

I. INTRODUCCION

El siglo XX se ha caracterizado por el gran avance científico y tecnológico, donde se han obtenido grandes logros para el bienestar de la humanidad. La tecnología de los alimentos, dentro de este avance cumple con varias funciones, como son la de mejorar las propiedades de los alimentos, conservarlos, evitar o reducir algunas de las características indeseables y facilitar su consumo. Así mismo, modificar la composición del alimento mediante el aumento o reducción del contenido de uno o más nutrimentos, como es el adicionar proteínas, para satisfacer demandas especiales de poblaciones. Tomando en cuenta costo y disponibilidad de alimentos, como es en la situación actual de nuestro país. (INEGI, 1994).

Siendo las proteínas de un orden primario para la nutrición, cabe destacar su importancia en la alimentación. Así, las proteínas o los aminoácidos de origen animal que se incorporan a los alimentos, deben tener un valor nutricional bueno para que tengan un mejor aprovechamiento. Apoyándose en la declaración sobre los derechos alimentarios del hombre, que enuncia: Todo ser humano tiene derecho a una alimentación suficiente y saludable. De esto se crea la necesidad de hacer nuevos alimentos de buena calidad y bajo costo para las poblaciones en América Latina, y en especial para México donde cada día va en aumento la población, y la demanda de alimentos en cantidad y calidad. Según el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubiran, señala que existen focos de poblaciones con desnutrición, como es el área rural donde un 57.4% de los niños menores de 4 años presentan desnutrición. Y en la población urbana marginada también se presenta la desnutrición debido a la miseria y su bajo poder adquisitivo (Giral, 1983)

De la misma manera en que hemos ido caminando por el desarrollo y el progreso, el ser humano a creado desechos, sobre todo de tipo industrial, que rompen con los procesos ecológicos de la vida, acabando con fuentes alimenticias, muy

importantes y formando peligros potenciales, para el futuro del lugar donde vivimos que es nuestro planeta.

La industria de la tenería, estando acorde a las necesidades ecológicas de nuestro país, y al moderno enfoque que se a dado para reducir el impacto de sus desechos y subproductos. Nos ha llevado a la tarea de crear nuevos caminos para dar un uso adecuado de los desechos obtenidos en los primeros pasos de la manufactura de la piel de bovino. Estos desechos son ricos en nutrimentos proteicos, de tipo fibroso y corresponden a la estructura del tejido conectivo de los animales superiores que se encuentra en mayor cantidad en el área reticular de la dermis de los bovinos. (Banks, 1980).

Por otra parte, el alto costo en la producción de forraje y la escasez de alimento para el ganado bovino, así como el mantenimiento de éste, ha permitido la creación de dietas específicas complementadas o enriquecidas con aminoácidos que cumplen con las necesidades nutritivas del ganado y que se apliquen para una buena producción ganadera, de bajo costo y alto rendimiento (Agricultural Research Council, 1968). Lo que implica introducir nuevas técnicas y materias primas que puedan ser satisfactorias, para la obtención de productos finales, que no requieran tanto proceso ni equipo especial. La alimentación animal no es únicamente nutrición aplicada, sino un arte complejo, donde juegan un papel muy importante no sólo los principios nutricionales, sino los económicos, los de demanda, de mercadeo, de manufactura en general del ganado y los productos que se obtienen de él.

La East/West Technolo. Dig. (1983), publicó en los Estados Unidos de Norteamérica que el material de desecho, que proviene de los primeros pasos del tratamiento que se le da a la piel de ganado bovino en las tenerías, puede ser usado en otras industrias y junto con Hungary's Novex Co. Ltd. menciona que la proteína con un alto contenido de aminoácidos puede ser usada como forraje y que además el proceso no debe de ser complicado.

En la actualidad en los Estados Unidos se producen alrededor de 40 millones de cabezas de ganado por año; dándonos una idea de la importancia a nivel mundial de la ganadería, y de la industria que procesa los productos del ganado bovino, como es la industria de la manufactura de la piel o la tenería. En el estado de Nuevo León la industria Agropecuaria reporta que existen 512,422 cabezas de ganado bovino en cría y engorda en el año de 1993 (INEGI, 1994). Y en el país existen alrededor de 20 millones de cabezas de ganado bovino de cría y engorda, dando un aporte muy significativo para el mantenimiento y economía del país.

La cantidad de desecho que se produce en las tenerías, donde es procesada la piel de ganado bovino, llega a ser aproximadamente de 20 toneladas al año, y esta cantidad cambia de acuerdo a la época del año. En la actualidad este subproducto de la industria de la tenería, es utilizado en la fabricación de gelatina, algunos la utilizan como alimento para cerdos y pollos pero sin una base científica y otros son desechados incinerándolos, o confinándolos con los demás subproductos que se producen en la manufactura de la piel de bovino al ser procesada.

El uso potencial de estos desechos proteicos no ha sido debidamente explotado, ya que su bajo costo y el contenido de aminoácidos que posee, son adecuados para ser usados como fuente de proteína. Ya sea para enriquecer las dietas de ganado bovino, o como materia prima para la obtención de aminoácidos e hidrolizados, también pueden ser utilizados en la industria de la alimentación, como complementos alimenticios, suplementos o potenciadores de sabor, y productos no alimenticios como fertilizantes, adhesivos, y en la industria farmacéutica. Esto da una idea del campo tan extenso donde estos subproductos pueden ser utilizados.

El Subproducto de tenería es único en su tipo como proteína y se compara con el colágeno (Ramshaw, 1985), debido al perfil de aminoácidos que posee, como son prolina, hidroxiprolina, glicina y alanina. Y aunque es deficiente en triptofano y lisina puede ser usado como fuente de aminoácidos para enriquecer alimentos para ganado y para uso humano (Henrickson, 1980).

En nuestro país, en la actualidad existen muy pocas industrias donde se producen aminoácidos, y estos se fabrican preferentemente a partir de fermentaciones. Es una realidad, que México depende de la tecnología y la manufactura de otros países, como son Alemania, Japón y U.S.A., para satisfacer las necesidades de la industria alimentaria Mexicana. (DEIA, 1994). Los aminoácidos que se comercializan, de manera importante son Lisina y Metionina, para la suplementación de alimentos humanos, y en la nutrición animal. El ácido glutámico se utiliza como la sal sódica o glutamato de sodio, como potenciador de sabor. Por lo anterior y a solicitud de una empresa de tenería, se realiza este estudio que pretende evaluar la utilización de los desechos o subproductos de tenería en la elaboración de una harina para alimentación de bovinos. Y la cuantificación de aminoácidos que sean tecnológicamente o nutricionalmente importantes.

II. HIPOTESIS DE TRABAJO

Es posible utilizar los subproductos de la piel del ganado bovino, como fuente proteica en la alimentación de ganado bovino y como materia prima para la obtención de aminoácidos y/o hidrolizados.

III. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

1. Elaborar una harina con la dermis de bovino, la cuál se valore química y nutricionalmente.
2. Determinar las condiciones óptimas de hidrólisis para obtener el máximo rendimiento de aminoácidos
3. Identificar mediante hidrólisis de la proteína del subproducto de tenería los aminoácidos de importancia nutricional y/o tecnológica.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Elaborar una harina a partir de subproductos de la dermis de res.
2. Conocer la composición química, la digestibilidad y/o utilización biológica por rumiantes de la harina de subproducto de tenería.
3. Elaborar una formulación en la cual se incluya como aporte proteico la harina obtenida.
4. Determinar las condiciones de hidrólisis óptimas para la máxima recuperación de los aminoácidos del subproducto de tenería.

IV. ORIGINALIDAD

El desarrollo tecnológico para la utilización de subproductos o productos de desecho que genera la industria, tiene en la actualidad una gran importancia, desde el punto de vista económico, de regulación sanitaria y en general de preservación del medio ambiente, así estos desechos de la industria de la tenería se usarán como fuente de proteína para la elaboración de dietas para ganado bovino, pudiéndose con la utilización de los resultados obtenidos, dar un valor agregado y evitar su confinamiento o mal uso, ayudando económicamente a la industria y evitando la contaminación, ya que actualmente y en especial, en el estado de Nuevo León, algunos de estos desperdicios se tiran a la intemperie produciendo malos olores y propiciando infecciones para los habitantes cercanos a los tiraderos.

En la actualidad no se le da un uso adecuado a estos subproductos, pudiéndose utilizar como materia prima para obtener gelatina, sin embargo no existen en Nuevo León industrias de este producto, presentándose así, el inconveniente de la conservación y transporte. También, se utiliza como sobrante para alimentar cerdos y pollos pero sin una base o fundamentación científica.

Según la English and Hungary's Novex Co. Ltd. (1983), empresa de los Estados Unidos que pertenece al ramo de la industria de la tenería, menciona que el material de desecho que proviene de los primeros pasos del tratamiento que se le da a la piel de ganado bovino en las tenerías, puede ser usado en otras industrias. Y la proteína que contiene posee aminoácidos que pueden ser usados en alimentación animal y además el proceso no debe ser complicado.

Observando las diferentes condiciones de hidrólisis que se puedan aplicar al subproducto de tenería estudiado y cuantificando los aminoácidos encontrados en su proteína, se pretende dar información respecto al potencial de estos desechos para la obtención de aminoácidos y/o hidrolizados a nivel industrial.

V. ANTECEDENTES

5.1 USO POTENCIAL EN LA ALIMENTACION DE GANADO

5.1.1 DATOS HISTORICOS

Las ganaderías americanas tienen su origen en el segundo viaje de Colón. Indiscutiblemente, la gran diferencia entre el Viejo Mundo y América estriba en la fauna, especialmente de animales domésticos. Aquella observación inicial de Colón, en los primeros días de las islas antillanas, sobre no haber visto ni cabras ni ninguna otra bestia parecida. Con excepción de algunos venados, bisontes o búfalos, los esquiucles y llamas. A pesar de las escasas novedades con que Colón alcanzó a los Reyes de Barcelona, a la vuelta de su primer viaje, en la corona de Castilla se valora o se intuye la riqueza potencial de las nuevas tierras. Como siempre, la intervención oportuna de este gran artífice de la historia española, Fray Hernando de Talavera como el confesor de la Reina, aconseja crear una comisión técnico-administrativa, para organizar el segundo viaje de Colón que ha sido justamente la gran expedición colonizadora como el modelo de un ensayo de población de nuevas tierras. Vale la pena dejar palabra a uno de los primeros cronistas, López de Gomara, quien hace la siguiente y espléndida síntesis de la preparación del aludido segundo viaje: *Comprándose a costa también de los reyes muchas yeguas, vacas, cabras y asnos para casta porque ahí no había semejantes animales.* (Giral, 1983).

Esta claro que la máxima importancia en las aportaciones del Viejo Mundo al Nuevo Mundo son las grandes ganaderías americanas que tienen su origen histórico en ese segundo viaje de Colón aunque después de siglos, se hayan hecho valiosas aportaciones para incrementar y mejorar la zootecnia, procedente de Europa, Asia y Africa. A partir de 1493 se hace posible que el ganado vacuno de todas las razas del mundo lleguen a encontrar pastos espontáneos y climas suaves y apropiados en América.

En México el consumo de los productos de ganado bovino como fuente de proteína, se han incrementado desde el siglo pasado debido a la gran demanda de poblaciones. (Casanova, 1983).

5.1.2 UTILIZACION ACTUAL DE LA DERMIS DE BOVINO

El subproducto de tenería estudiado es la dermis de bovino, mejor conocida como pellejo o carnaza, este no ha tenido una utilización específica en la alimentación de ganado bovino, y a nivel industrial sólo se utiliza como materia prima para obtener gelatina, y también se utiliza como sobrante para alimentar cerdos y pollos pero sin una base o fundamentación científica, haciéndose solamente en una forma empírica y para no crear desecho o basura. (Sánchez, 1995).

En los Estados Unidos estos desechos de tenerías se han estado usando para elaborar dietas para pollos, remplazando los niveles de proteína usadas a partir de soya en un 75% por la proporcionada por el subproducto de tenería hasta en un 35% añadiendo triptofano a la dieta, ya que es un aminoácido limitante (Weisman y Engel, 1961).

Se ha encontrado que los pollos alimentados con el 2% a 8% de hidrolizados de piel proporcionaban un buen aporte de aminoácidos, pero deficiente de metionina, triptofano y lisina para las necesidades de los pollos (Waldroup, 1970).

El uso de hidrolizados de desechos de piel de tenerías en dietas para ovejas, como aporte de aminoácidos hasta en un 75% en sustitución de proteína de soya, ocasionó un decremento en la digestibilidad hasta en un 25% (Knowlton, 1976).

En estudios hechos en Polonia se usó el desecho de piel obtenido en las tenerías, para hacer una dieta para alimentar cerdos y pollos, dando un tratamiento especial al desecho para hidrolizarlo y obtener una mejor disponibilidad de aminoácidos,

encontrando que la proteína de estos desechos era alta en glicina, prolina y ácido glutámico; y bajo en lisina, metionina y triptofano (Felicjanaik, 1977).

Easton, I. y Glen, J. (1981), trataron los desechos de piel de bovino en las tenerías, hidrolizándolos a través de métodos térmicos, enzimáticos y con ácido sulfúrico, usando éstos hidrolizados para preparar spray y gel añadiendo glicerol y agua para obtener preparados usados como protectores para la piel del ganado bovino.

En México, el desecho de tenerías como es la dermis de bovino que es rica en proteína, se usa para elaborar gelatina y en otras tenerías menores el pellejo se desecha sin mayor importancia, dándola como alimento sobrante o simplemente se desecha en cementerios clandestinos de basura en especial en la Cd. de Monterrey, N. L. (Sánchez, J. 1995).

5.1.3 EXIGENCIAS NUTRICIONALES DEL GANADO BOVINO

Para la mayoría de las especies los aminoácidos denominados esenciales son 10: lisina, triptofano, histidina, fenilalanina, leucina, isoleucina, treonina, metionina, valina y arginina. Se ha confirmado que este último puede ser sintetizado en pequeñas cantidades por algunos mamíferos, pero no en cantidades suficientes para permitir el máximo crecimiento, encontrándose que los de mayor requerimiento son lisina, leucina, isoleucina y metionina. En el ganado bovino que es un rumiante, no existen propiamente requisitos de aminoácidos, puesto que los microorganismos del rumen pueden sintetizar aminoácidos y formar proteína desde fuentes no-proteicas (Hale, J., 1984). Además poseen un mecanismo para ahorrar nitrógeno, cuando el contenido de éste es bajo en la dieta. Los requisitos básicamente son calculados por el Subcomité de ganado de carne NRC (1984).

Las proteínas de los alimentos son degradados por los microorganismos del rumen vía aminoácidos para formar amoniaco y ácidos orgánicos (ácidos grasos con

cadena múltiple). El amoníaco también viene de las fuentes de nitrógeno no-proteico de los alimentos y de la urea reciclada de la saliva y a través de la pared del rumen. Niveles demasiado bajos de amoníaco causan una escasez de nitrógeno para las bacterias y reduce la digestibilidad de los alimentos. Demasiado amoníaco en el rumen produce una pérdida de peso, toxicidad por amoníaco y en casos extremos, la muerte del animal. El amoníaco es utilizado para el crecimiento de la población bacteriana. El nivel de utilización de amoníaco para sintetizar proteína microbiana depende de la disponibilidad de energía generada por la fermentación de los carbohidratos. En promedio, 20 g de proteína es sintetizada por 100 g de materia orgánica fermentada en el rumen. Usualmente una porción de proteína de la dieta resiste la degradación en el rumen y pasa al intestino delgado sin degradarse. La resistencia a la degradación en el rumen varía considerablemente según la fuente de proteína. Usualmente las proteínas en forraje son degradadas a un nivel de 60-80% y las proteínas de concentrados o subproductos industriales a un 30-60% (Wattiaux, 1997).

La buena alimentación del ganado depende en gran parte de las prácticas agronómicas del ganadero. Este siempre necesitará de grandes cantidades de forraje y concentrados. Los sistemas que siguen los ganaderos para alimentar su ganado es un reflejo de la tradición y las condiciones agrícolas de la región (De Alba, 1973).

Para determinar si la alimentación de un hato ganadero es buena, es indispensable compararla con alguna base considerada como adecuada, y esto dependerá de muchos factores; como son la calidad del forraje y las necesidades de energía del bovino. Así mismo, se determinará el estadio a la que va dirigida la ración o dieta diseñada (De Alba, 1973).

Kameoka y Morimoto (1959), pusieron a una cabra en una dieta con cero de nitrógeno, después introdujeron caseína en el estómago verdadero y descubrieron que el contenido del rumen se enriquecía con alrededor de 2 g de nitrógeno al día concluyendo que hay una recirculación de nitrógeno, a través de las paredes de la panza.

Elliot (1961) estudió, el valor biológico de las proteínas para ganado bovino en engorda, examinó las consecuencias sobre el metabolismo del rumen, de una dieta demasiada alta en proteínas. A nivel ascendente, la digestibilidad de la proteína en el rumiante es gradualmente mayor hasta alcanzar niveles del 77% y 80%, sin embargo mucho de este beneficio es espúreo puesto que desaparece del rumen en forma de amoníaco, y a niveles mayores del 20% de proteína hay una pérdida considerable en incremento calórico.

Elliot (1961) ilustró, el principio de la digestibilidad de la proteína y su relación con el consumo voluntario o alimentación voluntaria, usando harina de yuca y torta de maíz sobre alimentación básica de pasto jaragu (*Hyparrhenia* sp.), observando que a mayor cantidad de proteína había mayor consumo.

Los concentrados básicos para la formación de mezclas son los cereales, maíz, trigo, sorgo y el grano de soya molido, todos estos granos se utilizan triturados, machacados o con tratamientos térmicos previos y poseen diferentes porcentajes de proteína dependiendo de la fuente de obtención. La Tabla No.1 muestra los concentrados comunes y su contenido de proteína total.

Tabla No. 1 Porcentaje de Proteína en Concentrados Básicos para dietas de Bovinos

menos 8%	8% al 13%	15% al 25%	35% al 45%	arriba de 45%
Melaza	Trigo	Afrecho de trigo	P. de Ajonjolí	H. de Sangre
H de Yuca	Maíz	Granaza de Trigo	Soya Molida	H. de Plumas
Pulpa de remolacha	Cebada	Pasta de coco	Pasta de Linaza	H. de S. T.
Pulpa de Cítricos	Sorgo	Pasta de girasol	Pasta de maní	H. de Hueso y carne
*H Harina	p. Pasta	S.T. subproducto de tenería		

Los subproductos industriales como las vinazas de cervecería o destilería son utilizadas en forma fresca en casi toda América Latina, y son más bien sustitutos del ensilaje, en vez de concentrados. Las vinazas de destilerías o cervecerías, tienen un valor mucho más elevado y no deben de pasar de un tercio de la fórmula concentrada (De Alba, 1973).

5.2 DIGESTIÓN DE LOS RUMIANTES

La digestión de los rumiantes es un proceso que envuelve una dinámica interacción entre la dieta y los microorganismos ruminales. Los rumiantes son fácilmente identificables porque mastican la comida mucho, aún cuando no ingieren alimentos. Esta masticación se llama ruminación y es parte del proceso que permite al rumiante obtener energía de la fibra. El retículo y rumen son los primeros estómagos de los rumiantes. El contenido del retículo es mezclado con el del rumen casi continuamente y ambos estómagos comparten una población densa de microorganismos como bacterias, protozoarios y hongos. El rumen puede llegar a contener hasta 100 kg de materia en digestión que puede permanecer entre 20 a 48 h. Aportando un ambiente apropiado, con un suministro generoso de alimentos, para el crecimiento y reproducción de los microorganismos. La ausencia de oxígeno en este sitio favorece el crecimiento de microorganismos que permiten convertir los alimentos fibrosos como forrajes, residuos de cultivos y agroindustriales, el amoníaco y la urea en alimentos altamente nutritivos para los seres humanos como son la carne y la leche.

Los alimentos fibrosos son esenciales para la salud del bovino porque mantienen la ruminación y la producción de saliva que son necesarias para la correcta función del rumen y los microorganismos que viven ahí. Un bovino puede comer forrajes y concentrados, sin embargo, la adición de altas cantidades de concentrados en una ración, debe ser progresiva de 4 a 5 días para permitir que la población bacteriana se adapte a la nueva dieta. (Wattiaux M., 1996).

5.3 USO POTENCIAL DE LA DERMIS DE BOVINO COMO MATERIA PRIMA PARA OBTENER AMINOACIDOS

5.3.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL COLÁGENO

El colágeno, la molécula principal de los tejidos conectivos, es la proteína más común en el mundo animal, y posee una estructura fibrosa que le confiere una alta rigidez y resistencia a la piel, de los vertebrados superiores. Debido a su alto contenido de prolina e hidroxiprolina, el colágeno no desarrolla una hélice alfa, sino una conformación que consiste en una triple hélice de cadenas polipeptídicas que se organizan en subunidades y se mantienen unidos por puentes de hidrógeno intermolecular, siendo así un soporte extracelular (Badui, 1988).

Hay por lo menos 5 tipos de colágeno, donde la glicina constituye cada tercer residuo. Esta estructura repetida puede ser representada por Gli-X-Y donde X y Y son aminoácidos diferentes, en los mamíferos cerca de 100 posiciones en X son prolina, y 100 de las posiciones en Y son 4-hidroxoprolina. Estos aminoácidos rígidos limitan la rotación de la cadena polipeptídica, además contiene 3-hidroxilisina en algunas posiciones X y 5-hidroxilisina en posiciones Y. El polímero de colágeno posee un peso molecular de alrededor de 350,000, una longitud de 3000 Å y un diámetro de 14 Å. En la Tabla No. 2 se presenta su distribución tisular y sus rasgos característicos (Bornstein P., 1980).

Tabla No. 2 Tipos de Colágeno

Tipo	Fórmula Molecular	Polímero nativo	Distribución Tisular	Rasgos característicos
I		Fibrilla	Piel, Tendón, Hueso	Cont. bajo hidroxilisina Fibrillas anchas
II	(II)	Fibrilla	Cartílago, Cuerpo vítreo, notocordio	Cont. alto hidroxilisina Fibrillas mas delgadas
III	(III)	Fibrilla	Piel, útero, vasos sanguíneos	Alto en hidroxilisina

La secuencia de aminoácidos completa de las cadenas de colágeno no es todavía conocida, pero las secuencias que aparecen con más frecuencia son Gly-X-Pro, Gly-Pro-X y Gly-X-Hyp, en las que X puede ser cualquier aminoácido, la mayor parte contiene alrededor de 35% glicina, 11% alanina, 12% prolina, hidroxiprolina 9% (Badui, 1988), siendo este aminoácido raro en proteínas distintas al colágeno. Ningún otra proteína que no sea colágeno contiene cadenas tripolohelicoidales (Lehninger, 1993).

5.3.2 METODOS DE HIDRÓLISIS ÁCIDA DE PROTEÍNA

Los métodos más usuales de hidrólisis ácida utilizan HCl 6M a temperaturas de 110°C y en atmósfera de N₂ por 22 a 24 h, Sin embargo, la selección final dependerán del aminoácido que se desee aislar en mayor cantidad.

Goldnik, A. (1983) refiere, que trató la piel de bovino hidrolizando a 110°C con HCl 6M (3 partes) conteniendo algo de NaH₂PO₂ en atmósfera de nitrógeno, con el objetivo de aislar aminoácidos en el desecho obtenido de la piel de bovino en las tenerías, obteniendo una hidrólisis de 85%, posteriormente el hidrolizado fue cromatografiado, usando un buffer de Citratos a un pH 3.3, obteniendo una fracción que contenía hidroxiprolina, ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutámico, prolina, glicina y alanina.

Zuchowski, Jerzy (1983) utilizó, las trizas de pellejo provenientes de la piel de bovino desechados en las tenerías donde fueron calentados a 110°C por 2.5 h a presión atmosférica para separar la grasa y obtener aminoácidos, luego lo hizo a 55°C y a 150°C, observando que a altas temperaturas hay pérdida de histidina, lisina, triptofano y metionina, sobre todo a la última temperatura de autoclaveado debido a la gelificación de la proteína.

Los primeros métodos de la AOAC (1985), para determinar cistina y metionina requieren de una oxidación con ácido per fórmico antes de la hidrólisis, además la presencia de cloruros puede interferir en la obtención de la metionina, esta interferencia puede ser eliminada usando el ácido per fórmico, recomendándose especiales cuidados para ajustar las condiciones de la oxidación cuando se va a determinar la cantidad de aminoácido en alimentos ricos en sal (NaCl). Se ha recomendado que estas condiciones de oxidación y de hidrólisis pueden ser usadas pero solamente para determinar ciertos aminoácidos, exceptuando triptofano, tirosina, fenilalanina e histidina.

Gehrke en 1985 (30) recomienda que para obtener o determinar la metionina y la cistina la proteína debe oxidarse con ácido per fórmico, pero aquí la treonina y la serina son destruidos en contraste con la valina y la isoleucina que no son obtenidos completamente después de 22 a 24 h, para trabajos específicos las condiciones de hidrólisis y sus tiempos deben de estar en orden para obtener los máximos rendimientos para los valores de treonina, serina, valina e isoleucina.

Gehrke (1987) encontró, que el tiempo de hidrólisis puede ser reducido, si se aumenta la temperatura, por lo que usó una temperatura de 145°C durante 4 h, sin pérdida de lisina pero disminuyendo la obtención de treonina y serina en porcentajes de 7 y 13 respectivamente y con aumento de valina en 8% e isoleucina en 13%.

5.3.3 METODOS PARA DETERMINAR AMINOACIDOS

La separación cuantitativa y la valoración de mezclas de aminoácidos ha tenido grandes logros desde la aparición de técnicas cromatográficas, las cuales son rápidas, precisas y sensibles, además de automatizadas y generalmente se usan para la separación, identificación y análisis cuantitativo.

Moore y Stein entre 1940 y 1958 fueron los primeros en realizar un estudio sistematizado de la separación y cuantificación de aminoácidos. Emplearon la

cromatografía de intercambio iónico (CII), utilizando columnas empacadas con resina sintética, para separar aminoácidos en hidrolizados de proteínas. A partir de esto se desarrolló un analizador automático (Blackburn, 1978).

El uso de HPLC para el análisis de aminoácidos ha tenido muchas revisiones. (Williams, 1988) determinando, que el HPLC puede ser usado como técnica para separar aminoácidos con columnas de intercambio iónico con una derivatización post-columna con ninhidrina, o con ortoftaldehído (OPA) (Ashworth, 1987) .También la derivatización pre y post-columna han sido revisados, llegando a la conclusión que los métodos de derivatización pre-columna son de más bajo costo y rápidos, comparados con los de derivatización post-columna (Engelhardt, 1986), (Cohen, 1988).

La pre-derivatización en columna para determinar aminoácidos han sido objeto de gran estudio, donde se han utilizado diferentes reactivos para hacer la pre-derivatización, así son mencionados el uso de feniltioscianto (PITC) (Yang y Sepúlveda, 1985), lo usaron como reactivo derivatizante formando feniltiocarbamil aminoácidos (PTC-aa) los cuales fueron separados a través de una columna de fase inversa empleando gradiente de elución. La detección de los derivados se hizo por espectrofotometría a 245 nm y se detectaron concentraciones menores a picomoles. El uso de ortoftaldehído (OPA), en presencia de un mercaptano, como el 2-mercaptanol (2ME), reacciona rápidamente con los aminoácidos primarios formando derivados isoindol altamente fluorescentes (Bidlingmeyer, 1987), la excitación se produce a 240 nm y la emisión se registra a 445 nm, la reacción es rápida, se hace en medio acuoso y a temperatura ambiente como se muestra en la Fig.1(Salazar, 1993).

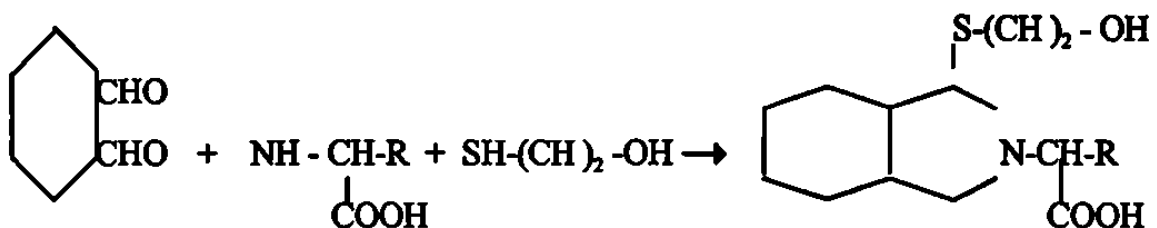


Fig.1 Reacción de aminoácidos con el reactivo OPA/2 ME para producir derivados isoindol fluorescentes.

Diversos autores como muestra en la evaluación cuantitativa en The Report of Joint FAO/Who (1990): Jones y Gilligan (1983) utilizaron, 9-fluorenylmethyl cloroformato (FMOC-Cl), Emarsson (1983) utilizó, 1-fluoro-2,4-dinitrobenzono (FDNB), Morton y Gerber (1988) derivataron con DNPA, Koccar y Christen (1989) usaron Cloruro de Dansilo (DANS), Thio y Thompkins (1989) el DANS, este forma derivados con aminoácidos primarios y secundarios. La detección de los derivados se realiza por fluorescencia. La reacción consume tiempo y el reactivo es fluorescente por sí mismo, las condiciones para la dansilación son extremadamente variables. Y el exceso de DANS interfiere en las separaciones cromatográficas, por lo que tiene que ser removido, además de la falta de especificidad ya que genera muchos derivados. La tabla No.3 muestra los diferentes métodos propios para derivatizar pre-columna.

Tabla No. 3 Características de reactivos para derivatizar

	I	II	III	IV	V	VI
Tiempo derivatización(min)	20	0.5	5	30	50	30
Remoción de reactivos por secado	si	no	no	si	si	no
Extracción de solventes	no	no	si	no	no	no
Determinación de amino-sec.	si	no	si	si	si	si
Derivatizado estable	si	no	si	si	si	no
Interferencias en los productos	no	no	no	si	si	si
Detección (nm)	254	Fl.	Fl.	365	340	Fl.
Sensibilidad	fmol	pmol	pmol	pmol	pmol	pmol
Tiempo cromatografía (min)	15	18	30	70	110	30
Rendimiento Cuantitativo	si	si	si	si	si	si

I Feniltiocianato

II OPA (orto-ftaldehído)

III FMOC (9-fluometilcloroformato)

IV FDNB (1-fluor-2,4-dinitrobenzono)

V FDNPA (1-fluor-2,4-dinitrofenil-5-L-alanin amida)

VI DANSYL (5-dimetilamino-1-naftalensulfónico cloruro)

Fl Fluorescencia

En principio los analizadores automáticos están basados en las técnicas de intercambio iónico e incluyen automatización de pasos, como la preparación de la muestra, el control de cambios de buffer, la derivatización post-columna y el registro de cálculo de concentración de los aminoácidos. Con esto se acorta los tiempos de análisis (Salazar, 1993).

En general la cromatografía de líquido de alta resolución (HPLC) ha tenido muchas aplicaciones para el análisis de componentes como los aminoácidos. Existen muchas publicaciones recientes sobre la aplicación de HPLC al análisis de aminoácidos. Las 2 técnicas más usuales son:

- 1.- Separación a través de una columna de fase inversa en la que la derivación se hace previa a la columna (pre-columna).
- 2.- Separación de los aminoácidos a través de una columna de intercambio iónico con derivación post-columna.

Algunas diferencias importantes existen entre ambos métodos, donde la cromatografía de fase inversa con derivación pre-columna, tiene ventajas sobre la cromatografía de intercambio iónico con derivatización post-columna:

- 1.- En el método pre-columna la desproteización es deseable pero no necesaria, como ocurre en el método de derivatización post-columna.
- 2.- La cantidad de reactivo derivante es mayor en el método post-columna.
- 3.- El costo del equipo es mayor en el método post-columna, así como las columnas y eluentes.
- 4.- Los coeficientes de variación para los tiempos de retención así como para áreas y altura de los picos o concentraciones son menores en el caso de los métodos pre-columna por lo que los resultados son más precisos (Salazar, 1993)

5.3.4 METODOS PARA EXTRACCION DE AMINOÁCIDOS

Haciendo una revisión de los principios de cromatografía y sus aplicaciones, vemos que los grandes progresos logrados desde 1940 en el terreno de la extracción de aminoácidos se debe en gran parte a las técnicas de intercambio iónico. Block (1949) publicó, una revisión sobre la utilización de los intercambiadores iónicos para la separación de aminoácidos. Turba (1941) fue el primero en demostrar que los aminoácidos básicos como lisina, arginina e histidina se adsorben sobre tierras ácidas. De esta manera los otros aminoácidos pueden ser separados de la mezcla. Diversos

autores reportaron el comportamiento de los aminoácidos sobre distintas resinas sintéticas y las condiciones en que pueden ser adsorbidos sobre las Amberlite IR-100 e IR-4, prestándole particular atención al efecto del tipo de resina, granulometría de la misma, longitud de columna, velocidad de flujo del disolvente, concentración de aminoácidos, pH y, también, el comportamiento de muchas mezclas binarias y terciarias (English y Fiess, 1949). Los aminoácidos neutros son retenidos poco por los intercambiadores catiónicos, y la adsorción de los ácidos dicarboxílicos en los intercambiadores aniónicos no presenta dificultad, mientras que la separación cuantitativa de las bases hexónicas es más difícil.

Ledeerer, E. & Ledeerer, M. (1960) refieren, que Sheehan y Bolhofer en 1950 efectuaron el aislamiento de la hidroxilisina natural adsorbiéndola sobre Amberlite IRC-50. La arginina y la lisina son retenidos mediante columna de "alúmina básica".

Recientemente se ha utilizado la resina Dowex-50 para la separación de los aminoácidos básicos (Piez, 1954). describe el aislamiento de la gelatina y la resolución de sus diastereoisómeros sobre columnas sódicas de Dowex-50. La patente Inglesa No. 568.369 describe la preparación de la histidina de un hidrolizado proteico mediante adsorción sobre una columna de tierra de fuller activada, y existen también otras patentes que describen la adsorción y elución de diaminoácidos sobre intercambiadores catiónicos. Weiland en 1944 demostró que la alúmina tratada con ácido clorhídrico N fija iones cloruro y se comporta como un intercambiador aniónico. Esta "alúmina ácida" adsorbe cuantitativamente a los ácidos aspártico y glutámico y también a la cistina. Distintos investigadores describieron la adsorción de los ácidos dicarboxílicos sobre resinas sintéticas, y así Cleaver en 1967 estudió el efecto del pH y de las sales en la adsorción del ácido glutámico sobre Amberlite IR-4. (Ledeerer, E. & Ledeerer, M., 1960).

Debido a que los aminoácidos neutros están cargados negativamente pueden ser retenidos en columnas de "alúmina ácida" y separados de esta manera de otras sustancias neutras (Schramm y Primosigh, 1944). demostraron que la glicina, serina y

treonina eran los suficientemente ácidas en presencia de formaldehído, como para ser adsorbidas en "alúmina ácida". De esta manera pudieron separar estos tres aminoácidos de los otros neutros, eluyendo la columna con álcali. Los aminoácidos neutros son débilmente adsorbidos por los intercambiadores catiónicos. Cleaver y Cassidy en 1958 hallaron, que la adsorción de los aminoácidos neutros por parte de las resinas de intercambio iónico aumentan cuando se aumenta la longitud de la cadena, siendo especialmente retenida la fenilalanina. Las distintas resinas de intercambiadores difieren en su grado de adsorción, poseyendo la Dowex-50 y la Ionac A-00 la menor capacidad de adsorción para los aminoácidos neutros. Carsten y Cannan en 1952 estudiaron el equilibrio de los aminoácidos neutros sobre Amberlite IR-100, IR-120, IRA-400 y Dowex-50 con distintos aminoácidos neutros, determinando los volúmenes de retardo (Ledeeer, E., & Ledeeer, M., 1960).

Scramm y Primosigh en 1945 sugirieron la separación de los aminoácidos en 5 grupos: 1) fenilalanina, tirosina y triptofano, que se adsorben sobre carbón; 2) arginina, lisina e histidina, sobre silicagel; 3) ácidos aspártico y glutámico, sobre alúmina ácida; 4) serina, treonina, glicina y cistina, sobre alúmina ácida, en presencia de formol, y 5) alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, e hidroxiprolina, que no son adsorbidas por ninguno de estos adsorbentes. Tiselius en 1947 describe la separación de los aminoácidos en cuatro grupos, adsorbiendo los aminoácidos aromáticos sobre carbón, los básicos sobre Wofatit C y los ácidos sobre Amberlite IR-4. Fromageot en 1954 (Ledeeer, E., & Ledeeer, M., 1960), describieron un método similar, que utiliza silicagel para adsorber las bases, y la alúmina ácida para los aminoácidos dicarboxílicos. El silicagel debe ser preparado lavándolo con ácido acético al 20% y HCl 0.1N para eliminar impurezas nitrogenadas. La técnica sugerida por Fromageot en 1951 (Ledeeer, E., & Ledeeer, M., 1960), se puede utilizar también para separar también los péptidos en cuatro grupos: básicos, ácidos, aromáticos neutros y alifáticos neutros. Brenner y Frey en 1951 (PQE. FAO/WHO) han obtenido también separaciones en grupos, haciendo pasar una solución de leucina, ácido glutámico y arginina en forma continua durante 23 horas a través de dos columnas de Amberlite IR-4B y Amberlite IRC-50 respectivamente.

5.4 COMERCIALIZACION DE AMINOÁCIDOS EN MEXICO

A inicios de este siglo se descubrieron en Japón las propiedades del ácido glutámico como saborizante, comenzando la producción de glutamato de sodio a partir de hidrolizados de trigo y proteína de soya.

En el sudeste asiático Japón, Corea y Taiwan se encuentran localizados 13 de los 17 mayores productores de aminoácidos a nivel mundial; siendo las empresas japonesas como Ajinomoto, Koyowa Hakko y Tanabe Seiyaku las de mayor capacidad productiva. Existen otros productores importantes en EUA, Francia y Alemania. (García, 1989).

En México la empresa Koyowa Hakko tiene una planta productiva de L-lisina, treonina y triptofano, mientras que en EUA las compañías Ajinomoto y Koyowa Hakka producen grandes cantidades de aminoácidos. Las ventas mundiales de aminoácidos fueron de 460,000 toneladas en 1968, mientras que en 1982 había sido de 485 mil toneladas con un valor de casi 1,150 millones de dólares. El incremento de la demanda global de aminoácidos se estima que será de 5% anual, aún cuando algunos aminoácidos como fenilalanina crecerán en tasas del 10%.

En la década de los años 70 se establecieron en México dos plantas productoras de aminoácidos: una de fermentación y otra de síntesis química. Recientemente en 1990 se instaló en México una nueva empresa productora de aminoácidos como L-lisina y DL-metionina (García, 1993).

La tecnología de producción de DL-metionina fue adquirida por la empresa paraestatal Alimentos Balanceados de México (ALBAMEX) en Japón, debido a la demanda de la población avipecuaria en el país. En 1979 disminuye un 40% la demanda y a mediados del 80 la planta cierra.

La empresa Fermentaciones Mexicanas, S.A. (FERMEX) se fundó en 1976 como empresa paraestatal de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH) siendo socio minoritario Koyowa Hakko, produciendo 3000 toneladas de L-lisina anuales y 1000 de ácido L-glutámico (García, 1993).

La L-leucina es otro aminoácido que se produce en México y se utiliza como materia prima para producir L-lisina, se hace a partir de fermentaciones también. Este aminoácido solamente se produce en Japón, México y EUA, teniendo problemas técnicos solamente en su separación y cristalización.

El mercado mexicano de alimentos balanceados para ganado es importantes, ya que el país cuenta con un importante hato ganadero, siendo el sorgo, maíz y soya las principales fuentes de proteína vegetal, es necesario adicionarles aminoácidos y FERMEX se ha iniciado en la producción de aminoácidos sólo a partir de fermentaciones de microorganismos. Ver tabla No. 4

La empresa mexicana Enzymologa productora de ácido aspártico, decidió iniciar un proceso de integración adquiriendo la tecnología de producción de L-fenilalanina de la empresa Suntory del Japón.

En México existen industrias que comercializan los aminoácidos y son:

DEGUSSA: comercializa al ácido glutámico como glutamato de sodio y otros como L-lisina, metionina, etc.

AMINOACIDOS SPECTRUM, S.A. de C.V.: comercializa el ácido glutámico como glutamato de sodio y otros aminoácidos (DEPIA, 1994).

Todos estos son comercializaciones, cabe volver a mencionar que en México sólo existe producción a partir de fermentaciones. Y dependemos en un porcentaje muy alto de importaciones de aminoácidos importantes para la industria alimentaria, y también de la propia tecnología de países como Japón, Francia y E.U.A.

Tabla No. 4 Situación actual y futura de la producción de aminoácidos en México

Prod. de insumos	capacidad instalada (1984)	capacidad futura (1991)	mercado nacional	Exportación
DL-metionina *	5000	—	+	+
L-lisina,HCl **	6000	15000	+	+
L-Leucina *	120	120	+	+
Ácido Glutámico **	3000	—	+	+
Treonina ***	—	200	+	+
L-Fenilalanina ***	—	70	+	+
Triptofano**	—	100	+	+

*Síntesis Química

**FERMEX

***ENZYMOLOGA

5.5 PRINCIPALES USOS Y MERCADEO DE AMINOACIDOS

Los aminoácidos tienen una amplia gama de aplicaciones industriales. Tradicionalmente han sido usados en la industria de los alimentos como potenciadores del sabor y en la alimentación animal y humana como aditivos. En años recientes se ha incrementado el uso de aminoácidos de grado farmacéutico en sueros y soluciones intravenosas (García, 1994).

Aproximadamente 60% de los aminoácidos producidos se destinan a la industria alimenticia, individualmente o en combinación para acentuar el sabor, edulcorantes, antioxidantes, etc. Ver Tabla No. 5

En alimentación animal los aminoácidos juegan un papel complementario de gran importancia, generalmente se usan en la formulación para alimentos balanceados para cerdos y aves.

Los aminoácidos están teniendo una creciente demanda en la industria química. A medida que sus precios bajan, su uso es más diversificado, en la manufactura de polímeros sirven como materias primas, tal es el caso de las fibras de polialanina o la

poli-gamma-metilglutamato que se usa como capa superficial de la piel sintética, la glicina es la materia prima para la producción del herbicida glifosfato y la treonina para la aztreonam que es un antibiótico.

En medicina, soluciones de aminoácidos esenciales se usan como sueros intravenosos para tratamientos postoperatorios (García, 1994).

Tabla No. 5 Principales usos de los aminoácidos

AMINOÁCIDOS	APLICACIÓN
Glicina	Edulcorante, Nutrición humana, agente terapéutico (distrofia muscular) y en cosméticos.
Alanina	Edulcorante, nutrición humana y cosméticos.
Valina, Leucina, isoleucina y Fenilalanina	Saborizante amargo y nutrición humana.
Metionina	Nutrición humana y animal, usos terapéuticos en hepatitis intoxicaciones y como agente lipotrópico.
Triptofano	Nutrición humana y animal, saborizante amargo.
Arginina	Saborizante amargo, nutrición, agente terapéutico en hiperamonemia y en desórdenes hepáticos.
Histidina	Nutrición humana, agente en úlceras duodenales y gástricas, indispensables en la regeneración de hemoglobina.
Lisina	Nutrición humana y animal.
Ácido aspártico y Glutámico	Nutrición humana, agente terapéutico, saborizante ácido, cosméticos.
Aspartato y Glutamato de sodio	Acentuadores de sabor.
Cistina y cisteína	Nutrición humana, agente terapéutico, cosméticos.
Ácido aspártico	Edulcorante.
Fenilalanina	Edulcorante.

VI. MATERIAL Y METODOS

6.1 MATERIAL

6.1.1 ORIGEN DE LA MUESTRA

La materia prima fue proporcionada por una empresa del ramo de la tenería en San Nicolás de los Garza, N.L. El bovino es sacrificado en el rastro y descarnado, luego la piel es llevada a la tenería y ahí se desroña (quitar el exceso de carne y hueso) (Subproductos animales, 1985), se lava y se pone a reposar con sosa y bactericidas en unas pilas por espacio de 72 h, para que la piel sufra una hidrólisis primaria y absorba agua, después de este tiempo es pasada a unas cuchillas rebanadoras para eliminar el pelo por una parte y la dermis como un subproducto, la cual corresponde al desecho que se genera en los primeros pasos del proceso de la piel, este subproducto es lo que se procesó y analizó.

6.2 METODOS

6.2.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La muestra se proceso en el Laboratorio de Ciencias de los Alimentos de la Fac. de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. de la siguiente manera:

- a. Lavado del pellejo o desecho, con agua potable y luego con agua destilada.
- b. Escurrido a temperatura ambiente.
- c. Secado en estufa de aire a 65 °C.
- d. Molido en un molino Willey pasando a través de un tamiz de 2 mm. Así mismo, la muestra se almacenó en frascos de polietileno, grado alimenticio, sellados, en lugar seco y a temperatura ambiente para luego proceder a los análisis planeados.

6.2.2 ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL

Siguiendo las técnicas y recomendaciones de la AOAC (1990) se determinaron por triplicado: Humedad, cenizas, lípidos, fibra, proteína y extracto libre de nitrógeno, reportando en cada caso su media y desviación estándar.

6.2.3. DIGESTIBILIDAD DE LA PROTEÍNA

6.2.3.1 DIGESTIBILIDAD “IN VITRO”

Se evaluó la digestibilidad “In vitro” mediante 2 métodos:

6.2.3.1.1 DIGESTIBILIDAD ENZIMÁTICA CON PEPSINA (AOAC)

Se peso 1g de la muestra y se procedió a desengrasarla con éter etílico (método de Goldfish) por espacio de 1 hora, después se llevó a digerirla por 16 horas con solución de pepsina (actividad 1:10,000) a una temperatura de 42-45 °C, con agitación constante, terminado el tiempo de digestión se procedió a filtrar sobre papel Whatman No.2, lavando el precipitado 3 veces con agua caliente para eliminar toda la pepsina presente, después se transfirió el papel filtro con el precipitado o residuo indigerido (*Proteína no digerible*) para determinarle Nitrógeno por el método de Kjeldhal, calculando el por ciento de digestibilidad por la fórmula:

$$\% \text{Digestibilidad} = \frac{\text{Proteína total} - \text{Proteína no digerible} \times 100}{\text{Proteína Total}}$$

6.2.3.1.2 DIGESTIBILIDAD DE LA MATERIA ORGÁNICA CON LIQUIDO RUMINAL

Tilley y Terry.(1963) En éste método se determina primero la materia seca y la materia orgánica en base a materia libre de humedad, haciéndose por triplicado y con cuatro blancos. Involucra un periodo de incubación por 48 horas con microorganismos del rumen en un medio buffer de pH 6.9 donde se pesaron 0.5 g de la muestra que se pusieron en una solución buffer de saliva artificial de McDugall la cual contiene por cada litro de solución: 9.80 g de NaHCO_3 , 7.00 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.57 g de KCl, 0.47 g de NaCl, 0.12 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 1 mL de CaCl_2 al 4% y se incuba con el líquido ruminal en atmósfera de CO_2 a 39 °C observándose cada 24 horas una alícuota de cada tubo que contenía las muestras al microscopio para ver la vitalidad de los protozoarios, éstos deben de permanecer vivos durante las 48 horas de la digestión. Después se realizó el segundo periodo de digestión ácida y enzimática, añadiendo 1mL de ácido clorhídrico al 20% y 2 mL de pepsina al 5% a cada tubo y se llevó nuevamente a incubación por 48 horas a 39 °C, después la muestra y blanco fueron filtrados, y junto con el papel filtro se lleva a 100°C a peso constante y luego a la mufla para determinar cenizas, determinándose la digestibilidad de la materia seca y la digestibilidad de la materia orgánica.

$$\text{D.M.O.} = \frac{\text{Materia orgánica inicial} - \text{Materia orgánica residual corregida por blancos} \times 100}{\text{Materia orgánica inicial}}$$

6.2.3.2 DIGESTIBILIDAD “IN SITU”

6.2.3.2.1 PROTEÍNA DE SOBREPASO

Se evaluó mediante una digestibilidad “In Situ” : Wilkerson, *et. al.* (1995) la cual consiste en poner muestras de aprox. 1g dentro de bolsas de 5 cm x 10 cm de polyester (polyethylene terephthalate), con un poro de $53 \pm 10 \mu\text{m}$ y llevadas a peso

constante. Cada bolsa fue cerrada utilizando en la parte superior un tapón No.0 de hule y sellando con ligas dos veces para obtener una mayor seguridad, cada bolsa se introdujo luego, en la bolsa de red que se introduce en el rumen del toro fistulado. Cada bolsa con la muestra fue templada a 39 °C por espacio de 20 minutos antes de ser introducida en el rumen. Se introdujeron las bolsas en los tiempos de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 24, 36, 48 y 72 hs. por duplicado, las bolsas fueron colocadas en el saco ventral del bovino fistulado.

El bovino fistulado fue un adulto macho de 5 años de la raza Holstein y fue mantenido antes del experimento por cinco días con una dieta a base de: 50% de olote de maíz mas 50% de concentrado, correspondientes a una primera corrida o primer experimento, y en un segundo experimento o segunda corrida el bovino se mantuvo con una dieta de 100% de forraje de sorgo, cinco días antes del experimento.

Después del tiempo de incubación las bolsas fueron sacadas y lavadas con agua a 39 °C, enjuagando perfectamente, removiendo perfectamente el liquido ruminal y quitando el tapón y las ligas. Las bolsas enjuagadas fueron llevadas a secar en estufa de aire a 65°C durante la noche , después se procedió a determinar la cantidad de Nitrógeno presente por el método de Kjeldhal, determinando la cantidad de proteína presente que sería la proteína no digerida.

$$\% \text{ de Nitrógeno} = \frac{(\text{mL. de HCl empleados en titulación}) (\text{factor del HCl})}{\text{g Muestra}}$$

$$\% \text{ de Proteína} = \% \text{ de Nitrógeno} \times 6.25 (\text{factor de N}_2)$$

Mediante la cantidad de proteína no digerida encontrada en los diferentes tiempos de 16 h y de 72 h se determina la proteína de sobrepaso y la proteína sobrepasante digestible.

$$\text{PS} = \frac{\text{Proteína potencialmente digestible residual a las 16 h}}{\text{Proteína Total}} \times 100$$

$$\text{Proteína Digestible} = \text{Proteína sobrepasante} - \text{Proteína residual a las 72 h}$$

Se realizó un 2o. experimento, siguiendo la misma metodología cambiando solamente la dieta del bovino utilizando solamente forraje de heno de sorgo. Ambas corridas se analizaron para separar la PC total en tres fracciones a, b, c. Con los datos de degradación ruminal se estimaron las fracciones proteicas para cada corrida. Se separó el total de la PC en tres fracciones:

a= PC rápidamente digestible, es la que desaparece al tiempo 0

b= PC potencialmente digestible, es la que desaparece durante el tiempo 0 a 72 h

c= PC indegradable y permanece hasta las 72 h

6.2.3.2.2 TASA DE DIGESTIÓN

La degradabilidad ruminal o Tasa de digestión fue estimada por el método de Orskov y McDonald (1979), mediante la ecuación de regresión no lineal: $p=a+b(e^{-ct})$, donde: p= porcentaje de desaparición de los nutrientes en un tiempo, a= es la fracción rápidamente soluble de la materia seca en la hora 0, b= es la fracción de la materia seca potencialmente degradable en el rumen, c= tasa de degradación de b; y t= tiempo de incubación, los datos estadísticos de análisis de varianza fueron estimados mediante el paquete computación de Excell en window 97.

6.2.4 ELABORACIÓN DE LA DIETA

En base a la evaluación química y a la digestibilidad de la proteína, se llevo a cabo la formulación de la dieta mediante el programa computacional NUTRION que formula y balancea raciones de acuerdo a los requerimientos de la especie, edad y estadio del animal. Se calculó una dieta comercial y una dieta que se incluyó la harina de tenería, formulados para ganado lechero.

DIETA COMERCIAL:

Ingredientes	Kg.		
Sorgo 9%	479.00	E.M. RUM. MC/Kg	2.694
Harinolina 41%	128.00	E.NM.RUM.MC/Kg	1.715
Semilla de algodón 45%	120.00	E.NG.RUM.MC/Kg	1.201
Melaza	90.00	EN.LACRUM.MC/Kg	1.636
Salvado de trigo 21%	110.00	TDN RUM %	68.819
Suplemento lechero 30%	30.00	Prot. Cruda %	17.94
Harina Mix 80%	35.00	Fos. Total	0.658
Carbonato de Calcio 38%	8.00	Calcio	1.144
	<u>1000.00</u>	Grasa Cruda	4.643

DIETA COMPLEMENTADA CON HARINA DE TENERÍA:

Ingredientes	Kg.		
Sorgo 9%	585.00	E.M.RUM.MC/Kg	2.643
Harinolina 41%	130.00	E.NM.RUM.MC/Kg	1.667
Semilla de algodón 45%	90.00	E.NG.RUM.MC/Kg	1.16
Melaza	80.00	EN.LACRUM.MC/Kg	1.6
Salvado de trigo 21%	50.00	TDM RUM %	66.83
Suplemento lechero 30	30.00	Proteína Cruda	17.93
Harina de tenería	<u>35.00</u>	Fos. Total	0.54
	1000.00	Calcio	0.57

El análisis químico proximal se realizó a las dos dietas siguiendo las técnicas y recomendaciones de la AOAC (1990).

En estas dietas también se determinó la digestibilidad "In Vitro" de la proteína con pepsina (AOAC, 1995), y la digestibilidad "In Situ" a las 16 h (Wilkerson, *et al.* 1995)

6.2.5 HIDRÓLISIS ÁCIDA DE LA PROTEÍNA

6.2.5.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Ashwort, R.W. (1987), se deshidrató la muestra a 60-70 °C x 24 h y se hace la extracción de lípidos debido a que su contenido es de 8.07%, y se recomienda desgrasar las muestras cuando el contenido de grasa sea mayor de 5%. A una muestra de 3 g aprox. Se le agrega 30 mL de acetona -cloroformo 3:1, se filtra a través de un filtro Gooch de flujo rápido (con vacío), se hace un segundo lavado con el solvente, se filtra nuevamente y el precipitado (muestra) se deja secar al aire.

6.2.5.2 HIDRÓLISIS DE LA MUESTRA

Gehrke et al. (1987), la muestra ya desgrasada y seca , se pesa dentro de tubos de hidrólisis de 25 x 150 mm con rosca y tapa con empaque de teflón. A continuación se adiciona con mucho cuidado la cantidad de HCl 6N requerido (B), tratando de que toda la muestra se humedezca con el reactivo de hidrólisis, ayudándose con un agitador mecánico (vortex). La muestra y ácido a colocar debe ser según lo siguiente:

$$A = \frac{0.0125 \times 100}{\%P}$$

$$B = \frac{1 \times 100}{\%P}$$

Donde: A= Cantidad de muestra en gramos
 B= mL de HCl 6N
 %P= Porcentaje de proteína de la muestra

Se colocaron a cada tubo 0.16 g de muestra + 12.88 mL de HCl. Se procedió a congelar el material de hidrólisis en un baño de hielo seco-acetona, y una vez congelado se le insufla nitrógeno de altísima pureza (exceptuando el tratamiento No. 1) hasta

saturar por espacio de cinco minutos y se procede a cerrar perfectamente con el tapón de rosca y cubierta de teflón. Una vez descongelado se somete a las condiciones de tiempo y temperatura de hidrólisis en un digestor tecator, calentando en blocks para tubos de 25mm de diámetro, ajustando las temperaturas para cada tratamiento y se lleva por triplicado:

Tratamiento 1 : 110 °C x 24 h (sin atmósfera de N₂)

Tratamiento 2 : 110 °C x 22 h (con atmósfera de N₂)

Tratamiento 3 : 110 °C x 24 h.. (con atmósfera de N₂)

Tratamiento 4 : 110 °C x 26 h.. (con atmósfera de N₂)

Tratamiento 5 : 145 °C x 04 h.. (con atmósfera de N₂)

Tratamiento 6 : 145 °C x 04 h adicionando 1% fenol para proteger Fen., His., Arg. y Tir. y con atmósfera de N₂

Tratamiento 7 : 110 °C x 24 h preoxidado con ácido per fórmico y con atmósfera de N₂

Una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis se deja enfriar un poco el tubo y se traspara a un matraz bola de 100 mL, para lavar cada muestra con agua caliente y solución lavadora de agua-etanol (3:1 con hidroquinona al 0.01%), el hidrolizado se evapora en un rotavapor a 75 °C hasta sequedad, 2 veces se lava para eliminar todo el HCL. Se hace un tercer lavado y se concentra a un volumen de 30 mL.

6.2.5.3 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS

Se separa una alícuota de 5 mL de los tubo de cada uno de los tratamientos para determinar el grado de hidrólisis, cuantificando la Proteína que no fue hidrolizada por el método de Biuret modificado por Noll, *et. al.* (1974). Cuando una proteína se mezcla con una solución de NaOH + CuSO₄ se produce la formación de un complejo entre el Cu²⁺ y el enlace peptídico que existe entre los aminoácidos que conforman la proteína formando un compuesto de coordinación de color violeta medible a una absorbancia de 550 nm. La adición de isopropanol es una modificación al Biuret que hace Noll encontrando que al añadir volúmenes iguales de isopropanol a la mezcla de tartrato

cúprico alcalina produce una solución mas estable y que reacciona mas rápidamente con la proteína. Se adiciona a 1 mL de la muestra hidrolizada, 5 mL de reactivo de Biuret modificado se mezclan y se incuba a 40 °C x 10 min., se centrifuga a 13,000 r.p.m. x 10 min. y el sobrenadante se lee a una absorbancia de 550 nm, llevándose un blanco y los estándares correspondientes de albúmina desde 0 a 1 mg/mL para la curva patrón.

Biuret: se mezclan 3 reactivos

- 1.- 8.4 g de KOH + 300 mL de H₂O + 2.5 g tartrato de sodio y potasio
- 2.- 1.2 g de Sulfato Cúprico pentahidratado + 200 mL de H₂O
- 3.- Se mezclan iguales proporciones de 1 y 2 y se agrega igual volumen de isopropanol

A Los resultados correspondientes se determinaron sus medias y desviación estándar.

6.2.6 PREPARACIÓN DEL HIDROLIZADO PARA EL ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS

Filtrado: Es importante destacar que todo el material de vidrio utilizado para la hidrólisis y para la preparación del análisis de los aminoácidos en HPLC, debe de ser lavado con agua regia (mezcla de HNO₃ y HCl 3:1), seguido de enjuagues de agua bidestilada, metanol y secado para evitar contaminaciones (Quattrocchi,1992).

El hidrolizado concentrado a 30 mL se filtra a través de papel filtro Whatman 541, sobre un buchner y kitasato con ayuda de vacío, enjuagando el matraz con agua HPLC y filtrando a través del papel filtro. Al filtrado se le agregan 2 mL de estándar de ácido alfa-aminobutírico 2.5 mM para ser usado como estándar interno, enseguida se afora a un volumen de 50 mL. Cuando la muestra no vaya a ser analizada de inmediato se debe ajustar el pH a 6.8 ± 0.2 con NaOH 5N.

Posteriormente las muestras se purificaron filtrando a través de membranas Millipore tipo GV de 0.22, luego se hizo un 2o. filtrado con un cartucho sep-pack C₁₈ que previamente había sido activado con 6 mL de acetonitrilo grado HPLC y con 6 mL de H₂O HPLC, se mezclaron 2mL de la muestra hidrolizada con 2 mL de acetonitrilo al 20% y se hicieron pasar lentamente a través del sep-pack C₁₈, se eliminó el primer mililitro y los otros 3 mL se pusieron en un frasco limpio para ser derivatizados y analizados por HPLC.

6.2.7 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LOS AMINOÁCIDOS POR HPLC

6.2.7.1 DERIVATIZACIÓN

La separación y determinación cuantitativa de los aminoácidos por HPLC se basa en el principio de retención de los aminoácidos en un sorbente de intercambio catiónico a pH y fuerza iónica bajos. Luego los aminoácidos eluyen en forma consecutiva en orden creciente de su capacidad iónica, elevando paulatinamente el pH y la fuerza iónica de la fase móvil. La detección de cada aminoácido se hace mezclando el eluente de la columna con un reactivo de derivatización que forma un compuesto coloreado (Qureshi, *et al.*, 1988). Derivatización pre-columna con OPA/ 2ME, separando los derivados de los aminoácidos coloreados y detectando los mismos por fluorescencia. La derivatización es una etapa imprescindible en un análisis de aminoácidos debido a que la mayoría de estos carecen de compuestos cromóforos o fluoróforos. El OPA (O-ftaldialdehído) se utiliza como reactivo fluorescente con una sustancia reductora como es el 2-mercaptoetanol, formándose isoindoles fluorescentes de aproximadamente 100 picomoles. Sin embargo, el OPA reacciona sólo con los grupos amino primarios, de modo que prolina, hidroxiprolina no son detectados (Garza-Ulloa, 1986).

En tubo Eppendorff de 1.5 mL se colocaron 40 µl de la muestra hidrolizada y filtrada, se añadieron 30 µl de agua y 30 µl de la solución derivatizante OPA/2 ME . se

agitaron durante 60 segundos, y se cargó al cromatógrafo de líquidos (HPLC) Beckman System Gold con bomba modelo 166 de capacidad de 20 μ l y se inyectó en la columna a los 120 seg.

6.2.7.2 SEPARACIÓN

Se usó una columna de fase reversa ODS C₁₈ de dimensiones de 150 mm x 4.6 mm de diámetro interno y con un tamaño de partícula de 5 μ m. Y para la separación de los derivados de aminoácidos se usó un gradiente de elución con una velocidad de flujo de 1 mL/min.

Elución: programa de gradiente

Fase A: Metanol:buffer de fosfatos 0.018M
pH 7.2 :Tetrahidrofurano (12:85:3)

Fase B: Los mismos reactivos pero en proporción 55:42:3
ambos eluentes se ajustaron a pH 7.2 con HCl 3N, se
filtraron y desgasificaron.

6.2.7.3 DETECCIÓN

Se llevó a cabo por fluorescencia

em 350 nm

ex 450 nm

Se trabajó de la misma manera una mezcla de estándares con una concentración de 100 μ M/mL de cada aminoácido: Asp., Glu., Asn., Ser., His., Gli., Arg., Thr., Ala., Tir., Met., Val., Trp., Phe., Ile., Leu. y Lis.

Se pusieron 20 μL de la mezcla de estándar de aminoácidos + 50 μL H_2O + 30 μL de OPA/2 ME, se agitaron durante 60 segundos y se cargo el loop del cromatógrafo inyectándose a los 120 minutos, se usó el mismo programa de elusión y de detección. Las concentraciones de los aminoácidos encontrados fueron calculados por interpolación de las curvas de calibración por el método de estándar interno utilizando el ácido alfa-aminobutírico como estándar interno. Este involucra añadir a la muestra una cantidad exactamente conocida de un compuesto con características físicas, químicas y cromatográficas similares a la de los compuestos que se van a cuantificar y compararlas con la altura de los picos de los aminoácidos encontrados en los aminogramas problemas, para determinar el factor de respuesta y así la concentración de los aminoácidos.

$$\text{Factor de Respuesta} = \frac{C_{aa} \times h_i}{C_i \times h_{aa}}$$

Donde C_{aa} es la concentración del aminoácido, C_i es la concentración del estándar interno, h_i la altura del pico del estándar interno y h_{aa} la altura del pico del aminoácido.

6.2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de concentración obtenidos, fueron comparados estadísticamente usando el paquete computacional SPSS (paquete estadístico de ciencias sociales) y se obtuvieron las estadísticas descriptivas de cada variable (media y desviación estándar) correlaciones y estadísticas inferenciales, prueba no paramétrica: prueba de Kolmogrov-Smirnov, el análisis de varianza por la Anova y para estimar la diferencia significativa entre los tratamientos de cada aminoácido se usó la prueba de: Tukey-B

6.2.9 DETERMINACIÓN DE TRIPTOFANO

El triptofano se determinó por método colorimétrico de Villegas *et. al.* (1985), basado en la reacción de Hopkins-Cole por medio del cual una molécula de ácido glioxílico y dos de triptofano forman un complejo colorido con un máximo de absorción a 560 nm. Se pesan 0.100 g de muestra desgrasada previamente, esto se hace por triplicado, se ponen en un tubo de ensayo de 13 x 100 con tapón de rosca y se agregan 3 mL de solución de papaína (se disuelve 1.0 g de papaína en 250 mL de buffer de acetato de sodio pH 7.0). Se tapan los tubos y se agitan cuidadosamente, asegurándose que la muestra esté totalmente mojada. Se colocan las muestras en incubación en la estufa a 63 ± 2 °C durante la noche (16 h). Se debe llevar dos tubos con solución de papaína como blancos y muestras conocidas de triptofano como testigos. Las muestras hidrolizadas se sacan de la estufa, se dejan enfriar a temperatura ambiente y se centrifugan a 2500 r.p.m. x 5 min.. Se transfiere 1mL del sobrenadante y se agregan 4 mL del reactivo de ácido glioxílico, se incuban nuevamente a 63 ± 2 °C durante 15 minutos para desarrollar el color, se deja enfriar y se lee su densidad óptica en un espectrofotómetro a 560 nm. Se preparó la curva de calibración con estándar de un rango de concentraciones de 0 a 40 mg/mL de triptofano (Tejada, I., 1992).

Solución de ácido glioxílico: Se preparan 2 soluciones:

- 1.- Solución de FeCl_3 al 0.027%. Disolviendo 270 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 0.5 mL de agua destilada y se afora a un litro con ácido acético.
- 2.- Solución de ácido sulfúrico 30 N

Se mezclan 1y 2 a volúmenes iguales, aproximadamente una hora antes de usarse, esta solución contiene el ácido glioxílico que se forma mezclando ácido acético conteniendo cloruro férrico con ácido sulfúrico. Este ácido glioxílico en presencia de triptofano forma compuestos coloreados con el grupo indólico del aminoácido, y su absorbancia es captada a 560 nm

CALCULOS:

$$\text{g DL Triptofano} = \frac{\text{D. O.} \times \text{factor curva} \times \text{volumen (3mL)} \times 100}{\text{g muestra(0.100g)} \times \text{alícuota (1 mL)} \times 1000}$$

factor de la curva: 2.41

6.2.10 DETERMINACIÓN DE LISINA REACTIVA

La lisina reactiva se cuantificó por el método de Hurrell, *et. al* (1979), se basa en la capacidad que tiene el Anaranjado ácido 12, de unirse a la proteína en sus grupos amino básicos y precipitarla para su cuantificación. Se realizaron dos mediciones, en una de las muestra se le agrega anhídrido propiónico el cual bloquea a los grupos ε-amino libres de la lisina, a la otra muestra no se le agrega el anhídrido. La reacción con anhídrido propiónico provoca que los ε-amino libres de las unidades de la lisina se neutralicen disminuyendo de esta forma la cantidad de colorante que precipita. La diferencia del colorante en el sobrenadante es una medida de la cantidad de lisina disponible en la muestra.

Se pesan por triplicado 2 muestras de 0.85 g a la que llamamos a y b . La muestra "a" se suspende en 1 mL de alcohol isopropílico y se inactiva el grupo épsilon amino de la lisina adicionando 0.2 mL de anhídrido propiónico, se adicionan 2 mL de acetato de sodio al 5% y se agita moderadamente 30 min. A ambas muestras se adicionan 20 mL de solución del colorante y se agita vigorosamente por 60 segundos, se toma un alícuota y se lleva a centrifugar a 5000 r.p.m. x 10 min. enseguida se toma una alícuota de 0.1 mL del sobrenadante centrifugado y se lleva a 10 mL con la solución reguladora pH 1.25, se lee en el espectrofotómetro a 475 nm, llevando un blanco a cero con solución reguladora.

Se lleva la curva de calibración con estándar cuya soluciones se encuentran de 0.5 a 3.5 mM/L de Anaranjado ácido¹² aforadas con solución reguladora.

CALCULOS:
$$\frac{\text{g de lisina}}{\text{g de muestra}} = \frac{(A-B) \times \text{meq. Lisina} \times 23}{1000 \times \text{peso de la muestra (g)}}$$

meq. Lisina = 0.1462

$$A = \frac{\text{D.O.} - b}{m} \quad B = \frac{\text{D.O.} - b}{m}$$

23 = Volumen total que se usa por los 20 mL colorante +
2 mL acetato + 1 mL isopropanol

Las lecturas solo deben aceptarse si están en el rango de 1 al.9

VII. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1 CARACTERÍSTICAS DE LA HARINA OBTENIDA

- Color : Blanca
- Tamaño de partícula : 2 mm
- Densidad : 0.3604 g/ml

7.2 ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL DEL SUBPRODUCTO DE TENERÍA

La tabla No. 6 nos muestra los diferentes datos encontrados en el análisis proximal de las diferentes repeticiones, con sus medias respectivas y su desviación estándar.

TABLA No. 6 Análisis químico proximal del subproducto de tenería

	R1	R2	R3	X	— ± D.S.
HUMEDAD%	5.32	5.35	5.38	5.35	0.03
CENIZA%	8.05	8.04	8.06	8.05	0.01
GRASA CRUDA%	8.12	8.04	8.05	8.07	0.04
FIBRA %	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PROTEINA (N X 6.25)%	77.59	77.63	77.63	77.62	0.02
EXTRACTO LIBRE DE N %	0.92	0.94	0.88	0.91	0.03

*R repetición

En el presente trabajo se elaboró una harina con subproducto de tenería, observándose que este subproducto se pudo moler fácilmente utilizando la maquinaria adecuada y con poca inversión. Es importante utilizar un tamaño de partícula de 2mm para obtener un molido que sea el apropiado para una harina que sea fácilmente mezclada.

Según la Underutilized Resources as Animal Feedstuffs (1983), en U.S.A. se procesan 40 millones de cabeza de ganado por año y los desechos de las tenerías que corresponden a las carnazas o pellejos frescos se analizaron y se encontró que poseen 64% de H₂O, 33% de Proteína, 2% de grasa y 0.5% de minerales (Ca y P). Además la Proteína correspondía a 87.8% de colágeno, 6.1% de Keratina y 5.2% de proteína no estructural como albumina y globulina y un 0.9% a elastina. De tal manera que el subproducto de tenería que se estudió en el presente trabajo, es algo diferente al reportado, la diferencia tal vez fue que el análisis proximal que se le hizo al subproducto de tenería fue después de haberlo secado al sol. Se usó un subproducto semi-seco.

Con el subproducto de tenería se pueden producir harinas con un alto contenido de proteínas, debido a que en el análisis proximal se encontró que su contenido de proteína es de 77.61%. En la tabla No. 7 se observa una comparación de ésta harina de subproducto de tenería con otras harinas que son fuentes importantes como ingredientes para la elaboración de dietas para ganado bovino, Feedstuffs ingredient analysis table 1989 (Allen,R., 1989).

TABLA No. 7 Comparación Nutricional de harinas obtenidas de subproductos

Ingredientes	% Proteína	% Ceniza	% Fibra	% Grasa	% M.S.	Dig. Rum.
Harina de Sangre	80.00	4.40	1.00	1.00	89.30	63.1
Harina de hueso y Carne	50.00	33.00	2.80	8.50	92.60	39.5
Harina de Plumas	85.00	3.90	1.50	2.50	93.20	70
Afrecho de Trigo	15.50	5.30	10.90	5.00	86.40	*****
Harina de Tenería	77.61	3.04	0.00	3.07	94.60	80.49

La Harina de Subproducto de tenería tiene un 77.61% de proteína contra un 50% de la harina de hueso y carne, o con una harina de hidrolizados de pluma que tiene 85%. Aquí, se podría notar la potencial ventaja de producir alimentos balanceados que tengan un bajo costo y alto rendimiento para animales de engorda y lecheros, sobretodo el utilizar productos que no se les daba un uso adecuado o simplemente se tiraban como basura y ahora se podría obtener un provecho de ellos.

La digestión en el rumen de los bovinos tiene como objetivo principal la obtención de energía metabolizable de la celulosa y sustancias similares. Pero en el rumen forzosamente ocurren cambios sobre otros elementos nutritivos como son las proteínas, donde los microorganismos del rumen juegan un papel muy importante, tanto en su digestión como en la producción de nitrógeno. Es importante para conocer mejor la alimentación de los rumiantes hacer un exámen de cuáles son las circunstancias favorables al desarrollo microbiano, una de las más importantes parece ser el nivel de nitrógeno en la dieta, debido a que, cuando el bovino tiene un ingreso menor de nitrógeno come menos. Es importante cuidar el nivel de proteína en las dietas, pues así como ocurren daños importantes cuando es deficiente, también inclusiones altas en la dieta provoca que haya mayor digestibilidad de la proteína y una pérdida considerable en incremento calórico a niveles mayores de 20% de proteína (Wattiaux, 1997).

La tabla No. 8 muestra que la harina de tenería tiene una digestibilidad ruminal de 80.49% comparándola con un hidrolizado de pluma (70%) y a la de una harina de sangre (63.1%) (Allen,G., 1989). El incremento de digestibilidad de raciones que son suplementadas con concentrados de proteína va acompañado siempre de una permanencia mas corta del forraje en el rumen, como consecuencia este menor tiempo de permanencia provoca que haya un mayor consumo del alimento en 24 h. Uno de los factores que opera sobre el tiempo de permanencia del alimento en el rumen, es el tamaño de partículas ingeridas (De Alba,1973). El ganado bovino puede llegar a morir cuando ingiere pastizales sobre todo del tipo fibroso (Dasylyrion, "sotol" agaves) cuya masticación se hace muy difícil y mueren al acumular grandes cantidades de material en el rumen.

7.3 DIGESTIBILIDAD DE LA PROTEÍNA

Los alimentos para ser biológicamente utilizados deben sufrir un proceso de hidrólisis o fragmentación para ser absorbidos y posteriormente transportados y/o almacenados en el interior de un organismo. Esta hidrólisis es el proceso de la digestión, en el cual intervienen proteínas especializadas como las enzimas, que poseen todos los

organismos dentro de su sistema digestivo (Digestibilidad "In Vivo"). Se ha logrado actualmente la extracción y purificación de algunas de estas enzimas, con la cual ha sido posible la determinación de la digestibilidad fuera del organismo (Digestibilidad "In Vitro"). Los compuestos nutritivos que se encuentran tanto en las materias primas como en los alimentos ya elaborados presentan diferente susceptibilidad para ser digeridos (Alanís, 1993). Así, es de gran importancia conocer la digestibilidad de la proteína y saber que tan fácilmente puede ser utilizada como fuente de aminoácidos y/o hidrolizados. Los datos proporcionados en la Tabla No. 8 muestran las digestibilidades "In vitro" y la digestibilidad de la materia orgánica. Se encontró que la harina de subproducto de tenería es altamente digestible, tanto en su proteína como en su materia orgánica, alcanzando niveles cercanos al 100%.

7.3.1 DIGESTIBILIDAD "IN VITRO"

TABLA No. 8 Digestibilidad "In Vitro"

Digestibilidad "In Vitro"	R1	R2	R3	\bar{X}	\pm D.S.
Digestibilidad Enzimatica	98.55	98.47	98.62	98.55	0.08
Digestibilidad ruminal de la Materia Orgánica	77.07	79.09	85.31	80.49	4.29

*R repetición

7.3.2 DIGESTIBILIDAD "IN SITU"

Los datos de la digestibilidad "In Situ" proporcionados en las tablas No. 9 y 10, muestran la cantidad de proteína que se obtuvo en los diferentes tiempos en que la harina de subproducto de tenería se puso en contacto con el líquido ruminal del bovino fistulado. Además se indica la proteína potencialmente digestible en cada tiempo, así

como la digerida y la por digerir , y haciendo una análisis de su regresión, se determina la proteína sobrepasante y la tasa de digestión; que son factores importantes para estimar la utilización biológica de la proteína.

Tabla No. 9

DIGESTIBILIDAD "IN SITU" CORRIDA						
No.1						
h	%PC	P.D.	%P.I.	% P.D.	%P. p.D.	lgn
0	72.61	66.27	100.00	0.00	100.00	4.6052
2	69.44	63.09	95.21	4.79	95.21	4.5561
4	69.22	62.88	94.89	5.11	94.89	4.5527
6	69.14	62.79	94.76	5.24	94.76	4.5513
8	67.68	61.34	92.56	7.44	92.56	4.5279
10	66.87	60.52	91.33	8.67	91.33	4.5145
12	31.59	25.25	38.10	61.90	38.10	3.6402
14	29.83	23.49	35.45	64.55	35.45	3.5681
16	26.79	20.45	30.85	69.15	30.85	3.4291
24	19.59	13.24	19.99	80.01	19.99	2.9952
36	13.42	7.07	10.67	89.33	10.67	2.3674
48	9.30	2.96	4.46	95.54	4.46	1.4951
72	6.34	0.00	0.00	100.00	0.00	

h Tiempo %P.C Proteína Completa Inicial a cada tiempo
 P.D. Proteína potencialmente digerible %P.I. Por ciento de Proteína Indigerida
 %P.D. Por ciento de Proteína digerida %P.p.D. Por ciento de Proteína por digerir

Tabla No. 10

DIGESTIBILIDAD "IN SITU" CORRIDA No: 2						
h	%PC	P.D.	%P.I.	% P.D.	%P. p.D.	lgn
0	72.81	48.08	100.00	0.00	100.00	4.61
2	64.32	39.59	82.34	17.66	82.34	4.41
4	57.58	32.85	68.32	31.68	68.32	4.22
6	55.36	30.63	63.71	36.29	63.71	4.15
8	52.99	28.26	58.78	41.22	58.78	4.07
10	50.64	25.91	53.89	46.11	53.89	3.99
12	50.08	25.35	52.72	47.28	52.72	3.96
14	49.60	24.87	51.73	48.27	51.73	3.95
16	46.52	21.79	45.32	54.68	45.32	3.81
24	42.47	17.74	36.90	63.10	36.90	3.61
36	38.33	13.60	28.29	71.71	28.29	3.34
48	31.85	7.12	14.81	85.19	14.81	2.70
72	24.73	0.00	0.00	100.00	0.00	

h Tiempo %P.C. Proteína Completa Inicial a cada tiempo
 P.D. Proteína potencialmente digerible %P.I. Por ciento de Proteína Indigerida
 %P.D. Por ciento de Proteína digerida %P.p.D. Por ciento de Proteína por digerir

3.2.1 PROTEÍNA SOBREPASANTE

$$\text{Proteína sobrepasante} = \frac{\text{Proteína potencialmente digestible}}{\text{Proteína Total}} \times 100$$

Proteína sobrepasante digerible en la 1a. corrida= 26.34%

Proteína sobrepasante digerible en la 2a. corrida= 28.07%

7.3.2.2 DEGRADABILIDAD RUMINAL O TASA DE DIGESTIÓN

Tasa de Digestión Corrida 1 =6.9 %/h

Tasa de Digestión Corrida 2= 3.5 %/h

7.3.2.3 COMPARACIÓN DE DIGESTIBILIDAD “IN SITU”

La Tabla No. 11 nos muestra una comparación de las digestibilidades “In Situ” que corresponden a las dos corridas a que fue sometido el bovino fistulado, observándose algunas diferencias de la proteína encontrada en los distintos tiempos. En lo que respecta a la proteína sobrepasante a las 16 h sólo existe una diferencia de 1.73% de proteína entre las dos corridas, y se encontró en mayor cantidad cuando se puso al bovino en la dieta que corresponde al 100% de forraje.

TablaNo. 11 Comparación de Digestibilidad “In Situ”

	CORRIDA No.1		CORRIDA No.2	
	%PC	%MS	%PC	%MS
%PC		77.61		77.61
ps= pc después de 16 h en rumen	34.52	26.79	59.94	46.52
PS DIGESTIBLE a las 16 h	26.34	33.94	28.07	36.17
c=pc residual después de 72 h.	8.17	10.53	31.86	41.05
a=pc de muestra - pc en hora 0	6.46	8.32	6.18	7.96
b=pc - a - c	81.15	58.75	50.97	28.57
Tasa de Digestión	6.9%/h (r ² = 0.97)		3.5%/h (r ² = 0.95)	

Corrida 1: Dieta con 50% olote de maíz y 50% de concentrados

Corrida 2: Dieta con 100 % Forraje de sorgo

La determinación de la digestibilidad “In Situ” estima una mejor medida de la degradabilidad de la proteína. La tasa de digestión y la proteína de paso nos estiman la utilización que tiene la proteína como tal.

En la primera corrida se encontró lo siguiente: La proteína que se puede digerir fue de 81.15%, que corresponde a la proteína potencialmente degradable (b), con un 6.4% para la fracción rápidamente soluble (a), el resto del subproducto de tenería es indigestible (c) lo que corresponde a un 8.17%. La proteína encontrada que permanece en la bolsa a las 16 horas, se considera la proteína sobrepasante, en este caso representa un 34.5% de la proteína cruda. Este valor está por abajo de los valores encontrados en los subproductos de origen animal (NRC, 1984), debido probablemente a que durante el proceso el material fue sujeto a hidrólisis haciendo a la proteína más disponible en el rumen.

La tasa de digestión ruminal fue de 6.9%/h, valor considerado en rango aceptable ya que la mayoría de los ingredientes tienen una tasa de digestión que varía de 3 a 7 %/h, la harina de maíz tiene 0.65%/h y la harina de soya 0.28%/h (SNUR, 1985).

En la 2o. Corrida:

El subproducto de tenería tiene un 77.61% de proteína, encontrándose que únicamente se puede digerir el 50.97% , que corresponde a la proteína potencialmente digestible (b), con un 6.18% para la fracción rápidamente soluble (a) el resto del subproducto de tenería es indigestible lo que corresponde a un 31.86%, en términos de materia seca es un 41.05%. La proteína que es potencialmente digestible a las 16 horas es de 21.79%, puesto que el 46.52% es la indigestible. El tiempo de 72 horas estima la proteína residual indegradable en el rumen, el cual fue de 24.73%, y la proteína que permanece a las 16 hs considerada como proteína sobrepasante en este caso fue de 59.94% .En cuanto a la tasa de digestión que se encontró fue de 3.5%/h, dentro de un rango bajo, según el modelo de Orskov (1985), como ya se mencionó lo común para la tasa de digestión de un ingrediente debe ser de 3 a 7.9%/h.

La tasa de digestión encontrada en la primera corrida fue alta (6.9%/h) muy probablemente afectada por el tipo de dieta a que fue sometido el toro fistulado. En dietas con únicamente de forraje es de esperar que los microorganismos del rumen degraden rápidamente la proteína.

Las diferencias encontradas entre las 2 corridas se basan específicamente en las dietas a las que fue sometido el bovino fistulado, ya que la primera que contenía los concentrados, la harina de tenería presentó mayor digestibilidad y menor proteína de paso, mientras que con la dieta que contenía mayor cantidad de forraje se encontró que podía proporcionar mayor cantidad de proteína de paso. La estimación de la proteína sobrepasante fue de 27.20%. Por lo que se deduce que el subproducto de tenería tiene aportes limitados de proteína de paso. Cabe mencionar que existen factores como el tipo y concentraciones de los ingredientes en la dieta que pueden afectar la Proteína sobrepasante (Subcommittee on Nitrogen Usage in Ruminantes, 1985), y otros factores que no fueron medidos y que pueden afectar tanto la degradación de la proteína como el tiempo de retención en el rumen, por ejemplo: el tamaño de partícula de los ingredientes de la dieta y la cantidad de alimento que se le proporciona al bovino.

Freer y Campling (1963) investigaron, los movimientos de alimentos en el tracto digestivo de las vacas bajo diferentes raciones de proteínas. Una prueba comparaba una dieta con 33% de fibra y 8.4% de proteína con pasto de alta calidad y otra dieta con 19% de proteína. El tiempo medio en el cual se realizó la digestión fue de 73 y 56 horas respectivamente, es obvio que agregar concentrados de proteína permite acelerar la digestión disminuyendo la retención en el rumen, y así aumentando el deseo de comer.

Desde el punto de vista económico el subproducto de tenería puede ser una opción al incluirlo en concentrados, ya que puede reducir el costo de estos, lo que representa un ahorro muy importante para el ganadero. Aquí es donde se podría evaluar la relación costo-beneficio, así como el valor agregado que podría tener un subproducto de desecho de tenería que originalmente no tenía ningún uso y que por el contrario producía contaminaciones.

7.4 ELABORACIÓN DE LA DIETA

Se formularon 2 dietas, una comercial y otra dieta complementando su proteína con harina de subproducto de tenería ambas se elaboraron de acuerdo al programa computacional de Nutrion, calculado para ganado lechero. Este programa permite el balanceo de raciones para los bovinos de acuerdo a la composición de los ingredientes seleccionados (INCAP, 1968). Además aumenta el rendimiento económico del ganadero, ajustando el costo de cada ingrediente y la necesidad del ganado para mejor producción a un menor costo.

La formula de las dietas se compone de la siguiente manera:

DIETA COMERCIAL

INGREDIENTES SELECCIONADOS

■SORGO 9%	479 g	E.M. RUM. MC/Kg	2.694
■HARINOLINA 41%	128 g	E.NM.RUM..MC/Kg	1.715
■S. DE ALGODÓN 35%	120 g	E.NG. RUM. MC/Kg	1.201
■MELAZA	90 g	EN.LACRUMMC/Kg	1.636
■SALV. DE TRIGO 21%	110 g	TDN RUM %	68.819
■SUPL. LECHERO 30%	30 g	Prot.Cruda %	17.940
■HARINA MIX 80%	35 g	Fos. Total	0.658
■Carbonato de Calcio	08 g	Calcio	1.144
Total	1000 g	Grasa Cruda	4.643

DIETA CON HARINA DE SUBPRODUCTO DE TENERÍA

INGREDIENTES SELECCIONADOS

■SORGO 9%	585g	E.M.RUM. MC/Kg	2.643
■HARINOLINA 41%	130g	E.NM. RUM MC/Kg	1.667
■S. DE ALGODÓN 45%	90g	E.NG.RUM.MC/Kg	1.169
■MELAZA	80g	EN.LACRUMMC/Kg	1.6
■SALVADO DE TRIGO 21%	50g	TDN RUM%	66.83
■SUPLEMENTO LECHERO 30	30g	Proteína Cruda %	17.93
■HARINA DE TENERÍA	35g	Fos. total	0.54
Total	1000g	Calcio	0.57

7.5 ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL Y DIGESTIBILIDAD DE LAS DIETAS

Se realizaron el análisis químico proximal de la dieta comercial y de la dieta complementada con harina de subproducto de tenería, la tabla No. 12 muestran los resultados encontrados, así como las digestibilidades "In Vitro" y la digestibilidad "In Situ" a las 16 horas expresada como por ciento de proteína.

TABLA No. 12 Análisis químico proximal y digestibilidad de las dietas

	DIETA CON HARINA DE SUBPRODUCTO DE TENERÍA		DIETA COMERCIAL	
	\bar{X}	\pm D.S.	\bar{X}	\pm D.S.
HUMEDAD %	11.98	0.52	11.09	0.15
MATERIA SECA %	88.02	0.52	88.91	0.15
CENIZA %	5.80	0.17	6.35	0.06
GRASA %	3.45	0.24	2.96	0.10
PROTEÍNA %	19.82	0.37	21.85	0.40
FIBRA %	3.26	0.50	7.48	0.23
E. L. N. %	55.69	0.00	50.27	0.00
DIG./PEPSINA %	77.92	0.00	70.96	0.00
DIG. "IN-SITU"	6.68	0.61	8.14	0.24
P.D.%	61.69	3.49	58.07	1.24

Digestibilidad "In-Situ": expresada como % de proteína sin digerir a las 16 h en rumen.

P.D.% : Porcentaje de Proteína potencialmente digestible

Las dietas que se formulan en el presente trabajo nos dan un aporte de proteína de alrededor de 18% siendo éste porcentaje bueno, y en cuanto a la digestibilidad de la proteína la dieta con subproducto de tenería es mayor con un porcentaje de 77.92% en comparación con la dieta comercial que tiene 70.96%. Estos resultados se recomiendan para formulaciones donde se suplemente con proteínas de valor biológico alto y con buen rendimiento. Es obvio que agregar concentrados a las dietas permite acelerar la digestión en el rumen, haciendo que el bovino coma mas en menor tiempo y favorezca a su engorde y a la producción de leche (Wattiaux M. & Howard T., 1997).

Con respecto a la cantidad de proteína sobrepasante estimada en las dietas completas, los valores de 8.14% para el concentrado sin subproducto de tenería, son considerablemente mayor al obtenido en el concentrado con subproducto de tenería 6.68%. Estos valores coinciden con los obtenidos "In Vitro" que fueron de 77.92% para la dieta que tenía el subproducto de tenería y de 70.96% para la dieta comercial. Las diferencias encontradas eran esperadas ya que el concentrado sin subproducto de tenería contenía harina de sangre, ingrediente muy alto en proteína sobrepasante.

7.6 HIDRÓLISIS ÁCIDA DE LA PROTEÍNA

Uno de los objetivos del presente trabajo es determinar las condiciones óptimas de hidrólisis del subproducto de tenería, para obtener el máximo rendimiento de sus aminoácidos, Así se sometió el subproducto de tenería a los siete tratamientos ya mencionados, terminado el tiempo de cada tratamiento se determinó el grado de avance de hidrólisis de la proteína que contiene el subproducto de tenería por el método de Biuret modificado por Noll. Esta reacción nos muestra la cantidad de proteína resistente o sin hidrolizar que permaneció en cada uno de los tratamientos. Cada uno de ellos se realizaron por triplicado y con la curva de estándares se determinó la concentración de proteína resistente en cada tratamiento, la gráfica No. 1 y la tabla No. 13 muestra las medias de las concentraciones, su desviación estándar y su coeficiente de varianza, mostrando al tratamiento No. 4 (110 °C x 26 h) como el de mayor grado de hidrólisis, la

proteína resistente encontrada fue de 0.049 mg/mL. Con un coeficiente de varianza de 0.76, lo cual se esperaba debido a que se extendió un 8.4% el tiempo de hidrólisis recomendado que equivale a 2 horas mas.

TABLA No. 13 Concentración de proteína resistente por tratamientos de hidrólisis

Tratamiento	Proteína Resistente mg/ml	\bar{X}	\pmD.S.	C.V.
1	0.0277 a 0.0930	0.0549	0.0340	0.6193
2	0.0930 a 0.2073	0.1365	0.0618	0.4528
3	0.0440 a 0.1583	0.0984	0.0573	0.5826
4	0.0277 a 0.0930	0.0494	0.0377	0.7626
5	0.1420 a 0.1746	0.1583	0.0163	0.1030
6	0.0767 a 0.1256	0.0984	0.0249	0.2530
7	0.0440 a 0.0930	0.0658	0.0250	0.3794

Tratamiento 1 110 °C x 24 h sin atmósfera de n₂

Tratamiento 2 110 °C x 22h

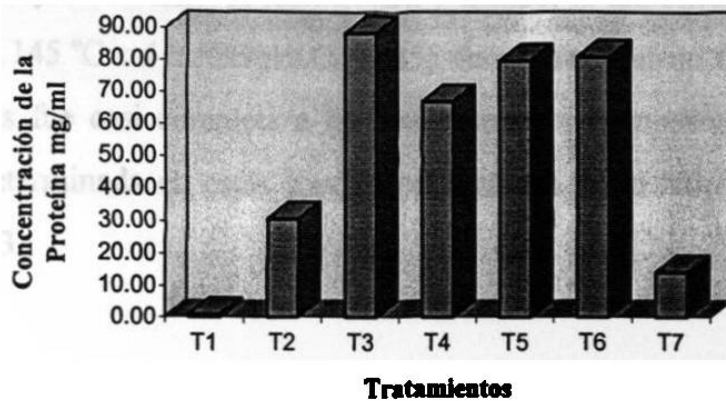
Tratamiento 3 110 °C x 24h

Tratamiento 4 110 °C x 26h

Tratamiento 5 145 °C x 4h

Tratamiento 6 145 °C x 4h + 1% fenol

Tratamiento 7 145 °C x 4h preox/perfórmico



Gráfica No. 1 Concentración de Proteína resistente en cada tratamiento

En las hidrólisis ácidas que se aplican al subproducto de tenería se encontró que tiempos de 22 h a 110 °C nos proporcionan una mayor cantidad de proteína 0.1365%, deduciendo que la hidrólisis fue incompleta. En el grado de hidrólisis a 110 °C x 24 h, se obtuvo una cantidad de proteína de 0.0984 mg%, y el grado de hidrólisis que se obtuvo con pre-oxidación con peróxido de hidrógeno fue muy agresivo debido a que la proteína resistente fue de solo 0.0658 mg%, en la hidrólisis sin atmósfera de Nitrógeno la proteína encontrada fue 0.0549 mg%, pero la detección de los aminoácidos en los cromatogramas revela que hubo destrucción de los aminoácidos y fueron detectados en muy poca cantidad o simplemente no fueron detectados.

En la hidrólisis a 145 °C x 4 h se aumenta la temperatura, y se reduce el tiempo de exposición observándose una mayor cantidad de proteína resistente a la hidrólisis 0.1583 mg%, y en el tratamiento donde se adiciona fenol para poder recuperar en mayor cantidad aminoácidos como fenilalanina, tirosina y arginina (Merck No.26, 1989), se observa una buena hidrólisis debido a que solo se encontró 0.0984 mg% igual que la proteína encontrada a 110 °C x 24 h.

El análisis de aminoácidos tiene una gran demanda en la actualidad, la aplicación de las técnicas apropiadas en la hidrólisis de la proteína, determina un éxito en las investigaciones donde se determina la concentración real de los aminoácidos. La

literatura nos marca preferentemente 2 tipos de hidrólisis ácida para la proteína, ambas con HCl 6N y solo varían la temperatura y tiempo, la hidrólisis a 110 °C x 24 h y la hidrólisis a 145 °C x 4 h (Gehrke,C., 1985), en nuestro trabajo se observó también que la hidrólisis fue casi completa a las temperaturas y tiempos recomendados, pues la proteína determinada en estas condiciones después de la hidrólisis fue mínima. Ver tabla No. 13

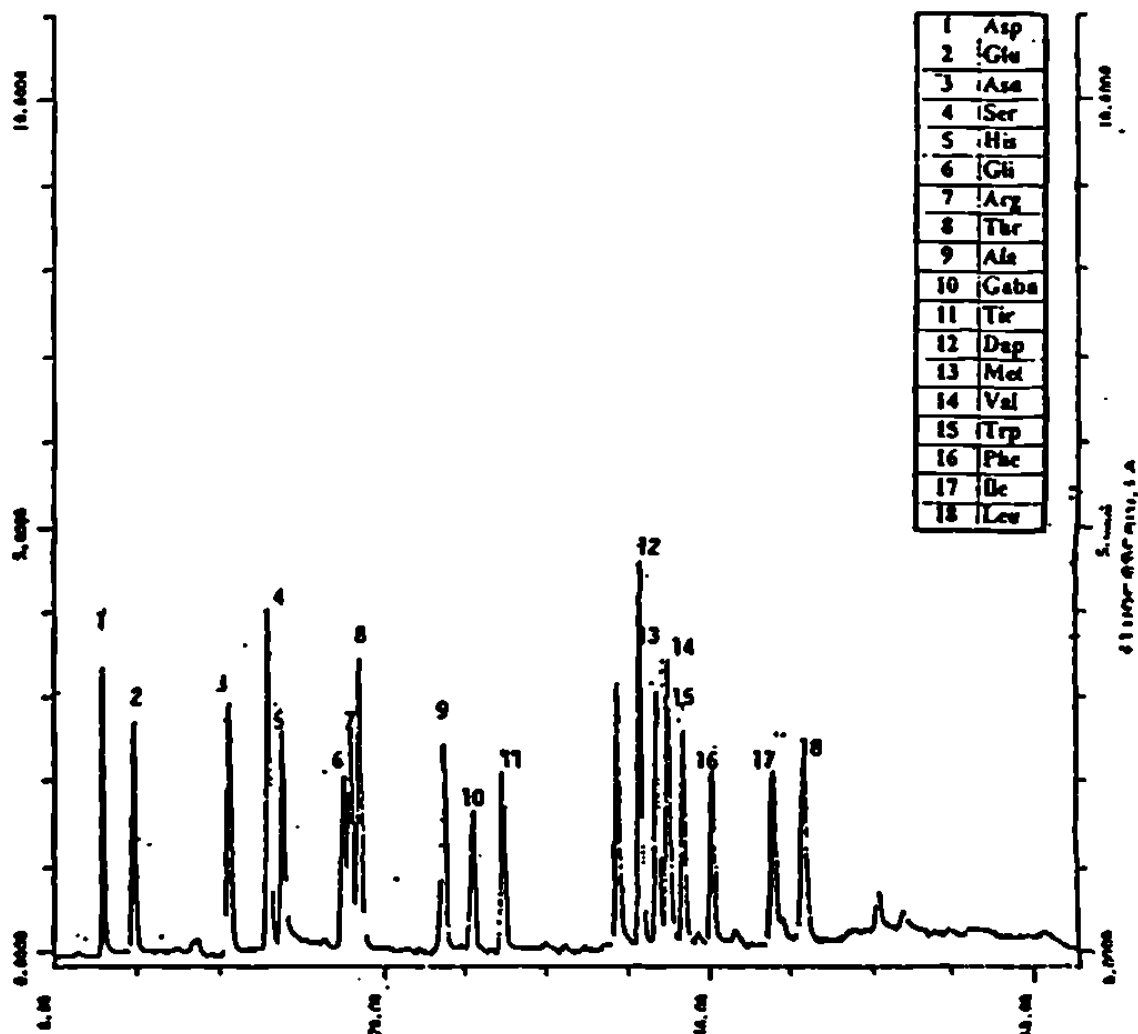
7.7 ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS POR HPLC

La cuantificación de los aminoácidos se realizó usando el OPA/2ME como reactivo derivatizante, la derivatización es una etapa imprescindible en un análisis de aminoácidos, ya que la mayoría de los aminoácidos carecen de capacidad cromófora o fluorófora, y al igual que otros reactivos de derivatización el OPA/2ME tiene algunas ventajas.

- 1.- La reacción de derivatización es muy rápida.
- 2.- Se lleva a cabo a temperatura ambiente y en medio acuoso.
- 3.- Es altamente fluorescente.

Se realizaron las cromatografías correspondientes de cada uno de los tratamientos, las tablas No. 14 a la No. 21 y los cromatogramas que corresponden a las gráficas de la No. 4 a la No. 11 muestran los resultados obtenidos en el análisis de aminoácidos por HPLC, del estándar y de los doce aminoácidos determinados, Asp., Glu., Ser., Gli., Arg., Thr., Ala., Met., Val., Phe., Ile. y Leu., en cada uno de los tratamientos, así como su análisis estadístico indicando las medias, desviación estándar y el coeficiente de variación. Cada tratamiento fue realizado por triplicado. La prolina no se incluyó ya que no puede ser detectada por el OPA/ 2ME. Para poder detectarla es necesario oxidarla primero con hipoclorito de sodio (Ishida,Y., 1981).

Se presentaron variaciones en los tiempos de retención en el análisis cromatográfico de la mezcla de estándares, pero el orden de elución de todos los aminoácidos fue siempre el mismo, ver Gráfica No.2.



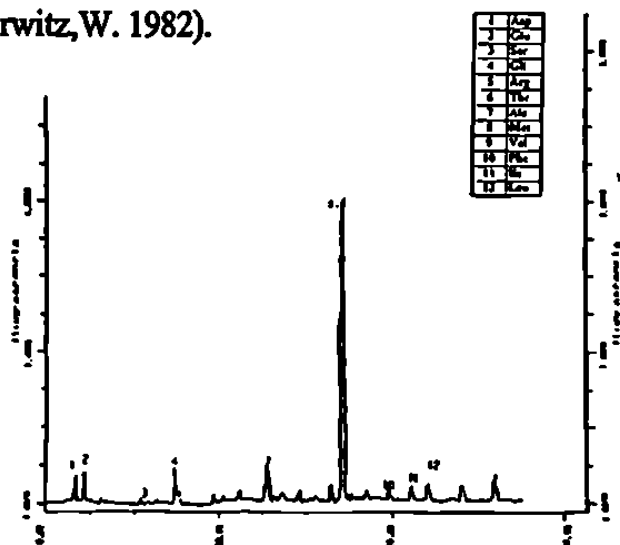
Gráfica No. 2 Cromatograma correspondiente a los estándares de los aminoácidos

7.7.1 TRATAMIENTO No. 1: 110 °C X 24 h SIN APLICAR

ATMÓSFERA DE N₂

Las condiciones de este tratamiento proporcionan un hidrolizado casi total, pero al mismo tiempo hay destrucción de los aminoácidos, en este tratamiento no se aplicó atmósfera de N₂ y esto hace que los aminoácidos se pierdan, lo cual comprobamos en el % de recuperación total 0.88%, y la concentración de cada aminoácido que se encontró fue también muy baja. Ver tabla No. 14 y gráficas No. 3 y 4, en algunas de las repeticiones el aminoácido no fue detectado debido a su baja respuesta, y no se logró ver su señal que era insuficiente, o sencillamente era un mínimo no cuantificable. Los aminoácidos mas dañados en estas condiciones fueron la Metionina, Serina, Valina y Treonina, de estos no se encontró nada. Las mayores concentraciones corresponden al Ac. Glutámico 0.25 g/100, y Glicina 0.22 g/100, resistiendo las condiciones de hidrólisis para ser resuelto. Lo cual pude justificarse ya que el subproducto de tenería corresponde a la dermis de bovino, y este tejido conectivo esta formada por la proteína de colágeno que en su mayor parte contiene Glicina (35%) (Lehninger, 1993).

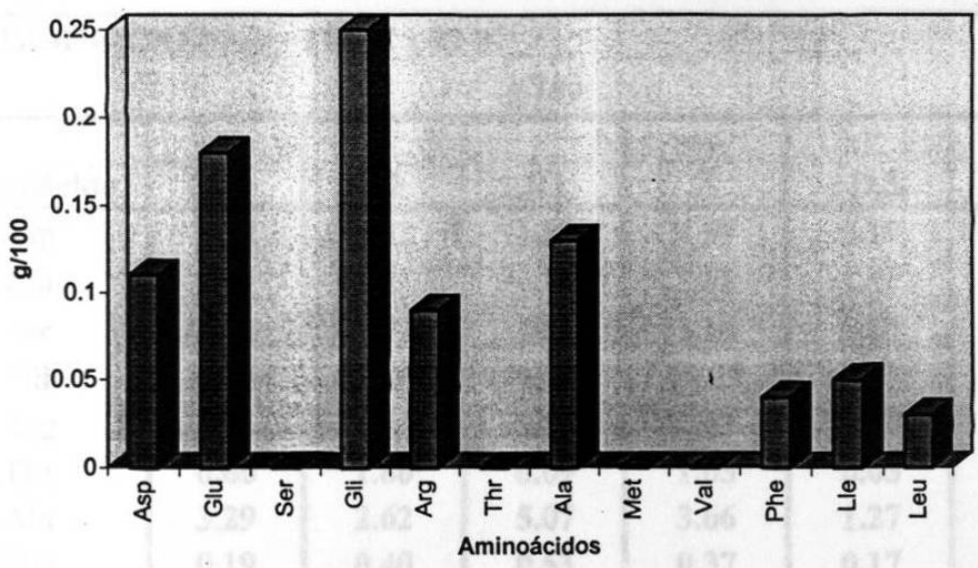
Los porcentajes de concentración de los aminoácidos observados fueron variables, aunque su coeficiente de variación se presentó en rangos de 0.22 a 0.40 a excepción de la Alanina que tuvo un C.V. de 3.33, estando dentro de los límites aceptables (Horwitz, W. 1982).



Gráfica No. 3 Cromatograma del análisis de aminoácidos correspondiente al tratamiento No.1

TABLA No. 14 Concentraciones de aminoácidos en el tratamiento No. 1

TRATAMIENTO No. 1 Hidrólisis ácida sin atmósfera						
De N₂ g/100						
Aminoácido	R1	R2	R3	X	+D.S.	C.V.
Asp	0.09	0.16	0.08	0.11	0.04	0.40
Glu	0.25	0.12	0.17	0.18	0.07	0.36
Ser	n.d	n.d	n.d	n.d	0.00	0.00
Gli	0.22	0.32	0.21	0.25	0.06	0.24
Arg	0.07	0.09	0.11	0.09	0.02	0.22
Thr	n.d	n.d	n.d	n.d.	n.d.	0.00
Ala	0.16	0.14	0.90	0.13	0.43	3.33
Met	n.d	n.d	n.d	n.d.	0.00	0.00
Val	n.d	n.d	n.d	n.d.	0.00	0.00
Phe	0.05	0.06	0.03	0.04	0.02	0.38
Lle	0.07	0.02	0.06	0.05	0.03	0.53
Leu	0.03	0.04	0.02	0.03	0.01	0.33
%REC.	0.94	0.95	1.58	0.88	0.37	0.42



Gráfica No.4 Concentración media de aminoácidos en el Tratamiento No. 1

110°C x 24 h sin atmósfera de N₂

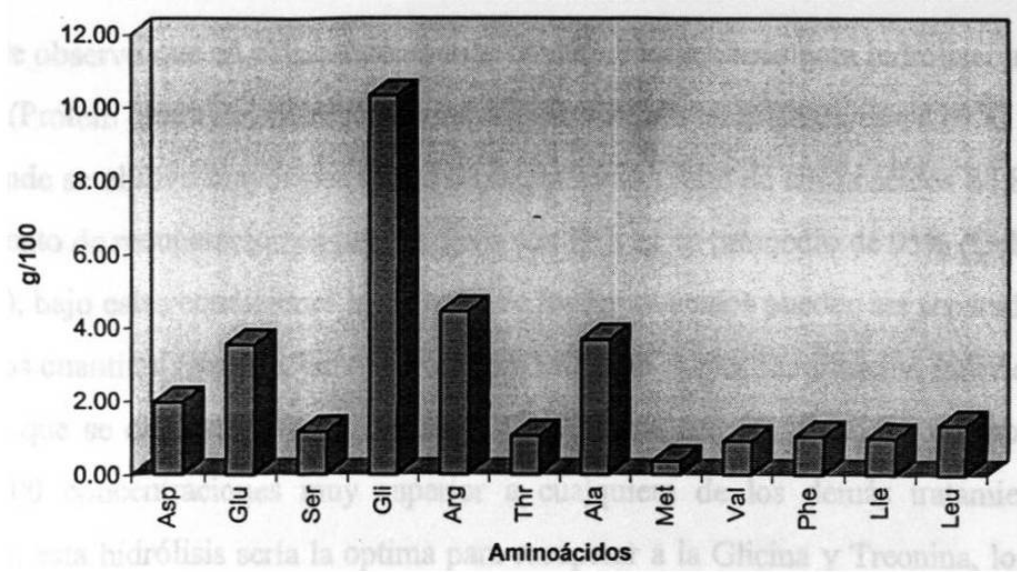
7.7.2 TRATAMIENTO No. 2: 110 °C X 22 h

En este tratamiento se proporcionó las condiciones recomendadas en la literatura (Gereck,C.,1985), solamente se varió el tiempo de exposición, disminuyendo en 2 horas. Se observa que el tiempo de hidrólisis no es suficiente, debido a que la determinación de proteína después de la hidrólisis se encontró una concentración media de proteína resistente de 0.13 mg/mL, representando una cantidad alta en comparación con los demás tratamientos, lo que nos indica que la hidrólisis fue incompleta.

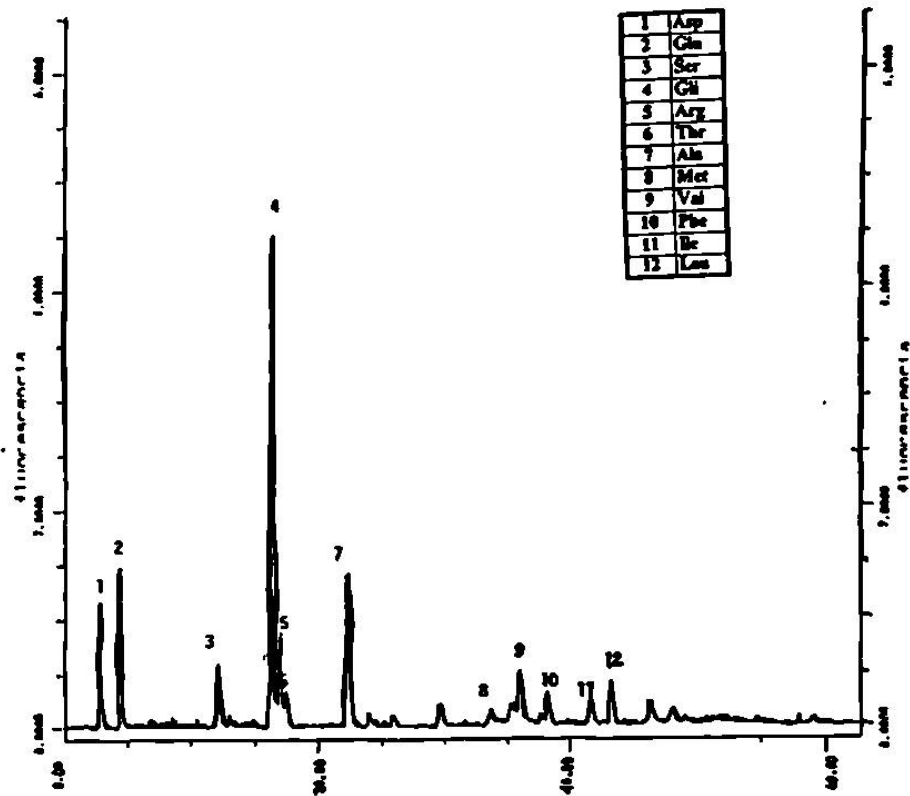
El por ciento de recuperación total de aminoácidos fue bajo (30.76%), al igual que la recuperación individual de cada aminoácidos en general, a excepción de Glicina 10.29 g/100, Alanina 3.66 g/100 y Ac. Glutámico 3.52 g/100. Ver tabla No. 15 y gráficas No. 5 y 6. Lo que viene a confirmar que la hidrólisis fue parcial. En los resultados de recuperación se observó que los porcentajes son variados, y su C.V. es <1. Ver Tabla No.15.

TABLA No.15 Concentración de aminoácidos en el tratamiento No.2

TRATAMIENTO No.2: 110 °C x 22 h						
g/100						
Aminoácido	R1	R2	R3	— X	+D.S.	C.V.
Asp	2.17	1.82	1.87	1.95	0.19	0.10
Glu	3.91	1.95	4.71	3.52	1.42	0.40
Ser	1.11	0.72	1.66	1.16	0.47	0.41
Gli	10.29	11.05	9.52	10.29	0.77	0.07
Arg	4.31	5.45	3.53	4.43	0.97	0.22
Thr	0.66	1.80	0.69	1.05	0.65	0.62
Ala	3.29	2.62	5.07	3.66	1.27	0.35
Met	0.19	0.40	0.53	0.37	0.17	0.46
Val	0.84	0.93	0.97	0.91	0.07	0.07
Phe	1.17	1.03	0.93	1.04	0.12	0.12
Lle	0.75	0.73	1.52	1.00	0.45	0.45
Leu	1.30	1.22	1.57	1.36	0.18	0.13
%REC	29.99	29.72	32.57	30.76	1.57	0.05



Gráfica No.5 Concentración media de aminoácidos en el Tratamiento No. 2 110°C x 22 h



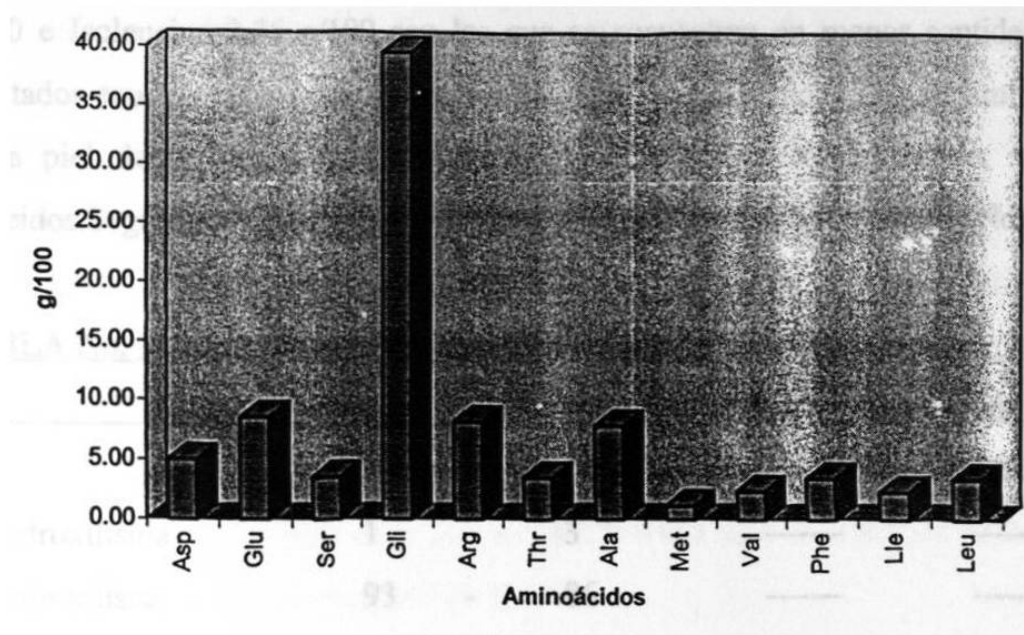
Gráfica No.6 Cromatograma del análisis de aminoácidos en el tratamiento No.2

7.7.3 TRATAMIENTO No. 3: 110 °C X 24 h

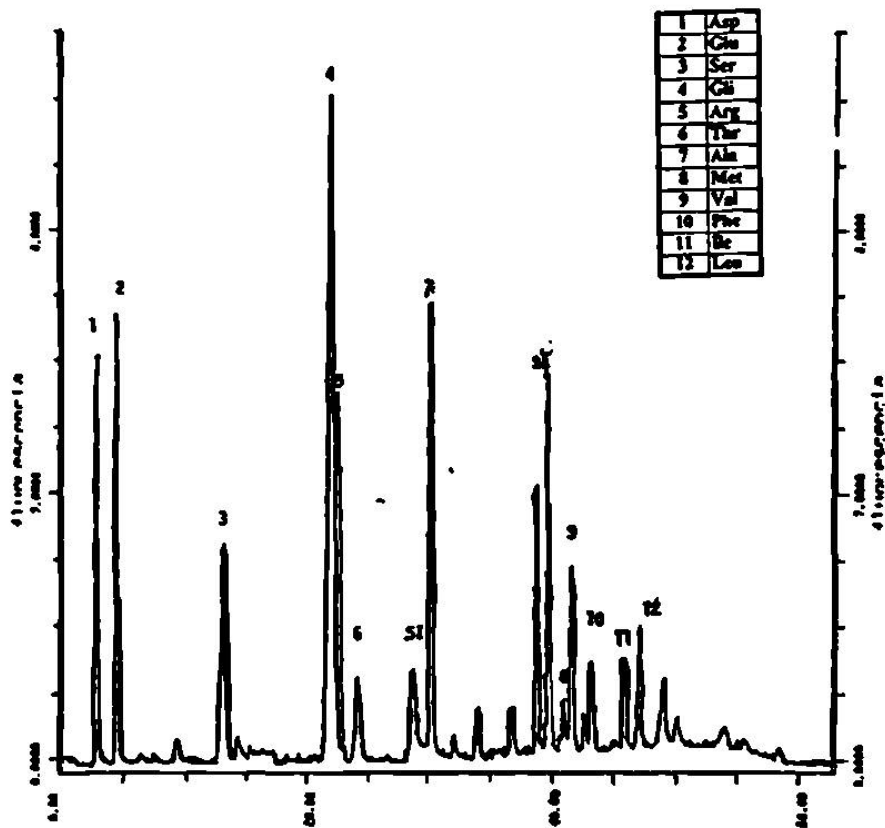
Se observó que en el tratamiento mas común recomendado para hidrolizar a una proteína,(Protein quality evaluation, Report of Join FAO/WHO, 1990), es a 110 °C x 24 h fue donde se obtuvo mayor por ciento de recuperación total de aminoácidos 88.84%. El por ciento de recuperación en las hidrólisis con HCl es en promedio de 95% (Gehrke, C., 1985), bajo estas condiciones la mayoría de los aminoácidos pueden ser separados y analizados cuantitativamente, pero no recuperados en su mayor rendimiento individual, debido a que se observa mayor recuperación de Glicina con 39.57 g/100, y Treonina 3.48 g/100 concentraciones muy superior a cualquiera de los demás tratamientos aplicados, esta hidrólisis sería la optima para recuperar a la Glicina y Treonina, lo que no sucede para los otros 10 aminoácidos determinados. Ver Tabla No. 16 y Gráfica No. 7 y 8.

TABLA No.16 Concentración de aminoácidos en el tratamiento No. 3

TRATAMIENTO No.3: 110 C x 24 h						
g/100						
Aminoácido	R1	R2	R3	\bar{X}	+D.S.	C.V.
Asp	2.47	6.51	6.04	5.01	2.21	0.44
Glu	4.33	11.28	10.10	8.57	3.72	0.43
Ser	1.61	5.47	3.43	3.50	1.93	0.55
Gli	39.61	46.52	32.57	39.57	6.98	0.18
Arg	8.05	7.32	9.02	8.13	0.85	0.10
Thr	2.50	6.10	1.83	3.48	2.30	0.66
Ala	4.11	10.90	8.52	7.84	3.45	0.44
Met	0.55	1.66	1.22	1.14	0.56	0.49
Val	1.16	2.98	3.03	2.39	1.07	0.45
Phe	1.62	4.56	4.20	3.46	1.60	0.46
Lle	0.96	2.65	3.43	2.35	1.26	0.54
Leu	1.38	4.32	4.52	3.41	1.76	0.52
%REC	68.35	110.27	87.91	88.84	20.98	0.24



Gráfica No. 7 Concentración media de aminoácidos en el Tratamiento No. 3 110°C x 24 h



Gráfica No. 8 Cromatograma del análisis de aminoácidos en el tratamiento No.3

La Metionina es pobremente recuperada 1.14 g/100 debido a que es fácilmente destruida bajo estas condiciones de hidrólisis. Otros aminoácidos como Valina 2.39 g/100 e Isoleucina 2.35 g/100 son los que se encuentran en menor cantidad. Estos resultados eran esperados debido a que si comparamos la composición de aminoácidos en la piel de bovino y los encontrados en el subproducto de tenería, son muy parecidos. Según la Enciclopedia of Food Science (Peterson, J., 1978), Tabla No.17.

TABLA No. 17 Composición de aminoácidos de piel de Bovino

	*Tipo 1		**Subproducto de Tenería	
	alfa 1	alfa 2	24 h/110 °C	4 h/145 °C
3-Hydroxilisina	1	- 3	-----	-----
4-Hydroxilisna	93	- 86	-----	-----
Ac. Aspártico	43	- 48	5.01	7.67
Treonina	16	- 17	3.48	2.91
Serina	31	- 34	3.50	5.65
Ac. Glutámico	75	- 72	8.57	11.38
Prolina	133	- 116	-----	-----
Glicina	332	- 330	39.57	15.56
Alanina	121	- 102	7.84	7.78
½ Cistina	--	- --	-----	-----
Valina	17	- 31	2.39	3.41
Metionina	7	- 4	1.14	2.09
Isoleucina	8	- 16	2.35	3.70
Leucina	20	- 32	3.41	3.39
Tirosina	2	- 3	-----	-----
Fenilalanina	13	- 14	3.46	6.12
Hidroxilisna	5	- 9	-----	-----
Lisina	31	- 32	-----	-----
Histidina	2	- 8	-----	-----
Arginina	50	- 55	8.13	10.39

*unidades de aminoácidos / 1000 unidades

** g % de muestra de subproducto de tenería

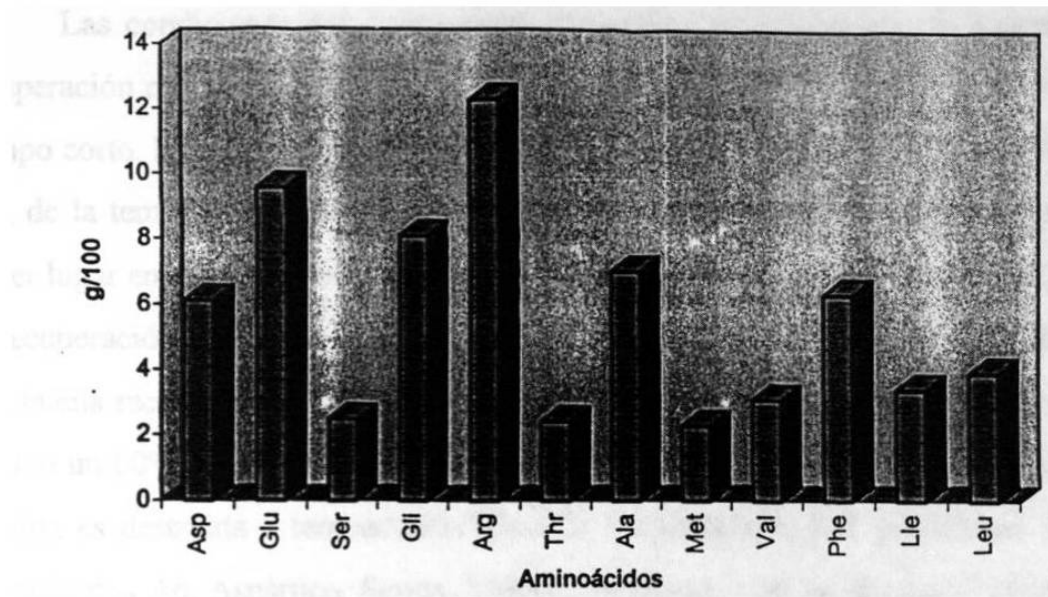
7.7.4 Tratamiento No. 4: 110 °C x 26 h

En este tratamiento se aplica la temperatura recomendada y se alarga el tiempo de exposición, por lo tanto se observó que los aminoácidos fueron destruidos parcialmente, ya que la recuperación total fue de 67.23%, muy especialmente fue menor la recuperación de Glicina, solo se recupera 8.10 g/100, lo mismo sucede con la Treonina 2.42 g/100, todos los demás aminoácidos aumentan su recuperación, como en Arginina 12.31 g/100, Fenilalanina 6.35 g/100, Leucina 3.96 g/100 y Metionina 2.29 g/100. Ver Tabla No. 18 y Gráfica No. 9 y 10. Se observó que la treonina se recupera en menor cantidad, la progresiva destrucción de este aminoácido estima las condiciones de experimentación específicas en la cual se debe llevar a cabo la hidrólisis de la proteína en especial en esta temperatura de 110 °C.

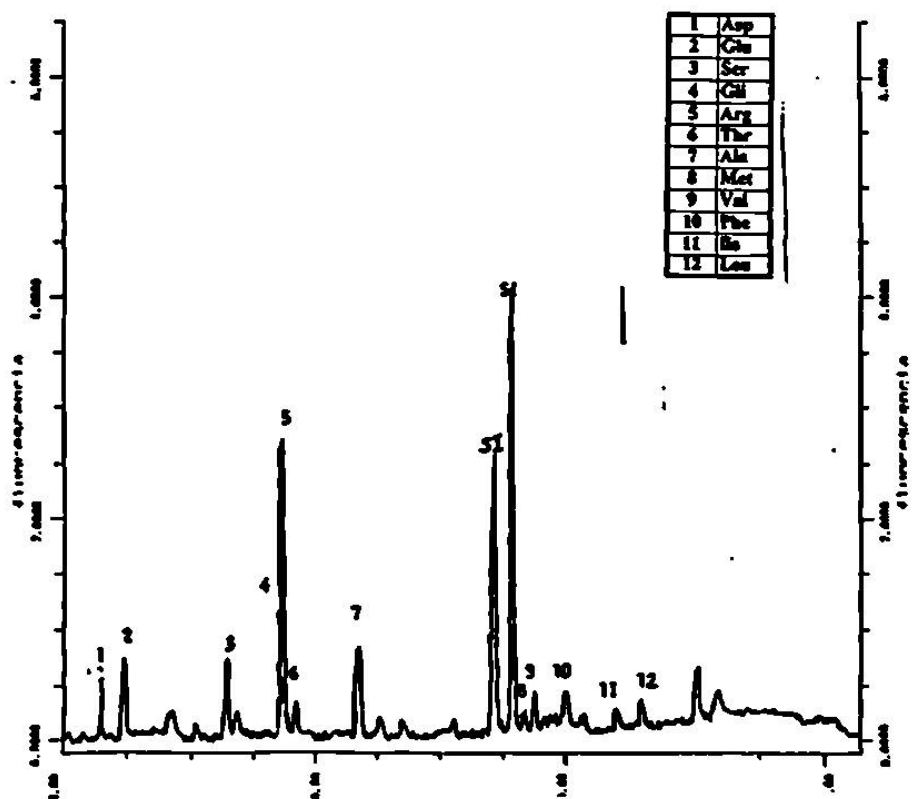
Gehrke (1987) trabajó hidrolizando la proteína de ribonucleasa y reportaron la cuantificación de los aminoácidos, cuando la proteína se hidrolizaba a diferentes tiempos y temperaturas, observaron que la treonina tenía una progresiva destrucción prolongando el tiempo de hidrólisis.

TABLA No.18 Concentración de aminoácidos en el tratamiento No. 4

TRATAMIENTO No.4: 110 °C x 26 h						
g/100						
Aminoácido	R1	R2	R3	— X	+D.S.	C.V.
Asp	3.57	7.87	6.96	6.13	2.27	0.37
Glu	4.67	12.40	11.68	9.58	4.27	0.45
Ser	2.44	3.77	1.24	2.48	1.27	0.51
Gli	7.41	8.86	8.03	8.10	0.73	0.09
Arg	9.57	12.52	14.85	12.31	2.52	0.20
Thr	1.72	2.65	2.90	2.42	0.62	0.26
Ala	4.03	8.58	8.51	7.04	2.61	0.37
Met	1.96	2.20	2.72	2.29	0.39	0.17
Val	2.25	3.45	3.60	3.10	0.74	0.24
Phe	5.19	6.51	7.36	6.35	1.09	0.17
Lle	2.68	3.57	4.08	3.44	0.71	0.21
Leu	3.08	4.74	4.07	3.96	0.84	0.21
%REC	48.57	77.12	76.00	67.23	16.17	0.24



Gráfica No. 9 Concentración media de aminoácidos en el Tratamiento No. 4 110°C x 26 h



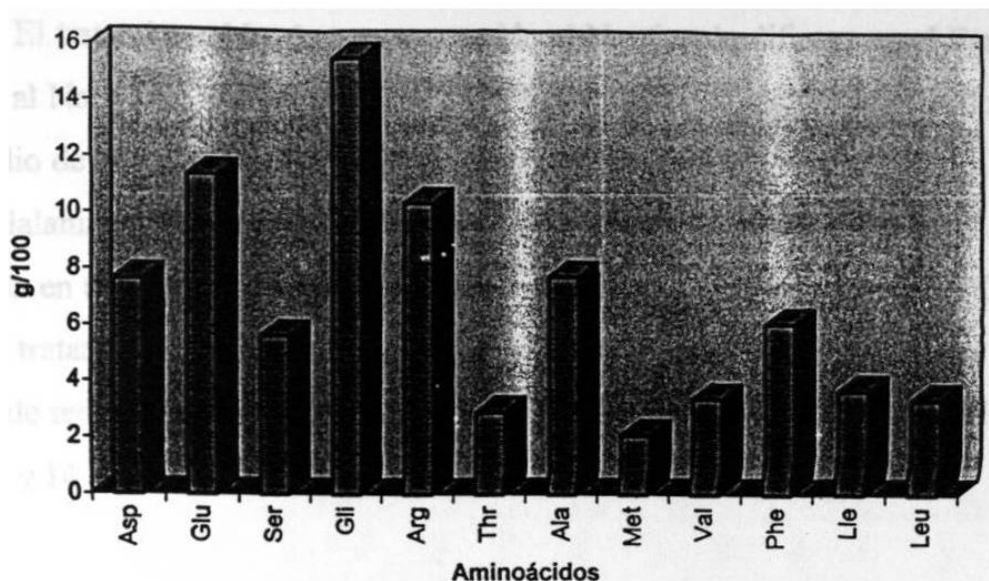
Gráfica No. 10 Cromatograma del análisis de aminoácidos del tratamiento No. 4

7.7.5 TRATAMIENTO No. 5 145 °C X 4 h

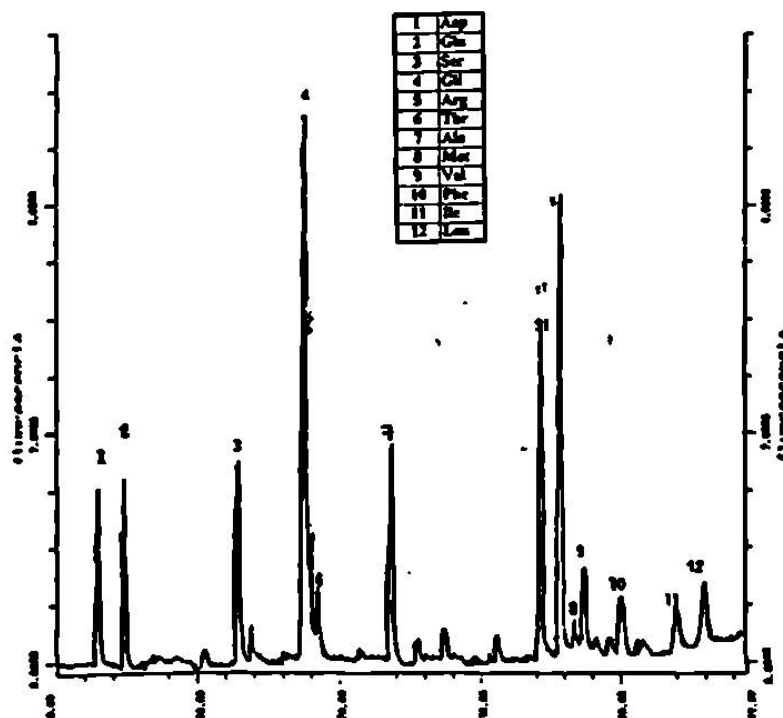
Las condiciones que proporciona este tratamiento producen un porcentaje de recuperación mayor (Gehrke, 1985), este tratamiento proporciona temperaturas altas en tiempo corto. Esto hace al método rápido y cuantitativamente aceptable. Al aplicar solo 4 h, de la temperatura de 145 °C se obtuvo un 80.07% de recuperación, ocupando un tercer lugar en rendimiento en el presente trabajo, superado por el tratamiento 3 y 6. En la recuperación individual de los aminoácidos se observa que 11 aminoácidos tienen una buena recuperación, y la Glicina fue parcialmente destruido a esta temperatura, se obtuvo un 60% menos que en el tratamiento 3 y 4, por lo que podemos deducir que la Glicina es destruida a temperaturas altas, la Treonina tuvo una pérdida de 17%, los aminoácidos Ac. Aspártico, Serina, Valina e Isoleucina son los de mayor recuperación en comparación con los demás tratamientos, y es reconocido que los péptidos que involucran a Isoleucina y Valina como pares Ile-Ile y Val-Val tienen una especial dificultad de ser hidrolizados,(Gehrke, 1985), pero en estas condiciones más drásticas fue el tratamiento que mayor recuperación de Valina e Isoleucina se obtuvo. Ver Tabla No.19 y Gráfica No. 11 y 12.

TABLA No. 19 Concentración de aminoácidos en el tratamiento No. 5

TRATAMIENTO No. 5: 145 °C x 04 h						
g/100						
Aminoácido	R1	R2	R3	— X	+D.S.	C.V.
Asp	6.89	7.33	8.80	7.67	1.00	0.13
Glu	10.77	11.36	12.00	11.38	0.62	0.05
Ser	4.96	4.21	7.79	5.65	1.89	0.33
Gli	20.71	11.59	14.37	15.56	4.67	0.30
Arg	10.99	9.81	10.38	10.39	5.44	0.52
Thr	2.76	2.61	3.37	2.91	0.40	0.14
Ala	8.37	6.59	8.38	7.78	1.03	0.13
Met	1.78	2.27	2.23	2.09	0.27	0.13
Val	3.23	3.45	3.56	3.41	0.17	0.05
Phe	5.42	7.26	5.69	6.12	0.99	0.16
Lle	3.46	3.65	4.00	3.70	0.27	0.07
Leu	3.11	3.61	3.45	3.39	0.26	0.08
%REC	82.45	73.74	84.02	80.07	5.54	0.07



Gráfica No. 11 Concentración media de aminoácidos en el Tratamiento No. 5 145°C x 04 h



Gráfica No. 12 Cromatograma del análisis de aminoácidos del tratamiento No. 5

7.7.6 TRATAMIENTO No. 6: 145 °C X 4 h , AÑADIENDO 1% DE FENOL

El tratamiento No. 6 es muy parecido al No. 5, solo difieren en el Fenol que se agrega al No. 6, según Mason (Merck, 1989) Señala que la inclusión de Fenol provoca un medio de mejor recuperación de aminoácidos lábiles como son la Tirosina, Arginina y Fenilalanina. Se observó que la recuperación de todos los aminoácidos es muy parecida en ambos tratamientos, solo la Arginina se recuperó un poco mas 0.04 g/100 en este tratamiento y el Ácido Glutámico junto con la Alanina obtuvieron el mejor por ciento de recuperación comparando entre los 7 tratamientos. Ver tabla No. 20 y gráfica No. 13 y 14

TABLA No. 20 Concentración de aminoácidos en el tratamiento No. 6

TRATAMIENTO No.6: 145 °C x 04 h						
HCl + 1% de fenol						
g/100						
Aminoácido	R1	R2	R3	\bar{X}	+D.S.	C.V.
Asp	6.48	8.61	7.54	7.54	1.07	0.14
Glu	11.10	12.45	11.76	11.77	0.68	0.06
Ser	4.85	5.01	4.19	4.68	0.43	0.09
Gli	20.96	16.11	18.53	18.53	2.43	0.13
Arg	10.41	10.45	10.43	10.43	0.02	0.00
Thr	2.65	2.01	3.30	2.65	0.65	0.24
Ala	8.41	9.23	8.83	8.82	0.41	0.05
Met	2.02	1.83	1.95	1.93	0.08	0.04
Val	3.25	3.23	3.24	3.24	0.01	0.00
Phe	6.22	5.15	4.65	5.34	0.80	0.15
Lle	3.13	4.13	2.12	3.13	1.01	0.32
Leu	3.65	2.96	3.31	3.31	0.35	0.10
%REC	83.13	81.17	79.85	81.38	1.65	0.02