lisina reactiva digestible determinada por el método de la guanidinación y como un indicador de disponibilidad, en harina de pescado peletizada y extrusionada, a través de bioensayos con ratas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el bioterio del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. en la ciudad de Hermosillo, Sonora, México, de acuerdo a los lineamientos establecidos para el cuidado y uso de animales de experimentación, estipulado por el Comité de Ética de la Institución. Se evaluaron dos harinas de pescado una peletizada y otra extrusionada.

Estudio de Digestibilidad

Se seleccionaron al azar veintinueve ratas (*Rattus norvegicus*) macho Sprague-Dawley de aproximadamente 100 \pm 5 g de peso inicial, alojadas individualmente en jaulas de acero inoxidable con piso de malla de alambre a 20 \pm 2°C, humedad relativa de 65-70% y un ciclo de luz oscuridad de 12 h. Las ratas se alimentaron *ad libitum* por 3 días para su adaptación, con una dieta formulada con caseína como fuente de proteína (TABLA I). Las ratas fueron entrenadas para consumir alimento por un período de 3 h (08:30-11:30) durante 7 días. Posteriormente se introdujeron las dietas experimentales, las cuales se administraron bajo el régimen de alimentación restringida (08:30-11:30) y el agua estuvo siempre disponible. Se formularon dos dietas experimentales a base de harina de pescado de origen sud-americano, superprime, una peletizada y otra extrusionada. Además, se formuló una dieta a base de caseína hidrolizada enzimáticamente (TABLA I).

Para el estudio de digestibilidad ileal se realizó un bioensayo, en el cual se dispuso de dos grupos de ratas, cada uno de 10 animales. A un grupo se les ofreció la dieta formulada con harina de pescado peletizada y al otro la dieta de harina de pescado extrusionada, durante un período de 16 días [16]. Para determinar el flujo ileal endógeno de lisina se realizó paralelamente un bioensayo, en el cual se dispuso de nueve ratas, las cuales se alimentaron con la dieta a base de caseína hidrolizada enzimáticamente [6].

Colección de la Muestra

En el día 16 de experimentación se llevó a cabo el sacrificio de las ratas, colocándoles en un desecador, en cuyo interior se depositaron 100 mL de cloroformo. Posteriormente se tomaron los 20 cm finales del ileon. El pH de la digesta ileal de las ratas alimentadas con la dieta a base de CHE se ajustó a pH 3 con HCl 6M para minimizar la actividad proteolítica. La digesta ileal de las ratas restantes se guardó por separado y se conservaron a -20°C para su posterior liofiliza-

TABLA I
COMPOSICIÓN DE LAS DIETAS DE CASEÍNA, CASEÍNA
HIDROLIZADA ENZIMÁTICAMENTE Y HARINAS DE
PESCADO (g Kg⁻¹, BASE SECA)/ INGREDIENT COMPOSITION
OF CASEIN, ENZYMICALLY HYDROLYSED CASEIN AND FISHMEAL
DIETS (g Kg⁻¹, DRY MATTER)

Ingredientes	Caseína	CHE	Harina de pescado
Almidón de maíz	635	633	633
Celulosa purificada	50	50	50
Aceite de maíz	65	65	65
Sacarosa	100	100	100
Vitaminas y minerales (1:4)*	50	50	50
Oxido de cromo	-	2	2
CHE	-	100	-
Caseína	100	-	-
HPP 70% **	-	-	100
HPE 70,3% **	-	-	100

CHE = Caseína hidrolizada enzimáticamente, HPP= harina de pescado peletizada, HPE= harina de pescado extrusionada.

* AIN-76 Mineral Mixture (g/100g). American Institute of Nutrition: Fosfato de calcio dibásico 50, cloruro de sodio 7,4, citrato de potasio monohidratado 22, sulfato de potasio 5,2, óxido de magnesio 2,4, carbonato de manganeso 0,35, citrato férrico 0,6, carbonato de zinc 0,16, carbonato de cobre 0,030, iodato de potasio 0,001, selenio de sodio 0,001, sulfato de sodio potasio 0,055, sacarosa 11,8.

AIN-76 Vitamin Mixture (g/100g). American Institute of Nutrition: Hidrocloruro de tiamina 0,06, riboflavina 0,06, hidrocloruro de piridoxina 0,07, ácido nicotínico 0,3, pantotenato de D-calcio 0,16, ácido fólico 0,02, D-biotina 0,002, cianocobalamina (vit B₁₂) 0,0001, palmitato de retinol (vit A) pre- mezcla (250,000 UI/g) 0,16, DL- acetato de tocoferol (250 UI/g) 0,20, colecalciferol (vit D₃) 400,000 UI/g) 0,025, menaquinona (vit K₂) 0,0005, sacarosa 97,29.

** Harina de pescado de origen sud-americano, super prime.

ción. El flujo endógeno de lisina en la digesta ileal fue determinado después de separar las proteínas endógenas más grandes de los péptidos dietarios no digeridos por centrifugación a 1400 X g por 45 min a 0°C y por ultrafiltración empleando células con agitación Amicon de 50 mL con un límite de exclusión de masa molecular de 10 000 Da, como lo describen Gutiérrez-Coronado y col. [6].

Determinación de Lisina Reactiva (Homoarginina)

La reacción de guanidinación [10], modificada de la técnica original, se realizó antes del análisis de aminoácidos y se determinó lisina reactiva en las dietas a base de HPP y extrusionada, y en la digesta ileal de los animales alimentados con esas dietas.

Técnica de Guanidinación [11, 15].

Preparación del Reactivo O-metil-isourea

Se adicionaron 4g de Hidróxido de Bario Ba(OH)₂·8H₂O a 16 mL de agua destilada-deionizada previamente hervida por

10 min. La solución se calentó casi a ebullición y se le añadieron 2g de O-metil-isourea (sal sulfatada) en un tubo de centrifuga de 40 mL. La solución se dejó enfriar por 30 min, antes de centrifugar a 6400 X g por 10 min. Se separó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 2 mL de agua destilada-deionizada y se centrifugó nuevamente. Los lavados se juntaron y se midió el pH. Si el pH de la solución fue menor de 12, la solución se volvía a preparar, pero si el pH fue mayor de 12, se ajusta al pH apropiado para la guanidinación (10,6-11,0) y se lleva a un volumen de 20 mL con agua destilada-deionizada.

Condiciones Iniciales de Guanidinación: Se analizaron muestras de HPP y extrusionada, digesta ileal y dietas. Las muestras del ingrediente prueba y de la dieta se trabajaron por duplicado, y se incubaron por 1 y 7 días respectivamente, en O-metil-isourea 0,6 M a pH 10,6 a 21 ± 2°C, en un baño con agua y agitación y una relación de reactivo a lisina mayor de 1000 (10 mg de muestra y 20 mL de reactivo). Las muestras de digesta ileal se incubaron por 3 días como mínimo y 7 días como máximo, en O-metil-isourea 0,6 M, a un pH más básico (pH 11) a la misma temperatura de 21 ± 2°C, en un baño con agua y agitación y una relación reactivo a lisina mayor de 1000. Después de la incubación, las muestras se llevaron a sequedad en un rotavapor. Posteriormente se realizó el análisis de aminoácidos mediante cromatografía líquida de alta resolución [16]. El porcentaje de guanidinación de la lisina se calculó a partir de la concentración de la lisina y de la homoarginina en las muestras guanidinadas de acuerdo a la siguiente fórmula:

Conversión de lisina a homoarginina = (mol de homoarginina/mol homoarginina + mol lisina) x 100

Análisis Químicos

La composición proximal de las harinas de pescado fue determinada por las técnicas oficiales de la Association of official Analytical Chemists (AOAC) [1]. A las muestras de harina de pescado, digesta ileal, así como a las dietas ofrecidas se les determinó óxido de cromo por espectroscopia de absorción atómica (Espectrómetro Varian Spectra AA-20, Victoria, Australia), equipado con lámpara de cátodo hueco para cromo ($\lambda = 357,9$ nm) y flama de aire/acetileno, previa digestión de las muestras por energía de microondas, a un rango del 80 al 100% a 90 Psi por 55 minutos. A las muestras de harina de pescado, digesta ileal, dietas y muestras guanidinadas se les determinó aminoácidos por HPLC (Cromatógrafo Varian 9010, Walnut Creek, EUA), columna microsorb RP-C18 (10 x 4,6 mm), detector de fluorescencia a $\lambda = 340$ nm (excitación) y 455 nm (emisión), fase móvil de metanol, acetato de sodio pH 2,2 y tetrahidrofurano al 1%, previa hidrólisis ácida (HCl 6N) de las muestras. Para las muestras guanidinadas no se llevó a cabo la dilución con el buffer de citratos [6].

Cálculos

Para los cálculos correspondientes se utilizaron las siguientes fórmulas:

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

Flujo ileal endógeno de lisina = Concentración de lisina en digesta ileal X (Cromo en dieta/Cromo en ileón) de las muestras obtenidas del bioensayo de ratas alimentadas con CHE.

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

Digestibilidad Aparente de lisina o lisina reactiva = 1- (Cromo en dieta x lisina o lisina reactiva en ileon/ lisina o lisina reactiva en dieta x cromo en ileon).

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

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

Análisis Estadístico

A los resultados obtenidos se les realizó un análisis descriptivo y se sometieron a un ANOVA de una sola vía y prueba de comparación de medias por el método de Tukey, con un nivel de significancia de 0,05 usando el programa estadístico NCSS, versión 6,0 (Number Cruncher Statistical System for Windows, Kaysville, Utah) [19].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición Química de las Harinas de Pescado

La composición proximal, así como el perfil de aminoácidos de las harinas de pescado peletizada y extrusionada analizadas en este estudio se presentan en la TABLA II.

Condiciones de Guanidinación

Con las condiciones iniciales de guanidinación se obtuvo un porcentaje de conversión de lisina a homoarginina de 33%, valor muy por debajo de lo reportado por Vulmurugu y col. [24], de 69%. Por lo que fue necesario probar diferentes condiciones de guanidinación en harina de pescado: pH 10,6, 21°C, 3 días de incubación; pH 11, 30°C, 11 días de incubación; pH 11, 30°C, 5 días de incubación. El máximo grado de conversión de lisina a homoarginina se logró con los siguientes parámetros: Cinco días de incubación en 0-metil isourea a pH 11,0, en un baño con agitación a 30°C y una relación de reactivo a lisina > de 1000. El porcentaje de conversión de lisina a homoarginina obtenido para la harina de pescado peletizada fue de 83% y para la harina de pescado extrusionada de 79%. La conversión completa de lisina a homoarginina no fue alcanzada para ninguna de las dos harinas, lo cual ya ha sido reportado por Vulmurugu y col. [24]. Estos autores reportan porcentajes de conversión variables dependiendo del ingrediente: 69-

71% para harina de pescado, 58-62% para harina de sangre y trigo, etc. Esta variabilidad refleja probablemente la inaccesibilidad de algunos residuos de lisina de ser guanidinados, asociados con otros compuestos poliméricos dentro del mismo ingrediente, o que también pueda ocurrir un proceso de de-guanidinación. Por lo que es necesario establecer las condiciones óptimas de guanidinación para cada ingrediente a analizar.

Comparación de lisina total y lisina reactiva (homoarginina) en las harinas de pescado peletizada y extrusionada

El contenido de lisina total para HPP y HPE fue de 5,7 y 5,5% respectivamente, valores más altos al contenido de lisina reactiva encontrado en ambas harinas de 5,1 y 4,4% respectivamente (TABLA III). La lisina reactiva fue 11,8 y 25,0% más baja para HPP y HPE, respectivamente. Torbatinejad y col. [21], reportaron diferencias de 20-54% en productos a base de cereales. La diferencia entre estos valores sugiere una consi-

TABLA II
COMPOSICIÓN QUÍMICA DE HARINA DE PESCADO (%)^{1/}
CHEMICAL COMPOSITION OF FISHMEAL (%)

	Harina de Pescado Peletizada	Harina de Pescado Extrusionada
Materia seca	92,1	92,74
Proteína	71,30	71,61
NNP ^b	1,26	1,24
Proteína - NNP	70,0	70,3
Grasa	9,34	9,89
Cenizas	14,13	14,21
<i>AA esenciales</i>		
Lisina	8,11	7,85
Metionina	2,38	2,32
Histidina	3,10	2,76
Fenilalanina	3,38	3,29
Tirosina	2,68	2,45
Treonina	3,64	3,53
Leucina	6,65	6,44
Isoleucina	3,93	3,87
Valina	4,37	4,41
<i>AA no esenciales</i>		
Aspártico	7,70	7,72
Serina	2,69	2,55
Glutámico	11,79	11,41
Glicina	7,07	7,03
Alanina	6,30	5,98
Arginina	5,89	5,52

NNP = Nitrógeno No Proteico. ¹ AOAC, 1990. [1]

TABLA III
LISINA TOTAL Y LISINA REACTIVA (HOMOARGININA) EN HARINA DE PESCADO PELETIZADA Y EXTRUSIONADA (%) / TOTAL AND REACTIVE LYSINE (HOMOARGININE) CONTENTS IN PELLETIZED AND EXTRUDED FISHMEAL (%)

Harina de Pescado	Lisina total ($\xi \pm DE$)	Lisina reactiva ($\xi \pm DE$)
Peletizada	5,7 \pm 0,30	5,1 \pm 0,12
Extrusionada	5,5 \pm 0,36	4,4 \pm 0,15

n= 3.

derable pérdida de lisina en las harinas analizadas. El contenido de lisina total y lisina reactiva fue más bajo para la HPE, el decrecimiento en el contenido de lisina reactiva resultó probablemente de una mayor formación de compuestos derivados de la reacción de Maillard durante el procesado de la harina.

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

En el presente estudio se consideró a los residuos de lisina alterados, como pérdida para el animal para su síntesis de proteína, y se determinó la absorción de los residuos de lisina no alterada o lisina reactiva remanentes en la harina de pescado.

La digestibilidad ileal verdadera de lisina (DIVL) y la digestibilidad ileal verdadera de lisina reactiva (DIVLR) para la HPP y HPE se presenta en la TABLA IV. Para llevar a cabo los cálculos correspondientes, se tomó en cuenta el valor obtenido por Gutiérrez y col. [6], de flujo ileal endógeno de lisina equivalente a 102 ppm.

El valor correspondiente a DIVL en ambas harinas (96,7 y 93,2%) fue más alto que el valor de DIVLR (87,7 y 86,5%). La estimación de la DIVL puede incluir, no solo la lisina que está presente en la proteína, sino también, la lisina dañada por reacción de Maillard que se revierte a lisina durante la hidrólisis ácida en el análisis convencional de aminoácidos. Además, el método para determinar digestibilidad ileal de aminoácidos, no siempre predice en forma adecuada la disponibilidad de la lisina en ingredientes tratados térmicamente y puede sobreestimar su valor hasta en un 20-30% [2].

En este estudio, la DIVL sobreestimó la digestibilidad de lisina en un 5,6% para HPP y en un 7,18% para HPE. Rutherford y Moughan [18], reportaron diferencias de 6,5 a 14% en productos lácteos. La DIVL no predice en forma precisa el contenido de lisina disponible, mientras que la DIVLR mide la absorción en el intestino delgado de moléculas de lisina estructuralmente inalteradas y provee estimados más precisos de lisina disponible.

Comparación de Lisina Reactiva Digestible y Lisina Digestible.

La técnica de lisina reactiva digestible empleada en este estudio, es una modificación de la técnica tradicional de la di-

TABLA IV
DIGESTIBILIDAD ILEAL VERDADERA DE LISINA Y DE LISINA REACTIVA EN HARINA DE PESCADO PELETIZADA Y EXTRUSIONADA (%) / TRUE ILEAL TOTAL AND REACTIVE LYSINE DIGESTIBILITY IN PELLETIZED AND EXTRUDED FISHMEAL (%)

Harina de Pescado	DIVLR ($\xi \pm DE$)	DIVL ($\xi \pm DE$)
Peletizada	87,7 \pm 3,07	96,7 \pm 1,05
Extrusionada	86,5 \pm 1,5	93,2 \pm 3,21

DIVLR= Digestibilidad ileal verdadera de lisina reactiva.

DIVL= Digestibilidad ileal verdadera de lisina.

n=3.

gestibilidad ileal de aminoácidos. Sin embargo, con la técnica de lisina reactiva digestible, se determinan los contenidos de lisina reactiva de las dietas y digesta ileal en lugar de determinar contenido de lisina total. Con esto se elimina el problema de obtener valores de lisina sobreestimados debido a la interferencia de los derivados de la reacción de Maillard. Los valores de lisina digestible encontrados para HPP y HPE fueron de 5,5 y 5,1%, respectivamente, valores más altos que los correspondientes a lisina reactiva digestible de 4,5 y 3,8%, respectivamente (TABLA V). La estimación de la lisina digestible puede incluir, no solo la lisina que está presente en la proteína, sino también, la lisina dañada por reacción de Maillard, como se mencionó anteriormente, que se revierte a lisina durante la hidrólisis ácida en el análisis convencional de aminoácidos. En este estudio, la lisina digestible sobreestimó el contenido de lisina en un 22,2% para HPP y en un 34,2% para HPE. Se ha reportado un 36,9% de sobreestimación en maíz seco y un 6,5% en bebidas a base de leche [17]. Los valores de lisina reactiva digestible obtenidos en este estudio (4,5 y 3,8%) fueron más bajos que el valor de lisina reactiva determinado por el método de Carpenter en una harina de pescado con contenido de lisina de 5,4%, el cual corresponde a 4,9%. Existe la evidencia de que en alimentos que han sufrido daño por reacción de Maillard, la lisina reactiva es absorbida en forma incompleta [3, 4, 22]. Por lo que, métodos como el FDNB (2-Fluoro di-nitro benceno) o método de Carpenter, que miden la lisina químicamente reactiva, no son muy precisos, ya que asumen una completa digestión y absorción de la lisina reactiva [4, 11, 13]. Los resultados obtenidos de lisina reactiva digestible se compararon con datos de disponibilidad de lisina reportados en la literatura y obtenidos a través de estudios de crecimiento. El contenido de lisina reactiva digestible para HPP (4,5%) fue muy similar a los reportados (4,2 y 4,3%) (TABLA V), por lo que la determinación de la lisina reactiva digestible se puede considerar un indicador confiable de la disponibilidad de la lisina en harina de pescado.

Adicionalmente se comparó el contenido de lisina total (LT) y lisina reactiva digestible, obteniéndose un 21% de reducción en el contenido de lisina reactiva digestible para la HPP y 30,9% para la HPE. En un estudio realizado por Hen-

TABLA V
LISINA DIGESTIBLE y LISINA REACTIVA DIGESTIBLE EN
HARINA DE PESCADO PELETIZADA Y EXTRUSIONADA
COMPARADA CON VALORES DE DISPONIBILIDAD (%) /
DIGESTIBLE LYSINE AND DIGESTIBLE REACTIVE LYSINE
IN PELLETIZED AND EXTRUDED FISHMEAL COMPARED
WITH AVAILABLE LYSINE VALUES (%)

Harina de pescado	Lisina digestible	Lisina reactiva digestible	Lisina disponible
Peletizada	5,5	4,5	4,2 ¹ 4,3 ²
Extrusionada	5,1	3,8	

¹= Thaler, R.C. 2002 [20]. ²= Batterham, E.S. 1992 [2].

dricks y col. [7], se encontró una reducción de 10 a 14% en el contenido de lisina reactiva de Carpenter (LRC) en harina de soya extrusionada y de 16% en harina de chícharos extrusionada [20]. Se ha reportado un comportamiento similar en canola procesada por extracción en frío con LT del 1,7% y de LRC de 1,3%; en canola procesada por extracción con solvente con 1,8% LT y 1,1% LRC; en canola procesada por extracción con expeler con 1,7% LT y 1,08% LRC [23].

Este método ha sido aplicado para determinar lisina reactiva digestible en chícharos. Los resultados obtenidos han sido muy cercanos a los valores de disponibilidad de lisina determinada por el método de relación de pendientes y el de regresión, los cuales involucran estudios de crecimiento [15]. También se ha aplicado en leche y caseína [17] y cereales [21].

CONCLUSIONES

El método de la lisina reactiva digestible empleado en este estudio fue sensible para detectar diferencias en el contenido de lisina reactiva digestible entre harina de pescado peletizada y harina de pescado extrusionada y además, resultó ser un indicador adecuado de disponibilidad de lisina. El método de la lisina digestible sobreestimó el contenido de lisina en un 22,2% para harina de pescado peletizada y en un 34,2% para la harina de pescado extrusionada. Se recomienda que para ingredientes proteicos procesados, la lisina se determine como lisina reactiva digestible más que como lisina digestible.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the AOAC**. 15th Ed. Arlington, Virginia. USA. 854-855pp.1990.

[2] BATTERHAM, E.S. Availability and utilization of amino acids for growing pigs. **Nutr Res. Rev.** 5: 1-18. 1992.

[3] BOCTOR, A.M.; HARPER, A.E. Measurement of available lysine in heated and unheated foodstuffs by chemical and biological methods. **J. Nutr.** 94: 289-298. 1968.

[4] DESROSIERS, T.; SAVAIRE, L.; BERGERON, G.; PARENT, G. Estimation of lysine damage in heated whey proteins by furosine determinations in conjunction with the digestion cell technique. **J. Agric. Food Chem.** 37: 1385-1391. 1989.

[5] FOWLER, V.R. Fishmeal in the diets of pigs. **Fishmeal Information Network (FIN)**. Reproduced from Pig Farming. 1-8 pp. 1997.

[6] GUTIÉRREZ-CORONADO, L.; GARCÍA-RICO, L.; VÁZQUEZ-ORTÍZ, F.; AHUMADA, S. Comparación de métodos para determinar el flujo ileal de aminoácidos y la digestibilidad verdadera de aminoácidos de harina de pescado suministrada a ratas. **Rev. Científ FCV-LUZ**. XV (5): 451-457. 2005.

[7] HENDRIKS, W.H.; MOUGHAN, P.J.; BOER, H.; VAN DER POEL, A.F.B. Effects of extrusion on the dye-binding, fluorodinitrobenzene-reactive and total lysine contents of soyabean meal and peas. **Anim. Feed Sci. Tech.** 48:94-109. 1994.

[8] HURRELL, R.F.; CARPENTER, K.J. The estimation of available lysine in foodstuffs after Maillard reactions. In: Eriksson, L. (Ed) **Progress in Food and Nutrition Science**. Vol 5. **Maillard reactions in food**. Pergamon Press, Oxford. U.K. 159-177 pp. 1981.

[9] KNABE, D.A.; LA RUE, D.C.; GREGG, E.J.; MARTINEZ, G.M.; TANKSLEY JR, T.D. Apparent Digestibility of nitrogen and amino acids in protein feedstuffs growing pigs. **J. Anim. Sci.** 67:441-458. 1989.

[10] MAURON, J.; BUJARD, E. Guanidination, an alternative approach to the determination of available lysine in foods. **Proc. 6th Int. Nutr. Congr.** Edinburgh: 08/9-15/1963. 489-490 pp.1964.

[11] MOUGHAN, P.J.; RUTHERFURD, S.M. A New method for determining digestible reactive lysine in foods. **J. Agric. Food. Chem.** 44: 2202-2209. 1996.

[12] MOUGHAN, P.J. Absorption of chemically unmodified lysine from proteins in food that have sustained damage during processing and storage. **J. AOAC Int.** 88 (3): 949-954. 2005.

[13] PARTANEN, K.; SILJANDERRASI, H.; ALAVIUHKOLAT, T.; VANDERPALS, N. Utilization of reactive lysine from meat and bone meals of different ash content by growing-finishing pigs. **Agric. Food Sci. in Finland** 1 (7): 1-11. 1998.

[14] PETERSON, W.R.; WARTHESEN, J.J. Total and available lysine determinations using high pressure liquid chromatography. **J. Food Sci.** 44:994-997. 1979.

[15] RUTHERFORD, S.M.; MOUGHAN, P.J.; VAN OSCH, L. Digestible reactive lysine in processed feedstuffs. Appli-

- cation of a new bioassay. **J. Agric. Food. Chem.** 45: 1189-1194. 1997.
- [16] RUTHERFORD, S.M.; MOUGHAN, P.J. Application of a new method for determining digestible reactive lysine to a range of variably heated protein sources. **J. Agric. Food Chem.** 45: 1582-1586. 1997.
- [17] RUTHERFORD, S.M.; MOUGHAN, P.J. The digestible amino acid composition of several milk proteins: Application of a new bioassay. **J. Dairy Sci.** 81: 909-917. 1998.
- [18] RUTHERFORD, S.M.; MOUGHAN, P.J. Digestible reactive lysine in selected milk-based products. **J. Dairy Sci.** 88: 40-48. 2005.
- [19] STEEL R.G.; TORRIE, J.H. Análisis de varianza. Capítulo 7 En: **Bioestadística Principios y Procedimientos**. 2da. Ed. McGraw-Hill Interamericana, México. 622 pp. 1988.
- [20] THALER, R.C. Dehulled soyabean meal as a meat and bone meal substitute in swine rations. American Soybean Association. Technical Bulletin. 1-5 pp. 2002.
- [21] TORBATINEJAD, N.M.; RUTHERFORD, S.M.; MOUGHAN, J.P. Total and reactive lysine contents in selected cereal-based food products. **J. Agric. Food Chem.** 53 (11): 4455-4458. 2005.
- [22] VALLE-RIESTRA, J.R.H. Digestion of heat-damaged egg albumen by the rat. **J. Nutr.** 100: 873-882. 1969.
- [23] VAN BARENVELD, R. Australian canola meal – A valuable component of pig feed. Australian Pork Limited (APL). Australia. On Line: <http://www.apl.au.com/> (25-01-06), Technical Notes.pdf. 2006.
- [24] VULMURUGU, R.; IMBEACH, M.; ANGKANAPORN, K.; BRYDEN, W.L. Guanidination of lysine in cottonseed protein. **J. Agric. Food Chem.** 44: 1812-1815. 1996.
- [25] WISEMAN, J.; JAGGER, S.; COLE, D.J.A.; HARESING, W. The digestion and utilization of amino acids of heat-treated fish meal by growing finishing pigs. **Anim. Prod.** 53:215-225. 1991.