UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTROAMERICA Y PANAMA

(INCAP)

EVALUACION DE DIGESTIBILIDAD Y CALIDAD PROTEINICA POR METODOS RAPIDOS Y SU CORRELACION CON ENSAYOS CONVENCIONALES EN LA RATA

ARLENE WOLZAK MARCUCCI

CENTRO DE ESTUDIOS SUPERIORES EN NUTRICION Y CIENCIAS DE ALIMENTOS
(CESNA)

CURSO DE POSTGRADO EN CIENCIAS Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

GUATEMALA, AGOSTO DE 1980

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTRO AMERICA Y PANAMA

EVALUACION DE DIGESTIBILIDAD Y CALIDAD PROTEINICA POR METODOS RAPIDOS Y SU CORRELACION CON ENSAYOS CONVENCIONALES EN LA RATA

T E S I S

ARLENE WOLZAK MARCUCCI

Previo a optar al grado de

MAESTRO
(Magister-Scientificae)

Centro de Estudios Superiores en Nutrición y Ciencias de Alimentos

CESNA

Curso de Postgrado en Ciencias y
Tecnología de Alimentos

Guatemala, agosto de 1980

INCAP T-302

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE

CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

DE LA

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

Decano	Lic. Leonel Carrillo
Vocal Primero	Dr. José Héctor Aguilar
Vocal Segundo	Lic. Eduardo Robles
Vocal Tercero	Lic. Justo Comas Fuxet
Vocal Cuarto	Br. Fernando Gamboa
Vocal Quinto	Br. Juana Castellanos
Secretario	Lic. Ma. del Carmen Bran

COMITE INTERISTITUCIONAL DEL CESNA

Director del CESNA	Dr. Luis Octavio Angel
Decano de la Facultad de Ciencias Médicas	Dr. Rolando Castillo
Decano de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia	Lic. Leonel Carrillo
Decano de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia	Dr. Max Ernesto Figueroa
Director de la Escuela de Nutrición	Dr. Luis Octavio Angel
Directora del Curso de Postgrado en Salud Pública con Enfasis en Nutrición Maternoinfantil	Dra. América de Fernández
Director del Curso de Postgrado en Bioquímica y Nutrición Humana	Dr. Oscar Pineda
Director del Curso de Postgrado en Ciencias de Alimentos y Nutrición Animal	Dr. J. Edgar Braham

COMITE ASESOR DE TESIS

Dr. Ricardo Bressani

Dr. Luiz G. Elías

Dr. Roberto Gómez Brenes

Con cariño,

A mis padres: **Johan Nicolaas Wolzak**

Elena Marcucci de Wolzak

A mis hermanos: **Liz y Enrique**

Leslie

Alice y Julito

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Ricardo Bressani por su constante interés y estímulo en mi formación profesional

Al Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá

Al International Development Research Centre (IDRC), Ottawa, Canadá

A la Universidad de San Carlos de Guatemala

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

A los miembros del Comité Asesor de esta tesis por su orientación e invaluable ayuda

A mis profesores por sus enseñanzas y amistad

Al personal de la División de Ciencias Agrícolas y de Alimentos, en especial de las secciones de Bioquímica Nutricional y de Ciencias de Alimentos, por su colaboración en el desarrollo de este estudio

CONTENIDO

I. Introducción

II. Revisión de Literatura
Generalidades
1. Ensayos utilizando enzimas proteolíticas
2. Ensayos utilizando el contenido de aminoácidos esenciales
2.1. Score o Puntaje Químico
2.2. Indice de Aminoácidos Esenciales
2.3. Score Simplificado
2.4. Método cromatográfico
2.5. Método de regresión múltiple
2.6. C-PER o PER calculado
2.7. Análisis discriminante computarizado

III. Objetivos

IV. Justificación

V. Materiales y Métodos
Primera Parte: Comparación y Reproducibilidad de ensayos convencionales de evaluación de calidad y digestibilidad proteínica
Segunda Parte: Estudio y aplicación del Método Multienzimático de digestibilidad proteínica in vitro
Tercera Parte: Modificación al Indice de Crecimiento Nitrogenado

VI. Resultados

VII. Discusión

VIII. Conclusiones y Recomendaciones

IX. Resumen

X. Bibliografía

XI. Apéndice

LISTA DE CUADROS

CUADRO 1 Contenido de nitrógeno y proteína cruda de las muestras utilizadas en la Primera Parte del estudio

CUADRO 2 Identificación y características de las variedades de frijol (Phaseolus vulgaris) del CIAT

CUADRO 3 Características de las muestras procesadas

CUADRO 4 Muestras para la Tercera Parte

CUADRO 5 Esquema del ensayo realizado para evaluar el efecto de diferentes variables sobre el valor del NGI modificado

CUADRO 6 Contenido de aminoácidos esenciales de las muestras

CUADRO 7 Resultados del primer ensayo de NPR

CUADRO 8 Resultados del primer ensayo de PER

CUADRO 9 Resultados del segundo ensayo de NPR

CUADRO 10 Resultados del segundo ensayo de PER

CUADRO 11 Digestibilidad aparente in vivo - Primer ensayo

CUADRO 12 Digestibilidad aparente in vivo - Segundo ensayo

CUADRO 13 Correlación y Reproducibilidad de Ensayos Biológicos Convencionales

CUADRO 14 Digestibilidad proteínica aparente in vivo y valores de pH a diferentes tiempos (Ensayo multienzimático)

CUADRO 15 Ecuaciones de regresión entre pH a diferentes tiempos y la digestibilidad proteínica aparente in vivo incluyendo todas las muestras evaluadas

CUADRO 16 Ecuaciones de regresión entre pH a diferentes tiempos y la digestibilidad proteínica aparente in vivo por grupos de muestras

CUADRO 17 Digestibilidad proteínica aparente *in vivo* y valores de pH a diferentes tiempos para muestras de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) del germoplasma del CIAT

CUADRO 18 Ecuaciones de regresión entre el pH a diferentes tiempos y la digestibilidad proteínica aparente *in vivo* de las leguminosas

CUADRO 19 Efecto de procesamiento térmico sobre los valores de pH a diferentes tiempos y sobre la digestibilidad proteínica aparente *in vivo*

CUADRO 20 Ecuaciones de regresión entre pH a diferentes tiempos, digestibilidad proteínica aparente *in vivo* y lisina disponible en muestras procesadas

CUADRO 21 Ecuaciones de regresión a utilizar para los diferentes grupos de muestras

CUADRO 22 Digestibilidad aparente *in vitro* y su comparación con el valor *in vivo* - Grupo I

CUADRO 23 Digestibilidad aparente *in vitro* y su comparación con el valor *in vivo* - Grupo II

CUADRO 24 Digestibilidad aparente *in vitro* y su comparación con el valor *in vivo* - Grupo III

CUADRO 25 Ecuaciones de regresión entre digestibilidad aparente *in vivo* e *in vitro*

CUADRO 26 Parámetros Químicos y Biológicos de Calidad Proteínica

CUADRO 27 Coeficientes de correlación entre métodos químicos y biológicos

CUADRO 28 Coeficientes de correlación entre el PER y C-PER

CUADRO 29 Resultados del ensayo exploratorio para modificar el NGI utilizando caseína

CUADRO 30 Resultados del ensayo de NGI tradicional y NGI modificado

CUADRO 31 Correlaciones encontradas entre métodos biológicos NGI tradicional, NPR y NGI modificado

CUADRO 32 Efecto de diferentes variables sobre el valor del NGI modificado

CUADRO 33 Comparaciones entre el NGI tradicional y modificado

CUADRO 34 Proteína de caseína para mantenimiento de peso expresada en gramos/día, calculada de los resultados de los diferentes experimentos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Preparación de las harinas de leguminosas

Figura 2 Sistema utilizado en el ensayo multienzimático

Figura 3 Línea de regresión entre digestibilidad proteínica aparente in vivo (primer ensayo) y pH a los 10 minutos

Figura 4 Línea de regresión entre digestibilidad proteínica aparente in vivo (primer ensayo) y pH a los 15 minutos

Figura 5 Línea de regresión entre digestibilidad proteínica aparente in vivo (primer ensayo) y pH a los 20 minutos

Figura 6 Líneas de regresión entre digestbilidad aparente in vivo y pH a diferentes tiempos

I. INTRODUCCION

El modelo ideal para estudiar la nutrición proteínica del hombre sería aquél en el cual las respuestas biológicas a los aminoácidos fueran idénticas a las mostradas por éste. Dado que este modelo no ha sido encontrado, se ha recurrido al uso de métodos químicos y biológicos en otras especies animales para obtener una indicación del valor nutritivo de un alimento dado para el hombre.

Entre los métodos biológicos convencionales más utilizados y de carácter oficial para propósitos regulatorios en muchos países está el Indice de Eficiencia Proteínica (PER) que se realiza en animales en crecimiento, particularmente la rata. Otros ensayos biológicos importantes que utilizan a la rata como sujeto experimental son la Razón Proteínica Neta (NPR) y, más recientemente, el Indice de Crecimiento Nitrogenado (NGI). Ahora bien, el alto costo, la cantidad de muestra necesaria y el tiempo requerido en las estimaciones de calidad proteínica por estos métodos ha motivado la investigación destinada a desarrollar métodos rápidos y económicos que permitan obtener información similar.

Se han propuesto métodos químicos basados en la composición aminoacídica de las proteínas (ej. score o puntaje químico, índice de aminoácidos esenciales, etc). Estos métodos sin embargo, indican el potencial máximo de una proteína sin tener en cuenta la disponibilidad biológica de sus aminoácidos.

El uso de enzimas proteolíticas en la hidrólisis previa a la determinación de la composición aminoacídica de las proteínas ha sido introducido con el objeto de simular la digestión proteínica en el organismo animal, con lo cual se corrige por disponibilidad biológica de los aminoaćidos. Las enzimas proteolíticas han sido utilizadas también en la determinación de digestibilidad proteínica, valor que en combinación con los resultados del análisis de aminoácidos, permite obtener un índice de eficiencia proteínica calculado (C-PER).

Considerando las ventajas de estas nuevas metodologías en la evaluación de la calidad proteínica con respecto a duración del ensayo, cantidad de muestra necesaria y costo sobre métodos tradicionales utilizando la rata, se investigó su eficiencia en muestras de proteínas vegetales principalmente, ya que éstas constituyen los alimentos básicos para la mayoría de la población en países subdesarrollados.

El presente trabajo se divide en tres partes para facilitar su exposición. La primera parte se refiere a la determinación de la comparabilidad y reproducibilidad de ensayos convencionales de evaluación de calidad y digestibilidad proteínica en la rata. La segunda parte se refiere al estudio y aplicación del método multienzimático para determinar digestibilidad <u>in vitro</u> de la proteína. Se comparan además los valores del C-PER o PER calculado con los valores del Indice de Eficiencia Proteínica, PER, en ratas.

Finalmente, la tercera parte da cuenta de ensayos realizados con el propósito de modificar el método Indice de Crecimiento Nitrogenado, NGI, en ratas, el cual está limitado actualmente por un alto costo debido al número de ratas y cantidad de muestra requerida.

II. REVISION DE LITERATURA

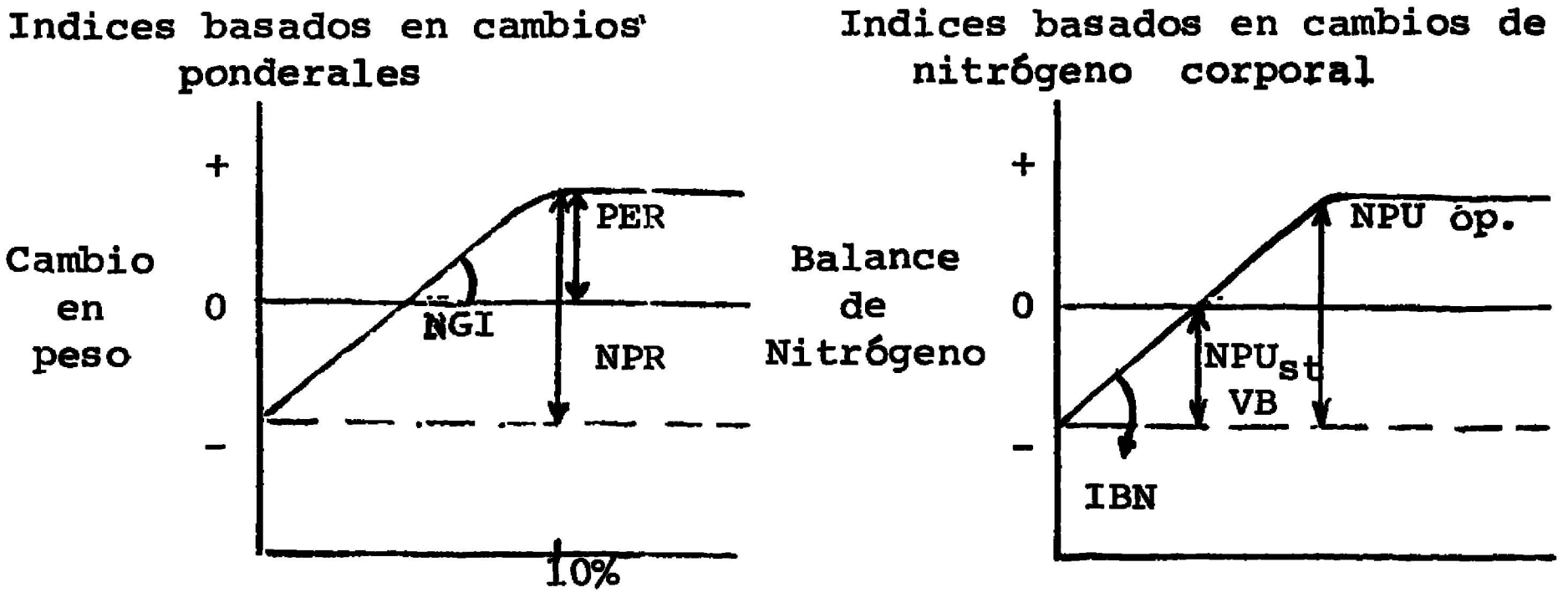
La calidad de una proteína indica la eficiencia con que ésta es utilizada en la síntesis y mantenimiento de la proteína tisular (53). Está determinada por la cantidad, disponibilidad y proporción de los aminoácidos esenciales y por la presencia de suficientes aminoácidos no esenciales para su óptima utilización (57).

Se han propuesto muchos métodos para la evaluación de las proteínas (11). Estos incluyen, en general, métodos químicos y métodos biológicos.

Los métodos químicos basados en la composición aminoacídica determinada por técnicas químicas, físicas o biológicas, después de una hidrólisis total de la proteína, dan una indicación muy limitada de la calidad proteínica de un alimento puesto que no consideran la digestibilidad, biodisponibilidad de los aminoácidos presentes, ni la presencia de factores antifisiológicos. Ejemplo de estos métodos son el Score o Puntaje Químico (74) y el Indice de Aminoácidos Esenciales (78).

Los ensayos biológicos están basados en las respuestas fisiológicas de animales comunes de laboratorio (rata, ratón, perro, etc.) y en algunos casos del hombre mismo, obtenidas bajo un conjunto de condiciones experimentales controladas (43, 17). Estos métodos evalúan parámetros como crecimiento o aumento ponderal en animales jóvenes, mantenimiento en adultos, balance nitrogenado, etc.

La figura a continuación muestra la relación que existe entre los diferentes ensayos biológicos (2).



Relación entre bioensayos para medir calidad proteínica (2).

Los ensayos más importantes de evaluación proteínica en la rata se muestran en la siguiente tabla, clasificados como ensayos de dos puntos y de múltiples puntos, y en función del parámetro evaluado: retención de nitrógeno o ganancia ponderal (84).

Clasificación de bioensayos en ratas (84).

Tipo de ensayo	Ejemplo
Ensayos de dos puntos	
Retención de nitrógeno	
1. Ingestión-excreción	Utilización proteínica neta, NPU
2. Análisis de carcás	Utilización proteínica neta, NPU
Ganancia Ponderal	
1. Relacionado a ingesta	Indice de Eficiencia Proteíca, PER
2. Relacionado a ingesta y a dieta no proteica	Razón Proteínica Neta, NPR

Continúa .....

Continuación.

Tipo de Ensayo	Ejemplo
Ensayos de múltiples puntos	
Balance de N vs. N absorbido	
1. Crecimiento vs. ingesta	Indice de Balance Nitrogenado, NBI
2. Respuesta vs. ingesta	Valor Nutritivo Relativo, RNV
3. Crecimiento vs. ingesta	Indice de Crecimiento Nitrogenado, NGI
4. Respuesta vs. ingesta sin grupo aproteico	Valor Proteínico Relativo, RPV

El método más conocido y oficial para propósitos regulatorios en Estados Unidos es el Indice de Eficiencia Proteínica, PER. Este método fue diseñado por Osborne y col. (81) como una forma de expresar la capacidad promotora del crecimiento de una proteína. El método puede aplicarse a cualquier animal en crecimiento, pero se usa generalmente como un ensayo de 4 semanas de duración utilizando la rata como sujeto experimental. Se calcula de la relación:

$$\text{PER} = \frac{\text{Ganancia en peso expresada en gramos}}{\text{Proteína consumida expresada en gramos}}$$

En todos los ensayos se incluye un grupo control de caseína, y el valor de la proteína bajo prueba se calcula en relación al grupo de caseína, o bien puede calcularse relativo al grupo de caseína corregido a un PER de 2.5, con lo cual se obtiene el PER corregido.(98).

$$\text{PER corregido} = \frac{\text{PER de proteína en prueba}}{\text{PER de caseína control}} \times 2.5$$

Siendo el método más antiguo, ha sido tal vez el más criti-

cado. Se ha señalado que de los criterios que se han establecido en la definición de un bioensayo válido, i.e. precisión, reproducibilidad, validez estadística, proporcionalidad, simplicidad y bajo costo, el PER sólo cumple con el de simplicidad (84).

Steinke (98) ha revisado los factores responsables de la variabilidad observada en los resultados del PER, haciendo notar que éste fue originalmente diseñado para evaluar alimentos ricos en proteína y no para alimentos complejos, altos en humedad, con contenidos de grasa mayores que de proteína, altos en ceniza no balanceada, bajo contenido proteico o bien carbohidratos poco usuales.

Otros factores que afectan los resultados del PER han sido señalados por Bressani (17). Estos incluyen raza y edad de la rata, así como la duración del período de experimentación.

A continuación se enumeran algunas críticas hechas al PER y la solución propuesta a ellas a través de nuevos métodos de evaluación proteínica.

1. El cambio en peso registrado no refleja necesariamente la deposición de proteína, ya que dependiendo del tipo de dieta puede ocurrir una deposición de grasa o de agua.

El NPU o Utilización Proteínica Neta, que se define como la porción del nitrógeno ingerido que es retenido, determina la proteína depositada en el organismo animal durante el período del estudio. Sin embargo, es un método más costoso y laborioso pues requiere el análisis del carcás por contenido de nitrógeno.

2. El método de PER no considera los requerimientos para mantenimiento, esto es, una proteína puede llenar los requerimientos para mantenimiento de un animal y no promover su crecimiento.

Considerando esto, se ha propuesto el NPR o Razón Proteínica Neta en el que se incluye un grupo que consume una dieta aproteica con lo cual se estiman los requeimientos para mantenimiento. Este índice se calcula sumando la pérdida de peso del grupo que consume la dieta libre de nitrógeno al aumento ponderal registrado en el grupo que consume el alimento a prueba y se divide entre la proteína consumida por dicho grupo. Este ensayo dura 10 días.

3. Un nivel de 9-10% de proteína en las dietas ha sido fijado como estándar, sin embargo, no todas las proteínas presentan su máxima respuesta al mismo nivel de proteína dietaria (17).

Para resolver esta limitación se ha creado el NGI o NER (Nitrogen Growth Index) o Indice de Crecimiento Nitrogenado, en el cual la proteína a prueba se alimenta a diferentes niveles y se evalúa la ganancia ponderal. El NGI es la pendiente de la línea de regresión entre el aumento de peso y la proteína consumida en un período de 14 días.

4. Muchos alimentos con bajo contenido proteínico (menor de 10%) no pueden ser evaluados por este método en forma confiable, ya que ocurre una sobreestimación de su calidad.

Estos alimentos pueden ser evaluados utilizando el Indice de Crecimiento Nitrogenado, NGI.

Es claro que en última instancia, el propósito de los bioensayos de calidad proteínica es conocer su valor para nutrición humana. Con respecto a ello, todos los ensayos deberían correlacionar con el valor en humanos. Sin embargo, la realización de ensayos rutinarios en humanos es impráctica, dada la enorme variabilidad biológica, el costo y dificultades involucradas en dichos estudios. De esa manera, los bioensayos en otras especies y los procedimientos químicos siguen siendo esenciales como métodos de rutina, aunque su comparabilidad con los resultados obtenidos en humanos debe ser demostrada.

En general, puede notarse que todos los ensayos biológicos consumen mucho tiempo, requieren cantidades considerables de muestra y, consecuentemente, son costosos (78). Estas limitaciones y la creciente necesidad de ensayos rápidos para evaluar calidad proteínica, particularmente en las áreas de procesamiento de alimentos (78) y de selección genética en cereales y leguminosas de mejor calidad nutricional (52), ha motivado el desarrollo de otros tipos de ensayo (50), que se mencionarán a continuación.

1. Ensayos utilizando enzimas proteolíticas

Las enzimas proteolíticas han sido utilizadas para predecir un aspecto de la calidad proteínica: su digestibilidad. Este aspecto constituye el determinante principal de la disponibilidad de los aminoácidos de una proteína (51).

La digestibilidad de un nutriente se define como la cantidad del nutriente ingerido que es absorbido (75). Puede expresarse como un porcentaje así:

$$\text{Digestibilidad} = \frac{\text{Nutriente ingerido - Nutriente en heces}}{\text{Nutriente ingerido}} \times 100$$

El valor así obtenido se denomina digestibilidad aparente, ya que parte del nutriente presente en las heces no se origina del alimento a prueba sino que proviene de procesos metabólicos u otras fuentes como bacterias del tracto gastrointestinal, enzimas, células epiteliales, etc. Para obtener la digestibilidad verdadera, es necesario determinar las pérdidas endógenas del nutriente estudiado cuando los animales en el ensayo ingieren una dieta libre de éste. Así:

$$\text{Digestibilidad verdadera} = \frac{\text{Nutr. ingerido-Nutr. heces + Nutr. endógeno}}{\text{Nutriente ingerido}} \times 100$$

La digestibilidad de una proteína puede obtenerse por bioensayo, siendo la rata el sujeto experimental más común. Sin embargo, el procedimiento es laborioso y requiere períodos de tiempo relativamente largos (51).

Melnick y Oser (71) mostraron que la tasa de digestión de las proteínas con pancreatina era influenciada por el procesamiento térmico a que había sido sometida la proteína. Esta correlación fue la base de un método *in vitro* para estimar la susceptibi

lidad de las proteínas a digestión enzimática.

Se han desarrollado varios métodos in vitro para la estima - ción de la digestibilidad proteínica (51). Estos han cobrado importancia dada su rapidez y sensibilidad.

Akeson y Stahmann (1) encontraron que un sistema enzimático de pepsina-pancreatina daba una aproximación razonablemente adecuada de la digestibilidad proteica determinada en la rata (1).

Ford y Salter (40) en la determinación del efecto de diferentes condiciones de tratamiento térmico en filetes de bacalao deshidratados por liofilización, encontraron que una preparación enzimática de Streptomyces griseus, la pronasa, podía ser utilizada en la predicción de la digestibilidad (40).

Buchanan (28) y Buchanan y Byers (29), describieron un método in vitro para medir digestibilidad proteica por digestión enzimática utilizando papaína en concentrados proteínicos de hoja de trigo sometidos a diferentes tratamientos térmicos. Los parámetros obtenidos concordaron con los resultados del ensayo de digestibilidad in vivo en la rata.

Saunders y col. (93) ensayaron la digestibilidad in vitro de un concentrado proteínico de alfalfa midiendo la solubilidad de la proteína utilizando tres sistemas enzimáticos: papaína, pepsina-pancreatina y pepsina-tripsina. Los valores obtenidos con los sistemas que incluían pepsina mostraron alta correlación con los

ensayos en la rata (r= 0.88 para el sistema pepsina-pancreatina y r = 0.91 para el sistema pepsina-tripsina), mientras que la correlación obtenida al utilizar papína fue pobre. Estos autores desarrollaron un sistema enzimático de papaína-tripsina cuyos resultados correlacionaron bien con los valores de digestibilidad in vivo (r = 0.91).

Maga y col. (61) midiendo la aceptabilidad digestiva de diferentes proteínas, señalaron que las tasas iniciales de hidróli - sis utilizando tripsina como agente proteolítico eran buenos indicadores de su digestibilidad.

Rhinehart (87) modificó el procedimiento de Maga y col. (61) e investigó la correlación entre la digestibilidad in vivo e in vitro. Examinó diversos sistemas enzimáticos que incluían tripsina, pepsina-tripsina, tripsina-quimotripsina y tripsina-quimotripsina-peptidasa. Los resultados fueron alentadores obteniéndose coeficientes de correlación de 0.79, 0.72, 0.80 y 0.74 para la tripsina, pepsina-tripsina, tripsina-quimotripsina y tripsina-quimotripsina-peptidasa respectivamente (87).

Hsu y col. (51) modificaron las técnicas in vitro de Maga y col. (61) y de Rhinehart (87) para la determinación rápida de la digestibilidad proteica utilizando un sistema multienzimático constituido por las enzimas pancreáticas tripsina y quimo - tripsina y la enzima intestinal aminopeptidasa. Estos autores en-

contraron que el pH de la suspensión proteínica inmediatamente después de 10 minutos de digestión con la solución multienzimática mostraba una alta correlación con los valores de digestibilidad aparente *in vivo* en ratas. El análisis de regresión de las 23 muestras ensayadas mostró un coeficiente de 0.90 con un error estándar de 2.23 entre el pH a los 10 minutos y la digestibilidad aparente *in vivo*. La ecuación de regresión obtenida fue:

$$y = 210.464 - 18.103\ x$$

donde x= pH de la suspensión proteínica a los 10 minutos de digestión con la solución multienzimática y y= digestibilidad *in vitro*.

La ventaja más significativa de este método está en que puede completarse en un tiempo muy corto y en que tiene un alto grado de sensibilidad. Además se encontró que es sensible a los efectos de inhibidores de tripsina y ácido clorogénico así como al procesamiento térmico (51, 32). La grasa y sales con capacidad buffer presentes en las 23 muestras no afectaron los resultados. Ahora bien, como más de las dos terceras partes de las muestras empleadas eran de origen vegetal y el resto productos lácteos, al aplicar el método a carnes y huevo se obtuvieron estimaciones bajas de la digestibilidad proteínica aparente. Satterlee y col. (92) modificaron el ensayo de Hsu y col. (51) aumentando el número de muestras para incluir productos cárnicos y huevo, y adicionando otra enzima, la proteasa de *Streptomyces griseus*, después de 10 minutos de digestión multienzimática. Este ensayo modificado

con una duración de 20 minutos permitió obtener estimaciones de digestibilidad más exactas para un conjunto más amplio de muestras.

Schuster y Bodwell (94) al comparar el contenido de aminoácidos esenciales (tanto individuales como a través de combinaciones de éstos) con la calidad nutricional de siete proteínas medida por ensayos biológicos en humanos y ratas, encontraron que las correlaciones eran altas y que no mejoraban al introducir el factor de digestibilidad en el análisis. Todas las proteínas incluidas en el estudio tenían digestibilidades proteínicas aparentes altas comprendidas entre 82 y 87% (valores promedio). De estas observaciones y de los resultados de Alsmeyer y col. (1) y de Lee y col.(58), Satterlee y col. (90) han concluido que aquellos ensayos derivados para una clase de alimentos que poseen un nivel alto y consistente de digestibilidad proteínica no necesitan incorporar datos de digestibilidad en las ecuaciones predictivas. Señalan, sin embargo, que debe tenerse cuidado al usar estas ecuaciones en otros alimentos que poseen digestibilidades proteínicas inferiores, en cuyo caso la calidad nutricional predicha será significativamente mayor que aquélla medida por bioensayo en animales o en el humano.

Marshall y col. (64) compararon las digestibilidades proteínicas aparentes de 33 alimentos de origen vegetal, animal y combinaciones de éstos. La comparación se realizó utilizando ensayos de digestión in vitro usando fluido pancreático humano, pancrea-

tina de rata y pancreatina porcina. Del análisis cuidadoso de la tasa y grado de digestión por cada enzima en los 33 alimentos, los autores concluyeron que la digestión in vitro es idéntica entre las tres pancreatinas utilizadas, pero que la clase o tipo de alimento fue un factor determinante en la tasa de digestión. Así, las proteínas animales eran hidrolizadas a una tasa menor que las vegetales y combinadas. Los autores concluyeron de estos hallazgos con las diferentes pancreatinas que cada clase de alimentos deberá de tener una ecuación separada para determinar digestibilidad proteínica in vitro.

Bodwell y col. (14) usaron 6 proteínas alimenticias (3 vegetales y 3 animales) para comparar digestibilidad proteínica determinada en humanos, ratas y a través del ensayo multienzimático modificado (92). Las correlaciones para digestibilidad aparente y verdadera entre el humano y la rata fueron de 0.375 y 0.455 respectivamente. Estas bajas correlaciones fueron atribuidas al bajo nivel de ingesta utilizado (0.4 g proteína/Kg/día para los humanos) y a una muestra engañosa que alteró los resultados. Los autores establecieron que si esta muestra (atún) era eliminada de las comparaciones, la digestibilidad verdadera entre humanos y ratas estaba altamente correlacionada (r=0.964). Al comparar los datos de digestibilidad in vivo contra los datos del ensayo multienzimático de cuatro enzimas, Bodwell y col. encontraron al igual que

Marshall y col. (64) que existen altas correlaciones (r mayor de 0.90) cuando los alimentos son comparados por clases (vegetales o animales) en lugar de considerarlos como un grupo.

Rich (88) y Rich y col. (89) compararon la digestibilidad proteínica entre humanos, ratas y el ensayo de cuatro enzimas (92). Se utilizaron 6 proteínas (3 leguminosas y 3 no leguminosas) que fueron alimentadas al nivel de 1 g de proteína/Kg de peso/día a los humanos y al 10% de la dieta en ratas. Rich encontró una alta correlación (r=0,957) entre las digestibilidades aparentes medidas en el humano y en la rata. La correlación entre el sistema enzimático y los valores de digestibilidad aparente en humanos fue muy buena (r=0.859) y regular con los valores en la rata (r=0.781).

El objetivo del estudio de Rich era establecer si existían diferencias en la digestión de leguminosas y no-leguminosas por el humano, la rata y el sistema multienzimático. El análisis de los datos mostró que la digestibilidad proteínica aparente para ambos grupos de proteínas evaluada a través del humano y la rata fue prácticamente idéntica (r=0,997). Los datos de digestibilidad <u>in vitro</u> correlacionaron mejor con los humanos que con la rata para las proteínas no leguminosas (r=0.877 y 0.840), y no tan bien para las proteínas de leguminosas (r=0.811 y 0.761 respectivamente).

2. Ensayos utilizando el contenido de aminoácidos esenciales de la proteína

2.1. Score o Puntaje Químico

La calidad de una proteína puede ser estimada de su composición aminoacídica comparándola con la composición de una proteína de referencia de alto valor nutritivo o bien contra patrones establecidos (ej. Patrón FAO/OMS), Mitchell y Block (73) sugirieron que ya que todos los aminoácidos deben estas presentes en cantidades adecuadas en el sitio de síntesis proteica para que ésta ocurra, porcentajes iguales de deficiencia de cualquier aminoácido esencial limitarían la síntesis proteínica en grado comparable. Así si se conoce la composición de una proteína ideal, esto es, aquélla que contenga todos los aminoácidos esenciales en cantidades suficientes para llenar los requerimientos sin que hayan excesos, sería posible computar la calidad de una proteína calculando el déficit de cada aminoácido esencial en relación a la proteína ideal. El aminoácido limitante en primer lugar, esto es, el que se encuentra en mayor deficiencia, determinaría supuestamente el valor nutritivo. En la práctica, estos autores sugirieron la proteína del huevo completo como "ideal" ya que se sabía que tenía un valor biológico cercano a 100. Estos autores compararon los valores biológicos con los déficits aminoacídicos calculados utilizando el huevo como proteína de referencia, encontrando una alta correlación entre los dos y, por tanto, sugirieron que el procedimiento era

válido. Este método se denominó Score o Puntaje Químico. Actualmente se prefiere el término Score Aminoacídico (FAO/OMS, 1973). Se calcula más bien como el porcentaje de adecuación y no como las deficiencias sugeridas por Mitchell y Block. El uso de la proteína patrón FAO/OMS se considera preferible al uso de la proteína del huevo o leche humana como referencia, de tal forma que el Score Aminoacídico de una proteína o mezcla de proteínas está dado por:

$$\text{Score Aminoacídico} = \frac{\text{mg de aminoácido en 1g de proteína}}{\text{mg de aminoácido en 1g patrón de ref.}} \times 100$$

Este método ofrece algunas ventajas pero también presenta serias limitaciones. Es un método simple comparado con otros ya que sólo es necesario conocer el contenido de aminoácidos de la proteína bajo estudio y tener un patrón de referencia contra el cual establecer la comparación. Permite la identificación del aminoácido limitante, lo cual no es revelado por un ensayo biológico. Permite además el diseño de mezclas proteínicas con máxima complementación que pueden utilizarse en el desarrollo de alimentos nutritivos de bajo costo.

La principal limitación de este método es que asume una disponibilidad completa de todos los aminoácidos, es decir no considera la digestibilidad de la proteína, la cual constituye un factor primario de su calidad. No considera el papel que juegan los imbalances de aminoácidos ni el efecto de materiales tóxicos presentes en algunos alimentos. Por otra perte, depende de la exac-

titud del método analítico utilizado en la determinación de aminoácidos. En resumen, puede decirse que el Score o Puntaje Aminoacídico puede predecir la calidad de un alimento o dieta en forma limitada, considerando sólo un componente de ésta: el aminoácido en mayo deficiencia en relación a los requerimientos.

2.2. Indice de Aminoácidos Esenciales

Oser (82), sugirió el uso del contenido total de aminoácidos esenciales en vez de sólo el primer aminácido limitante para determinar la calidad proteínica. Este autor propuso el uso de un índice integrado al que denominó Indice de Aminoácidos Esenciales y el cual queda definido como la media geométrica de las razones entre el contenido de los aminoácidos esenciales en una proteína, en relación al contenido del aminoácido correspondiente en una proteína de referencia de alto valor biológico. Oser al igual que Mitchell y Block, utilizó la proteína del huevo completo como referencia. Así:

$$\text{Indice de AA Esenciales} = \sqrt[n]{\frac{Lis_m}{Lis_r} \times \frac{Trip_m}{Trip_r} \times \frac{Val_m}{Val_r} \times \cdots\cdots}$$

en la que el suscripto m se refiere a la muestra proteínica estudiada, r a la proteína de referencia y n al número de aminoácidos esenciales.

En la derivación de este índice se adoptaron dos suposiciones

más o menos arbritarias, siendo ellas que en el cálculo la razón mínima era de 1% y la máxima de 100%. La primera de ellas se justifica por el hecho de que aún las proteínas completamente defi - cientes en algún aminoácido esencial (ej. gelatina) muestran valores biológicos finitos, originándose ello probablemente del hecho de que el balance nitrogenado se efectúa en períodos de tiempo cortos, durante los cuales los aminoácidos ausentes en las proteínas a prueba pueden ser tomados del intestino o de productos del catabolismo tisular tal vez en cantidades traza, pero suficientes para permitir alguna utilización de las proteínas dietarias.

En la proposición original del Indice de Aminoácidos Esenciales se consideraron además de los 8 actualmente reconocidos como esenciales a la arginina e histidina. El valor parcial de reemplazo de cistina por metionina fue también reconocido. Mitchell (72) modificó la propuesta original omitiendo la arginina e incluyendo la tirosina junto con la fenilalanina dado su valor parcial de reemplazo, en analogía al par metionina-cistina.

Este método sufre las mismas limitaciones que se señalaron para el Score, ya que ambos están basados en la determinación del contenido de aminoácidos después de una hidrólisis completa de la proteína, sin considerar la disponibilidad de éstos al organismo.

2.3. Score Químico Simplificado

McLaughlan y col. (70) considerando que la mayoría de los

alimentos son deficientes en lisina, metionina y cistina, recomendaron el uso de un Puntaje Químico Simplificado usando únicamente estos tres aminoácidos. Estos autores compararon los resultados del score simplificado con determinaciones del Indice de Eficiencia Proteínica en 43 alimentos que fueron asignados a dos clases: aquellos aparentemente deficientes en lisina en un primer grupo y los deficientes en metionina + cistina en el segundo. Los grupos estuvieron constituidos por 16 y 27 muestras respectivamente, obteniéndose coeficientes de correlación entre el Score Químico Simplificado y PER de 0.96 para el primer grupo y de 0.83 para el segundo. Los autores señalan como principal limitación de éste método el hecho de que no proporciona información concerniente a la digestibilidad de la proteína, pero teniendo esto en considera - ción,puede utilizarse como un método rápido y relativamente simple de predecir calidad proteínica(70).

En los tres métodos anteriormente descritos, el patrón o proteína de referencia ha sido siempre sujeto de controversia. El Comité FAO para requerimientos proteínicos (FAO,1957) propuso el uso de un patrón de referencia provisional basado en los requerimientos humanos de aminoácidos. Este patrón fue criticado por otro comité de expertos (FAO/OMS, 1965) quienes consideraron excesivos los valores para triptofano y aminoácidos azufrados. Un nuevo patrón de referencia actualmente en vigor fue propuesto por el comité de expertos FAO/OMS (1973). La siguiente tabla presenta los

patrones mencionados.

Patrones aminoacídicos de referencia (84)

Aminoácido esencial	Huevo entero	FAO (1957)	FAO (1973)
	mg / g N		
Isoleucina	340	270	250
Leucina	540	306	440
Lisina	440	270	340
AA. Azufrados totales	355	270	220
AA. Aromáticos totales	580	360	380
Treonina	294	180	250
Triptofano	106	90	60
Valina	410	270	310
Aminoácidos esenciales totales	3065	2026	2250

2.4. Método Cromatográfico

Pinto y col. (85) han desarrollado un método de cromatografía circular en papel para separar los aminoácidos de proteínas en 7 subgrupos. Los constituyentes de cada uno de estos subgrupos se muestran en la siguiente tabla.

Distribución de los aminoácidos en 7 subgrupos (85)

SUBGRUPO	Constituyentes principales	Contaminantes
1	amoníaco, cisteína	
2	arginina, histidina, lisina	amoníaco
3	glicina, serina, ac. aspártico	ac. glutámico, sulfóxido de metionina, ácido cisteico
4	ácido glutámico, treonina	alanina, glicina, ácido aspártico
5	prolina, alanina, tirosina	
6	valina, metionina, fenilalanina	
7	leucina, isoleucina, fenilalanina	

En teoría las proteínas puras, o bien sistemas con componentes proteicos, dan lugar por hidrólisis a una mezcla de aminoácidos que refleja sus características. Dichas mezclas pueden ser separadas y los subgrupos obtenidos tienen características relacionadas al material original. La transformación de las absorbancias para cada subgrupo a porcentajes de la absorbancia total, permite usar el método dentro de ciertos límites, independiente de la masa del hidrolizado utilizado.

Estos autores estudiaron 20 muestras encontrando una excelente reproducibilidad. Así fue también posible detectar diferencias conocidas, como por ejemplo el caso de maíz común y opaco-2. El subgrupo dos (que comprende a la lisina) corresponde a 8.7 y 12.7% de la absorbancia total en el maíz común y opaco-2 respectivamente.

Dada la sencillez de este método y su bajo costo, se piensa que podría ser utilizado en la evaluación de la calidad proteínica si se estableciera una correlación entre los porcentajes de las fracciones proteicas y los resultados de ensayos convencionales.

2.5. Método de regresión múltiple utilizando composición aminoacídica.

Alsmeyer y col. (4) describieron ecuaciones de regresión múltiple, basadas en el contenido de aminoácidos seleccionados por computadora, que proveen estimaciones del PER para alimentos que contienen carne. Este análisis de regresión por etapas determina la relación matemática entre una variable dependiente (PER en este

caso) y una o más variables independientes (contenido de algunos aminoácidos). El hecho de que la metionina, leucina, histidina y tirosina estén presentes en la ecuación final, no implica que son los más significativos biológicamente, sin tan solo que son los que guardan una relación matemática más significativa con el PER. En otras palabras, los cambios en cantidades de estos aminoácidos tienen la capacidad de predecir cambios en el PER, pero pueden no tener una relación directa con éste (4). Las ecuaciones derivados por estos autores eran capaces de proveer estimaciones acertadas del PER para productos cárnicos, ya que fueron derivadas a partir de un grupo de muestras de este tipo pero no fueron útiles para estimar el PER de combinaciones carne-proteínas vegetales, legumino-sas, vegetales y productos lácteos. Los autores han explicado esto en base a dos criterios: uno, las diferencias en digestibilidad que se sabe existen entre diferentes tipos de alimentos y que no se consideraron en las ecuaciones derivadas y dos, el número limitado de alimentos en los cuales se basó el desarrollo de estas ecuaciones. Happich y col. (44) usando las ecuaciones de Alsmeyer (4) con otros productos, encontraron que cuando éstas eran utilizadas por sí solas, ninguna de ellas era capaz de hacer una predicción adecuada del PER para productos de soya, suero y combinaciones carne-soya. Estos autores establecieron que si se utilizaba la digestibilidad proteínica para ajustar los perfiles aminoacídicos de los

productos de soya, el PER predicho era similar al PER en la rata.

Lee y col. (58) desarrollaron un ensayo rápido para predecir el PER de carnes con niveles variables de tejido conectivo. El ensayo está basado en la composición aminoacídica de la muestra de carne, con énfasis en su contenido de hidroxiprolina como indicador del contenido de colágeno. Ahora bien, este método puede aplicarse solamente a alimentos constituidos predominantemente por carne, ya que de lo contrario las estimaciones del PER son erróneas.

2.6. Método C-PER o PER calculado

Satterlee y col.(91) predijeron el valor del PER para una variedad de proteínas alimenticias expresando el perfil de aminoácidos esenciales de cada muestra y de la caseína (como referencia) como porcentaje del perfil de aminoácidos esenciales de la proteína patrón FAO 1973. Cada uno de los porcentajes se corrigen por su digestibilidad in vitro(92) para integrarse a la ecuación predictiva que está basada en el PER real de la caseína.

Este método se diseñó para muestras que tienen un PER evaluadoe en la rata entre 0.67 y 3.22. Los aminoácidos utilizados en el cálculo son lisina, metionina+cistina, treonina, isoleucina, leucina, valina, fenilalanina+tirosina y triptofano. El procedimiense detalla a continuación.

Procedimiento para el Cómputo del C - PER

1. Determinar la digestibilidad in vitro de la muestra y de la caseína de referencia por el método multienzimático (92).

2. Determinar el contenido de cada aminoácido esencial en la muestra y en la caseína de referencia, expresándola en g de AA es/ 100 g de proteína.

3. Expresar el contenido de cada aminoácido esencial como porcentaje del patrón FAO/OMS 1973 corrigiendo cada uno por la digestibilidad *in vitro* :

$$\% \text{ de AA es.} = \frac{\text{contenido de AA es.*(paso 2)}}{\text{standard FAO/OMS de ese AA es.}} \times \text{Dig. } \textit{in vitro}$$

4. Ajustar el porcentaje de cada AA es. de la siguiente forma:
   a. si todos los porcentajes son iguales o menores que el 100%, siga al paso 5.
   b. si cualquier porcentaje de AA es. es mayor que el 100%, redúzcalo a 100 y prosiga al paso 5.

5. Asigne los siguientes factores ponderales a cada porcentaje de AA esenciales:

% de AA es. redondeado al entero más cercano	Factor	% AA es. redondeado al entero más cercano	Factor
100	1	51-60	8
91-99	2	41-50	11.31
81-90	2.83	31-40	16
71-80	4	21-30	22.63
61-70	5.66	11-20	32
		0-10	45.25

y compute lo siguiente:

$x = \Sigma$ (1/% AA es.) (factor ponderal)
$y = \Sigma$ factores ponderales usados

6. Calcule y/x de la muestra y de la caseína de referencia para obtener el score de aminoácidos esenciales para cada uno.

7. Divida el score de AA es. de la muestra entre el score de AA es. de la caseína para expresar la muestra como una razón del estándar de caseína (SPC).

8. Calcule el C-PER de la muestra de la ecuación:

$$\text{C-PER} = -2.1074 + 7.1312\ (\text{SPC}) - 2.5188\ (\text{SPC})^2$$

---

* AA es. = aminoácido esencial.

2.7. Análisis discriminante computarizado, DC-PER.

Jewell y col. (55) demostraron que la calidad proteínica podía estimarse correctamente de los perfiles aminoacídicos por sí solos. El modelo computarizado puede predecir la digestibilidad proteínica aparente del contenido de lisina, leucina, ácido aspártico, prolina, cistina y amoníaco en la proteína. La exactitud de predicción en la digestibilidad fue 2.2 veces mejor que con el sistema de cuatro enzimas de Satterlee y col. (92). Esta mayor exactitud condujo también a una mejor predicción del PER.

Las proteínas son categorizadas a través de ecuaciones discriminantes, lo cual permite establecer qué ecuación utilizar para determinar la digestibilidad *in vitro*.

Se ha encontrado que este método funciona bien en todo tipo de proteínas a excepción de aquéllas encerradas en una pared celular resistente (ej.proteína unicelular) o en aquellas termoprocesadas inadecuadamente y que poseen cantidades significativas de inhibidores de proteasas. Estos autores han recomendado que para este tipo de alimentos podría recurrirse al método multienzimático en el cálculo de digestibilidad proteínica *in vitro*.

III. OBJETIVOS

Objetivo general:

Someter a prueba métodos rápidos de evaluación de digestibilidad y calidad proteínica con respecto a valores obtenidos por métodos convencionales utilizando la rata como sujeto experimental.

Objetivos específicos

1. Establecer el método de determinación de digestibilidad *in vitro* utilizando un ensayo multienzimático (51, 92).
2. Determinar la composición aminoacídica y digestibilidad *in vitro* de un conjunto de proteínas de diferente calidad para obtener su PER calculado o C-PER (50).
3. Investigar la eficiencia de métodos rápidos: C-PER, digestibilidad *in vitro* y NGI corto para detectar diferencias en calidad y digestiblidad proteínica de cereales, leguminosas, oleaginosas y mezclas de ellas en relación con ensayos convencionales en la rata (PER, NPR y digestibilidad proteínica *in vivo*).
4. Investigar la capacidad del método multienzimático de detectar el efecto del procesamiento sobre la digestibilidad de muestras sometidas a tratamiento térmico.
5. Estudiar la posibilidad de modificar el Indice de Crecimiento Nitrogenado (NGI).

IV. JUSTIFICACION

1. El desarrollo de métodos rápidos y económicos para la evalua - ción de la calidad proteínica, que sean aplicables a una amplia gama de alimentos se ha manifestado como una necesidad urgente en el área de Ciencia y Tecnología de Alimentos.
2. Los programas de selección genética de alimentos básicos de mejor valor nutritivo disponen en sus etapas iniciales de pequeñas cantidades de muestra y requieren, por lo tanto, métodos de evaluación que utilicen poca muestra y que proporcionen resultados en un corto lapso de tiempo.
3. El tratamiento térmico a que se someten los alimentos durante el procesamiento modifica muchas veces su valor nutritivo. En algunos casos, el efecto es beneficioso (ej. destrucción de factores tóxicos), mientras que en otros resulta en daños a la proteína con lo que disminuye su valor nutritivo. La evaluación de estos efectos es necesaria en la determinación de procesos que permitan alcanzar calidad óptima, así como en el control de los mismos.
4. El desarrollo de alimentos proteínicos de alto valor nutritivo a base de proteínas vegetales se basa en el conocimiento de las proporciones con las cuales se obtiene máxima complementación. Un ensayo rápido, sencillo y de bajo costo sería de gran utilidad en este tipo de estudios.

V. MATERIALES Y METODOS

I. Primera Parte. Comparación y reproducibilidad de ensayos convencionales de evaluación de calidad y digestibilidad proteínica.

1. Preparación de las muestras

Las muestras fueron seleccionadas de manera a incluir diferentes tipos de fuentes proteicas de origen vegetal, es decir, cereales, leguminosas, oleaginosas y mezclas cereal/leguminosa o cereal/oleaginosa solas y suplementadas con 5% de leche descremada ó 10% de harina de carne, cubriendo así un amplio espectro de calidad proteínica. Las muestras utilizadas se detallan en el Cuadro 1.

La Figura 1 muestra la secuencia seguida en la preparación de las leguminosas. El maíz tierno se preparó pelando y desgranando las mazorcas y secando luego los granos en un horno con aire circulante a 40°C. El ajonjolí (Sesamum indicum) utilizado en la obtención de harina fue prensado en un molino de discos y luego extraído con hexano. Las harinas desgrasadas de soya y de semilla de algodón fueron de origen comercial. La harina de carne se preparó secando 10 lb. de carne magra de res previamente molida en un horno con aire circularnte a 50°C. La harina de trigo fue harina comercial para panificación[1].

Las mezclas se prepararon utilizando harina de maíz instantá-

---

1/ Harina de trigo Gold Medal, Industria Harinera Guatemalteca S.A.

nea para tortillas[2], harina precocida de frijol[3] y leche descremada en polvo[4]. El arroz, gandul, maíz tierno y soya en las mezclas fueron los mismos que se utilizaron individualmente. Todas las demás muestras se sometieron únicamente al proceso de molienda en un molino de martillos a un grosor de partícula de 60 mallas.

Las muestras se almacenaron en un cuarto refrigerado, a una temperatura de 5°C hasta el momento de los análisis químicos y biológicos.

2. Análisis Químicos

Las muestras que se presentan en el Cuadro 1 fueron analizadas por su contenido de nitrógeno por el método de macro Kjeldahl (5).

3. Ensayos biológicos

Como base de comparación para las nuevas metodologías rápidas desarrolladas en la evaluación de calidad proteínica, se realizaron dos ensayos biológicos tradicionales: el Indice de Eficiencia Proteínica (IEP o PER) y la Razón Proteínica Neta (NPR). Se utilizaron ratas de la raza Wistar de 21-23 días de edad provenientes de la colonia animal del INCAP. Los grupos incluían 8 ratas, 4 machos y 4 hembras, que fueron alojadas en jaulas individuales de tela metálica. El agua y la dietas experimentales fueron ofrecidas ad libitum. El cambio en peso e ingesta de alimento se registraron

---

2/ Harina de maíz Torti-yá, Industria del Maíz, S.A. Guatemala
3/ Productos YAESTA, 40 Av. 1-25 zona 11 Mixco, Guatemala.
4/ Empresa de Productos Lácteos Prolac, S.A. Asunción Mita, Jutiapa Guatemala

semanalmente durante el estudio, cuya duración total fue de 28 días.

Las ratas se pesaron a los 10 días para calcular la Razón Proteínica Neta según la siguiente fórmula:

$$NPR = \frac{\text{Cambio en peso grupo experimental+/pérdida de peso grupo DLN*/}}{\text{Proteína consumida por el grupo experimental, g}}$$

El estudio se continuó hasta completar 28 días y se calculó el Indice de Eficiencia Proteínica así:

$$PER = \frac{\text{Ganancia en peso , g}}{\text{Proteína consumida , g}}$$

Durante la última semana (días 21-28) se recolectaron las heces de las 8 ratas de cada grupo, se secaron, molieron y se les analizó por su contenido de nitrógeno (macro-Kjeldahl) para calcular el porcentaje de digestibilidad aparente, según la fórmula:

$$\%\ \text{digestibilidad aparente} = \frac{\text{Nitrógeno ingerido - Nitrógeno fecal}}{\text{Nitrógeno ingerido}} \times 100$$

Las dietas fueron preparadas sustituyendo parte del almidón de maíz de la dieta basal por la muestra para alcanzar el contenido de proteína deseado. La composición porcentual de la dieta basal fue: almidón de maíz, 90; mezcla mineral (48), 4; aceite de semilla de algodón, 5; aceite de hígado de bacalao, 1 ; suplementada con 5 ml de solución de vitaminas (62). Las dietas fueron preparadas al 9% de proteína a excepción de aquellas muestras cuyo contenido proteínico no permitió alcanzar este valor en la dieta experi-

*DLN= dieta libre de nitrógeno

mental y que se prepararon al 7% de proteína. El control lo representaron dos grupos alimentados con caseína, uno al nivel de 7% de proteína y el otro al 9%, incluyéndose además un grupo en dieta libre de nitrógeno (DLN) para el cálculo del NPR.

4. Análisis estadísticos

La comparabilidad y reproducibilidad de los parámetros de calidad y digestibilidad proteínica se evaluó por análisis de correlación simple (95).

II. Segunda Parte: Estudio y aplicación del Método Multienzimático de digestibilidad proteínica *in vitro*.

1. Muestras

En la etapa inicial se utilizaron las muestras detalladas anteriormente en el Cuadro 1. Para establecer si las leguminosas y muestras procesadas térmicamente constituían una sola población o dos poblaciones diferentes del resto de las muestras se analizó por digestibilidad *in vitro* un lote de 17 variedades de frijol común (*P. vulgaris*) cosechados en la Finca experimental del INCAP a partir de muestras del Banco de Germoplasma del CIAT y de las cuales se tenía información previa sobre rendimiento e identificación agronómica de cada variedad, análisis físicos, químicos y nutricionales de las harinas de los granos cocinados con su caldo y molidos (60). Estas muestras se presentan en el Cuadro 2.

El efecto de procesamiento sobre la digestibilidad *in vivo* e

in vitro se investigó en tres lotes de muestras: pan de rodaja, maíz opaco 2 y harina de algodón. La muestra control de pan de rodaja se preparó secándolo con aire circulante a temperatura ambiente, en tanto que el pan de las muestras procesadas fue llevado a dos grados diferentes de tostación en un horno a 300°F. Las muestras de maíz fueron tostadas en un tambor rotatorio calentado por gas, modificando el tiempo de residencia a 20.5 y 26 minutos. Dos de las harinas de algodón eran de procedencia comercial y resultantes de extracción por prensa. La tercera muestra fue preparada a partir de semilla de algodón quebrada y delinterizada que fue extraída con hexano y lavada con acetona para remover el gosipol. Todas las muestras fueron molidas a 60 mesh en un molino de martillos.

2. *Análisis Químicos*

Las muestras se analizaron por su contenido de nitrógeno (5) determinándose así su proteína cruda (38). En las muestras procesadas se determinó, además, su contenido de lisina disponible (30). La digestibilidad *in vitro* se evaluó en todas las muestras por el método multienzimático (92).

3. *Método Multienzimático de digestibilidad in vitro*

Las muestras se molieron en un molino Udy Cyclone y se analizaron por su contenido de nitrógeno por el método de Kjeldahl (5). Se pesó una cantidad de muestra que contuviera 250 mg de proteína cruda (%N x factor, 38) colocándose en un frasco de vidrio de 5.5

cm. de diámetro y 6 cm. de alto. Se agregaron 40 ml. de agua destilada a cada muestra y se colocaron en el refrigerador (T=5°C) por 2 ½ horas y luego se dejaron a temperatura ambiente hasta el momento de practicar el análisis (máximo 4 horas).

La solución multienzimática se preparó fresca para cada corrida, pesando el equivalente de 22,704 BAEE unidades de tripsina[1], 186 unidades de quimotripsina[2] y 0.052 unidades de peptidasa[3] por cada mililitro de solución. Esta se equilibró a 37°C y se llevó a pH 8.00 con NaOH 0.1 N y/o HCl 0.1N. Posteriormente se colocó en un baño de hielo y se distribuyó en tubos en la cantidad requerida para cada muestra (4 ml/muestra).

La solución de proteasa[4] se preparó con cada corrida pesando 7.95 mg/ml. Para lograr disolverla se colocó en un agitador magnético y una vez disuelta se colocó en un baño de hielo, hasta el momento de usarla en el análisis.

La suspensión de proteína se colocó por 15 minutos en un recipiente al cual se le circulaba por medio de una bomba, agua de un baño a 37°C y se llevó a pH 8.00 con NaOH 0.1N y/o HCl 0.1N. Al alcanzar el pH 8.00 se agregó la solución multienzimática, 1 ml/10 ml de suspensión y se inició el conteo de tiempo con un cronómetro. La caída de pH fue registrada con el potenciómetro Orion

---

1/ Tripsina de páncreas de cerdo, TIPO IX; Sigma Chemical Co.
2/ α-Quimotripsina de páncreas de bovino, TIPO II; Sigma Chemical Co.
3/ Amino peptidasa de mucosa intestinal de cerdo Grado II, Sigma Chemical Co.
4/ Proteasa bacteriana de Streptomyces griseus, Sigma Chemical Co.

Research Digital Ionalizar model 701 A acoplado a un recorder Perkin Elmer 56, manteniendo agitación constante en la muestra por medio de un agitador magnético. Al cabo de 10 minutos exactos de la adición de la solución multienzimática, se agregó la proteasa bacteriana (1ml/10 ml de suspensión proteica) cambiándose la bomba de agua del baño a 37°C a un baño a 55°C. Pasados 8 ½ minutos de la adición de la proteasa, se regresó la bomba al baño a 37°C y se registró el pH a los 20' exactos de iniciado el análisis, registrándose la temperatura en el interior de la muestra, la cual fue de 45-48°C.

La Fig. 2 muestra la disposición del equipo utilizado en el análisis.

Con el propósito de estudiar y conocer más a fondo el método se realizaron pruebas tendientes a evaluar el efecto de diferentes factores como concentración de enzima, temperatura del baño, tiempo de reacción, etc. Estas se describen a continuación.

3.1. Efecto de la cantidad de enzima agregada.

Para ello se pesaron separadamente 3 réplicas de caseinato de sodio y 3 réplicas de maíz opaco-2 conteniendo 250 mg de proteína cada una. Estas se hidrataron como se ha descrito y luego se realizó el ensayo agregando 2, 3 y 4 ml de la solución multienzimática e igual cantidad de proteasa bacteriana, registrándose la caída de pH en cada caso bajo las condiciones previamente señaladas para el análisis.

3.2. Efecto de Temperatura

Las pruebas que se describen a continuación se hicieron con caseinato de sodio.

a. Para determinar si era necesario cambiar la temperatura de reacción de 37 a 55°C al agregar la proteasa bacteriana, se realizó un experimento en el cual la temperatura del baño se mantuvo a 37°C durante todo el ensayo.

b. En otro ensayo se mantuvo la temperatura a 55°C todo el tiempo, equilibrando la muestra a pH 8.00 siguiendo con la adición de la solución multienzimática y, finalmente, a los 10 minutos se agregó la proteasa bacteriana.

3.3. Efecto de tiempo

a. Para determinar si 10 minutos era tiempo suficiente para la acción de las enzimas de la solución multienzimática, se realizó una prueba en la cual se dejaron actuar por una hora sin cambio en temperatura ni adición de la proteasa bacteriana.

b. El efecto de tiempo sobre el pH final se evaluó tomando el pH a intervalos de 1 minuto hasta completarse 60 minutos de iniciada la reacción.

3.4. Efecto de predigestión con carbohidrasas

Fue evaluado en la muestra de maíz común y frijol negro cocinado 20 minutos. Las enzimas utilizadas fueron macerozimasa[1] y ce

1/ Macerozyme, Enzyme Products, All Japan Biochemicals Co., Ltd. Shingikancho, Nishinomiya, Japan.

lulasa[1] que se agregaron a los 40 ml de agua destilada que se adicionan para hidratar las muestras. La cantidad usada de cada una de estas enzimas fue aquella que mantuviera una relación enzima/ muestra de 100 mg/ 2.5 g (86). Las muestras se incubaron por 4 horas a 32°C, al cabo de lo cual se sometieron al ensayo multienzimático.

4. Ensayos biológicos

Los ensayos biológicos (PER, NPR y digestibilidad proteínica aparente in vivo) se realizaron como se ha descrito anteriormente.

5. Análisis estadísticos

La relación entre los valores de pH a los 10, 15 y 20 minutos y los de digestibilidad aparente in vivo en ratas, fue analizada por regresión simple para todas las muestras juntas inicialmente y luego separándolas en grupos. La digestibilidad in vitro fue calculada de las ecuaciones de regresión por grupos y comparada con los valores in vivo en la rata.

III. Tercera Parte: Modificación del Indice de Crecimiento Nitrogenado.

1. Muestras

Las muestras utilizadas se detallan en el Cuadro 4. Estas muestras fueron analizadas por su contenido de nitrógeno (macro-Kjeldahl, 5) y sometidas a los ensayos biológicos.

1/ Celulase "onozuka" SS. Enzyme Products, All Japan Biochemicals Co., Ltd. Shingikancho, Nishinomiya, Japan.

2. Ensayos Biológicos

El Indice de Crecimiento Nitrogenado, NGI' corresponde numéricamente al valor de la pendiente en la ecuación de regresión que relaciona cambio en peso a consumo de proteína a diferentes niveles de ingesta por un período de 14 días. Este valor fue calculado expresando los datos de ganancia en peso y consumo de proteína en g/día.

El NGI modificado consistió en alimentar a un grupo de 6 ú 8 ratas por cada muestra de la siguiente forma: los primeros 3 días se les ofreció la dieta con 2% de proteína, los siguientes 3 días se les ofreció la dieta al 4% y así sucesivamente hasta completar 15 días y la ingesta de la dieta al 10% por 3 días, excepto en los casos del maíz y arroz que por llegar sólo al 8 y 6% de proteína en la dieta terminaron a los 12 y 9 días respectivamente. Los cambios en peso y consumo de alimento se registraron cada tres días. La proteína ingerida calculada del alimento consumido y el contenido de proteína en las dietas, así como los cambios en peso, se expresaron en términos de g/día/rata para establecer de la regresión simple el valor del NGI modificado y compararlo con el valor tradicional.

Se realizó un primer ensayo exploratorio utilizando caseína. En el segundo ensayo, se utilizaron 6 ratas de 21-23 días de edad por cada ración experimental. Las raciones fueron preparadas sustituyendo parte del almidón de maíz de la dieta basal para dar 2,

4, 6, 8 y 10 % de proteína proveniente de las diferentes muestras a excepción del maíz y el arroz para los que se prepararon dietas hasta el nivel de 8 y 6% respectivamente.

El valor del NPR para cada muestra se calculó de los datos de cambio en peso y alimento ingerido a los 10 días por el grupo consumiendo la dieta al 10%, excepto para el maíz y el arroz en los que se utilizaron los datos de la dieta al 8 y 6% respectivamente.

Se realizó un tercer experimento utilizando caseína con el propósito de estudiar el efecto de diferentes variables sobre el valor del NGI modificado. Se corrió un ensayo tradicional y cuatro ensayos modificados para evaluar: 1) el efecto del nivel proteínico inicial, 2) el efecto del tiempo en cada nivel proteínico y 3) el efecto de seguir una secuencia creciente o decreciente de niveles proteínicos. El Cuadro 5 resume la forma en que se realizaron los ensayos. El efecto del nivel inicial se evaluó comparando los ensayos 2.1. y 2.2. Los ensayos 2.2. y 2.3. corresponden al efecto del tiempo de consumo de cada nivel de proteína sobre el valor del NGI modificado y, finalmente, el efecto de la secuencia ascendente o descendente de niveles proteicos se evaluó de la comparación de los ensayos 2.1. y 2.4.

VI. RESULTADOS

I. Primera Parte: Comparabilidad y reproducibilidad de ensayos convencionales de evaluación de calidad y digestibilidad proteínica.

1. Muestras

El Cuadro 1 presenta el contenido de nitrógeno y proteína cruda de las muestras utilizadas. El rango de proteína fue de 7.6% en arroz hasta 88.5% para el caseinato de sodio. De las muestras incluidas, 10 fueron cereales, 11 leguminosas, 4 oleaginosas, 6 mezclas cereal/leguminosa y 4 mezclas cereal/leguminosa suplementadas con leche descremada o harina de carne.

2. Ensayos biológicos

Los valores de ganancia en peso, consumo de alimento y parámetro biológico para los ensayos de Razón Proteínica Neta (NPR) e Indice de Eficiencia Proteínica (PER) realizados con 30 muestras y caseína como control en el primer experimento (mayo), se presentan en los Cuadros 7 y 8. Los Cuadros 9 y 10 muestran resultados similares correspondientes al ensayo realizado un mes después con un número menor de muestras. Es evidente de estos resultados que se ha cubierto un amplio intervalo de calidad proteínica como lo señalan los valores de PER y NPR que oscilaron en el primer ensayo entre 3.29 y -0.57; y 5.34 y 1.89 respectivamente. La mayor ganancia en peso y la mejor calidad proteínica correspondió a la mezcla

arroz/frijol 95/5 + 10 % carne, siendo detectada por ambos métodos. En cuanto a la muestra de peor calidad no hubo acuerdo entre los métodos, ya que el menor NPR correspondió al frijol negro cocinado 20' (1.89) , mientras que el menor PER correspondió al corn flakes. En general, puede notarse que el NPR dio valores de calidad más bajos para las leguminosas que los que mostró el PER.

Los resultados de digestibilidad proteínica aparente in vivo para ambos ensayos se resumen en los Cuadros 11 y 12. Al comparar los resultados de ambos experimentos puede notarse que los valores de digestibilidad del segundo ensayo (junio) son consistentemente más bajos que los obtenidos en el primer ensayo. En ambos ensayos la mejor digestibilidad correspondió a la caseína y la muestra con la menor digestibilidad fue el frijol rojo.

El Cuadro 13 indica la correlación encontrada entre los dos ensayos convencionales de calidad proteínica (PER-NPR) para las dos repeticiones (mayo y junio), así como la reproducibilidad de los mismos realizados a diferente tiempo. La correlación entre el NPR y PER fue altamente significativa para los dos experimentos realizados (r=0.801 en mayo y r=0.919 en junio). La reproducibilidad del PER entre experimentos fue mejor que la del NPR como puede observarse de los coeficientes de correlación que fueron 0.915 y 0.835 respectivamente.

II. Segunda Parte: Estudio y Aplicación del Método Multienzimático de Digestibilidad proteínica in vitro

1. Estudio del Método

a. Variabilidad

El Cuadro a continuación resume los valores absolutos de pH a diferentes tiempos obtenidos para el caseinato de sodio en diferentes ensayos. El valor promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para cada parámetro se presentan también en este Cuadro. A pesar de que los coeficientes de variación son bajos, la alta sensibilidad del método hace necesario que los valores de pH obtenidos para las muestras analizadas en cada ensayo sean ajustados a valores fijos para el grupo control que fue el caseinato de sodio. Satterlee y col. (99) han establecido en la propuesta final del método un coeficiente de variación máximo de 0.8% para los valores de pH a los 20 minutos. En base a ello, todos los valores de pH obtenidos en diferentes experimentos han sido ajustados proporcionalmente a los del caseinato de sodio corrido como control en cada ensayo. Los valores fijados fueron 6.75 a los 10 minutos, 6.21 a los 15 minutos y 6.16 a los 20 minutos, correspondientes al promedio de las primeras cuatro estimaciones presentadas en el Cuadro y obtenidas de los ensayos en que se analizó el mayor grupo de muestras. El utilizar los valores promedio del Cuadro modificaría proporcionalmente a todas las muestras y por lo tanto no afecta los resultados obtenidos.

Valores de pH a diferentes tiempos obtenidos para el Caseinato de sodio en ensayos distintos.

Fecha de ensayo	pH		
	10'	15'	20'
Nov. 22, 1979	6.75	6.17	6.13
Nov. 28, 1979	6.76	6.20	6.16
Nov. 29, 1979	6.75	6.24	6.20
Dic. 3, 1979	6.72	6.20	6.13
Dic. 7, 1979	6.70	6.12	6.06
Dic. 14, 1979	6.62	6.05	6.03
Dic. 19, 1979	6.69	6.13	6.06
Feb. 13, 1980	6.52	5.98	5.98
Feb. 19, 1980	6.62	6.02	5.99
Feb. 26, 1980	6.68	6.13	6.08
Abr. 7, 1980	6.73	6.26	6.13
Media	6.68	6.14	6.09
Desviación estándar	0.08	0.09	0.07
Coeficiente de variación, %	1.17	1.47	1.15

b. Efecto de tiempo de ensayo

1. Tiempo total

El estudio de algunas variables en el ensayo enzimático confirma que el método como ha sido descrito permite obtener estimaciones adecuadas de la digestibilidad proteínica aparente. La única diferencia importante está en el valor de pH usado en este estudio para los cálculos, ya que se determinó que existía una mejor correlación entre los valores de digestibilidad aparente *in vivo* y pH a los 15', que entre ésta y el pH a los 10 ó 20'. El valor de pH a los 20 minutos parece conducir a una pérdida en la capacidad discriminatoria al ir llevando las muestras a valores finales

con diferencias menores entre sí. Ello se muestra a continuación:

Efecto de tiempo sobre la actividad enzimática .

Diferencia entre el caseinato de sodio y	DIFERENCIA EN pH 15'	DIFERENCIA EN pH 20'	Dig. in vivo
Maíz tierno	0.85	0.78	12.1
Corn Flakes	0.59	0.46	18.7
Opaco-2	0.66	0.58	10.4
Trigo	0.33	0.29	9.1
Frijol rojo 20'	0.44	0.33	19.5
Cowpea 10'	0.31	0.24	17.1
Harina de soya	0.13	0.06	7.7
Harina de ajonjolí	0.64	0.63	6.3
Maíz/frijol 87/13	0.67	0.45	8.1
Maíz/frijol 87/13+5% leche	0.51	0.51	8.4
Maíz/frijol 87/13+10% carne	0.19	0.18	4.6
Arroz/frijol 95/5+5% leche	0.46	0.49	9.2
Arroz/frijol 95/5+10% carne	0.21	0.23	4.4

Puede notarse que para las muestras con suplementos de origen animal las diferencias respecto al caseinato de sodio a los 15 y 20 minutos de reacción son esencialmente iguales o ligeramente mayores no así para las demás muestras en que se observan, en general, diferencias menores a los 20 que a los 15'. La adición de la proteasa bacteriana de Streptomyces griseus 10 minutos después de iniciado el ensayo con tripsina, quimotripsina y peptidasa fue desarrollada para aumentar la correlación entre pH y digestibilidad in vivo para muestras de carne y huevo a consecuencia de que las proteínas del tejido conectivo en éstas son digeridas in vivo pero son reacias al ataque enzimático in vitro (50). A excepción de las mezclas suplementadas con harina de carne o leche descremada, todas

las demás muestras ensayadas son de origen vegetal, observándose a pesar de ello que, en general, la adición de la cuarta enzima ha mejorado la capacidad predictiva en relación al sistema trienzimático de pH a los 10 minutos.

2. Sistema tripsina-quimotripsina-peptidasa a 37°C.

El estudio del efecto del tiempo de reacción sobre el valor de pH de la muestra de caseinato de sodio después de la adición del sistema trienzimático a temperatura constante de 37°C mostró que a los 10' la curva de pH vs. tiempo había alcanzado un valor estable con poca variación. Así el valor de pH a los 10 minutos fue sólo 0.5% mayor que a los 20', y éste a su vez 0.4% mayor que el valor a los 40'. Como lo que se pretende es un ensayo rápido que permita predecir la digestibilidad aparente, el tiempo mínimo que proporciona una respuesta adecuada con ese sistema enzimático es de 10'. Esta estabilización en la actividad enzimática puede estar relacionada a factores de la muestra, de las enzimas o de ambas. En cuanto a la naturaleza de la muestra se ha demostrado que durante la hidrólisis enzimática *in vitro* los péptidos solubilizados (de peso molecular intermedio y bajo) son de naturaleza muy hidrofílica en relación al residuo no digerido el cual, a su vez, es más hidrofóbico que la muestra proteica inicial (90). En cuanto a las enzimas se refiere, hay dos factores de importancia, uno es el cambio en las condiciones del sistema, particularmente el cambio en pH co

mo resultado de la actividad proteolítica, y el otro la susceptibilidad de éstas a inhibición por los productos de reacción. Se sabe que la tripsina y quimotripsina pueden funcionar más activamente como transpeptidasas en presencia de un exceso de sus productos de reacción (40). Ahora bien, es de esperar que la naturaleza misma de la proteína sea el factor más importante pues de lo contrario el método carecería de capacidad discriminatoria entre muestras.

3. Proteasa bacteriana, 55°C

En este ensayo la acción de la proteasa bacteriana se extendió desde 10 hasta 45 minutos de iniciado el ensayo. El valor a los 45 minutos fue exactamente el mismo que a los 20 minutos (6.06). Se encontró que al cambiar la temperatura del baño nuevamente a 37°C, el pH al cabo de 1.5 minutos, que es el tiempo que transcurre entre el cambio de temperatura en el baño y la toma del pH final (20'), fue de 6.12, que es el mismo que en el caso del ensayo convencional. Nuevamente, la rapidez requerida por el método hace que el tiempo seleccionado sea el menor, o sean 10 minutos.

c. Efecto de temperatura

La adición de tripsina, quimotripsina y peptidasa a la muestra equilibrada a 55°C permitió observar que se obtiene una caída inicial más brusca, así como un pH a los 10' más bajo (6.53 vs. 6.75 en el ensayo a 37°C). Al adicionar la proteasa bacteriana al sistema anterior (i.e. manteniendo la temperatura a 55°C), los valores

de pH a los 15 y 20' fueron ligeramente superiores a los obtenidos en el ensayo normal. Para evaluar la importancia de estos hallazgos sería necesario utilizar un mayor número de muestras, aunque la utilidad de dicha investigación es dudosa si el ensayo como se ha descrito permite obtener resultados satisfactorios.

La adición de la proteasa bacteriana sin cambio en temperatura del baño (i.e. manteniendo la temperatura de reacción a 37°C) hizo que el valor de pH a los 20' fuera bastante más alto que el obtenido con cambio de temperatura a 55°C. El valor de pH a los 20' así obtenido fue de 6.45 contra un valor de 6.16 en el ensayo no modificado. Ello indica que el cambio en la temperatura del baño al agregar la cuarta enzima es necesario para obtener la actividad enzimática adecuada.

Estas dos observaciones pueden explicarse en función del efecto que tiene la temperatura sobre la actividad enzimática: en general, un aumento o disminución en la temperatura de reacción origina un aumento o disminución en la actividad enzimática, siempre y cuando los cambios en temperatura no ocasionen la desnaturalización e inactivación de las enzimas.

d. Cantidad de enzima agregada

El efecto de la cantidad de enzima agregada sobre el pH a diférentes tiempos se estudió en el caseinato de sodio y en la muestra de maíz opaco-2. La única modificación al método como ha sido descrito fue agregar 2, 3 y 4 ml de la solución multienzimática y

una cantidad correspondientemente igual de solución de proteasa bacteriana. El Cuadro a continuación muestra los resultados obtenidos:

Efecto sobre el pH de la cantidad de enzima agregada

Muestra	ml solución multienzimática	ml proteasa bacteriana.	pH 10'	pH 15'	pH 20'
Caseinato de sodio	2	2	6.83	6.22	6.20
	3	3	6.74	6.16	6.14
	4	4	6.75	6.15	6.13
Maíz Opaco-2	2	2	7.69	7.08	6.95
	3	3	7.57	6.96	6.83
	4	4	7.52	6.87	6.74

Para el caseinato de sodio, la adición de 3 ml de cada solución enzimática fue equivalente a la de 4 ml, no así en el caso del maíz opaco-2 en que se observó un efecto marcado de la cantidad de enzima sobre el pH: a mayor cantidad de enzima menor el valor del pH en el intervalo usado. Puede notarse, sin embargo, que las diferencias son mayores entre 2 y 3 ml que entre 3 y 4 ml de enzima agregada por lo que el valor de 4 ml se utilizó en todos los ensayos.

Las diferencias entre estas dos muestras pueden atribuirse al hecho de que el caseinato es una proteína prácticamente pura, mientras que la muestra de opaco-2 es un material más complejo con otros componentes que pueden tener efecto sobre el ensayo (inhibidores de proteasas, paredes celulares, etc).

e. Efecto de Inhibidores de Tripsina

Siendo la tripsina una de las enzimas utilizadas en el ensayo es de esperar que muestras como harinas de frijol crudo que contienen inhibidores trípticos se comporten en forma diferente de las muestras correspondientes sometidas a tratamiento térmico, el cual, se sabe, destruye estas sustancias. Este fenómeno se exploró en 3 muestras de frijol común (P.vulgaris) crudas y cocinadas en autoclave por 20 minutos y los resultados se resumen a continuación:

Efecto de la presencia de Inhibidores de tripsina sobre el pH

Muestra	Valor del pH								
	10'			15'			20'		
	crudo	cocido	dif.	crudo	cocido	dif.	crudo	cocido	dif.
frijol blanco	7.63	7.10	0.53	6.97	6.52	0.45	6.94	6.40	0.54
frijol negro	7.72	7.19	0.53	6.94	6.60	0.34	6.88	6.46	0.42
frijol rojo	7.53	7.28	0.25	6.84	6.65	0.19	6.81	6.49	0.32

De las tres muestras estudiadas, el menor efecto inhibitorio entre muestras crudas y cocidas se observó en el frijol rojo y el mayor en el blanco. Esto está asocidado a los niveles iniciales y residuales de inhibidores de tripsina en las muestras, que se presentan a continuación:

Contenido de Inhibidores de tripsina expresados en unidades de tripsina inhibida (UTI)/ml

Muestra	Crudo	Cocido 20'	Diferencia
Frijol blanco	9.62	1.68	7.94
Frijol negro	7.88	1.65	6.23
Frijol rojo	4.32	2.28	2.04

Como puede observarse, para las muestras crudas el frijol blanco presenta la mayor concentración de inhibidores de tripsina, mientras que el rojo presenta la menor. El menor efecto inhibitorio en los frijoles rojos está pues asociado a la menor concentración de inhibidores en la muestra cruda y a una menor diferencia de éstos entre la muestra cruda y cocida.

f. Efecto de predigestión con carbohidrasas.

El tratamiento del maíz y frijol negro cocido por 20' con carbohidrasas previo al ensayo multienzimático tuvo un efecto opuesto al esperado. Se había pensado que la predigestión con carbohidrasas, al producir la ruptura de la célula, liberaría los cuerpos proteicos y facilitaría la digestión de las proteínas por las enzimas proteolíticas. Sin embargo, los valores de pH en las muestras predigeridas fueron mayores que los correspondientes para las muestras no tratadas. Ello se puede observar a continuación:

Efecto sobre el pH de la predigestión con carbohidrasas

	MAIZ		FRIJOL NEGRO 20'	
	Sin tratar	Tratado	Sin tratar	Tratado
pH 10'	7.53	7.71	7.19	7.41
pH 15'	6.81	7.15	6.60	6.94
pH 20'	6.61	7.08	6.43	6.83

2. Aplicación del Método Multienzimático

2.1. Relación entre la caída de pH y digestibilidad aparente *in vivo*.

Los valores de pH a los 10, 15 y 20 minutos para las muestras de la Primera Parte (Cuadro 1) se presentan en el Cuadro 14. Se incluyen además los valores de digestibilidad proteínica aparente *in vivo* de los ensayos realizados en mayo y en junio. Las Figuras 3, 4 y 5 muestran las líneas de regresión entre digestibilidad aparente *in vivo* (primer ensayo realizado en mayo) y pH a los 10, 15 y 20 minutos respectivamente. En estas figuras se han identificado las muestras de acuerdo al número que les corresponde en el Cuadro 14. La Fig. 6 esquematiza los resultados obtenidos en el segundo ensayo de digestibilidad (junio). En esta figura se han presentado juntas las líneas de regresión entre digestibilidad *in vivo* y pH a los 10, 15 y 20 minutos.

El Cuadro 15 muestra las ecuaciones de regresión entre los valores de digestibilidad aparente *in vivo* y pH a los 10, 15 y 20 minutos incluyendo todas las muestras utilizadas en cada ensayo. Puede notarse aquí que las correlaciones para el segundo ensayo fueron altamente significativas con los tres valores de pH considerados (r=-0.791 a los 10'; -0.868 a los 15' y -0.804 a los 20'), no así en el caso del primer ensayo en que las correlaciones fueron menores aunque significativas a los 10 y 15' (r=-0.418 y -0.421 respectivamente), pero no significativas con el pH a los 20 minutos.

Estas diferencias pueden atribuirse a que en el primer ensayo se utilizó un grupo muy diverso de proteínas que incluyó cereales, leguminosas, oleaginosas y mezclas, en tanto que en el segundo ensayo se usó un grupo más limitado en el que la mayor parte de las muestras eran leguminosas. Estas observaciones y la distribución de puntos en las Fig. 3, 4 y 5 sugieren que el comportamiento de cada muestra en el ensayo multienzimático depende del tipo de proteína que ésta sea.

El Cuadro 16 resume los resultados del análisis de regresión entre digestibilidad aparente in vivo y pH a diferentes tiempos por grupos de muestras. Puede notarse que los cereales y leguminosas constituyen dos poblaciones distintas dentro de las cuales se obtienen correlaciones elevadas individualmente. Para todos los grupos con excepción de las mezclas, la correlación entre digestibilidad in vivo y pH a los 15' es mejor que a los 10 ó 20 minutos. En cuanto a la comparación entre estas dos últimas se encuentra que en algunos grupos (por ejemplo: cerales, leguminosas y mezclas) la correlación entre digestibilidad aparente in vivo y pH a los 10' fue mejor que los 20', mientras que para otros (por ejemplo: cereales sin corn flakes, cereales+oleaginosas, cereales sin corn flakes+ mezclas, etc.) ocurrió lo contrario.

El Cuadro 17 presenta los resultados del ensayo multienzimático y valores de digestibilidad proteínica aparente in vivo para el grupo de frijoles del germoplasma del CIAT (Cuadro 2). El aná-

lisis de regresión entre pH a diferentes tiempos y digestibilidad aparente *in vivo* para el grupo completo de muestras y para éstas separadas por color se resume en el Cuadro 18. Se incluyen además ecuaciones calculadas del total de leguminosas evaluadas, i.e. 17 varieadades de *P. vulgaris* del CIAT más ocho muestras evaluadas en el segundo ensayo de digestibilidad *in vivo* (junio) que incluyen otras especies como *Vigna sinensis* (cowpea) y *Cajanus cajan* (gandul) bajo diferentes condiciones de procesamiento.

Se observa que la correlación entre digestibilidad aparente *in vivo* y el pH fue altamente significativa tanto a los 10 como a los 15 y 20 minutos para las leguminosas estudiadas. La inclusión de otras especies (*V.sinensis* y *C. cajan*) además de las variedades de *P.vulgaris* en el cálculo de las regresiones no afectó apreciablemente el valor del coeficiente de correlación por lo que puede considerarse a todas las leguminosas como una población homogénea.

De las ecuaciones por grupos de muestras en el Cuadro 16 es evidente que eliminando el corn flakes y la harina de algodón del cálculo de las regresiones que incluyen al grupo de cereales y oleaginosas, mejora considerablemente el valor del coeficiente de correlación. Así por ejemplo el valor de r entre pH a los 15' y digestibilidad aparente *in vivo* para cereales y oleaginosas combinados es de -0.574 ($P < 5\%$), valor que aumenta a -0.747 ($P < 1\%$) al eliminar los datos del corn flakes y harina de algodón del cál-

culo. Se sospechó que esta divergencia en comportamiento del corn flakes y harina de algodón dentro de sus respectivos grupos estaba relacionada a efectos de procesamiento térmico.

Este posible efecto de procesamiento observado en el caso del corn flakes y harina de algodón fue investigado y los resultados se resumen en el Cuadro 19. Las muestras utilizadas en este ensayo, su contenido de nitrógeno, proteína cruda y lisina disponible se resumen en el Cuadro 3. Las ecuaciones de regresión entre digestibilidad aparente *in vivo* y pH a diferentes tiempos, así como entre otros parámetros de las muestras procesadas se presentan en el Cuadro 20. La correlación entre digestibilidad aparente *in vivo* y pH a los 15' fue altamente significativa ($P < 1\%$) mientras que con el pH a los 10 y 20' la correlación fue menor aunque sí significativa ($P < 5\%$). El análisis por grupos (pan, maíz opaco-2 y harina de algodón separadamente) mostró significancia ($P < 5\%$) solamente entre digestibilidad aparente *in vivo* y pH a los 15' para las muestras de pan ($r=-0.959$, $n=4$). No se encontró correlación entre lisina disponible y digestibilidad *in vivo* total ni por grupos. En cuanto a la relación entre lisina disponible y pH a los diferentes tiempos (10', 15' y 20') no se encontró significancia en el análisis total ni por grupos excepto entre pH a los 15' y lisina disponible para las muestras de pan ($r=-0.997$, $n=3$). Se piensa que estos resultados pueden deberse al reducido número de mues-

tras consideradas en cada grupo, por lo que sería de gran utilidad investigar este fenómeno más a fondo con un mayor número de muestras dentro de cada grupo.

El Cuadro 21 resume las ecuaciones a utilizar en el cálculo de digestibilidad in vitro para los diferentes grupos de muestras. El pH a los 15 minutos ha sido seleccionado como variable independiente, ya que es la que guarda mejor correlación con la digestibilidad aparente in vivo para los diferentes grupos de muestras estudiadas.

2.2. Comparación entre digestibilidad aparente in vivo e in vitro.

La comparación entre digestibilidad aparente in vivo e in vitro calculada de las ecuaciones del Cuadro 21 se presentan por grupos de muestras en los Cuadros 22, 23 y 24. El Cuadro 22 incluye al grupo de cereales(sin corn flakes), oleaginoas (sin harina de algodón) y mezclas cereal/leguminosa solas y suplementadas con leche descremada o harina de carne. En el Cuadro 23 se presentan los resultados para el grupo de leguminosas y finalmente en el Cuadro 24 las muestras sometidas a procesamiento térmico.

El Cuadro 25 presenta las ecuaciones de regresión entre digestibilidad aparente in vivo e in vitro total y por grupos de muestras. Las correlaciones fueron altamente significativas ($P < 1\%$) tanto en total ($r=0.838$, $n=60$) como dentro de cada grupo.

2.3. Comparación entre parámetros químicos y biológicos de calidad proteínica.

El Cuadro 26 muestra los valores de parámetros biológicos y químicos de calidad proteínica. Los parámetros biológicos incluidos son: PER, NPR y digestibilidad proteínica aparente *in vivo*. La digestibilidad *in vitro* así como los valores netos y corregidos por digestibilidad *in vitro* del Score o Puntaje Aminoacídico e Indice de Aminoácidos Esenciales se muestran también en este Cuadro. Finalmente se presenta el valor del PER calculado o C-PER y su diferencia con el valor del PER *in vivo*. Puede notarse que el C-PER sobreestima la calidad de las leguminosas y muestras procesadas, pero subestima la calidad de mezclas que contienen suplementos de proteína animal al compararlo con el PER *in vivo*. Así por ejemplo, en el caso del frijol negro 20' y frijol rojo 20', el valor del C-PER es 1.05 y 1.11 unidades mayor que el PER en la rata respectivamente, mientras que en las mezclas maíz/frijol 87/13+10% carne y arroz/frijol 95/5+10 % carne, el valor *in vivo* supera al C-PER en 0.64 y 0.80 respectivamente.

El Cuadro 27 resume las correlaciones totales y excluyendo las leguminosas, encontradas entre diferentes parámetros biológicos y químicos de calidad proteínica. Puede notarse que la correlación entre el PER y parámetros químicos como el Score e Indice de Aminoácidos Esenciales netos y corregidos por digestibilidad *in vitro*, es mejor que entre éstos y el NPR, aunque para ambos ensa-

yos biológicos las correlaciones fueron altamente significativas. La correlación entre el PER y todos los parámetros químicos mejora al eliminar las leguminosas del cálculo. Lo mismo sucede con el NPR a excepción de NPR-Indice de AA Esenciales corregido en el que el valor sin leguminosas es ligeramente menor que el total. Se observa que al corregir el Score por digestibilidad in vitro, la correlación entre el PER y Score mejora ligeramente en el total de las muestras, pero no en el cálculo en que se han eliminado las leguminosas. Por otra parte, al corregir el Indice de Aminoácidos Esenciales por digestibilidad in vitro, la correlación con el PER para todas las muestras mejora, pero disminuye en el grupo que no incluye a las leguminosas (r=0.913 sin corregir; r=0.849 corregido).

La correlación entre el Score y NPR mejora al corregir por digestibilidad in vitro tanto en el total de las muestras como en el grupo sin leguminosas. En el caso de la correlación entre el NPR y el Indice de Aminoácidos Esenciales, al corregir este último por digestibilidad in vitro disminuye la correlación en el grupo en el que se han eliminado las leguminosas, pero aumenta en el total de las muestras.

La comparación entre parámetros químicos muestra una alta correlación entre ellos. Al eliminar las leguminosas del cálculo el valor del coeficiente de correlación aumentó ligeramente. La co-

rrelación entre el C-PER y Score corregido fue mejor que con el Score sin corregir, tanto en el grupo total como al eliminar las leguminosas. Al corregir el Indice de Aminoácidos Esenciales por la digestibilidad in vitro, la correlación con el C-PER en el grupo total mejoró, pero disminuyó en el grupo en que se eliminaron las leguminosas.

El Cuadro 28 muestra los coeficientes de correlación entre el PER y C-PER totales y por grupos. La correlación entre el PER y C-PER incluyendo todas las muestras fue altamente significativa. Al incluir en el cálculo sólo las muestras cuyo PER in vivo fue mayor de 0.67 y menor de 3.22 (50) el valor de r mejoró ligeramente. El análisis por grupos reveló que una alta correlación existe en cereales, oleaginosas y mezclas tanto individual como conjuntamente. Al eliminar corn flakes, polenta y harina de trigo de los grupos anteriores, hay un aumento notorio en el valor de la correlación. Para las leguminosas, la correlación entre el PER y C-PER fue no significativa al no incluir la caseína en el cálculo, pero cuando ésta se incluyó el valor de r fue altamente significativo. En resumen, puede notarse que al eliminar las leguminosas y muestras procesadas mejora la correlación entre el PER y C-PER.

III. Tercera Parte: Modificación al Indice de Crecimiento Nitrogenado, NGI .

Los resultados del primer experimento exploratorio para modificar el NGI se presentan en el Cuadro 29. Este ensayo se realizó utilizando caseína como fuente de proteína.

Las regresiones simples presentadas en el Cuadro 29 indicaron que las dos formas del ensayo dan esencialmente los mismos valores tanto en el coeficiente de regresión como en los interceptos en x (i.e. ganancia en peso=0) y en "y" (i.e. a ingesta de proteína=0)

Los resultados del segundo experimento con doce muestras alimenticias se resumen en el Cuadro 30. De los resultados presentados es evidente que tanto el valor de la pendiente como el del intercepto de las líneas de regresión se ven afectados por la inclusión en el cálculo de los datos de la DLN, tanto en el ensayo tradicional como en el modificado. En general, los valores numéricos del NGI modificado son mayores que los del método tradicional, en especial en el caso del maíz y del arroz. Debe indicarse que para el arroz y maíz, el ensayo modificado duró sólo 9 y 12 días respectivamente, contra 15 días para las demás muestras. Esto se debió al bajo contenido de proteína de estas muestras que sólo permitió preparar dietas hasta el 6% de proteína para el arroz y hasta el 8% para el maíz.

El Cuadro 31 resume las correlaciones encontradas entre los diferentes parámetros biológicos evaluados. Se ha incluido tam-

bién la correlación encontrada al eliminar los datos del maíz y arroz cuyos valores obviamente han sido sobreestimados por el método modificado. Por lo menos dos factores pueden ser responsables, uno la menor duración del ensayo y otro el nivel máximo de proteína más bajo que en las otras muestras contribuyendo a una sobreestimación del valor (6 y 8% vs. 10%).

De los resultados del análisis de regresión puede observarse una alta correlación entre el NPR y NGI tradicional. Una correlación menor pero siempre significativa se encuentra entre el NGI modificado y el NPR así como con el NGI tradicional. La inclusión de los datos de la dieta libre de nitrógeno en el cálculo del NGI modificado mejora la correlación de su valor con el NPR y NGI tradicional. Al excluir los valores del arroz y del maíz, las correlaciones que involucran al NGI modificado muestran un aumento considerable en el valor del coeficiente de correlación (ej: de 0.761 con 12 gl. a 0.936 con 10 gl. entre el NPR y NGI modificado; de 0.710 con 12 gl. a 0.951 con 10 gl. entre el NGI tradicional y el NGI modificado). El análisis de regresión pro grupos entre el NGI tradicional y modificado fue no significativo para los cereales, significativo para leguminosas y mezcla, y altamente significativo para las oleaginosas.

El Cuadro 32 presenta los valores de las pendientes e interceptos de las líneas de regresión entre ganancia en peso y consumo de proteína, ambos expresados en gramos/día, tanto incluyendo como

ignorando los datos de la dieta libre de nitrógeno en el cálculo para el ensayo en el cual se estudió el efecto de diferentes variables sobre el valor del NGI modificado.

El análisis estadístico de los valores de los interceptos y pendientes calculados incluyendo y omitiendo los datos de la DLN, reveló que a excepción del ensayo de NGI modificado 2.2. (Cuadro 5, i.e. 4-5-6-8-10% de proteína, 3 días/nivel), en que el intercepto de la línea sin los datos de la DLN fue significativamente diferente de la línea que los incluía, el incluir o no los datos de la DLN no produce un efecto estadísticamente significativo sobre la pendiente o el intercepto.

El Cuadro 33 resume algunas comparaciones entre diferentes variantes del NGI modificado. Puede notarse que los valores de los interceptos fueron inguales estadísticamente en todos los casos. Los valores de las pendientes del método tradicional y modificado 2.1. (Cuadro 5, i.e. 2-4-6-8-10% de proteína, 3 días/nivel) fueron significativamente diferentes, así como también es evidente que el ofrecer las dietas en orden decreciente de concentración proteínica indujo valores del NGI significativamente diferentes a los obtenidos al seguir una secuencia ascendente. A pesar de que se obtienen valores numéricamente distintos, estadísticamente no parece existir ningún efecto de nivel proteínica incial ni de tiempo de consumo de cada nivel sobre los valores del NGI modificado.

De las líneas de regresión entre ganancia en peso y consumo

de proteína de los tres experimentos realizados, se calculó la proteína requerida en g/día para mantener peso constante (i.e. intercepto en el eje de las x cuando la ganancia en peso = 0). Esto se hizo para el ensayo NGI tradicional y para el modificado 2.1. (Cuadro 5, i.e. 2-4-6-8-10% de proteína, 3días/nivel). Estos resultados se presentan en el Cuadro 34. Puede observarse que el coeficiente de variación fue un poco mayor en el método modificado que en el tradicional. Al igual que se ha observado para los valores numéricos del NGI, el método modificado tiende a sobreestimar la calidad en relación al método tradicional, obteniéndose requerimientos proteínicos menores con el método modificado que los obtenidos con el método tradicional. El área de traslape de la media± 1 d.s. para ambos métodos abarca desde 0.186 g proteína de caseína/día hasta 0.244, intervalo en el cual quedan incluidos los promedios de las estimaciones derivadas de ambos métodos (0.239 y 0.192). Al considerar el área de traslape de la media± 2 d.s. para ambos métodos, se encuentra que ésta abarca desde 0.133 hasta 0.296, incluyendo también los dos valores promedio.

VII. DISCUSION

1. Comparabilidad y Reproducibilidad de Ensayos Convencionales de Calidad y Digestibilidad Proteínica.

Los criterios básicos en la selección de las muestras fueron el de incluir fuentes proteínicas real o potencialmente importantes para las poblaciones latinoamericanas y el de cubrir un rango amplio de calidad proteínica. Las dietas fueron en su totalidad de origen vegetal a excepción de aquellas mezclas que fueron suplementadas con leche descremada o harina de carne. En términos del Indice de Eficiencia Proteínica, el rango de calidad proteínica cubierto en el primer ensayo (mayo) va desde 3.29 para la mezcla arroz/frijol 95/5 + 10% carne hasta el Corn Flakes que no presentó ninguna capacidad promotora del crecimiento y que acusó un valor de PER de -0.57. En términos de la Razón Proteínica Neta, NPR, el límite inferior de calidad correspondió al frijol negro 20' con un valor de 1.89, en tanto que el superior fue la misma mezcla con un valor de 5.34. En el segundo ensayo (junio) el intervalo de calidad proteínica fue más limitado cubriendo sólo desde un PER de 0.16 para el frijol rojo 20' hasta un máximo de 2.72 para la harina de soya. El contenido de nitrógeno y proteína cruda, así como los resultados de los ensayos biológicos convencionales de calidad y digestibilidad proteínica en la rata, i.e. Indice de Eficiencia Proteínica, Razón Proteínica Neta y digestibilidad aparente, para el conjunto de muestras empleadas son similares a los ya existentes en la literatura (19, 22, 27, 26, 35,36).

Los coeficientes de correlación entre PER y NPR fueron altamente significativos y estadísticamente diferentes en los dos ensayos siendo mayor en el segundo (r=0.919) que en el primero (r=0.801). Como se indicará más adelante el tipo de muestra afecta el valor de la correlación entre diferentes métodos evaluativos, pudiendo esta observación ser una explicación para las diferencias en los valores de r para los dos ensayos ya que en el primero se incluyeron muestras muy diversas, mientras que en el segundo la mayoría eran leguminosas. La alta correlación entre los valores de NPR y PER es de esperarse puesto que ambos parámetros se basan en un mismo tipo de respuesta (i.e. ganancia de peso en relación al consumo de proteína), además de haber sido obtenidos en un mismo ensayo y utilizando las mismas ratas.

Henry (49) estudió la correlación entre el PER y otros métodos biológicos como NPR, NPU (carcás) y NPU (balance) utilizando 23 muestras que incluyeron oleaginosas: harina de linaza, de semilla de algodón, de nuez y de soya, concentrados proteínicos de origen animal (harina de pescado, harina de carne, huevo y leche en polvo) y gluten de trigo. El coeficiente de correlación entre PER y NPR para todas las muestras fue de 0.88. La autora señaló que la correlación encontrada entre los distintos métodos era excelente para proteínas de buena calidad, pero que disminuía a medida que la calidad proteínica de las muestras empeoraba. Así se observó que las proteínas que indujeron ganancias de peso mayores de 10-12 g/semana originaron las mejores correlaciones entre métodos.

Lachance y col. (57) calcularon las ecuaciones de regresión

y coeficientes de correlación por grupos de muestras entre diferentes parámetros biológicos. Así para un grupo de 18 cereales, el coeficiente de correlación entre NPR y PER fue de 0.89, en tanto que para un grupo de 21 leguminosas el r fue de 0.96 (21). En el presente trabajo se calculó la correlación para el grupo de cereales, incluyendo a la caseína, encontrándose una correlación de 0.777 (n= 11), entre el PER y el NPR, valor que aumentó significativamente a 0.922 al eliminar al Corn Flakes cuyo valor de PER fue negativo al inducir pérdida de peso en las ratas que consumieron esta dieta, y a la polenta cuyo valor de PER subestimó la calidad en relación al NPR. En relación a ésto, Mc.Laughlan y Keith han señalado que el NPR tiende a sobreestimar las proteínas en lisina en tanto que el PER las penaliza (69). La dificultad para obtener estimaciones confiables de calidad proteínica en términos de PER para la polenta ha sido señalada por Hsu y col. (50). En estas dos muestras, la lisina juega un papel muy importante. En el caso de la polenta por deficiencia y en el del Corn Flakes sumado a bajos niveles en el maíz está el efecto de procesamiento térmico que reduce la disponibilidad de este aminoácido en especial (16). Se ha señalado que en la rata la deficiencia de diferentes aminoácidos limitantes no se refleja necesariamente por respuestas equivalentes (12). En bioensayos que involucran el procedimiento de razón de pendientes (RPV, RNV por ejemplo) se ha indicado que una deficiencia en lisina o treonina afecta los valores obtenidos en forma diferente que deficiencias en otros aminoácidos (67, 69). En base a ello puede esperarse que el efecto de la ausencia o deficiencia de diferentes aminoácidos esenciales sobre ensayos basados en crecimiento sea distinto (12).

En el presente trabajo la correlación entre el PER y NPR para el grupo de 10 leguminosas fue de 0.97 (segundo ensyo), similar al valor de 0.96 para el grupo de 21 leguminosas obtenido por Bressani y Elías (21). Para las mezclas, la correlación fue altamente significativa también, r=0.906 (n=11), siendo mayor que para los cereales, pero menor que para las leguminosas. Lo anterior confirma la observación de que el tipo de muestra (y probablemente en forma más específica el aminoácido limitante) va a influir en la capacidad predictiva de diferentes métodos de evaluación de la calidad proteínica.

En relación a los índices de calidad proteínica evaluados por los métodos de PER y NPR (Cuadros 7-10), se puede decir que ambos producen esencialmente la misma clasificación de las muestras, lo cual es de esperarse en función de la correlación encontrada entre ellos. El efecto de los suplementos de origen animal a las mezclas cereal/leguminosa fue detectado por ambos métodos tanto en términos de PER como de NPR. En el caso de la mezcla maíz/frijol 87/13, la mejoría en calidad proteínica fue de 15% cuando el suplemento fue leche y de 41% cuando fue carne. Para la mezcla arroz/frijol 95/5, los dos métodos mostraron diferente sensibilidad al suplemento, aunque que siempre el mayor efecto se observó cuando el suplemento fue carne. Chávez y Pellet (31) observaron también cómo la adición de carne a arepas de maíz degerminado producía un incremento notable en calidad proteínica, de tal forma que su RNPR (NPR relativo a la lactalbúmina aumentó de 0.28 a 1.14. Se trató de correlacionar estas observaciones al contenido de aminoácidos esenciales, sin em

bargo ello fue difícil ya que ambas muestras, lactalbúmina y arepa con carne, llenaban más del 100% del patrón aminoacídico.

Para las mezclas maíz/frijol 87/13 + 10% de carne y arroz/frijol 95/5 + 10% carne, sí existe diferencia con la proteína de referencia (caseína) en cuanto a la adecuación de su contenido de aminoácidos esenciales. Ambas mezclas fueron limitantes en treonina pero en menor grado que la deficiencia de azufrados mostrada por la caseína (Cuadro 26).

En cuanto a los resultados de digestibilidad proteínica aparente *in vivo* se encontró una reproducibilidad altamente significativa entre ensayos ($r=0.744$, $n=88$). Algunos fenómenos interesantes son evidentes de estos resultados. Con respecto a la digestibilidad de las leguminosas, se observa que el valor más alto correspondió al caupí (*V. sinensis*), seguido del gandul (*Cajanus cajan*) y finalmente de las muestras de *P. vulgaris*, cuando el tiempo de cocción fue de 20 minutos para todas ellas. Bressani y Elías han concluido que en las leguminosas son por lo menos cuatro los factores que controlan la digestibilidad proteínica. En leguminosas crudas, la baja digestibilidad de algunas especies es causada por factores antifisiológicos como inhibidores de tripsina y hemaglutininas. El tratamiento térmico a que se someten las leguminosas resulta en la destrucción de esta actividad inhibitoria y en un aumento en la digestibilidad proteínica. La destrucción de la estructura terciaria de ciertas proteínas resistentes a la proteólisis enzimática, así como la ruptura de paredes celulares puede originar un aumento en digestibilidad. El minimizar, controlar o

destruir el efecto de sustancias capaces de formar complejos con las proteínas, particularmente a través de almacenaje adecuado, tendrá como efecto un incremento adicional en digestibilidad (22).

Puede notarse también que el aumento en el tiempo de cocción mejoró la digestibilidad del caupí y del frijol blanco aunque disminuyó la de frijol negro. Se ha señalado que la aplicación de calor tiene un efecto doble: por una parte disminuye y elimina la actividad de factores antifisiológicos, mientras que por otra aumenta la disponibilidad de aminoácidos azufrados presentes en alta concentración en los inhibidores de tripsina. Sin embargo, debe tenerse en cuenta también que un tratamiento térmico excesivo puede disminuir la disponibilidad de ciertos aminoácidos, en particular de la lisina (16). En relación a esto, se encontró que de las tres muestras de P. vulgaris crudos, el frijol blanco contenía la mayor concentración de inhibidores de tripsina, por lo que el mayor tiempo de cocción pudo resultar en una mayor destrucción de factores tóxicos y, por ende, en una mejoría en la digestibilidad proteínica.

Eggum y Christensen (33) teniendo en cuenta que tanto las determinaciones de calidad como las de digestibilidad de la proteína se hacen en alimentos individuales que luego se consumen como parte de raciones o dietas, estudiaron la relación existente entre la digestibilidad de alimentos aislados (cereales, leguminosas, harinas de carne, pescado, sangre, etc.) y la digestibilidad de mezclas de ellos, encontrando que la digestibilidad de las mezclas de dos fuentes proteicas estaba directamente relacionada a la de

sus componentes. Este fenómeno fue evidente en este estudio ya que se observa para las mezclas que la adición de leguminosas a cereales causa una disminución gradualmente mayor en el valor de la digestibilidad. En cuanto a los suplementos de origen animal, la leche tendió a reducir la digestibilidad de éstas, mientras que la carne la mejoró.

Hegsted y Juliano (47) han señalado dos tipos de errores básicos en las evaluaciones biológicas. Uno es la variación natural en la respuesta de los animales y cuyas causas no se conocen ni entienden bien, mientras que el otro concierne al diseño mismo del ensayo biológico, como sería por ejemplo el nivel proteínico más adecuado para realizar la determinación, puesto que la dependencia de diferentes parámetros de calidad proteínica en el nivel de ésta en la dieta se encuentra bien documentada (54, 23). Sin embargo, el hecho de que en última instancia los alimentos evaluados son utilizados en nutrición humana y animal justifica su evaluación por métodos biológicos en condiciones bien estandarizadas.

La necesidad de más y mejor alimentos proteínicos para la creciente población en el mundo corresponde a la necesidad de desarrollar métodos rápidos y adecuados de evaluación proteínica. Los ensayos biológicos son caros y consumen mucha muestra y tiempo. Como consecuencia de esto, la evaluación *in vitro* ha cobrado mayor importancia y mucha investigación está concentrada en desarrollar nuevos métodos que proporcionen datos comparables a los ensayos biológicos. Es necesario, sin embargo, determinar la forma en que estos métodos se correlacionan con los ensayos *in vivo* (79).

2. Método multienzimático de digestibilidad in vitro y otros ensayos rápidos.

En este trabajo se aplicó el método multienzimático de Hsu y col. (51) modificado por Satterlee y col. (92) para determinar digestibilidad in vitro. En cuanto a parámetros químicos de calidad se calcularon el Score o Puntaje Aminoacídico (73), el Indice de Aminoácidos Esenciales (72, 82) y el C-PER (91), basados en la composición de aminoácidos esenciales obtenida de tablas (36, 80).

La mejor correlación encontrada entre digestibilidad in vivo y pH a los 15 minutos se explica por un mayor grado de proteólisis de las muestras, pero sin llegar a perderse la capacidad discriminativa del método que parece ocurrir ya a los 20 minutos.

Del análisis de regresión global y por grupos entre el pH y la digestibilidad aparente in vivo, es evidente que no es posible predecir la digestibilidad a través de una sola ecuación para todo tipo de muestras. Satterlee y col. (90) han señalado ya que una gran dificultad en el desarrollo de métodos enzimáticos y químicos rápidos para medir calidad proteínica está en que el método puede trabajar bien para una clase de muestras pero pobremente para otra, lo cual puede atribuirse a ciertas características físicas o químicas propias de los alimentos evaluados a los cuales el método rápido puede no ser sensible (ej: presencia de factores antinutricionales, paredes celulares, etc). De allí la necesidad de obtener suficientes datos con proteínas de diferentes tipos y cubriendo un amplio rango de calidades para probar la validez de un nuevo ensayo.

Se ha confirmado una ventaja importante del método multien-

zimático, siendo ésta la sensibilidad del mismo a la presencia de inhibidores tripticos, que fuera demostrada por Hsu y col. (51) por adición de inhibidor purificado a la caseína. En este estudio se ha demostrado la sensibilidad del método a la presencia de diferentes cantidades de inhibidores tripticos en leguminosas crudas. Puede recomendarse la aplicación de este método a programas de selección de leguminosas con menor concentración de factores antinutricionales, en particular de inhibidores de tripsina.

Las mayores diferencias entre el valor de digestibilidad *in vivo* e *in vitro* se encontraron en el grupo de muestras procesadas, lo que se hace evidente de la comparación de los errores estándar de las diferencias que fueron 0.569, 0.597 y 2.387 para cereales+ oleaginosas (sin procesar)+ mezclas, leguminosas y muestras procesadas respectivamente. Oke y Umoh (79), al comparar métodos *in vivo* e *in vitro* en la evaluación del valor nutritivo de la proteína de hojas, han señalado que los métodos enzimáticos no son tan sensibles como la rata a la baja disponibilidad de ciertos aminoácidos como la lisina en particular, y por lo tanto tienden a sobreestimar el valor de la digestibilidad. Esta observación se confirmó en el presente estudio, principalmente en el maíz opaco-2 tostado 26' y en las harinas de algodón obtenidas por prensa en que el valor de digestibilidad *in vivo* fue menor que el valor *in vitro* en 11.9, 11.8 y 10.6 unidades de porcentaje de digestibilidad.

Un problema en torno al cálculo de parámetros químicos basados en la composición de aminoácidos ha sido el patrón de referencia a utilizar. El patrón ideal debe no sólo predecir correctamen

te el aminoácido limitante y su grado de deficiencia, sino que también debe de indicar en qué secuencia otros aminoácidos se vuelven deficientes. Se ha utilizado la proteína del huevo, leche humana y patrones propuestos por comités de FAO (1957) ó FAO/OMS (1973), basados en requerimientos de aminoácidos. En el presente trabajo el patrón utilizado fue el de FAO/OMS (1973) basado en los requerimientos aminoacídicos de niños en edad preeescolar y que es el más aceptado actualmente. Kaba y Pellet (56), en un estudio del valor nutritivo de componentes comunes en las dietas del Cercano Oriente y Norte de Africa (arroz,lentejas, leche y trigo precocido), demostraron que el patrón FAO/OMS (1973) es superior a todos los demás examinados tanto en su correlación con el NPU en ratas jóvenes como en su capacidad de predecir el verdadero aminoácido limitante. Los otros patrones examinados fueron la composición aminoacídica del huevo entero, leche humana, carcás de rata y el patrón FAO (1957).

En cuanto a la relación entre parámetros biológicos y químicos de calidad proteínica, se encuentra que al incluir todas las muestras evaluadas (Cuadro33), existe una mejor correlación entre los parámetros químicos (Score, Indice de Aminoácidos Esenciales) y el PER, que entre éstos y el NPR. Tanto el PER como el NPR correlacionaron mejor con el Score que con el Indice de Aminoácidos Esenciales. Bender (7) ha señalado que a pesar de que se encuentran correlaciones relativamente altas entre el Indice de Aminoácidos Esenciales y parámetros biológicos, en realidad no debiera existir ninguna ya que todas las determinaciones biológicas dependen sólo del aminoácido limitante. Esto explica la mejor correlación observada entre los pa-

rámetros biológicos y el Score. En el Indice de Aminoácidos Esenciales, la importancia de la deficiencia del aminoácido limitante se diluye de tal forma que, en general, se observa una sobreestimación de la calidad proteínica a través de este índice y una menor capacidad en indicar cambios en calidad (101). Así de los datos del Cuadro 26, puede notarse que mientras el PER y NPR variaron entre -0.57 y 3.29 y entre 1.47 y 5.34, el Score osciló entre 34.5 y 95.7, mientras que el Indice de Aminoácidos Esenciales lo hizo sólo entre 73.8 y 99.6. En el caso del Score, Mauron (65) ha indicado que ocurre una subestimación en relación al valor biológico de una proteína y que la parte más crítica de la correlación está a nivel bajo de calidad, en donde el aminoácido limitante es responsable del grado de discrepancia.

Los hallazgos de este estudio confirman las conclusiones de Woodham y Deans (101) de que a pesar de que el Score puede considerarse como un indicador imperfecto de calidad proteínica, es tal vez el mejor de los índices basados en composición aminoacídica disponible al presente.

Como se ha indicado, los datos de aminoácidos utilizados en el cálculo de parámetros químicos fueron obtenidos de tablas, ya que a pesar de haberse realizado los análisis de aminoácidos, se observaron niveles muy bajos de treonina, aminoácidos azufrados, lisina e isoleucina, probablemente debidos a la destrucción durante la hidrólisis para los primeros tres y a una liberación incompleta en el caso de la isoleucina (95).

Los resultados de Chávez y Pellet (31) justifican el uso de ca

tos sobre la composición aminoacídica derivados de Tablas de Alimentos. Para una serie de alimentos comunes en Latinoamérica, encontraron un acuerdo general entre la calidad determinada por el ensayo de razón de pendientes (RPV) y los Scores basados en composición aminoacídica determinada en las muestras usadas (r=0.79, n=12), así como entre el RPV y el Score basado en datos de tablas (r=0.73, n=12). De estos resultados, los autores concluyeron que la predicción de calidad proteínica utilizando datos de composición aminoacídica de tablas aunque menos exacta, fue adecuada para la mayoría de dietas.

Una de las grandes críticas a los métodos químicos de calidad proteínica ha sido que representan el potencial máximo de la proteína, suponiendo una digestibilidaad y disponibilidad completa de sus aminoácidos determinados después de una hidrólisis química completa. Para ello se ha recomendado corregir el parámetro químico por la digestibilidad determinada a través del método enzimático. En nuestro estudio se encontró que, en general, los coeficientes de correlación entre el parámetro biológico, PER o NPR, y el Score no se modifican apreciablemente al corregir este último por digestibilidad *in vitro*, en especial cuando se han eliminado las leguminosas del cálculo. Para el Indice de Aminoácidos Esenciales, la correlación sí mejora cuando el cálculo incluye a las leguminosas, pero empeora al no incluirlas. Esto sin duda está relacionado al hecho de que el Indice de Aminoácidos Esenciales tiende a sobreestimar la calidad proteínica en especial de muestras de baja digestibilidad (7).

La utilidad de corregir los parámetros químicos por digesti-

bilidad *in vitro* ha sido cuestionada por varios investigadores. Bodwell (13) al analizar resultados de NPU, Valor Biológico, índices enzimáticos (PDR y PPD) y químicos (Score, Indice de Aminoácidos Esenciales) obtenidos en las mismas muestras, concluyó que el uso de ensayos enzimáticos per se para estimar el valor nutritivo de proteínas de granos no parece ofrecer ventajas sobre índices basados en la composición de aminoácidos. Reconoció, sin embargo, la utilidad del ensayo multienzimático de Hsu como un medio de obtener información acerca de la biodisponibilidad de aminoácidos y como un factor que combinado a los datos de aminoácidos, podría dar indicación del valor nutritivo de granos en programas de fitomejoramiento.

Desde el punto de vista práctico puede decirse que el beneficio de realizar o no un ensayo enzimático para corregir los parámetros químicos depende de la muestra en cuestión. En leguminosas crudas o en muestras procesadas, a pesar de que el análisis de aminoácidos muestre un alto potencial (Cuadro 26), sólo una mínima parte puede ser utilizado *in vivo* y el parámetro químico no será capaz de indicar el grado hasta el cual este potencial es aprovechado (65).

Schuster y Bodwell (94) en el estudio de la calidad de siete proteínas por su contenido de aminoácidos esenciales y por bioensayos en ratas y en humanos, encontraron una alta correlación entre el contenido de ciertos aminoácidos esenciales y métodos biológicos, observando que el valor de la correlación no mejoró al corregir por digestibilidad. Ahora bien, todas las proteínas en el es

tudio tenían una digestibilidad aparente alta, comprendida entre 82 y 87%. De estos resultados Satterlee y col. (90) han concluido que para grupos de muestras con digestibilidad alta y consisitente, no hay necesidad de incorporar el factor de digestibilidad en las ecuaciones predictivas de calidad, pero que estas ecuaciones no deberán entonces aplicarse a muestras de baja digestibilidad en que la calidad predicha será mucho mayor que la obtenida por bioensayo en humanos o en animales. En el caso de nuestro estudio, es evidente que para muestras como las leguminosas y muestras procesadas, el factor digestibilidad debe ser considerado en la estimación rápida de su calidad proteínica.

La estimación del C-PER o PER calculado dio aproximaciones relativamente buenas con el PER *in vivo* en el caso de cereales, oleaginosas no procesadas y en mezclas cereal/leguminosa. En el caso del Corn Flakes y las leguminosas el C-PER sobreestima la calidad proteínica, mientras que en las mezclas suplementadas con proteínas animales ocurre una subestimación. Se ha indicado que el método es aplicable a muestras con PER *in vivo* comprendido entre 0.67 y 3.22, sin embargo, no se encontró diferencia en la correlación al excluir las muestras cuyo PER estaba fuera de estos límites.

Nuestros resultados no parecen confirmar las observaciones de Hsu y col. (50) de que el C-PER es una predicción razonable del PER en la rata independiente de la muestra considerada. La sobreestimación que se observa en las leguminosas puede deberse, como ya se indicara, a que índices de calidad proteínica que toman en consideración la adecuación de todos los aminoácidos esenciales, en

particular para muestras de baja digestibilidad, no correlacionarán adecuadamente con parámetros biológicos que dependen en realidad sólo del aminoácido limitante (7). Otras posibles causas de las desviaciones entre el PER y el C-PER han sido señaladas por Hsu y col. (50). Una es la dificultad para obtener una estimación adecuada de la digestibilidad proteínica a través del método multienzimático, lo cual puede ocurrir en el caso de muestras procesadas como el Corn Flakes en el cual la digestibilidad *in vitro* fue mayor al valor *in vivo* ocurriendo así una sobreestimación en el C-PER. La dificultad para obtener estimaciones exactas del PER en la rata para muestras de bajo contenido proteínico y en particular para la polenta fue señalada por Hsu y col. (50). En nuestro estudio, se ha encontrado también una discrepancia entre el PER y C-PER para esta muestra, de tal forma que el C-PER la sobreestimó en 1.21 con respecto a su PER. La subestimación que ocurre en muestras que contienen carne y leche ha sido explicada como resultado de que la digestibilidad *in vitro* es menor a la obtenido *in vivo* en la rata en un 5 a 7 % (50). La máxima diferencia encontrada por nosotros entre el valor *in vivo* e *in vitro* de mezclas cereal/leguminosa + suplemento animal fue de 3.7, por lo que ésta no parece ser la única razón de las diferencias tan grandes entre los valores del PER y el C-PER.

Para las muestras cereal/leguminosa evaluadas en este estudio, el C-PER dio estimaciones adecuadas de su calidad proteínica, indicando la sensibilidad de este método a detectar efectos de complementación entre las proteínas de estos dos tipos de muestras.

De los resultados aquí presentados se considera que no es posible la aplicación del C-PER a todo tipo de muestras. En particular, el método no parece proporcionar resultados válidos para las leguminosas, muestras procesadas y sistemas que contengan proteínas de origen animal. En el caso de las muestras procesadas, la predicción de la digestibilidad por el método multienzimático fue mala como resultado de las reacciones que ocurren entre aminoácidos y carbohidratos que dan lugar a la formación de enlaces resistentes a la hidrólisis enzimática. Esto hizo que el C-PER discrepara considerablemente del PER. Para las mezclas suplementadas con proteína animal, la capacidad predictiva inexacta del C-PER está asociada también a la dificultad para obtener estimaciones adecuadas de digestibilidad *in vitro*. A diferencia de estos dos grupos anteriores, la discrepancia entre el C-PER y PER para las leguminosas parece más bien estar asociada a la dificultad para predecir calidad proteínica de la composición aminoacídica de muestras con un balance de aminoácidos relativamente bueno pero con una baja digestibilidad *in vivo*. La aplicación práctica del C-PER parece limitarse al momento a cereales, oleginosas y mezclas cereal/leguminosa en las cuales predomine el cereal.

3. Modificación al Indice de Crecimiento Nitrogenado (NGI)

Los resultados del ensayo preliminar con caseína, a juzgar por los coeficientes de regresión e interceptos sobre el eje de las ordenadas, sugirieron que la modificación del INdice de Crecimiento Nitrogenado (NGI) era posible ya que valores prácticamente idénticos eran obtenidos con respecto al método tradicional.

En el segundo ensayo, los valores obtenidos por el método modificado fueron a excepción del maíz y el arroz ligeramente superiores a los obtenidos por el método tradicional. Hallazgos similares han sido reportados por Bressani y col. (24) en perros y por Navarrete y col. (77) en humanos en sus estudios tendientes a modificar el Indice de Balance Nitrogenado (3). En los experimentos de que aquí se informa, estas diferencias pueden explicarse de la siguiente manera. Las ratas al iniciarse el experimento pasan de la dieta de la colonia, adecuada para sus requerimientos de crecimiento, a consumir una dieta con solo 2% de proteína con lo cual se depletan y pierden peso. Esta depleción y el corto tiempo durante el cual las ratas se alimentan con cada nivel de proteína hace que al aumentarse el nivel de proteína en la dieta (por ejemplo de 2 a 4%), el primer efecto sea una mayor respuesta en crecimiento que decrece después con el tiempo hasta alcanzar un valor de equilibrio más o menos constante, siempre y cuando las condiciones experimentales se mantengan por el tiempo necesario.

Para el arroz y el maíz, los valores por el método modificado fueron el doble y el triple respectivamente del valor tradicional. El ensayo de estas muestras duró sólo 9 y 12 días contra 15 días para las otras muestras y 14 días para el ensayo tradicional; a estos se suma el hecho de que los niveles máximos ensayados fueron 6% para el arroz y 8% para el maíz. La diferencia en los valores de las pendientes (i.e. NGI tradicional y modificado) se explica por el efecto combinado de nivel proteínico y duración

del ensayo sobre el valor de los parámetros biológicos de evaluación proteínica (15, 54).

Estos resultados parecen indicar que para muestras de bajo contenido proteínico el método modificado no puede aplicarse, y que son necesarios más ensayos para determinar si aumentando el número de niveles proteínicos o el tiempo de ingesta de cada nivel permite obtener resultados similares a los del ensayo tradicional para estas muestras.

Las correlaciones entre los métodos aplicados (NPR, NGI tradicional y NGI modificado) fueron altamente significativas y mejoraron notoriamente al eliminar del cálculo las muestras problema (arroz y maíz) cuando el NGI modificado era uno de los métodos comparados, lo cual nuevamente indica el potencial de este método.

En cuanto al efecto de introducir o no los datos de la dieta libre de nitrógeno en el cálculo de las ecuaciones de regresión, es obvio que se ven afectados tanto los valores del intercepto como los de la pendiente. Este aspecto es todavía un punto de controversia y no existe una posición oficial con respecto a si deben o no incluirse estos valores en los ensayos de razón de pendientes (42).

El estudio del efecto de variables como el nivel inicial, tiempo en cada nivel de proteína y secuencia de niveles proteínicos seguida, indicó que no existe efecto significativo de tiempo en cada nivel ni de nivel inicial, aunque la secuencia de niveles sí afectó el valor de la pendiente. La secuencia descendente dio un valor de calidad alto, 7.207, en relación al ascendente, 4.872. Seguir una secuencia descendente de niveles proteínicos constituye una mejor alternativa, ya que se está favoreciendo el crecimien

to de las ratas al proporcionarles el nivel máximo cuando sus requerimientos son mayores, e ir disminuyendo la concentración proteínica a la par de la disminución de sus necesidades. Se observó además que el tomar en consideración los datos de la dieta libre de nitrógeno no afectó la pendiente ni el intercepto, lo cual es otra ventaja sobre el método modificado ascendente.

En el Indice de Balance Nitrogenado (IBN) se ha indicado que el intercepto de la línea de regresión entre nitrógeno ingerido y balance de nitrógeno (nitrógeno retenido) y la línea de equilibrio nitrogenado debe ser diferente para proteínas de distinta calidad, siendo posible utilizar este valor para comparar la calidad relativa de las proteínas (25). Siguiendo un razonamiento similar, en el caso del Indice de Crecimiento Nitrogenado, NGI, el intercepto entre la línea de regresión y el eje de las abscisas (y=0) indicaría la cantidad mínima de la proteína evaluada necesaria para mantenimiento de peso corporal, estando esta cantidad relacionada también a calidad proteínica. El método de NGI modificado produjo un valor promedio menor al método tradicional (0.191 vs. 0.239 gramos de proteína de caseían/ día). Sin embargo los valores para dos de los tres experimentos fueron casi iguales (0.277 vs. 0.249 y 0.178 vs. 0.182) entre sí y sólo en uno de ellos hubo diferencia significativa entre los dos métodos (0.260 vs. 0.146). Cuando se consideran los intervalos $\bar{X} \pm 1$ d.s. y $\bar{X} \pm 2$ d.s. (66.6 y 95% de los datos respectivamente) se obtiene un traslape de los valores de ambos métodos donde el límite inferior lo da el método modificado y el superior, el tradicional.

La principal ventaja del método modificado es reducir el costo del ensayo al requerir un menor número de ratas, así como una menor cantidad de muestra lo cual es particularmente favorable para programas de fitomejoramiento. Por otra parte, el método modificado probó ser sensitivo a los efectos de suplementación aminoacídica, especialmente en muestras de baja calidad (frijol y harina de algodón) y a la complementación proteínica. Es un método más laborioso respecto al NGI tradicional ya que requiere que las ratas sean pesadas y su dieta cambiada cada 3 días, mientras que en el ensayo tradicional ello se hace cada 7 días, aunque con un número mayor de ratas.

Se considera que el método tiene futuro aunque será necesario realizar más experimentación, especialmente con el método modificado descendente para poder llegar a una generalización en cuanto a su utilidad como un bioensayo válido y rápido.

VIII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Se encontró una alta correlación entre los métodos biológicos de evaluación de calidad proteínica ensayados (PER y NPR) en un grupo de muestras de diferente calidad proteínica. A pesar de las críticas de que ha sido objeto el PER presentó una mejor reproducibilidad que el NPR. La mejor comparabilidad entre ambos métodos se encontró en el grupo de leguminosas, por lo que para este tipo de muestra el NPR parece ser más adecuado que el PER por tener una menor duración y requerir una menor cantidad de muestra.

2. Con base a los resultados del presente estudio, se recomienda aplicar el método multienzimático para determinar digestibilidad in vitro bajo las siguientes condiciones:

a. Proteína Estándar: Caseinato de sodio, pH 8.0; liofilizado

b. pH inicial (estándar y muestras): 8.00,ajustado con HCl 0.1 N ó NaOH 0.1N.

c. Sistema enzimático: Cuatro enzimas distribuidas de la siguiente forma:

   1. Solución multienzimática de tripsina-quimotripsina-peptidasa, T=37°C, t=10 minutos.

   2. Proteasa bacteriana de Streptomyces griseus, T=55°C, t=10 minutos adicionales (total=20 minutos).

d. Parámetro a medir: pH a los 15 minutos

e. Ecuaciones para calcular digestibilidad proteínica aparente

in vitro:

1. Cereales, oleaginosas y mezclas (cereal/leguminosa con y sin suplemento animal, cereal/oleaginosa) sin procesar $y = 150.770 - 10.250\ x$

2. Leguminosas $y = 287.781 - 32.586\ x$

En el caso de cereales y oleaginosas procesadas, aunque los valores de digestibilidad in vitro correlacionaron bien con los valores in vivo en general, la capacidad predictiva de la ecuación derivada fue buena sólo para las muestras de pan procesadas pero falló en muestras procesadas de maíz y harina de algodón. Para poder hacer estimaciones adecuadas de la digestibilidad in vitro para muestras procesadas se recomienda estudiar el comportamiento de dichas muestras utilizando un mayor número de éstas dentro de cada grupo evaluado (maíces, harinas de algodón, etc).

3. El Score Aminoacídico probó ser el parámetro químico más confiable de calidad proteínica. En muestras de baja digestibilidad, la corrección del parámetro químico por la digestibilidad in vitro mejoró su capacidad predictiva de la calidad proteínica, mientras que en muestras de alta digestibilidad no la afecta significativamente.

4. De los resultados obtenidos se considera que la aplicación del C-PER a todo tipo de muestras no es posible, por lo menos en la forma en que el método está descrito actualmente. Su aplicación práctica parece limitarse a muestras no procesadas como cereales, oleaginosas y mezclas cereal/leguminosa y ce-

real/oleaginosa. De las muestras aquí evaluadas el método falló en la predicción del PER para leguminosas, muestras procesadas (cereales u oleaginosas) y sistemas que contenían proteínas de origen animal.

5. Aunque los métodos in vitro pueden dar una información adecuada de la calidad proteínica de ciertos alimentos, el hecho de que las proteínas sean utilizadas con fines biológicos mantiene vigente la importancia de los bioensayos. Los resultados presentados acerca de la modificación al Indice de Crecimiento Nitrogenado, NGI, sugieren que ésta es prometedora aunque se necesita más experimentación antes de poder llegar a una conclusión definitiva sobre su aplicabilidad general.

IX. RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el propósito de someter a prueba métodos rápidos de evaluación de digestibilidad y calidad proteínica con respecto a valores obtenidos por medio de métodos convencionales en la rata.

Un conjunto de muestras vegetales que cubrían un amplio espectro de calidad proteínica fue sometido a ensayos biológicos (PER, NPR, digestibilidad proteínica aparente) a dos tiempos distintos, ensayos químicos y enzimáticos. Se evaluó la comparabilidad y reproducibilidad entre los ensayos biológicos, así como la comparabilidad entre éstos y parámetros químicos y enzimáticos (Score Aminoacídico, Indice de Aminoácidos Esenciales Modificado, digestibilidad *in vitro* y C-PER).

La correlación entre el PER y NPR fue altamente significativa para los dos experimentos realizados ($r=0.801$, $n=240$ para el primero y $r=0.919$, $n=120$ para el segundo). La reproducibilidad fue mejor para el PER ($r=0.915$, $n=88$) que para el NPR ($r=0.835$, $n=88$) y para la digestibilidad proteínica aparente *in vivo* ($r=0.744$, $n=88$).

El estudio del método multienzimático de digestibilidad *in vitro* mostró que las mejores correlaciones entre la digestibilidad *in vivo* y pH se obtienen a los 15 minutos de ensayo, utilizando una solución de tripsina, quimotripsina y peptidasa a 37°C durante los primeros 10 minutos y una solución de proteasa bacteriana a 55°C el tiempo restante. Se confirmó la sensibilidad del método

a la presencia de inhibidores de tripsina en tres muestras de frijol común (Phaseolus vulgaris) crudo y cocido.

La aplicación del método multienzimático al grupo diverso de proteínas vegetales reveló que el comportamiento de las diferentes muestras es distinto, y que varias poblaciones pueden ser definidas en función de una ecuación que relacione pH y digestibilidad in vivo propia. Un grupo más amplio de leguminosas y muestras procesadas (Corn Flakes, harina de algodón y cereales tostados) se evaluó obteniéndose las tres ecuaciones siguientes para calcular digestibilidad in vitro según el tipo de muestra:

1. Cereales, Oleaginosas y Mezclas (Cereal/Leguminosa con y sin suplemento animal, cereal/oleaginosa) sin procesar	$y = 150.770 - 10.250\ x$
2. Leguminosas	$y = 287.781 - 32.586\ x$
3. Cereales y Oleaginosas procesadas	$y = 309.072 - 35.564\ x$

donde x = pH a los 15 minutos, y = digestibilidad aparente in vitro.

Las correlaciones entre digestibilidad in vitro e in vivo para los tres grupos de muestras fueron altamente significativas: r=0.683 para el primer grupo con 23 muestras (cereales y oleaginosas sin procesar y mezclas), r= 0.762 para el segundo con 26 muestras (leguminosas) y r = 0,745 para el tercero con 11 muestras (muestras procesadas). La correlación total que incluyó 60 datos fue de 0.838.

Varios parámetros químicos de calidad proteínica fueron calculados y correlacionados con los ensayos biológicos. El PER se

correlacionó mejor que el NPR con el Score e Indice de Aminoácidos Esenciales netos y corregidos por digestibilidad in vitro. El C-PER o PER calculado se computó en base a la digestibilidad in vitro y composición de aminoácidos. La correlación entre PER y C-PER para todas las muestras (n=33) fue altamente significativa (r=0.871), sin embargo, al realizar el análisis por grupos se encontró que no existe correlación significativa para las leguminosas y que las correlaciones en otros grupos de muestras como oleaginosas y cereales no procesados son mucho mejores. Al comparar los valores del PER in vivo y los del C-PER se observó que este método tiende a sobreestimar la calidad de las leguminosas y subestima a las mezclas suplementadas con proteína animal (carne o leche descremada).

Se han presentado también los resultados de experimentos realizados con el propósito de modificar el Indice de Crecimiento Nitrogenado, NGI. La modificación consistió en alimentar un solo grupo de ratas con dietas conteniendo diferentes niveles de proteína por períodos sucesivos de 3 días hasta un total de 15 días. Un experimento preliminar utilizando caseína como fuente de proteína mostró que los valores obtenidos tanto para la pendiente como para el intercepto era iguales por el método tradicional o por el modificado (4.336 vs. 4.297 para las pendientes y -1.203 vs. -1.072 para interceptos). Sin embargo, al utilizar otras muestras alimenticias, en particular cereales con bajo contenido de proteína (arroz y maíz), estos resultados no se reprodujeron sino que se obtuvieron discrepancias en los valores tanto de la pendiente como del intercepto evaluados por el método tradicional y modificado.

El estudio del método modificado reveló que usar un nivel inicial de 2 ó 4% de proteína dietaria no afecta los resultados, como tampoco los afecta utilizar períodos de 3 ó 4 días en cada nivel de proteína. Se encontró que seguir una secuencia descendente de niveles proteícos, aunque proporciona un valor de NGI numéricamente mayor que el tradicional, parece ser un valor más confiable que el obtenido por el método modificado ascendente. Se ha recomendado estudiar esta variante más a fondo.

X. BIBLIOGRAFIA

1. Akeson, W. R. y M. A. Stahmann. "A pepsin-pancreatin digest index of protein quality". J. Nutr., 83:257-261. 1964.

2. Allison, J. B. "The nutritive value of dietary proteins". En: Munro, H. N. y J. B. Allison. eds. Mammalian protein metabolism. New York, Academic Press, 1964. v.2, pp. 41-86.

3. _____ y J. A. Anderson. "The relation between absorbed nitrogen, nitrogen balance and biological value of protein in adult dogs". J. Nutr., 29:413-420. 1945.

4. Alsmeyer, R. H.; A. E. Cunningham y M. L. Happich. "Equations predict PER from amino acid analysis". Food Techn., 28(7): 34-40. 1974.

5. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. Official methods of the A. O. A. C. 11th ed. Washington, D.C., 1970. pp. 16-17.

6. Baldwin, F. M. y E. J. Movitt. "Nutritional value of autoclaved and raw soybeans, supplanted only by vitamins and salt mixture". Food Res., 7:403-404. 1942.

7. Bender, A. E. "Chemical scores and availability of amino acids". En: Porter, J. W. y B. A. Rolls. eds. Proteins in human nutrition. London, Academic Press, 1973. pp. 167-168.

8. _____ y B. H. Doell. "Biological evaluation of proteins; a new aspect". Brit. J. Nutr., 11:140-148. 1957.

9. Bodwell, C. E. "Application of animal data to human protein nutrition; a review". Cereal Chem., 54(4):958-983. 1977.

10. _____. "Human versus animal assays". En: Wilcke, H. L.; D. T. Hopkins y D. H. Waggle. eds. Soy protein and human nutrition. New York, Academic Press, 1979. pp. 331-339.

11. _____. "Problems in the development and application of rapid methods of assessing protein quality". Food Techn., 31(6):73-77, 84. 1977.

12. _____. "The nutritive value of the same protein prepara-

tions as estimated by human, rat and chemical assays". J. Am. Oil Chem. Soc., 56(3):156-159. 1979.

13. _____. "Use of enzymatic assays for the determination of nutritional quality". En: Nutritional evaluation of cereal mutants. Proceedings of an Advisory Group Meeting. Vienna, July 26-30, 1976. Vienna, International Atomic Energy Agency, 1977. pp. 85-105.

14. _____; L. D. Satterlee y L. R. Hackler. "Protein digestibility of the same protein preparations by human and rat assays and by in vitro enzymatic digestion methods". Am. J. Clin. Nutr., 33(3):677-686. 1980.

15. Braham, J. E.; L. G. Elías, Silvia de Zaghi y R. Bressani. "Effect of protein level and duration of test on carcass composition, Net Protein Utilization (NPU) and on Protein Efficiency Ratio (PER)". Nutr. Dieta., 9:99-111. 1967.

16. Bressani, R. "Effect of processing on the nutritional value of feeds in Central America". En: Effect of processing on the nutritional value of feeds. Proceedings of a Symposium. Gainesville, Florida, January 11-13, 1972. Washington, D. C., National Academy of Sciences, 1973. pp. 452-477.

17. _____. "Evaluación biológica de las proteínas". En: Conferencia sobre Recursos Proteínicos en América Latina. Guatemala, 24-27 de feb. de 1970. Editores: M. Béhar y R. Bressani. Guatemala, Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, 1971. pp. 21-52. (INCAP, Publicación L-1).

18. _____. "La importancia del maíz en nutrición humana en América Latina y otros países". En: Bressani, R. y J. E. Braham. eds. Mejoramiento nutricional del maíz. Guatemala, Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, 1972. pp. 5-30.

19. _____. "Legumes in human diets and how they may be improved". En: Milner, M. ed. Nutritional improvement of food legumes by breeding. Protein Advisory Group of the United Nations System. Rome, July 3-5, 1972. New York, John Wiley & Sons, 1973. 389 p.

20. _____. "Nutritional contribution of soy protein to food systems". J. Am. Oil Chem. Soc., 52(4):254A-262A. 1975.

21. _____ y L. G. Elías. "Evaluación de la calidad proteínica de varias leguminosas de grano usando diversos métodos biológicos". Arch. Lat. Nutr., 26(3):325-339. 1976.

22. _____ y L. G. Elías. "The problem of legume protein digestibility". En: Hulse, J. H.; K. O. Rachie y L. W. Billingsley. eds. Nutritional standards and methods of evaluation for food legume breeders. Ottawa, IDRC, 1977. pp. 61-72

23. _____; L. G. Elías y B. O. Juliano. "Evaluation of the protein quality and milled rices differing in protein content". J. Agric. Food Chem., 19(5):1028-1034. 1971.

24. _____; L. G. Elías, J. Olivares y Delia A. Navarrete. "Comparación del Indice de Balance de Nitrógeno de tres proteínas calculado de períodos de balance de nitrógeno diarios o de cuatro días". Arch. Lat. Nutr., 28(3):318-336. 1978.

25. _____; Delia A. Navarrete; L. G. Elías y J. E. Braham. "A critical summary of a short-term Nitrogen Balance Index to measure protein quality in adult human subjects". En: Wilcke, H. L.; D. T. Hopkins y D. H. Waggle. eds. Soy protein and human nutrition. New York, Academic Press, 1979. pp. 313-323.

26. _____ y María T. Valiente. "All vegetable protein mixtures for human feeding. VII. Protein complementation between polished rice and cooked black beans". J. Food Sci., 27:401-406. 1962.

27. _____; María T. Valiente y C. Tejada. "All vegetable protein mixtures for human feeding. VI. The growth promoting value of combinations of lime-treated corn and cooked black beans". J. Food Sci., 27:394-400. 1962.

28. Buchanan, R. A. "In vivo and in vitro methods of measuring nutritive value of leaf protein concentrates". Brit. J. Nutr., 23:533-545. 1969.

29. _____ y M. Byers. "Interference of cyanide with the measurements of papain hydrolysis". J. Sci. Food Agric., 20:364-367. 1969.

30. Carpenter, K. J. "The estimation of available lysine in animal-protein foods". Biochem. J., 77:604-610. 1960

31. Chávez, J. F. y P. L. Pellet. "Protein quality of some representative Latin American diets by rat bioassay". J. Nutr., 106(6):792-801. 1976.

32. Dryden, M. J. y L. D. Satterlee. "Effect of free and bound

chlorogenic acid on the in vitro protein digestibility and Tetrahymena-based PER of a casein model system". J. Food Sci., 43(2);650-652. 1978.

33. Eggum, B. O. y K. O. Christensen. "Protein digestibility of a feed mixture in relation to the protein digestibility of the individual protein components". Brit. J. Nutr., 31:213-218. 1974.

34. Elías, L. G.; R. Bressani y J. A. del Busto. "Evaluación de la calidad de la proteína de alimentos de bajo contenido proteínico". Arch. Lat. Nutr., 24(1):81-96. 1974.

35. Elías, L. G.; F. R. Cristales, R. Bressani y H. Miranda. "Composición química y valor nutritivo de algunas leguminosas de grano". Turrialba, 26(4):375-380. 1976.

36. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Amino-Acid content of foods and biological data on proteins. Rome, 1970. 285 p. (FAO, Nutritional studies No. 24).

37. _____. Protein requirements. Rome, 1957. 52 p. (FAO, Nutritional studies, No. 16).

38. _____ y World Health Organization. Energy and protein requirements. Report of a Joint FAO/WHO ad hoc Expert Committee on Energy and Protein Requirements. Geneva, World Health Organization, 1973. 118 p. (WHO, Technical Report Series No. 522; FAO, Nutritional Report Series No. 52).

39. _____ y World Health Organization. Protein requirements. Report of a Joint FAO/WHO Expert Group. Rome, Food and Agriculture Organization, 1965. 71 p. (FAO, Nutr. Meetings Rep. Ser. No. 37; WHO, Technical Report Series, No.301).

40. Ford J. E. y D. M. Salter. "Analysis of enzymatically digested food proteins by Sephadex-gel filtration". Brit. J. Nutr., 20:843-860. 1966.

41. Gómez Brenes, R. "Enriquecimiento de los cereales y sus productos con concentrados proteínicos y aminoácidos o ambos; aspectos nutricionales". En: Conferencia sobre Recursos Proteínicos en América Latina. Guatemala, 24-27 feb. 1970. Editores: M. Béhar y R. Bressani. Guatemala, Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, 1971. pp. 333-352. (INCAP, publicación L-1).

42. Hackler, L. R. "Methods of measuring protein quality; a review of bioassay procedures". Cereal Chem., 54(4):984-995. 1977.

43. Halevy, S. y N. Grossowicz. "A microbiological approach to nutritional evaluation of proteins". Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 82(4):567-571. 1953.

44. Happich, M. L.; C. E. Swift y J. Naghski. "Equations for predicting PER from amino acid analysis; a review and current scope of application". En: Friedman, M. ed. Protein nutritional quality of foods and feeds. Part I, Assay methods - biological, biocehmical and chemical. New York, Marcel Dekker, 1975. pp. 125-135.

45. Hegsted, D. M. "The amino acid requirements of rats and human beings". En: Porter, J. W. y B. A. Rolls. eds. Proteins in human nutrition. London, Academic Press, 1973. pp. 275-291.

46. _____ y Y. O. Chang. "Protein utilization in growing rats. I. Relative Growth Index as a bioassay procedure". J. Nutr., 85:159-168. 1965.

47. _____ y B. O. Juliano. "Difficulties in assessing the nutritional quality of rice protein". J. Nutr., 104:772-781. 1974.

48. _____; R. C. Mills, C. A. Elvehjem y E. B. Hart. "Choline in the nutrition of chicks". J. Biol. Chem., 138:459-466. 1941.

49. Henry, Kathleen M. "A comparison of biological methods with rats for determining the nutritive value of proteins". Brit. J. Nutr., 19:125-135. 1965.

50. Hsu, H. W.; N. E. Sutton; M. O. Banjo; L. D. Satterlee y J. G. Kendrick. "The C-PER and the T-PER assays for protein quality". Food Techn., 32(12):69-73. 1978.

51. Hsu, H. W.; D. L. Vavak; L. D. Satterlee y G. A. Miller. "A multienzyme technique for estimating protein digestibility". J. Food Sci., 42(5):1269-1273. 1977.

52. Hulse, J. H.; K. O. Rachie y L. W. Billingsley. eds. Nutritional standards and methods of evaluation for food legume

breeders. Ottawa, International Development Research Center, 1977. 100 p.

53. Jansen, G. R. "Biological evaluation of protein quality". Food Techn., 32(12):52-56. 1978.

54. _____. "Influence of rat strain and protein level on Protein Efficiency Ratio (PER) determination". J. Nutr., 78:231-240. 1962.

55. Jewell, D. K.; J. G. Kendrick y L. D. Satterlee. "The DC-PER assay; a method for predicting protein quality solely from amino acid compositional data". Nutr. Rept. Intl., 21:25-38. 1980.

56. Kaba, H. y P. L. Pellet. "Prediction of true limiting amino acid using available protein scoring systems". Ecol. Food Nutr., 4:109-116. 1975.

57. Lachance, P. A.; R. Bressani y L. G. Elías. "Shorter protein bioassays". Food Techn., 31(6);82-84. 1977.

58. Lee, Y. B.; J. G. Elliot, D. A. Rickansrud y E. G. Hagberg. "Predicting Protein Efficiency Ratio by the chemical determination of connective tissue content of meat". J. Food Sci., 43:1359-1362. 1978.

59. Liener, I. "Significance for humans of biologically active factors in soybeans and other food legumes". J. Am. Oil Chem. Soc., 56(3):121-129. 1979.

60. Linares, Sonia M. C. y Concepción M. de Bosque. Evaluación de estándares nutricionales y tecnológicos de 20 variedades de Phaseolus vulgaris. Tesis (Magister-Scientificae)-Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia-INCAP/CESNA-Curso de Postgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos. Guatemala, 1979. 62 p.

61. Maga, J. A.; K. Lorenz y O. Onayemi. "Digestive acceptability of proteins as measured by the initial rate of in vitro proteolysis". J. Food Sci., 38:173-174. 1973.

62. Manna, L. y S.M. Hauge. "A possible relationship of vitamin B_{13} to orotic acid". J. Biol. Chem., 202:91-96. 1953.

63. Mariani, A. y M. A. Spadoni. "Rat models in protein quality

evaluation". J. Am. Oil Chem. Soc., 56(3):154-156. 1979.

64. Marshall, H. F.; G. W. Wallace y L. D. Satterlee. "Prediction of protein digestibility by an in vitro procedure using human, porcine and rat pancreatin preparations". Nutr. Rept. Intl., 19:901-913. 1979.

65. Mauron, J. "The analysis of food proteins, amino acid composition and nutritive value". En: Porter, J. W. G. y B. A. Rolls. eds. Proteins in human nutrition. London, Academic Press, 1973. pp. 139-154.

66. McLaughlan, J. M. "Critique of methods for evaluation of protein quality". En: Wilcke, H. L.; D. T. Hopkins y D. H. Waggle. eds. Soy protein and human nutrition. New York, Academic Press, 1979. pp. 281-297.

67. _____. "Nutritional evaluation of proteins by biological methods". Cereal Sci. Today, 17:162-165. 1972.

68. _____. "The Relative Nitrogen Utilization method for evaluating protein quality". J. Assoc. Off. Anal. Chem., 59:42-45. 1976.

69. _____ y M. O. Keith. "Bioassays for protein quality". En: Friedman, M. ed. Protein nutritional quality of foods and feeds. Part I. Assay methods - biological, biochemical and chemical. New York, Marcel Dekker, 1975. pp. 79-85.

70. _____; C. G. Rogers; D. G. Chapman y J. A. Campbell. "Evaluation of protein in foods. IV. A simplified chemical score". Can. J. Biochem. Physiol., 37:1293-1299. 1959.

71. Melnick, D. y B. L. Oser. "Influence of heat processing on the functional and nutritive properties of protein". Food Techn., 3:53-71. 1949.

72. Mitchell, H.H. Wiss. Abhandl deut Akad. Landwirtsh., 2:79. 1954. Citado por Oser, B.L. "An integrated essential amino acid index for predicting the biological value of proteins". En: Albanese, A. A. ed. Protein and amino acid nutrition. New York, Academic Press, 1959. pp. 281-295.

73. _____ y R. J. Block. "Some relationships between the amino acid content of proteins and their nutritive value for the rat". J. Biol. Chem., 163:599-619. 1946.

74. Mitchell, M. "A method of determining the biological value of protein". J. Biol. Chem., 58:873-903. 1924.

75. National Research Council. Evaluation of protein quality. Washington, D.C., National Academy of Sciences, 1963. 74 p. (NRC, Publication No. 1100).

76. _____. Nutrient requirements of laboratory animals. Washington, D.C., National Academy of Sciences, 1972. 117 p.

77. Navarrete, Delia A.; Vera A. Loureiro de Daqui; L. G. Elías, P. A. Lachance y R. Bressani. "The nutritive value of egg protein as determined by the Nitrogen Balance Index -NBI-". Nutr. Rept. Intl., 16(6):695-704. 1977.

78. Nesheim, R. D. "Food industry requirements for rapid methods of protein quality assessment". Food Techn., 31(6):71-73. 1977.

79. Oke, O. L. e I. B. Umoh. "Nutritive value of leaf protein; a note on the comparison of in vitro and in vivo methods". Nutr. Rept. Intl., 10(6):397-403. 1974.

80. Orr, M. L. y B. K. Watt. Amino acid content of foods . U. S. Dept. of Agriculture, Home Economics Research Report No. 4 Dec. 1957. 82 p.

81. Osborne, T. B.; L. B. Mendel y Edna L. Ferry. "A rapid method of expressing numerically the growth-promoting value of proteins". J. Biol. Chem., 37:223-229. 1919.

82. Oser, B. L. "Method for integrating essential amino acid content in the nutritional evaluation of protein". J. Am. Diet. Assn., 27:396-402. 1951.

83. _____. "An integrated essential amino acid index for predicting the biological value of proteins". En: Albanese, A. A. ed. Protein and amino acid nutrition. New York, Academic Press, 1959. pp. 281-295.

84. Pellet, P. L. "Protein quality revisited". Food Techn., 32(5): 60-79. 1978.

85. Pinto, G. F.; Vera Costa-Carvahlo; Edna Souza y J. S. Araujo-Neto. "A screening method for protein characterization and differentiation". J. A. O. A. C., 59(3):584-590. 1976.

86. Restrepo, O. J. Aislamiento e identificación de cuerpos proteicos en el frijol común (Phaseolus vulgaris). Tesis (Magister-Scientificae)-Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia- INCAP/CESNA- Curso de Postgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos. Guatemala, 1978. 76 p.

87. Rhinehart, D. A nutritional characterization of the distiller's grain protein concentrates. M.S. Thesis University of Nebraska, Lincoln, NE. Citado por Hsu, H. W.; D. L. Vavak; L. D. Satterlee y G. A. Miller. "A multienzyme technique for estimating protein digestibility". J. Food Sci., 42(5): 1269-1273. 1977.

88. Rich, N. A comparison of human and rat in vivo and in vitro digestibility with purified enzyme in vitro digestibility of selected foods. M. S. Thesis. University of Nebraska, Lincoln, NE. Citado por Satterlee, L.D.; J. G. Kendrick; D.K. Jewell y W. D. Brown. "Estimating apparent protein digestibility from in vitro assays". Presented at the Conference and Workshop on Protein Quality in Humans; Assessment and in vitro Estimation. Warrenton, Virginia, March 23-26, 1980. /Nebraska, Agricultural Experimental Station, 1980/ 45 p. Mimeografiado.

89. _____; L. D. Satterlee y J. L. Smith. "A comparison of in vivo apparent protein digestibility in man or rat to in vitro protein digestibility as determined using human and rat pancreatins and commercially available proteins". Nutr. Rept. Intl., 21:285-299. 1980.

90. Satterlee, L. D.; J. G. Kendrick, D. K. Jewell y W. D. Brown. "Estimating apparent protein digestibility from in vitro assays", Presented at the Conference and Workshop on Protein Quality in Humans; Assessment and in vitro Estimation. Warrenton, Virginia, March 23-26, 1980. /Nebraska, Agricultural Experimental Station, 1980/ 45 p. Mimeografeado.

91. _____; J. G. Kendrick y G. A. Miller. "Rapid in vitro assays for estimating protein quality". Food Techn., 31(6):76-81. 1977.

92. _____; H. F. Marshall y J. M. Tennyson. "Measuring protein quality". J. Am. Oil Chem. Soc., 56(3):103-109. 1979.

93. Saunders, R. M.; M. A. Connor; A. N. Booth; E. M. Bickoff y G. D. Kohler. "Measurement of digestibility of alfalfa concen

trates, by in vivo and in vitro methods". J. Nutr., 103: 530-535. 1973.

94. Schuster, E. M. y C. E. Bodwell. "Relationship between protein nutritive value as estimated in young men and rats, essential amino acid composition and protein digestibility". Fed. Proc., 38:313-317. 1979.

95. Smyth, D. y D. F. Elliot. "Some analytical problems involved in determining the structure of peptides and proteins; a review". Analyst, 89(1055):81-94. 1964.

96. Snedecor, G. W. y W. G. Cochran. Statistical methods. 6th ed. Ames, Iowa, Iowa State University Press, 1967. 593 p.

97. Steinke, F. H. "Measuring protein quality of food". En: Wilcke, H. L.; D. T. Hopkins y D. H. Waggle. eds. Soy protein and human nutrition. New York, Academic Press, 1979. pp. 307-312.

98. _____. "Protein Efficiency Ratio; pitfalls and causes of variability". Cereal Chem., 54:949-957. 1977.

99. University of Nebraska, Food Protein Research Group. "Development of methodologies for rapidly assessing the protein quality of foods, Final Report. /Lincoln, University of Nebraska, 1979/ 172 p. (National Science Foundation project report).

100. Woodham, A. A. y Eileen Clarke. "Nutritive value of mixed proteins. 2. As determined by Net Protein Utilization and Protein Efficiency Ratio tests". Brit. J. Nutr., 37:309-319. 1977.

101. Woodham, A. A. y P. S. Deans. "Nutritive value of mixed proteins. 1. In cereal-based diets for poultry". Brit. J. Nutr., 37:289-308. 1977.

XI. APENDICE

CUADRO 1

Contenido de nitrógeno y proteína cruda de las muestras utilizadas en la Primera Parte del estudio.

Muestra	Nitrógeno %	Factor de conversión*	Proteína cruda, %
A. Cereales			
1. Polenta	1.43	6.25	8.9
2. Maíz común	1.55	6.25	9.7
3. Maíz Opaco-2 tuxpeño	1.39	6.25	8.7
4. Maíz tierno	1.79	6.25	11.2
5. Corn flakes	1.28	6.25	8.0
6. Maicillo blanco	1.33	6.25	8.3
7. Maicillo rojo	1.34	6.25	8.3
8. Arroz	1.28	5.95	7.6
9. Harina de trigo	2.05	5.70	11.7
10. Trigo integral	2.14	5.83	12.5
B. Leguminosas			
11. Frijol blanco crudo	3.86	6.25	24.1
12. Frijol blanco 30' **	3.93	6.25	24.5
13. Frijol blanco 20'	4.03	6.25	25.2
14. Frijol negro crudo	3.63	6.25	22.7
15. Frijol negro 30'	3.89	6.25	24.3
16. Frijol negro 20'	3.92	6.25	24.5
17. Frijol rojo crudo	3.50	6.25	21.8
18. Frijol rojo 20'	3.77	6.25	23.2
19. Gandul 20'	3.49	6.25	21.8
20. Caupí 20'	3.88	6.25	24.2
21. Caupí 10'	3.88	6.25	24.2
C. Oleaginosas			
22. Soya 20'	5.84	5.71	33.3
23. Harina de soya	7.54	5.71	43.0
24. Harina de algodón	6.50	6.25	40.6
25. Harina de ajonjolí	6.23	6.25	38.9

* (38)

** Indica tiempo de cocción de las leguminosas expresado en minutos.

Continuación Cuadro 1

Muestra	Nitrógeno %	Factor de conversión*	Proteína cruda, %
D. Ingredientes de las mezclas			
26. Harina de maíz Tortiyá	1.36	6.25	8.5
27. Harina de frijol	3.52	6.25	22.0
28. Leche descremada	5.36	6.38	34.2
29. Harina de carne	13.11	6.25	81.9
E. Mezclas			
30. Maíz/frijol 87/13	1.62	6.25	10.1
31. Maíz/frijol 70/30	2.11	6.25	13.2
32. Arroz/frijol 95/5	1.35	5.95	8.0
33. Arroz/frijol 80/20	1.68	5.95	10.0
34. Maíz tierno/gandul 75/25	2.32	6.25	14.5
35. Maíz/soya 70/30	2.74	6.25	17.1
36. Maíz/frijol 87/13+ 5% leche descremada	1.72	6.25	10.7
37. Maíz/frijol 87/13+ 10% harina de carne	2.75	6.25	17.2
38. Arroz/frijol 95/5+ 5% leche descremada	1.55	5.95	9.2
39. Arroz/frijol 95/5+ 10% harina de carne	2.54	5.95	15.1
40. Caseína ANRC	13.88	6.25	86.7
41. Caseinato de sodio ANRC (pH 8.0)	14.16	6.25	88.5

* (38)

CUADRO 2

Identificación y características de las variedades de frijol (Phaseolus vulgaris) del CIAT

Variedad #	Identif. CIAT	Nombre de variedad	Color	Nitrógeno % *	Proteína % *
1	P-757	Porrillo 1	Negro	4.33	27.1
2	P-459	Jamapa	Negro	4.17	26.0
3	P-302	PI-309-804	Negro	4.27	26.7
4	P-458	Ica Tui	Negro	4.11	25.7
5	P-566	Porrillo sintético	Negro	4.49	28.0
6	P-498	Puebla 152	Negro	3.68	23.0
7	P-560	51051	Negro	4.28	26.7
8	P-675	Ica Pijao	Negro	4.54	29.3
9	P-539	Venezuela 2	Negro	4.48	28.0
10	P-512	S-166 A-N	Negro	4.39	27.4
11	P-402	Brasil 2	Café	3.39	24.0
12	P-524	S630 BC-63	Café	4.40	27.5
13	P-758	Puebla 152	Café	3.70	23.2
14	P-755	Pompadour	Rojo	4.40	27.5
15	P-392	Sanilac	Blanco	4.41	27.6
16	P-756	Ex Rico	Blanco	4.48	28.0
17	P-643	Nep-2	Blanco	4.56	28.5

* Análisis realizado en la muestra cocinada según el esquema mostrado en la Fig. 1 por un tiempo de 30 minutos.

CUADRO 3

Características de las muestras procesadas

Muestra	Nitrógeno %	Proteína % *	Lisina disponible g/16g N
Opaco-2	1.35	8.4	4.667
Opaco-2, 20.5' 1)	1.38	8.6	3.625
Opaco-2, 26'	1.43	8.9	2.758
Pan secado con aire	2.34	13.3	2.230
Pan tostado + 2)	2.38	13.6	1.904
Pan tostado ++	2.43	13.9	1.279
Harina de algodón NAISA 3)	6.75	42.2	3.091
Harina de algodón M-J 3)	6.50	40.6	3.328
Harina de algodón, INCAP 4)	7.84	49.0	4.452

* % N x factor; factor = 6.25 para opaco-2 y harina de algodón, 5.70 para pan

1) Indica tiempo de tostación en minutos
2) Indica grado de tostación
3) Proceso de prensa
4) Extraída con hexano y lavada con acetona

CUADRO 4

Muestras para la Tercera Parte

Muestra	Nitrógeno %	Factor de conversión*	Proteína %
1. Caseína	13.88	6.25	88.5
2. Caseína+0.3% DL-metionina	------	------	------
3. Harina de soya	7.54	5.71	43.1
4. Harina de algodón NAISA (tamizada)	5.29	6.25	33.1
5. Harina de algodón+0.3% de L-lisina-HCl 1)	------	------	------
6. Maíz	1.57	6.25	9.8
7. Frijol negro	3.72	6.25	23.2
8. Frijol negro + 0.3% DL-metionina 1)	------	------	------
9. Maíz/frijol 70/30	2.20	6.25	13.8
10. Arroz	1.16	5.95	6.9
11. Trigo	2.01	5.83	11.5
12. Triticale	2.16	5.76	12.4

1) La base en cada caso es la muestra anterior, el suplemento aminoacídico en las raciones se agregó a expensas del almidón.

* De nitrógeno a proteína.

CUADRO 5

Esquema del ensayo realizado para evaluar el efecto de diferentes variables sobre el valor del NGI modificado

---

I. **NGI Tradicional**
ratas = 40
Tiempo total = 14 días

- 8 ratas — Dieta libre de nitrógeno — 14 días
- 8 ratas — Dieta de caseína, 2% proteína — 14 días
- 8 ratas — Dieta de caseína, 4% proteína — 14 días
- 8 ratas — Dieta de caseína, 6% proteína — 14 días
- 8 ratas — Dieta de caseína, 8% proteína — 14 días
- 8 ratas — Dieta de caseína, 10% proteína — 14 días

1. Registrar cambio en peso
2. Registrar consumo de alimento
3. Calcular consumo de proteína
4. Calcular ecuación de regresión entre cambio en peso y proteína consumida.

II. NGI Modificado
de ratas = 8 ratas por ensayo
Tiempo total = 15 días

2.1. 8 ratas — 2% (3 días) → 4% (3 días) → 6% (3 días) → 8% (3 días) → 10% (3 días)

2.2. 8 ratas — 4% (3 días) → 5% (3 días) → 6% (3 días) → 8% (3 días) → 10% (3 días)

2.3. 8 ratas — 4% (4 días) → 6% (4 días) → 8% (4 días) → 10% (3 días)

2.4. 8 ratas — 10% (3 días) → 8% (3 días) → 6% (3 días) → 4% (3 días) → 2% (3 días)

1. Registrar cambio en peso y consumo de alimento al final de cada período cambiando la dieta al nivel siguiente.
2. Calcular regresión entre cambio en peso y proteína consumida.

CUADRO 6

Contenido de aminoácidos esenciales de las muestras [1]

Muestra	Aminoácido en g/100 g de proteína							
	Lisina	Azufrados totales	Treonina	Isoleucina	Leucina	Valina	Aromáticos [2]	Triptofano
Patrón FAO/OMS 1973	5.50	3.50	4.00	4.00	7.00	5.00	6.00	1.00
Caseína	8.29	3.22	4.75	5.52	9.71	6.88	11.28	1.65
Maíz común	2.67	3.47	3.60	3.68	12.53	4.85	8.70	0.70
Maíz tierno [3]	3.70	3.62	4.08	3.71	10.99	6.24	8.94	0.62
Corn flakes [3]	1.90	3.54	3.39	3.78	12.93	4.77	7.86	0.64
Polenta [3]	2.88	3.15	3.98	4.62	12.96	5.10	10.66	0.61
Opaco-2	4.21	3.10	3.30	3.20	8.40	4.90	8.30	1.30
Maicillo	2.02	2.90	3.02	3.92	13.31	5.01	7.57	1.22
Arroz	3.80	3.85	3.48	4.40	8.64	6.07	8.45	1.23
Harina de trigo	2.28	4.39	2.95	4.00	7.72	4.53	7.88	1.18
Trigo	3.07	4.34	3.14	3.50	7.15	4.73	8.04	1.17
Frijol común	7.20	1.90	3.97	4.19	7.61	4.59	7.74	1.01
Caupí	6.83	2.26	3.60	3.82	7.04	4.53	7.78	1.09
Gandul	7.70	1.50	2.91	3.10	6.30	3.60	10.29	0.56
Soya	6.99	2.84	4.22	4.97	8.51	5.25	8.84	1.40
Harina de soya	6.65	3.38	4.68	5.29	8.56	5.73	9.63	1.68
Harina de algodón	4.14	2.91	3.28	3.14	5.81	4.34	8.06	1.42
Harina de ajonjolí	2.73	4.62	3.57	3.62	6.70	4.61	7.55	1.34
Maíz/frijol 87/13	3.94	3.04	3.65	3.83	11.17	4.78	8.45	0.79
Maíz frijol 70/30	5.05	2.64	3.79	3.93	9.94	4.71	8.20	0.86
Arroz/frijol 95/5	4.24	3.59	3.55	4.37	8.50	5.87	8.36	1.20
Arroz/frijol 80/20	5.23	3.03	3.69	4.31	8.21	5.45	8.15	1.14

1) FAO (36)
2) Fenilalanina +tirosina
3) Orr y Watt (80)

Continuación Cuadro 6

Muestra	Aminoácido en g/100 g proteína							
	Lisina	Azufrados totales	Treonina	Isoleucina	Leucina	Valina	Aromáticos	Triptofano
Gandul/maíz tierno 25/75	5.27	2.79	3.62	3.47	9.14	5.20	9.47	0.60
Maíz/frijol 87/13 + 5% leche	4.51	3.08	3.86	4.21	10.95	5.04	8.65	0.88
Maíz/frijol 87/13+ 10% carne	5.63	3.41	3.83	4.43	9.47	5.11	7.96	0.97
Arroz/frijol 95/5 + 5% leche	4.87	3.55	3.74	4.73	8.73	6.05	8.64	1.24
Arroz/frijol 95/5 + 10% carne	5.96	3.71	3.80	4.75	8.00	5.67	7.86	1.18
Maíz/soya 70/30	5.37	3.07	3.97	4.49	10.01	5.07	8.78	1.14

CUADRO 7

Resultados del primer ensayo de NPR

Ración	Proteína %	Ganancia en peso, g*	Consumo de alimento, g*	NPR*
Caseína	7.4	17.4 ± 2.6	83.0 ± 5.7	4.11 ± 0.32
Caseína	9.3	33.0 ± 4.3	108.8 ± 11.5	4.44 ± 0.25
Maíz común	8.5	7.6 ± 3.2	84.6 ± 12.4	2.72 ± 0.29
Maíz tierno	8.9	16.4 ± 4.8	85.8 ± 10.6	3.70 ± 0.26
Corn flakes	6.7	-1.8 ± 1.0	57.1 ± 8.4	2.72 ± 0.44
Polenta	6.9	0.9 ± 3.3	40.8 ± 5.8	3.17 ± 0.75
Opaco-2	6.5	11.1 ± 4.3	90.4 ± 9.9	3.94 ± 0.48
Maicillo blanco	7.4	6.3 ± 3.1	85.0 ± 12.2	2.93 ± 0.40
Maicillo rojo	7.0	5.0 ± 1.8	80.5 ± 7.0	3.05 ± 0.52
Arroz	6.7	14.6 ± 7.2	96.9 ± 14.3	4.05 ± 0.60
Harina de trigo	9.2	4.3 ± 2.7	84.4 ± 8.3	2.12 ± 0.39
Trigo entero	9.5	12.9 ± 3.0	87.6 ± 8.6	3.00 ± 0.33
Frijol negro 20'[a]	9.1	1.1 ± 3.2	71.4 ± 7.8	1.89 ± 0.61
Frijol blanco 20'	9.5	6.5 ± 2.9	83.4 ± 7.1	2.33 ± 0.31
Frijol rojo 20'	9.0	1.9 ± 1.9	67.0 ± 6.0	2.22 ± 0.31
Cowpea 20'	9.4	6.9 ± 3.2	79.9 ± 3.2	2.51 ± 0.42
Gandul 20'	9.5	6.3 ± 4.9	78.9 ± 14.4	2.41 ± 0.33
Soya	9.1	30.5 ± 9.7	104.1 ± 10.9	4.44 ± 0.63
Harina de soya	8.8	27.5 ± 8.7	113.8 ± 16.0	3.94 ± 0.59
Harina de algodón	8.2	17.9 ± 4.3	121.9 ± 11.7	3.00 ± 0.41
Harina de ajonjolí	9.0	5.9 ± 2.7	79.8 ± 6.6	2.50 ± 0.42
Maíz/Frijol, 87/13	9.1	19.8 ± 5.6	115.8 ± 13.5	3.02 ± 0.27
Maíz/Frijol, 70/30	8.5	26.8 ± 4.5	120.1 ± 12.9	3.81 ± 0.33
Arroz/Frijol, 95/5	7.2	16.3 ± 7.3	117.8 ± 13.5	4.01 ± 0.53
Arroz/Frijol, 80/20	9.1	26.8 ± 7.3	118.5 ± 13.4	3.58 ± 0.46
Gandul/Maíz tierno, 25/75	9.3	16.3 ± 4.5	90.4 ± 12.0	3.37 ± 0.37
Maíz/Frijol, 87/13 + 5% leche	9.6	28.4 ± 2.3	121.1 ± 12.9	3.46 ± 0.23
Maíz/Frijol, 87/13 + 10% carne	9.2	37.3 ± 8.8	125.4 ± 20.5	4.27 ± 0.27
Arroz/Frijol, 95/5 + 5% leche	6.9	29.8 ± 4.4	115.9 ± 12.5	5.23 ± 0.33
Arroz/Frijol, 95/5 + 10% carne	9.1	43.6 ± 5.7	114.5 ± 9.7	5.34 ± 0.30
Maíz/Soya, 70/30	9.1	25.3 ± 4.1	94.9 ± 7.6	4.31 ± 0.32
Dieta libre de Nitrógeno	0.7	-12.4 ± 5.2	60.4 ± 13.6	

* Media ± desviación estándar.

a Indica tiempo de cocción.

CUADRO 8

Resultados del primer ensayo de PER

Ración	Proteína %	Ganancia en peso, g*	Consumo de alimento, g*	PER*
Caseína	7.4	38.9 ± 8.3	226.1 ± 76.8	2.09 ± 0.28
Caseína	9.3	82.6 ± 13.5	343.8 ± 21.5	2.62 ± 0.30
Maíz común	8.5	22.9 ± 6.8	240.9 ± 35.1	1.10 ± 0.18
Maíz tierno	8.9	43.0 ± 9.9	271.9 ± 44.0	1.76 ± 0.15
Corn flakes	6.7	-5.3 ± 2.1	147.8 ± 32.8	-0.57 ± 0.29
Polenta	6.9	2.2 ± 3.7	148.8 ± 30.9	0.16 ± 0.34
Opaco-2	6.5	27.6 ± 21.4	274.4 ± 57.2	1.96 ± 0.54
Maicillo blanco	7.4	12.6 ± 6.9	215.4 ± 38.2	0.76 ± 0.34
Maicillo rojo	7.0	11.1 ± 6.3	207.0 ± 30.4	0.78 ± 0.24
Arroz	6.7	28.6 ± 16.4	264.0 ± 38.9	1.78 ± 0.41
Harina de trigo	9.2	12.1 ± 4.3	229.0 ± 31.4	0.64 ± 0.10
Trigo entero	9.5	30.5 ± 4.6	241.6 ± 20.5	1.34 ± 0.12
Frijol negro 20'	9.1	-1.4 ± 4.5	176.5 ± 24.7	-0.10 ± 0.28
Frijol blanco 20'	9.5	15.9 ± 6.2	219.8 ± 30.8	0.74 ± 0.22
Frijol rojo 20'	9.0	-1.1 ± 2.9	168.4 ± 27.3	-0.02 ± 0.19
Cowpea 20'	9.4	22.4 ± 10.0	236.4 ± 22.8	0.99 ± 0.39
Gandul 20'	9.5	25.6 ± 10.4	235.9 ± 39.5	1.19 ± 0.25
Soya	9.1	67.9 ± 7.1	303.1 ± 32.4	2.43 ± 0.39
Harina de soya	8.8	79.5 ± 18.3	360.0 ± 60.1	2.50 ± 0.31
Harina de algodón	8.2	40.6 ± 9.5	350.1 ± 55.2	1.41 ± 0.23
Harina de ajonjolí	9.0	20.3 ± 6.2	228.0 ± 12.9	0.99 ± 0.27
Maíz/Frijol, 87/13	9.1	67.9 ± 7.0	360.1 ± 27.1	2.07 ± 0.16
Maíz/Frijol, 70/30	8.5	72.9 ± 9.3	365.9 ± 32.4	2.31 ± 0.10
Arroz/Frijol, 95/5	7.2	57.8 ± 18.5	355.9 ± 35.8	2.35 ± 0.49
Arroz/Frijol, 80/20	9.1	79.5 ± 12.9	366.4 ± 40.4	2.38 ± 0.25
Gandul/Maíz tierno, 25/75	9.3	58.1 ± 14.0	308.9 ± 40.6	2.00 ± 0.19
Maíz/Frijol, 87/13 + 5% leche	9.6	94.3 ± 9.8	410.3 ± 25.9	2.39 ± 0.16
Maíz/Frijol, 87/13 + 10% carne	9.2	107.9 ± 20.2	398.8 ± 53.1	2.93 ± 0.21
Arroz/Frijol, 95/5 + 5% leche	6.9	70.6 ± 11.2	352.3 ± 32.4	2.90 ± 0.34
Arroz/Frijol, 95/5 + 10% carne	9.1	114.4 ± 10.9	381.8 ± 28.5	3.29 ± 0.20
Maíz/Soya, 70/30	9.1	70.5 ± 12.1	305.3 ± 32.4	2.54 ± 0.19

* Media ± desviación estándar.

CUADRO 9

Resultados del segundo ensayo de NPR (junio)

Ración	Proteína %	Ganancia en peso, g *	Consumo de alimento, g*	NPR *
Caseína	7.4	17.4± 2.6	83.0± 5.7	4.11 ± 0.32
Caseína	9.2	31.0± 3.1.	97.0± 5.4	4.34 ± 0.26
Arroz[a]	6.5	11.6± 3.3	80.9± 9.9	3.68 ± 0.36
Harina de trigo[a]	8.7	5.6± 2.7	73.3± 8.3	2.09 ± 0.33
Gandul 20'[a]	9.2	6.5± 4.1	68.6±11.2	2.23 ± 0.51
Frijol rojo 20'[a]	9.1	1.0± 2.3	59.8± 4.5	1.61 ± 0.44
Frijol blanco 20'[a]	9.0	7.0± 2.9	66.0± 7.1	2.48 ± 0.40
Frijol negro 20'[a]	9.1	1.0± 2.7	58.1± 6.0	1.62 ± 0.43
Cowpea 20'[a]	9.1	5.3± 1.8	68.5±11.1	2.10 ± 0.20
Cowpea 10'[b]	9.0	8.1± 2.6	78.3± 8.9	2.27 ± 0.36
Frijol negro 30'[b]	9.0	1.4± 3.3	67.6± 6.9	1.47 ± 0.45
Frijol blanco 30'[b]	8.7	3.3± 3.2	66.0± 6.3	1.90 ± 0.46
Soya íntegra[a]	8.9	18.8± 9.4	88.0±11.9	3.86 ± 0.45
Harina de soya[a]	8.7	26.6± 7.1	98.9±11.8	3.97 ± 0.47
Harina de algodón	8.7	12.8± 4.2	92.8± 7.9	2.50 ± 0.43
Dieta Libre de Nitrógeno	0.6	-7.8± 2,1	46.4± 8.3	

* Media ± desviación estándar

a) Corresponden a la misma muestra utilizada en el primer ensayo

b) Corresponden a las mismas muestras utilizadas en el primer ensayo sólo que sometidas a diferentes condiciones de procesamiento como se indica.

CUADRO 10

Resultados del segundo ensayo de PER (junio)

Ración	Proteína %	Ganancia en peso, g *	Consumo de alimento, g*	PER *
Caseína	7.4	38.9± 8.3	226.1± 76.8	2.09 ± 0.28
Caseína	9.2	73.6±12.5	309.0± 29.1	2.57 ± 0.22
Arroz[a]	6.5	31.5± 6.8	241.9± 33.4	1.99 ± 0.20
Harina de trigo[a]	8.7	17.4± 5.1	202.3± 30.1	0.98 ± 0.22
Gandul 20'[a]	9.2	23.8± 8.2	210.9± 36.3	1.21 ± 0.30
Frijol rojo 20'[a]	9.1	2.4± 2.5	166.0± 24.2	0.16 ± 0.17
Frijol blanco 20'[a]	9.0	21.3± 7.6	191.4± 18.9	1.21 ± 0.36
Frijol negro 20'[a]	9.1	3.8± 4.3	152.3± 15.1	0.25 ± 0.28
Cowpea 20'[a]	9.1	19.3± 5.7	197.4± 34.3	1.09 ± 0.23
Cowpea 10'[b]	9.0	28.5± 9.7	237.1± 53.6	1.32 ± 0.23
Frijol negro 30'[b]	9.0	4.4± 4.9	164.9± 16.4	0.29 ± 0.36
Frijol blanco 30'[b]	8.7	14.4± 6.6	196.6± 32.1	0.81 ± 0.28
Soya íntegra[a]	8.9	62.1±11.2	280.3± 32.0	2.48 ± 0.20
Harina de soya[a]	8.7	79.9±20.9	333.6± 43.9	2.72 ± 0.36
Harina de algodón	8.7	34.4± 8.5	281.9± 11.5	1.38 ± 0.30

*Media ± desviación estándar

a) Corresponden a la misma muestra utilizada en el primer ensayo (mayo)

b) Corresponden a las mismas muestras utilizadas en el primer ensayo sólo que sometidas a diferentes condiciones de procesamiento como se indica.

CUADRO 11

Digestibilidad aparente *in vivo*- Primer ensayo

Ración	Digestibilidad proteica aparente, % Media ± desviación estándar
Caseína	90.7 ± 1.2
Maíz común	83.0 ± 3.3
Maíz tierno	78.6 ± 2.4
Corn flakes	72.0 ± 4.7
Polenta	86.5 ± 1.9
Opaco-2	80.3 ± 2.3
Maicillo blanco	80.6 ± 3.3
Maicillo rojo	77.4 ± 6.3
Arroz	86.0 ± 2.8
Harina de trigo	90.7 ± 2.5
Trigo entero	81.6 ± 2.7
Frijol negro 20'	73.2 ± 4.0
Frijol blanco 20'	74.1 ± 7.0
Frijol rojo 20'	71.2 ± 4.5
Cowpea 20'	80.0 ± 2.0
Gandul 20'	76.4 ± 3.6
Soya íntegra	80.5 ± 3.0
Harina de soya	83.0 ± 1.7
Harina de algodón	76.9 ± 4.4
Harina de ajonjolí	84.4 ± 1.9
Maíz/frijol 87/13	82.6 ± 2.2
Maíz/frijol 70/30	79.2 ± 2.1
Arroz/frijol 95/5	82.3 ± 2.4
Arroz/frijol 80/20	80.0 ± 2.1
Gandul/maíz tierno 25/75	76.9 ± 2.5
Maíz/frijol 87/13+5% leche	82.3 ± 1.9
Maíz/frijol 87/13+10% carne	86.1 ± 1.2
Arroz/frijol 95/5+5% leche	81.5 ± 1.4
Arroz/frijol 95/5+10% carne	86.3 ± 1.7
Maíz/soya 70/30	79.5 ± 2.5

CUADRO 12

Digestibilidad aparente in vivo - Segundo ensayo

Ración	Digestibilidad proteica aparente, % Media ± desviación estándar
Caseína	87.7 ± 3.1
Caseína	91.4 ± 0.6
Arroz	81.9 ± 3.5
Harina de trigo	89.4 ± 1.0
Gandul 20'	73.7 ± 4.2
Frijol rojo 20'	69.0 ± 7.5
Frijol blanco 20'	71.4 ± 4.1
Frijolnnegro 20'	72.5 ± 7.5
Cowpea 20'	76.0 ± 2.1
Cowpea 10'	74.3 ± 2.5
Frijol negro 30'	68.2 ± 3.2
Frijol blanco 30'	75.4 ± 5.2
Soya íntegra	78.0 ± 1.7
Harina de soya	79.7 ± 2.9
Harina de algodón	73.4 ± 4.0

CUADRO 13

Correlación y Reproducibilidad de Ensayos Biológicos Convencionales.

	n	r	Significancia
A. Correlación entre métodos			
1. PER - NPR (Mayo)	240	0.801	**
2. PER - NPR (Junio)	120	0.919	**
B. Reproducibilidad de métodos			
1. NPR mayo - NPR junio	88	0.835	**
2. PER mayo - PER junio	88	0.915	**
3. Digestibilidad aparente mayo-junio	88	0.744	**

** Altamente significativa, $p < 1\%$.

CUADRO 14

Digestibilidad proteínica aparente *in vivo* y valores de pH a diferentes tiempos (Ensayo multienzimático)

Muestra	Digestibilidad aparente, %		pH		
	Mayo	Junio	10'	15'	20'
1. Caseína	90.7		6.75	6.21	6.16
Cereales					
2. Maíz común	83.0		7.50	6.71	6.74
3. Maíz tierno	78.6		7.58	7.06	6.94
4. Corn flakes	72.0		7.38	6.80	6.62
5. Polenta	86.5		7.11	6.51	6.43
6. Opaco-2	80.3		7.52	6.87	6.74
7. Maicillo blanco	80.6		7.62	6.95	6.91
8. Maicillo rojo	77.4		7.64	7.12	6.97
9. Arroz	86.0	81.9	7.16	6.44	6.40
10. Harina de trigo	90.7	89.4	6.95	6.34	6.22
11. Trigo entero	81.6		7.11	6.54	6.45
Leguminosas					
12. Frijol negro 20'	73,2	72.5	7.19	6.60	6.46
13. Frijol blanco 20'	74.1	71.4	7.10	6.52	6.40
14. Frijol rojo 20'	71.2	69.0	7.28	6.65	6.49
15. Cowpea 20'	80.0	76.0	7.13	6.52	6.42
16. Gandul 20'	76.4	73.7	7.16	6.59	6.47
17. Cowpea 10'		74.3	7.06	6.52	6.40
18. Frijol negro 30'		68.2	7.19	6.64	6.57
19. Frijol blanco 30'		75.4	7.12	6.57	6.50
Oleaginosas					
20. Soya íntegra	80.5	78.0	6.96	6.37	6.31
21. Harina de soya	83.0	79.7	6.92	6.34	6.22
22. Harina de algodón	76.9	73.4	7.06	6.41	6.31
23. Harina de ajonjolí	84.4		7.40	6.85	6.79
Mezclas					
24. Maíz/frijol 87/13	82.6		7.22	6.88	6.61
25. Maíz/frijol 70/30	79.2		7.19	6.67	6.64
26. Arroz/frijol 95/5	82.3		7.12	6.58	6.51
27. Arroz/frijol 80/20	80.0		7.13	6.65	6.57
28. Maíz/frijol 87/13 + 5% leche	82.3		7.20	6.72	6.67
29. Maíz/frijol 87/13 + 10% carne	86.1		7.15	6.67	6.65
30. Arroz/frijol 95/5 + 5% leche	81.5		6.95	6.48	6.39

Continuación Cuadro 14

Muestra	Digestibilidad aparente, % *		pH		
	Mayo	Junio	10'	15'	20'
31. Arroz/frijol 95/5 + 10% carne	86.3		6.93	6.40	6.34
32. Gandul/maíz tierno 25/75	76.9		7.47	6.97	6.90
33. Maíz/soya 70/30	79.5		7.20	6.62	6.55

* Valores promedio de 8 ratas.

CUADRO 15

Ecuaciones de regresión entre el pH a diferentes tiempos y la digestibilidad proteínica aparente *in vivo* incluyendo todas las muestras evaluadas

Variables[a]	Ecuación	r	Significancia
A. Mayo (n = 30)			
1. pH a los 10'	y = 146.177 - 9.078 x	-0.418	*
2. pH a los 15'	y = 142.119 - 9,253 x	-0.421	*
3. pH a los 20'	y = 125.240 - 6.795 x	-0.308	N.S.
B. Junio (n = 14)			
1. pH a los 10'	y = 354.530 - 39.249x	-0.791	**
2. pH a los 15'	y = 372.259 - 45.606x	-0.868	**
3. pH a los 20'	y = 367.920 - 45.604x	-0.804	**

a) y = % digestibilidad proteínica aparente *in vivo*
x = pH a diferentes tiempos
b) N. S. = no significativa
* = P < 5%
** = P < 1%

CUADRO 16

Ecuaciones de regresión entre pH a diferentes tiempos y la digestibilidad proteínica aparente *in vivo* por grupos de muestras

Grupo	Ecuación de regresión	r	Significancia[c]
Cereales (n=11)	y = 187.976 - 14.446(pH 10')	-0.765	**
	y = 185.526 - 15.410(pH 15')	-0.814	**
	y = 181.106 - 14.946(pH 20')	-0.751	**
Cereales sin corn flakes (n=10)	y = 182.396 - 13.553(pH 10')	-0.904	**
	y = 178.208 - 14.183(pH 15')	-0.940	**
	y = 180.153 - 14.647(pH 20')	-0.930	**
Leguminosas (n=6)	y = 337.653 - 36.619(pH 10')	-0.945	**
	y = 357.249 - 42.924(pH 15')	-0.954	**
	y = 422.479 - 53.887(pH 20')	-0.928	**
Cereales más Leguminosas (n=16)	y = 156.591 - 10.528(pH 10')	-0.440	NS
	y = 160.772 - 12.121(pH 15')	-0.500	*
	y = 142.624 - 9.537(pH 20')	-0.381	NS
Cereales más Oleaginosas (n=15)	y = 151.927 - 9.637(pH 10')	-0.554	*
	y = 148.591 - 10.015(pH 15')	-0.574	*
	y = 141.630 - 9.089(pH 20')	-0.509	NS
Cereales + Oleaginosas sin harina de algodón (n=14)	y = 161.109 - 10.833(pH 10')	-0.640	*
	y = 168.322 - 12.964(pH 15')	-0.655	*
	y = 153.725 - 10.852(pH 20')	-0.616	*
Cereales sin corn flakes + Oleaginosas sin harina de algodón (n=13)	y = 154.081 - 9.766(pH 10')	-0.716	**
	y = 151.936 - 10.333(pH 15')	-0.747	**
	y = 150.818 - 10.292(pH 20')	-0.729	**
Cereales+ Oleaginosas + Leguminosas (n=20)	y = 139.594 - 8.198(pH 10')	-0.371	NS
	y = 139.575 - 8.946(pH 15')	-0.402	NS
	y = 123.389 - 6.598(pH 20')	-0.292	NS
Mezclas (n=11)	y = 202.256 - 16.823(pH 10')	-0.807	**
	y = 189.081 - 16.139(pH 15')	-0.801	**
	y = 181.729 - 15.163(pH 20')	-0.757	**

Continuación Cuadro 16

Grupo[a]	Ecuación de regresión[b]	r	Significancia[c]
Cereales más	y = 171.463 - 12.355(pH 10')	-0.678	**
Mezclas	y = 194.720 - 16.960(pH 15')	-0.778	**
(n=21)	y = 173.947 - 13.918(pH 20')	-0.705	**
Cereales más	y = 164.146 - 11.285(pH 10')	-0.715	**
Mezclas sin	y = 172.489 - 13.497(pH 15')	-0.819	**
corn flakes	y = 172.199 - 13.592(pH 20')	-0.804	**
(n=20)			
Cereales más	y = 150.850 - 9.557(pH 10')	-0.546	**
Mezclas más	y = 147.614 - 9.879(pH 15')	-0.566	**
Oleaginosas	y = 142.858 - 9.282(pH 20')	-0.514	**
(n=25)			
Cereales sin			
corn flakes,	y = 149.025 - 9.214(pH 10')	-0.619	**
Oleaginosas	y = 150.770 - 10.250(pH 15')	-0.684	**
sin harina de	y = 151.017 - 10.412(pH 20')	-0.673	**
algodón, Mez-			
clas (n=23)			

a) Cada grupo incluye en el cálculo de la ecuación de regresión a la proteína control: caseinato de sodio ANRC

b) x = pH a diferentes tiempos (10, 15 ó 20 minutos)
y = % de digestibilidad proteínica aparente

c) NS= no significativa
* = significativa, P < 5%
**= altamente significativa, P < 1%

CUADRO 17

Digestibilidad proteínica aparente *in vivo* y valores de pH a diferentes tiempos para muestras de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) del germoplasma del CIAT.

Muestra	Digestibilidad aparente *in vivo* % *	pH		
		10'	15'	20'
1. Caseinato de sodio	90.7	6.75	6.21	6.16
2. P-757 Porrillo 1 (N) **	72.7	7.34	6.69	6.59
3. P-459 Jamapa (N)	71.5	7.24	6.59	6.46
4. P-302 PI-309-804 (N)	71.4	7.25	6.68	6.55
5. P-458 Ica Tui (N)	68.7	7.25	6.64	6.51
6. P-566 Porrillo sintético (N)	73.3	7.26	6.60	6.49
7. P-498 Puebla 152 (N)	66.6	7.45	6.74	6.58
8. P-560 51051 (N)	71.0	7.27	6.58	6.47
9. P-675 Ica Pijao (N)	74.5	7.16	6.52	6.42
10. P-539 Venezuela 2 (N)	68.6	7.33	6.58	6.43
11. P-512 S 166 AN (N)	71.6	7.11	6.50	6.37
12. P-402 Brasil 2 (C)	72.1	7.40	6.75	6.59
13. P-524 S630 BC 63 (C)	73.7	7.16	6.54	6.39
14. P-758 Puebla 152 (C)	66.4	7.44	6.72	6.55
15. P-755 Pompadour (R)	72.1	7.40	6.71	6.56
16. P-392 Sanilac (B)	76.7	7.37	6.69	6.51
17. P-756 Ex Rico (B)	76.3	7.33	6.61	6.46
18. P-643 Nep-2 (B)	77.4	7.34	6.48	6.43

* Valores obtenidos por Linares y de Bosque (60).

** La letra entre paréntesis indica el color de la testa: (N)= negro, (C)= café, (R)= rojo, (B)= blanco.

CUADRO 18

Ecuaciones de regresión entre el pH a diferentes tiempos y la digestibilidad proteínica aparente *in vivo* de las leguminosas

Ecuación de regresión[a]	r	Significancia[b]
A. *Phaseolus vulgaris* del germoplasma del CIAT (n=18)		
1. y = 252.777 - 24.721(pH 10')	-0.740	**
2. y = 289.677 - 32.811(pH 15')	-0.781	**
3. y = 323.520 - 38.689(pH 20')	-0.745	**
B. *Phaseolus vulgaris* del germoplasma del CIAT agrupados por color		
I. *Negros* (n=11)		
1. y = 308.964 - 32.716(pH 10')	-0.923	**
2. y = 338.550 - 40.418(pH 15')	-0.895	**
3. y = 356.233 - 43.896(pH 20')	-0.826	**
II. *Cafés* (n=4)		
1. y = 305.399 - 31.955(pH 10')	-0.967	**
2. y = 337.978 - 40.008(pH 15')	-0.948	**
3. y = 393.899 - 49.541(pH 20')	-0.924	**
III. *Blancos* (n=4)		
1. y = 247.352 - 23.213(pH 10')	-0.996	**
2. y = 280.195 - 30.769(pH 15')	-0.929	**
3. y = 359.080 - 43.631(pH 20')	-0.982	**
C. *P. vulgaris* (CIAT) + leguminosas del 2°ensayo (junio), (n=26)		
1. y = 224.537 - 20.960(pH 10')	-0.661	**
2. y = 287.781 - 32.586(pH 15')	-0.763	**
3. y = 313.342 - 37.158(pH 20')	-0.720	**

a) x = pH a diferentes tiempos
y = digestibilidad aparente *in vivo*
b) **= P < 1%

CUADRO 19

Efecto de procesamiento térmico sobre los valores de pH a diferentes tiempos y sobre la digestibilidad proteínica aparente *in vivo*

Muestra	Lisina disponible, g/16 g N	Digestibilidad ap. *in vivo*, %	pH 10'	pH 15'	pH 20'
Caseinato de sodio	-----	90.2	6.75	6.21	6.16
Opaco-2	4.67	79.3	7.50	6.78	6.70
Opaco-2 20.5'[a]	3.62	74.8	7.39	6.76	6.65
Opaco-2 26'	2.76	48.9	7.56	6.98	6.83
Corn flakes	2.12	72.0	7.38	6.80	6.62
Pan secado al aire	2.23	86.5	6.96	6.31	6.19
Pan tostado +[b]	1.90	86.6	7.02	6.33	6.22
Pan tostado ++	1.28	82.3	7.08	6.38	6.25
Harina de algodón M-J[c]	3.33	66.5	7.20	6.49	6.38
Harina de algodón INCAP[d]	4.45	83.0	7.21	6.51	6.40
Harina de algodón NAISA[c]	3.09	69.8	7.13	6.43	6.32

a) Indica tiempo de tostación
b) Indica grado de tostación
c) Proveniente de proceso de prensa
d) Extraída por solvente y lavada con acetona.

CUADRO 20

Ecuaciones de regresión entre pH a diferentes tiempos, digestibilidad proteínica aparente *in vivo* y lisina disponible en muestras procesadas

Ecuación de regresión	r	Significancia[a]
A. (x= pH; y= digestibilidad aparente *in vivo*)		
1. *Todas las muestras* (n=11)		
y = 328.364 - 35.004(pH 10')	-0.720	*
y = 309.072 - 35.564(pH 15')	-0.744	**
y = 311.379 - 36.556(pH 20')	-0.717	*
2. *Pan* (n=3)		
y = 360.172 - 43.404(pH 15')	-0.959	*
B. (x= lisina disponible en g/16 g N., y= pH 15')		
1. *Pan* (n=3)		
y = 6.474 - 0.075 x	-0.997	*

a) * = P < 5%
** = P < 1%

CUADRO 21

Ecuaciones de regresión a utilizar para los diferentes grupos de muestras

Grupo de muestras	Ecuación[b]
I. Cereales y Oleaginosas (sin procesar[a]) y Mezclas	y = 150.770 - 10.250 x
II. Leguminosas	y = 287.781 - 32.586 x
III. Cereales y Oleaginosas procesadas	y = 309.072 - 35.564 x

a) corn flakes y harina de algodón
b) y = digestibilidad aparente in vitro
x = pH a los 15 minutos.

CUADRO 22

Digestibilidad aparente *in vitro* y su comparación con el valor *in vivo* - Grupo I [a]

Muestra	pH 15'	Digestibilidad aparente, % *in vitro*	Digestibilidad aparente, % *in vivo*	Diferencia [b,c]
1. Caseína	6.21	87.1	90.7	3.6
Cereales				
2. Maíz común	6.71	82.0	83.0	1.0
3. Maíz tierno	7.06	78.4	78.6	0.2
4. Polenta	6.51	84.0	86.5	2.5
5. Opaco-2	6.87	80.3	80.3	0.0
6. Maicillo blanco	6.95	79.5	80.6	1.1
7. Maicillo rojo	7.12	77.8	77.4	-0.4
8. Arroz	6.44	84.8	86.0	1.2
9. Harina de trigo	6.34	85.8	90.7	4.9
10. Trigo entero	6.54	83.7	81.6	-2.1
Oleaginosas				
11. Soya íntegra	6.37	85.5	80.5	-5.0
12. Harina de soya	6.34	85.8	83.0	-2.8
13. Harina de ajonjolí	6.85	80.5	84.4	3.9
Mezclas				
14. Maíz/frijol 87/13	6.88	80.3	82.6	2.3
15. Maíz/frijol 70/30	6.67	82.4	79.2	-3.2
16. Arroz/frijol 95/5	6.58	83.3	82.3	-1.0
17. Arroz/frijol 80/20	6.65	82.6	80.0	-2.6
18. Maíz/frijol 87/13 + 5% leche	6.72	81.9	82.3	0.4
19. Maíz/frijol 87/13 + 10% carne	6.67	82.4	86.1	3.7
20. Arroz/frijol 95/5 + 5% leche	6.48	84.4	81.5	-2.9
21. Arroz/frijol 95/5 + 10% carne	6.40	85.2	86.3	1.1
22. Gandul/maíz tierno 25/75	6.97	79.3	76.9	-2.4
23. Maíz/soya 70/30	6.62	82.9	79.5	-3.4

a) Cereales sin corn flakes, oleaginosas sin harina de algodón, mezclas, Ecuación I en el Cuadro 21.
b) Dig. *in vivo* - Dig. *in vitro*
c) Promedio de las diferencias = 0.004; d.e.= 2.727; e.e.=0.569

CUADRO 23

Digestibilidad aparente *in vitro* y su comparación con el valor *in vivo* - Grupo II[a]

Muestra	pH 15'	Digestibilidad aparente, %		Diferencia[b,c]
		in vitro	*in vivo*	
1. Caseína	6.21	85.4	90.7	5.3
Frijoles del CIAT				
2. P-757 Porrillo 1	6.69	69.8	72.7	2.9
3. P-459 Jamapa	6.59	73.0	71.5	-1.5
4. P-302 PI-309-804	6.68	70.1	71.4	1.3
5. P-458 Ica Tuí	6.64	71.4	68.7	-2.7
6. P-566 Porrillo sintético	6.60	72.7	73.3	0.6
7. P-498 Puebla 152	6.74	68.2	66.6	-1.4
8. P-560 51051	6.58	73.4	71.0	-2.4
9. P-675 Ica Pijao	6.52	75.3	74.5	-0.8
10. P-539 Venezuela 2	6.58	73.4	68.6	-4.8
11. P-512 S 166 AN	6.50	76.0	71.6	-4.4
12. P-402 Brasil 2	6.75	67.8	72.1	4.3
13. P-524 S 630 BC 63	6.54	74.7	73.7	-1.0
14. P-758 Puebla 152	6.72	68.8	66.4	-2.4
15. P-755 Pompadour	6.71	69.1	72.1	3.0
16. P-392 Sanilac	6.69	69.8	76.7	6.9
17. P-756 Ex Rico	6.61	72.4	76.3	3.9
18. P-643 Nep-2	6.48	76.6	77.4	0.8
Muestras ensayo junio				
19. Frijol negro 20'	6.60	72.7	72.5	-0.2
20. Frijol blanco 20'	6.52	75.3	71.4	-3.9
21. Frijol rojo 20'	6.65	71.1	69.0	-2.1
22. Cowpea 20'	6.52	75.3	76.0	0.7
23. Gandul 20'	6.59	73.0	73.7	0.7
24. Cowpea 10'	6.52	75.3	74.3	-1.0
25. Frijol negro 30'	6.64	71.4	68.2	-3.2
26. Frijol blanco 30'	6.57	73.7	75.4	1.7

a) Leguminosas, Ecuación II en el Cuadro 21.
b) Dig. aparente *in vivo* - Dig. aparente *in vitro*
c) Promedio de las diferencias = .012; d.e.= 3.042; e.e.= 0.597

CUADRO 24

Digestibilidad aparente *in vitro* y su comparación con el valor *in vivo* - Grupo III[a]

	Muestra	pH 15'	Digestibilidad aparente, %		Diferencia[b,c]
			in vitro	*in vivo*	
1.	Caseína	6.21	88.2	90.2	2.0
2.	Opaco-2	6.78	67.9	79.3	11.4
3.	Opaco-2, 20.5'	6.76	68.7	74.8	6.1
4.	Opaco-2, 26'	6.98	60.8	48.9	-11.9
5.	Corn flakes	6.80	67.2	72.0	4.8
6.	Pan secado al aire	6.31	84.7	86.5	1.8
7.	Pan tostado +	6.33	84.0	86.6	2.6
8.	Pan tostado ++	6.38	82.2	82.3	0.1
9.	Harina de algodón M-J	6.49	78.3	66.5	-11.8
10.	Harina de algodón INCAP	6.51	77.6	83.0	5.4
11.	Harina de algodón NAISA	6.43	80.4	69.8	-10.6

a) Cereales y Oleaginosas procesadas, Ecuación III en el Cuadro 21
b) Digestibilidad aparente *in vivo* - Dig. aparente *in vitro*
c) Promedio de las diferencias = -0.009; d.e.= 7.916; e.e.= 2.387

CUADRO 25

Ecuaciones de regresión entre digestibilidad aparente *in vivo* e *in vitro*

Muestras	Ecuación[a]	r	Significancia[b]
GRUPO I (n=23)			
(Cereales, Oleaginosas sin procesar y Mezclas)	y= 0.404 + 0.995 x	0.683	**
GRUPO II (n=26)			
(Leguminosas)	y=-0.010 + 1.000 x	0.762	**
GRUPO III (n =11)			
(Cereales y Oleaginosas procesadas)	y= 0.048 + 0.999 x	0.745	**
Todas las muestras (n=60)	y= 0.036 + 1.000 x	0.838	**

a) x = digestibilidad aparente *in vitro*
   y = digestibilidad aparente *in vivo*
b) **= P < 1%

CUADRO 26

Parámetros Químicos y Biológicos de Calidad Proteínica

Muestra	PER	NPR	Digestibil. in vitro	Score		Indice de AAes		C-PER	Dif.[c,e]
				neto	Correg.[b]	neto	Correg.		
Caseína	2.62	4.44	87.1	92 Az	80.1	99.0	86.2	2.50	0.12
Maíz común	1.10	2.72	82.0	48.5 L	39.8	84.9	69.6	1.23	-0.13
Maíz tierno	1.76	3.70	78.4	62.0 L	48.6	88.8	69.6	1.50	0.26
Corn flakes	-0.57	2.72	67.2	34.5 L	23.2	80.1	53.8	0.38	-0.94
Polenta	0.16	3.17	84.0	52.3 L	43.9	85.5	71.8	1.37	-1.21
Opaco-2	1.96	3.94	80.3	76.5 L	61.4	90.2	72.4	1.87	0.09
Maicillo blanco	0.76	2.93	79.5	36.7 L	29.2	83.0	66.0	0.66	0.10
Maicillo rojo	0.78	3.05	77.5	36.7 L	28.4	83.0	64.3	0.63	0.15
Arroz	1.78	4.05	84.8	69.1 L	58.6	93.8	79.5	1.98	-0.20
Harina de trigo	0.64	2.12	85.8	41.4 L	35.5	85.2	73.1	1.01	-0.37
Trigo entero	1.34	3.00	83.7	55.8 L	46.7	88.1	73.7	1.59	-0.25
Frijol negro 20'[d]	0.25	1.62	72.7	54.3 Az	39.5	91.6	66.6	1.30	-1.05
Frijol blanco 20'[d]	1.21	2.48	75.3	54.3 Az	40.9	91.6	69.0	1.37	-0.16
Frijol rojo 20'[d]	0.16	1.61	71.1	54.3 Az	38.6	91.6	65.1	1.27	-1.11
Cowpea 20'[d]	1.09	2.10	75.3	64.6 Az	48.6	91.8	69.1	1.67	-0.58
Gandul 20'[d]	1.21	2.23	73.0	42.9 Az	31.3	73.8	53.9	0.72	0.49
Cowpea 10'[d]	1.32	2.27	75.3	64.6 Az	48.6	91.8	69.1	1.67	-0.35
Frijol negro 30'[d]	0.29	1.47	71.4	54.3 Az	38.8	91.6	65.4	0.68	-0.39
Frijol blanco 30'[d]	0.81	1.90	73.7	54.3 Az	40.0	91.6	67.5	1.33	-0.52

a. Aminoácido limitante: L-lisina, Az = Azufrados (Met. más Cistina), Tri= Triptofano, Tre= Treonina.
b. Valor neto corregido por % de digestibilidad proteínica in vitro.
c. PER - (C-PER).
d. Resultados del segundo ensayo biológico (junio).
e. Promedio de las diferencias = -0.045, d.e. = 0.514, e.e. = 0.090.

Continuación Cuadro 26

Muestra	PER	NPR	Digestibil. in vitro	Score neto	Score Correg.[b]	Indice de AAes neto	Indice de AAes Correg.[b]	D-PER	Dif.[c,]
Soya	2.43	4.44	85.5	81.1 Az	69.3	97.4	83.3	2.31	0.12
Harina de soya	2.50	3.94	85.8	96.6 Az	82.9	99.6	85.4	2.57	-0.07
Harina de algodón	1.41	3.00	77.6	75.3 Az	58.4	85.7	66.5	1.05	0.36
Harina de ajonjolí	0.99	2.50	80.5	49.6 L	39.9	87.8	70.7	0.93	0.06
Maíz/Frijol, 87/13	2.07	3.02	80.3	71.6 L	57.5	89.4	71.8	1.81	0.26
Maíz/Frijol, 70/30	2.31	3.81	82.4	75.4 Az	62.1	92.2	76.0	1.97	0.34
Arroz/Frijol, 95/5	2.35	4.01	83.3	77.1 L	64.2	95.4	79.5	2.18	0.17
Arroz/Frijol, 80/20	2.38	3.58	82.6	86.6 Az	71.5	96.6	79.8	2.27	0.11
Maíz/Frijol, 87/13 + 5% leche	2.39	3.46	81.9	82.0 L	67.2	94.1	77.1	2.07	0.32
Maíz/Frijol, 87/13 + 10% carne	2.93	4.27	82.4	95.7 Tre	78.8	98.7	81.3	2.29	0.64
Arroz/Frijol, 95/5 + 5% leche	2.90	5.23	84.4	88.5 L	74.7	97.7	82.4	2.17	0.73
Arroz/Frijol, 95/5 + 10% carne	3.29	5.34	85.2	95.0 Tre	80.9	99.4	84.7	2.49	0.80
Gandul/Maíz tierno, 25/75	2.00	3.37	79.3	60.0 Tri	47.6	88.0	69.8	1.56	0.44
Maíz/Soya, 70/30	2.54	4.31	82.9	87.7 Az	72.7	98.0	81.2	2.27	0.27

a. Aminoácido limitante: L-lisina, Az = Azufrados (Met más Cistina), Tri = Triptofano, Tre = Treonina.
b. Valor neto corregido por % de digestibilidad proteínica in vitro.
c. PER - (C-PER).
d. Resultados del segundo ensayo biológico (junio).
e. Promedio de las diferencias = -0.045, d.e. = 0.514, e.e. = 0.090.

CUADRO 27

Coeficientes de correlación entre métodos químicos y biológicos

Comparación	Sin leguminosas (n=25)	Con leguminosas (n=33)
PER - Score	0.916 **	0.884 **
PER - Score corregido[a]	0.919 **	0.906 **
PER - Indice de Aminoácidos Esenciales	0.913 **	0.683 **
PER - Indice de Aminoácidos Esenciales corregido[a]	0.849 **	0.819 **
NPR - Score	0.804 **	0.744 **
NPR - Score corregido[a]	0.813 **	0.799 **
NPR - Indice de Aminoácidos Esenciales	0.838 **	0.553 **
NPR - Indice de Aminoácidos Esenciales corregido[a]	0.748 **	0.767 **
Score - Indice de Aminoácidos Esenciales	0.937 **	0.859 **
Score corregido-Indice de Aminoácidos Esenciales corregido[a]	0.894 **	0.899 **
C-PER - Score	0.934 **	0.929 **
C-PER - Score corregido[a]	0.954 **	0.944 **
C-PER - Indice de Aminoácidos Esenciales	0.960 **	0.872 **
C-PER - Indice de Aminoácidos Esenciales corregido[a]	0.932 **	0.911 **

a) Valor neto corregido por digestibilidad proteínica in vitro
** Correlación, altamente significativa, (P < 1%)

CUADRO 28

Coeficientes de correlación entre el PER y C-PER

Muestras	n	r	Significancia
1. Todas	33	0.871	
2. Muestras con 0.67 < PER *in vivo* < 3.22	27	0.889	**
3. Cereales[a]	11	0.864	**
4. Cereales sin corn flakes y polenta	9	0.946	**
5. Leguminosas[a]	9	0.741	**
6. Leguminosas[b]	8	0.335	NS
7. Oleaginosas[a]	5	0.981	**
8. Oleaginosas[b]	4	0.984	**
9. Cereales + Oleaginosas[a]	15	0.881	**
10. Cereales + Oleaginosas[b]	14	0.857	**
11. Cereales + Oleaginosas[a] sin corn flakes, polenta y harina de trigo	12	0.965	**
12. Cereales + Oleaginosas[a] sin corn flakes y polenta	13	0.953	**
13. Mezclas[a]	11	0.784	**
14. Mezclas[b]	10	0.829	**
15. Cereales + Mezclas[a]	21	0.916	**
16. Cereales + Mezclas[a] sin corn flakes y polenta	19	0.935	**
17. Cereales + Mezclas + Oleaginosas[a]	25	0.907	**
18. Cereales + Mezclas + Oleaginosas[a] sin corn flakes y polenta	23	0.931	**

a) Incluye caseína en el cálculo
b) No incluye caseína en el cálculo

CUADRO 29

Resultados del ensayo exploratorio para modificar el NGI utilizando caseína

Método	Ecuación[a]	r	Significancia[d]
NGI tradicional[b]	y = -1.203 + 4.336 x	0.988	**
NGI modificado[b]	y = -1.072 + 4.297 x	0.932	**
NGI modificado[c]	y = -1.071 + 4.296 x	0.949	**

a) x = proteína consumida, g/día
   y = ganancia en peso, g/día
b) Incluye los datos de la dieta libre de nitrógeno
c) No inlcuye los datos de la dieta libre de nitrógeno
d) **= altamente significativa, (P < 5%)

CUADRO 30

Resultados del ensayo de NGI tradicional y NGI modificado

Muestra	NPR[a]	NGI tradicional				NGI modificado			
		Intercepto[b]		Pendiente		Intercepto[b]		Pendiente	
		con 0[c]	sin 0	con 0[c]	sin 0	con 0[c]	sin 0	con 0[c]	sin 0
1. Caseína	4.42	-1.024	-0.848	3.98	3.78	-0.830	-0.722	5.07	4.95
2. Caseína + 0.3% DL-metionina	4.60	-0.802	-0.613	4.66	4.46	-0.717	-0.508	5.26	5.07
3. Harina de soya	3.88	-0.899	-0.828	3.74	3.65	-0.968	-0.939	4.49	4.45
4. Harina de algodón	2.60	-0.785	-0.652	2.51	2.37	-0.530	-0.398	2.59	2.39
5. Harina de algodón+ 0.3% L-lisina HCl	3.18	- 1.008	-1.024	3.12	3.14	-0.872	-0.785	3.51	3.35
6. Maíz	2.64	-0.848	-0.717	2.37	2.07	-1.102	-1.277	4.22	4.82
7. Frijol	2.50	-0.898	-0.848	2.29	2.22	-0.714	-0.542	2.37	2.06
8. Frijol + 0.3% DL-metionina	3.43	-0.799	-0.598	3.71	3.47	-0.373	-0.428	3.71	3.81
9. Maíz/frijol 70/30	3.02	-0.809	-0.683	3.05	2.90	-0.895	-0.830	3.79	3.70
10. Arroz	4.50	-0.880	-0.725	4.18	3.85	-1.350	-1.977	6.45	8.06
11. Trigo	2.51	-0.713	-0.528	2.42	2.14	-0.745	-0.577	3.19	2.95
12. Triticale	3.17	-0.694	-0.485	2.61	2.31	-0.748	-0.549	3.02	2.70

a) Calculado de la dieta al 10% de proteína excepto en el maíz al 8% y en arroz al 6%
b) Intercepto sobre el eje de las ordenadas, i.e. cuando nitrógeno ingerido = 0
c) Incluyendo los datos de las ratas consumiendo la dieta libre de nitrógeno en el cálculo.

CUADRO 31

Correlaciones encontradas entre métodos biológicos
NGI tradicional, NPR y NGI modificado

Comparación	r	Significancia[a]
A. <u>Todas las muestras (n=12)</u>		
1. NPR - NGI tradicional	0.960	**
2. NPR - NGI modificado [b]	0.761	**
3. NGI trad.[c] - NGI modif.[b]	0.710	
4. NPR - NGI modificado[c]	0.869	**
5. NGI trad.[c] - NGI modificado[c]	0.823	**
6. NGI modif.[c] - NGI modif.[b]	0.971	**
B. <u>Sin arroz y sin maíz (n=10)</u>		
1. NPR - NGI tradicional	0.952	**
2. NPR - NGI modificado[b]	0.936	**
3. NGI trad.- NGI modif.[b]	0.951	**
4. NPR - NGI modificado[c]	0.949	**
5. NGI trad. - NGI modif.[a]	0.941	**
6. NGI modif.[c] - NGI modif.[b]	0.994	**
C. <u>Regresiones entre NGI trad.-NGI modif.</u>[b]		
1. Cereales y caseínas (n=6)	0.655	NS
2. Leguminosas, mezcla y caseínas (n=5)	0.944	*
3. Oleaginosas y caseínas (n=5)	0.961	**

a) NS = no significativa; * significativa (P < 5%); ** altamente significativa (P < 1%)
b) No incluye datos de la DLN en el cálculo
c) Incluye datos de la DLN en el cálculo

CUADRO 32

Efecto de diferentes variables sobre el valor del NGI modificado

Ensayo	Pendiente		Intercepto	
	Con cero	Sin cero	Con Cero	Sin Cero
NGI tradicional 14 días	4.056	NS	3.917	-0.724 NS -0.594
NGI modificado - 2.1. 2-4-6-8-10% 3 d/nivel	5.534	NS	4.872	-1.568 NS -0.886
NGI modificado - 2.2. 4-5-6-8-10% 3 d/nivel	5.575	NS	4.742	-1.700 ** -0.869
NGI modificado - 2.3· 4-6-8-10% 4 d/nivel	5.201	NS	4.320	-1.310 NS -0.322
NGI modificado - 2.4. 10-8-6-4-2% 3 d/nivel	7.151	NS	7.207	-2.787 NS -2.830

a) Fuente de proteína: caseína
N.S.= diferencia entre los dos valores no es significativa
** = diferencia entre los dos valores es altamente significativa (P< 1%).
Prueba Estadística: Comparación de líneas de regresión (96)

CUADRO 33

Comparaciones entre el NGI tradicional y modificado

Comparación[a]	Diferencia estadística entre	
	Pendientes	Interceptos
NGI tradicional con cero vs. NGI modificado 2-4-6-8-10% 3 d/nivel, sin cero	*	NS
NGI modificado 2-4-6-8-10% 3 d/nivel, sin cero vs. NGI modificado 4-6-8-10% 4 d/ nivel, sin cero	NS	NS
NGI modificado 4-5-6-8-10% 3d/nivel, sin cero vs. NGI modificado 2-4-6-8-10% 3 d/nivel, sin cero	NS	NS
NGI modificado 2-4-6-8-10% 3 d/nivel, sin cero vs. NGI modificado 10-8-6-4-2% 3 d/nivel, sin cero	**	NS

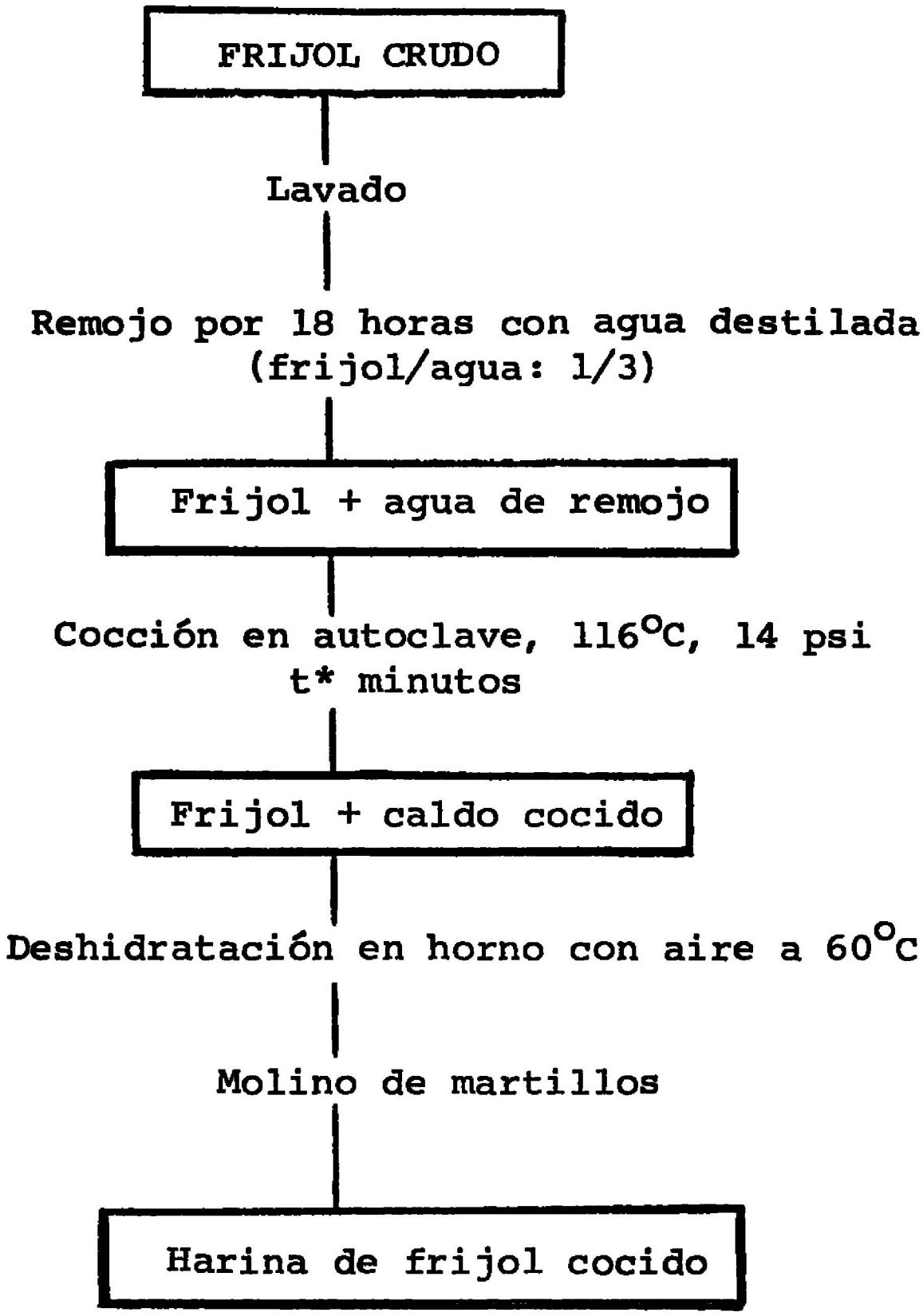
a) Prueba estadística: Comparación de líneas de regresión (96).
NS = diferencia no significativa
* = diferencia significativa, ($P < 5\%$)
** = diferencia altamente significativa, ($P < 1\%$)

CUADRO 34

Proteína de caseína para mantenimiento de peso expresada en gramos/día, calculada de los resultados de los diferentes experimentos.

Experimento	Ensayo biológico	
	NGI tradicional	NGI modificado[a]
1	0.277	0.249
2	0.260	0.146
3	0.178	0.182
Media	0.239	0.192
Desviación estándar	0.053	0.052
Coeficiente de variación,%	22.3	27.1
Media $\pm$ 1 d. e.	0.186 - 0.292	0.140 - 0.244
Media $\pm$ 2 d. e.	0.133 - 0.345	0.088 - 0.296

a) NGI modificado: 2-4-6-8-10% de proteína; 3días/nivel.



* 20 y 30 minutos para Phaseolus vulgaris negro y blanco
20 minutos para P.vulgaris rojo, gandul y soya
10 y 20 minutos para el caupí
30 minutos para 17 variedades de P. vulgaris del CIAT

Figura 1. Preparación de las harinas de leguminosas.

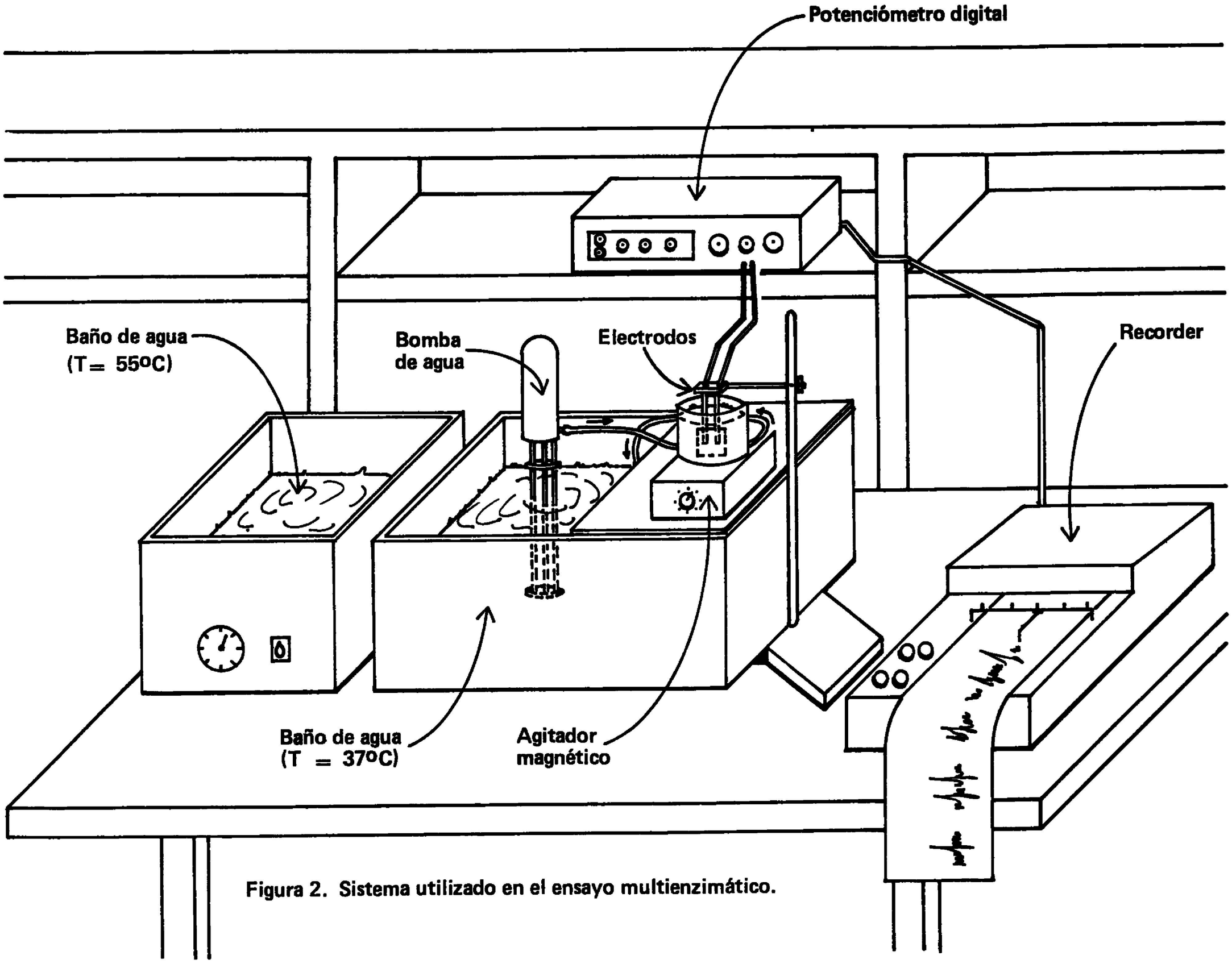


Figura 2. Sistema utilizado en el ensayo multienzimático.

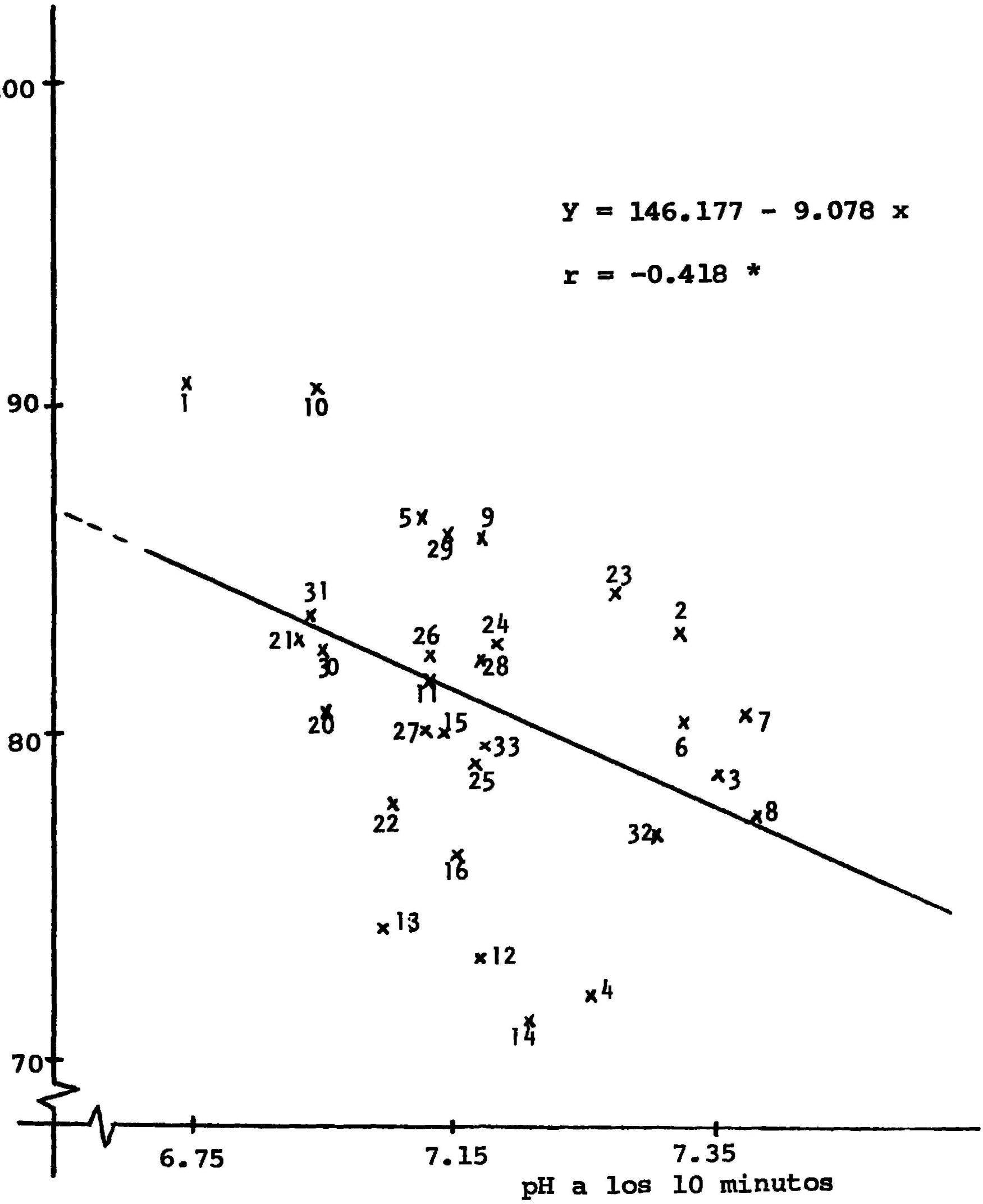


Fig. 3 Línea de regresión entre digestibilidad proteínica aparente in vivo (primer ensayo) y pH a los 10 minutos

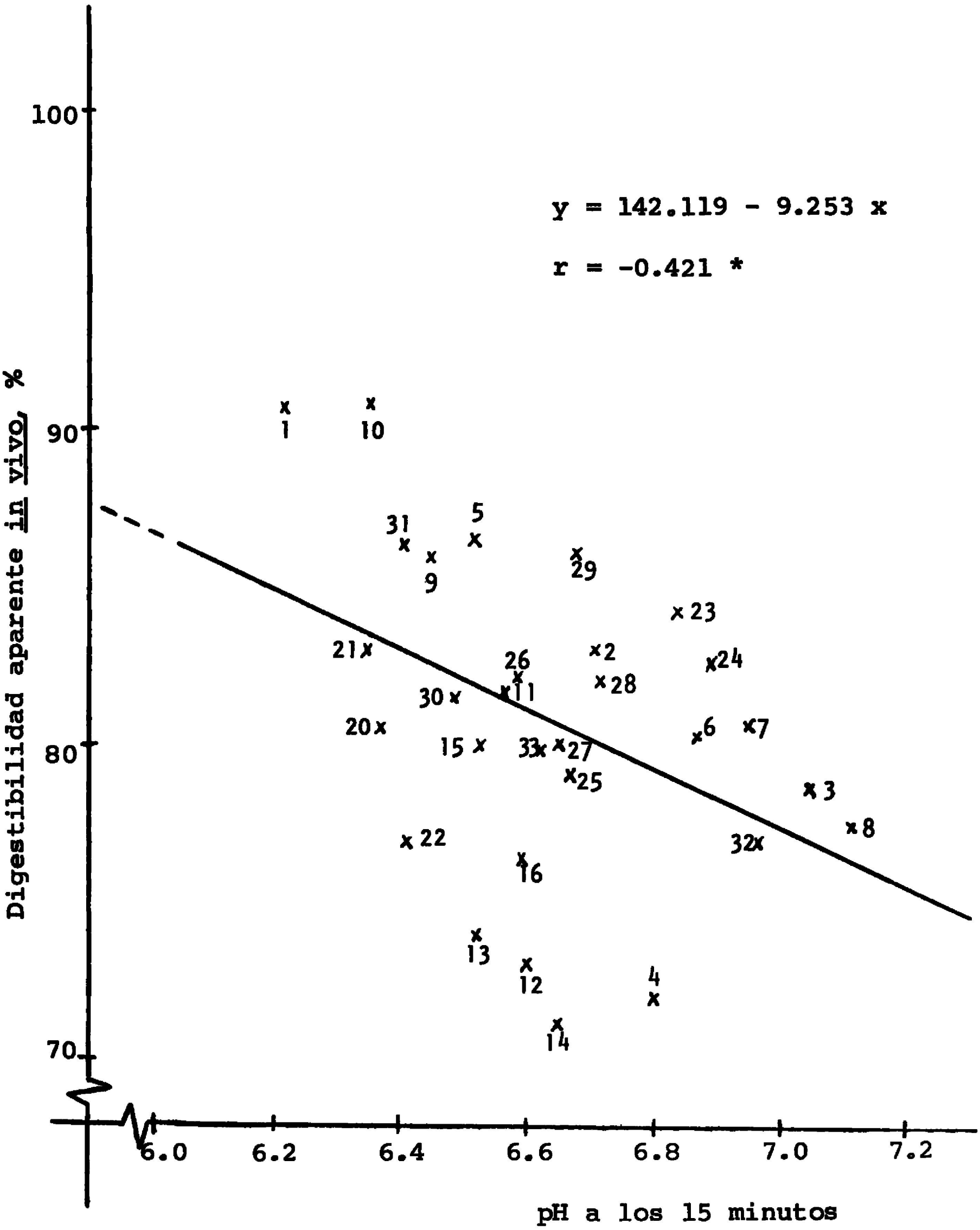


Fig. 4 Línea de regresión entre digestibilidad proteínica aparente *in vivo* (primer ensayo) y pH a los 15 minutos.

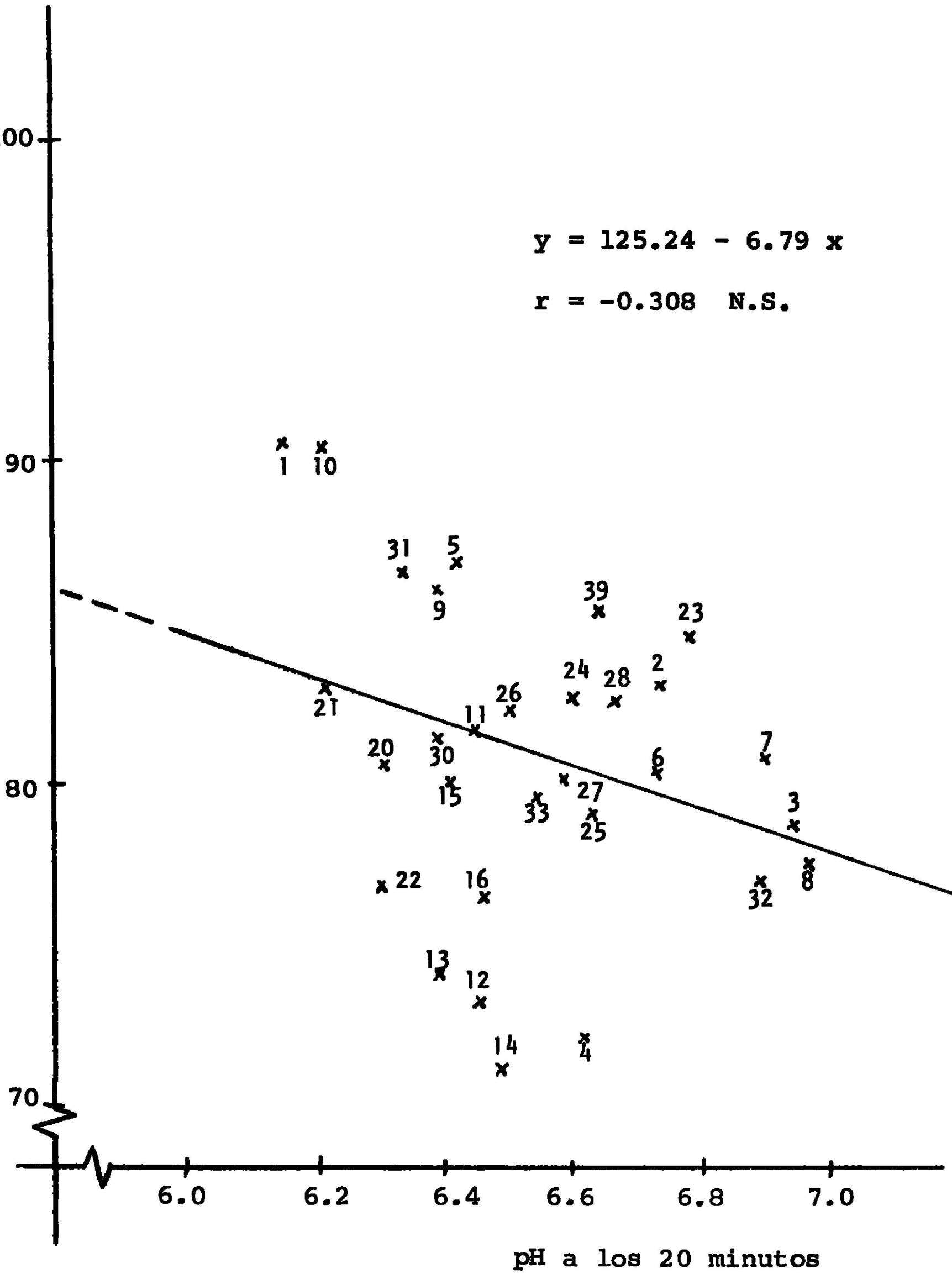


Fig 5. Línea de regresión entre digestibilidad proteínica aparente *in vivo* (primer ensayo) y pH a los 20 minutos

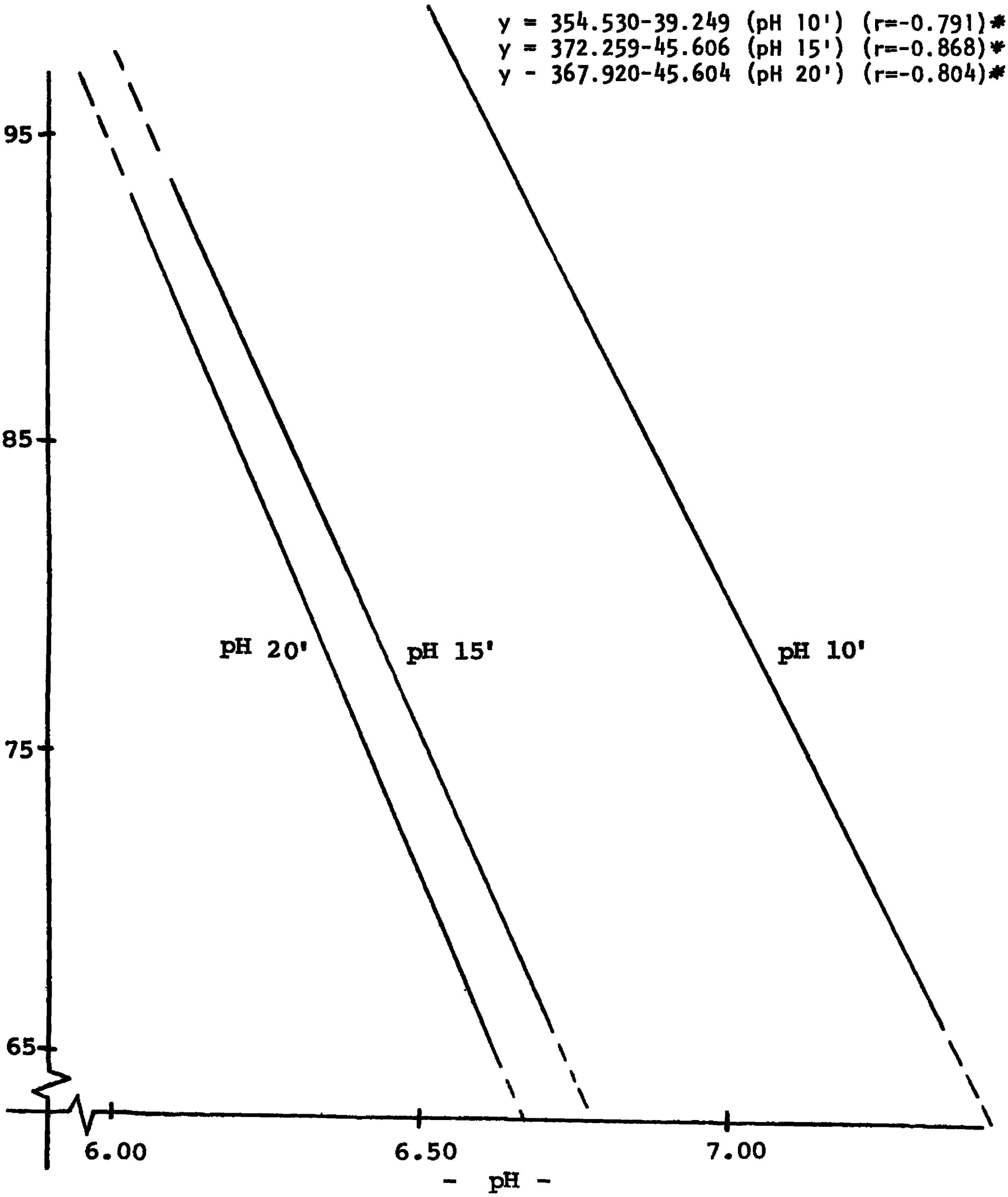


Fig. 6 Líneas de regresión entre digestibilidad aparente *in vivo* y pH a diferentes tiempos

VISTO BUENO

Comité de Tesis

Dr. Ricardo Bressani

Dr. Luiz G. Elías

Dr. Roberto Gómez Brenes

Arlene Wolzak Marcucci

Imprímase:

Dr. José Héctor Aguilar
Decano A.I. de la Facultad de
Ciencias Químicas y Farmacia