

EL HIDROLIZADO
O BIOPROTEOCATENOLIZADO DE PESCADO
PARA USO HUMANO

I.— Preparación, características y análisis bromatológico

PROF. VÍCTOR H. BERTULLO *

“La libertad, no metafísica, sino práctica, está condicionada por las proteínas. La vida será humana a partir del día en que todo el mundo pueda comer a su antojo y todo hombre pueda ejercer su oficio en las condiciones que le convengan.” — J. P. SARTRE.

INTRODUCCIÓN

De Castro (14) al declarar que el hambre parcial o “hambre oculta” en que por falta de determinados elementos nutritivos en sus regímenes habituales, grupos enteros se dejan morir lentamente de hambre, a pesar de comer todos los días; Rao (36) al decir que “existen pruebas suficientes para afirmar que más de la mitad de la población de la tierra está desnutrida o malnutrida”; Lengelle (26), al terminar su comunicación diciendo que “el mejoramiento del nivel alimenticio del hombre no se efectúa sin un aumento proporcional del consumo de proteínas” y que “el hombre tiene tendencia a preferir las proteínas de origen animal y sustituir así las de origen vegetal, de las que disponía anteriormente”; Sen (38); al solicitar a los científicos que traten de acercarse al objetivo de un mundo libre de hambre y malnutrición, como una tarea que “debe ser hecha —puede ser hecha— y será hecha para asegurar la sobrevi-

* Profesor de Tecnología Pesquera. Director del Instituto de Investigaciones Pesqueras. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

vencia de la raza humana", son cuatro ejemplos de los muchos que podríamos dar, sobre la real dimensión del problema del hambre y desnutrición que vive la especie humana.

Las necesidades proteicas van en continuo aumento, porque no sólo es imperativo nutrir ya al cincuenta por ciento de la humanidad subalimentada, sino que a ello debe sumarse el crecimiento vegetativo de la misma, que cada día complica y hace más difícil la solución del problema.

En la actualidad, sólo cosechamos apenas el uno por ciento de los recursos alimenticios obtenibles del mar (36), a pesar de su riqueza proteínico-mineral y a pesar de la afirmación de Mayer (28) al declarar que "la malnutrición proteica es el principal problema alimentario del mundo de la actualidad" representada por la más común y maligna de todas las deficiencias, como lo son el Kwashiorkor y Marasmo (10) y que serían combatidas si en las exigencias proteicas cumplimos con las normas de calidad y cantidad.

Los concentrados proteicos de origen marino, "fish meal" y "fish flour" para alimentación humana, tienen su origen en 1890, cuando el Prof. Waage, intentó producir harina de pescado para uso humano (4), seguidos luego por aquellos efectuados en Islandia en 1931 (23) a base de filetes de bacalao despellejados, desecados por vapor al vacío, pero sin desengrasar y desodorizar el producto final; y los producidos por el Fishing Industry Research Institute de Africa del Sur, en 1937 (15), que sin gusto ni olor fue utilizada en productos de cereales para uso humano. El desengrasado de este producto, fue hecho con etanol como solvente.

Distintos procedimientos tales como extracción por nafta y alcohol de la materia grasa de la harina de pescado o del pescado fresco molido (12); por extracción con solventes azeotrópicos (27), hidrólisis ácida y extracción con etanol (22), marcan la tendencia de obtención de concentrados proteicos que pueden ser mezclados con cereales y constituir así un efectivo ingreso proteico al organismo humano, sin que el hombre lo note y ponga objeciones.

La hidrólisis biológica de productos del mar llevada a cabo por medio de una levadura proteolítica (6), profusamente probada en los animales domésticos (7) con resultados ampliamente satisfactorios, nos llevó a preparar el hidrolizado o bioproteocatenolizado (8) de pescado para uso humano. Como primera etapa, sumarizamos en este trabajo, los resultados obtenidos en lo que se refiere a los incluidos en el subtí-

tulo, encontrándose en progreso en los presentes momentos, la evaluación biológica de la proteína así obtenida, así como también el estudio económico pertinente.

MATERIAL Y METODO

a) En la preparación del producto final, hemos seleccionado como materia prima, la Merluza (*Merluccius merluccius hubbsi*, Marini) así reclasificada por Angelescu, Gneri y Nani (2); por las siguientes razones:

1) Ser una especie muy abundante no sólo en nuestra zona de pesca, sino que se encuentra ampliamente distribuida en el mundo entero. Efectivamente, en América Latina, se captura *Merluccius gayi* (L) y *Merluccius polilepsis* (de Buen) en Chile (1); *Merluccius merluccius hubbsi* (Marini) en Argentina y Uruguay; no haciéndose como *Merluccius gayi* (24) en Perú y *Merluccius merluccius hubbsi* (Marini) y *Merluccius senegalensis* (Cob.) (30) en Brasil.

En América del Norte, puede capturarse en la parte atlántica, *Merluccius bilinearis* (Mitchil) y *Merluccius albidus* (9), y en la pacífica, costa californiana, *Merluccius productus* (Ayles).

En Europa se encuentra, según Le Danois (25), *Merluccius merluccius* (L), con sus razas meridional, del Golfo de Gascuña y Celta, que de acuerdo a Rodríguez y Alvaríño (37) se extienden desde las Islas Faroes al norte, hasta el Ecuador, pescándose también la Merluza negra de Marruecos o *Merluccius senegalensis* (Cob.)

En el hemisferio sur, en Africa del Sur, se encuentra *Merluccius capensis* y *Merluccius gorgi* (30) en la parte pacífica; comprobándose en la zona de Nueva Zelandia la presencia de *Merluccius gayi* (37).

2) Por ser una especie magra, más rica en proteínas que las especies grasas y requerir por ende, un más breve proceso de desengrasado.

3) Porque su captura con arte de trawl (arrastre) no ofrece mayores problemas a los pescadores.

Su amplia distribución geográfica, facilita entonces la comparación de los datos que se obtengan, por tratarse prácticamente de una misma materia prima.

b) Sustituimos la melaza con sacarosa, por las razones siguientes:

1) Evitar la coloración marrón oscura que produce la melaza al mezclarse con el pescado molido.

2) Prevenir la presencia de cualquier producto deletéreo en la misma, que pudiese resultar inconveniente para el ser humano.

3) Facilitar la fermentación con una fuente energética que ha demostrado ser excelente.

c) El pescado utilizado, fue Merluza fresca, seleccionada por sus caracteres organolépticos y conteniendo 1,5 mg. por 100 grs. de carne, de N de Trimetilamina, determinado por el método del Fiskeriministeriets Forsogslaboratorium de Dinamarca (20).

Los espécimen fueron eviscerados, descamados, descabezados, eliminándose las aletas; lavados luego con agua potable, secados con un paño limpio y molidos finamente.

d) Para la fermentación se utilizaron ollas esmaltadas de 20 lts. de capacidad, convenientemente lavadas y esterilizadas.

e) Se adicionaron cantidades representativas de cultivos industriales de *Saccharomyces platensis proteolytica*, n. sp. (6) y la fermentación se llevó a cabo a una temperatura de $37^{\circ} \pm 0,5$ C. durante 72 horas.

f) Terminada la fermentación, el hidrolizado se secó en bandejas en estufa a aire caliente circulante a una temperatura de 38° - 39° C.

g) Los análisis bromatológicos se hicieron de acuerdo a las técnicas oficiales de la A. O. A. C. (3).

h) La proteína soluble fue determinada por extracción a 25° C. (3) y por agua hirviendo a partir de 2 grs. de substancia en 100 mls. de agua destilada. Se tomaron partes alícuotas que fueron concentradas, previa acidulación con ácido sulfúrico.

i) El pH fue tomado con un potenciómetro Beckman, modelo G.

j) Los análisis bacteriológicos (19), se efectuaron a partir de 1 gr. de muestra en 100 mls. de solución fisiológica estéril. Se sembraron 1, 3 y 5 mls. de la dilución en medios de cultivo apropiados, preparados con productos Difco, efectuándose la incubación a 37° C.

k) Las pruebas de toxicidad fueron ejecutadas en ratas y ratones albinos, durante treinta días.

RESULTADOS

La pasta resultante de la mezcla de pescado molido y sacarosa, con un color inicial gris claro, comenzó a mostrar una fermentación evidente al cabo de 4-5 horas al encontrar la levadura una temperatura propicia a su desarrollo.

A las 24 horas era ya evidente comprobar una facie líquida netamente separada de la sólida, constituida por trozos de músculo y hueso molido.

El color tendía hacia un gris cremoso y el olor era el característico del producto durante la hidrólisis proteica (8).

A las 48 horas se presentaron las mismas características notándose el aumento de la facie líquida, la que se hizo más evidente aún a las 72 horas, en que se comprobó que la fermentación había cesado.

El pH final fue de 4,6, habiéndose iniciado con 6,2, bajando a las 24 horas a 5,8 y alcanzando a las 48 horas 5,00.

El producto fue homogeneizado y colocado en capa fina en bandejas de aluminio anodizado que previamente se habían recubierto con un trozo de polietileno, para evitar el pegamiento del producto a sus paredes.

La estufa a aire caliente circulante entre 38-39° C. secó el producto en 48 horas, lapso prolongado pero ya previsto por la circunstancia de que la velocidad del aire es pequeña y el arrastre de humedad lógicamente pobre.

Fundamentalmente, tratamos de trabajar con baja temperatura, similar a aquella que podría obtenerse con equipo de desecación al vacío y que en el momento de la experiencia no poseíamos, para así ajustarnos a los conceptos enunciados por Mrochkov (32).

El hidrolizado seco, molido, se desengrasó en una batería Soxhlet, con isopropanol como solvente, de acuerdo a la recomendación de Parisser (33) y extrayéndose la materia grasa durante 6 horas.

El producto final fue secado a estufa a 37° C. para eliminar los restos del solvente, procediéndose a su remolido y presentando las siguientes características: color blanco amarillento; suave olor a levadura; estado pulverulento homogéneo y límpido.

La investigación de contaminación fue negativa al cabo de 48-72 horas en lo referente a *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*, dando una cuenta bacteriana total de 500 gérmenes aerobios por gr. (19).

Las pruebas de toxicidad del producto, así como también de algún posible remanente del solvente, se investigaron durante treinta días en

ratas y ratones albinos, agregándose en la proporción del 10 % del material en estudio, en el total de la ración.

Los animales se comportaron normalmente durante todo el tiempo, alimentándose con regularidad. La autopsia efectuada en varios especímenes, dio resultado negativo a la observación macroscópica en la apreciación de lesiones anatomopatológicas.

Análisis bromatológico

Procedimos a efectuar el análisis bromatológico del producto antes y después del desengrasado con isopropanol, con los resultados siguientes:

Elemento	Producto sin desengrasar	Producto desengrasado
Nitrógeno	10,64	12,00
Proteína (N \times 6,25)	66,50	75,00
Materia grasa	9,08	0,35
Cenizas	9,30	12,32
Humedad	9,79	5,58
pH	4,90	5,60

En las cenizas del producto final, sólo determinamos calcio y fósforo, obteniéndose los valores que a continuación se expresan:

Calcio como Ca	3,17 %
" " CaO	4,35 %
Fósforo como P ₂ O ₅	5,28 %

La evaluación del nitrógeno solubilizado por la hidrólisis, fue llevado a cabo por los métodos de la A. O. A. C. (3) y por agua hirviendo.

Método	Nitrógeno soluble	Proteína N. soluble	% proteína hidrolizada, en base a proteína bruta, 75 %
A. O. A. C.	4,577	28,69	38,14
Agua hirviendo	5,9276	37,05	49,40

Rendimiento.— A los efectos de sólo tener una idea del rendimiento de la Merluza bajo la forma de hidrolizado seco desengrasado, obtuvimos valores promediales de varias experiencias, todas ellas efectuadas con pescado capturado durante el mes de marzo.

Merluza sin limpiar a Merluza limpia para uso humano	63-67 %
Merluza limpia uso humano a hidrolizado uso humano	25-28 %
Rendimiento de Merluza sin limpiar a hidrolizado seco, desengrasado	16-18 %

Por cada kilo de hidrolizado uso humano desengrasado con una humedad promedio del 6 %, se necesitan de 5,6 a 6,3 kgs. de Merluza fresca.

DISCUSION

El hidrolizado seco, para uso humano, llena a “prima-facie” las exigencias establecidas por FAO, UNICEF y OMS (17) y fundamentalmente las condiciones de producción y utilización de la harina comestible de pescado, en lo relativo a valor nutritivo, toxicidad, aceptabilidad y costo. Si bien aún no hemos determinado el valor biológico del producto —que actualmente se estudia— la experiencia con el hidrolizado húmedo y seco en animales domésticos, principalmente aves y cerdos, nos permiten adelantar la obtención de un valor aceptable.

Llena también el producto, los objetivos marcados por el Bureau of Commercial Fisheries, del U. S. Department of the Interior, según comunicación de Pariser (35), al requerir para su elaboración bajo costo inicial de capitalización, ser económica su fabricación. ser flexible para producción en pequeña y gran escala, etc.

Frente a productos similares obtenidos de harinas de pescado, tiene la ventaja del aprovechamiento total de la proteína utilizada; la hidrólisis que efectúa una predigestión proteica liberando polipéptidos y aminoácidos (6) manteniendo altos niveles de lisina y que en ningún momento la temperatura sobrepasa los 40-42° C. evitando por lo tanto el problema de coagulación y quemado de proteínas como en los preparados denominados “fish flour” o “fish meal” (16), o pérdidas de aminoácidos como sucede en los métodos convencionales de fabricación de harina y que según Mrochkov (32), lleva a una pérdida de N de aminoácidos que varía entre el 13 y 25,5 % y que produce una disminución del nivel de lisina, que probablemente no es el único aminoácido afectado por el tratamiento térmico (11).

Por otra parte, existe un aprovechamiento total de las proteínas hidrosolubles y de los minerales del pescado, que por cocción al vapor dentro de los métodos convencionales, produce pérdidas del 30 % de los iones Cl, Na y K, y del 15 al 25 % de los iones P, Mg, Cu y Fe (29).

La selección del isopropanol como solvente fue efectuada en base a lo recomendado por Pariser (33), Dambergers (13) y Fougere (21).

Morrison (31), en base a los trabajos de Harris y Mattiel, comunica que la cantidad total de N de aminoácidos liberado por digestión pancreática "in vitro", no fue influenciada significativamente por el tratamiento de aquel solvente, así como tampoco fue afectada la disponibilidad de la lisina, por prolongada extracción, aunque estamos de acuerdo con dicho autor cuando afirma que en los presentes momentos no es posible declarar definitivamente que cualquier solvente dado produzca siempre harinas de buena calidad, aunque estimamos, por la experiencia recogida, que nuestro procedimiento da siempre un contenido proteico de buena calidad por las razones que precedentemente hemos expuesto.

Al cabo de seis meses de almacenamiento del producto, no hemos comprobado reversión del olor, como sucede cuando la extracción se efectúa con etanol (15), aunque creemos que en este fenómeno no sólo influye la condición del pescado —magro o graso—, sino que también las ligaduras grasas (31) entre los prótidos y lípidos que luego por posible saturación de las cadenas insaturadas producen el "olor a pescado", lo que podría explicar la reversión del olor denunciada por Dreosti, Merwe y Dreyer (15), que aparece durante el almacenamiento, a veces a los pocos días.

El hecho de trabajarse con un ser organizado como lo es el pescado, en donde los distintos elementos están profundamente correlacionados formando combinaciones a asociaciones aún mal conocidas, agregado a que hasta el presente el ligero "olor a pescado" en las harinas para uso animal no se estimó un inconveniente, hace que la necesidad de prescindir de ese olor o sabor, planteen las interrogantes que se hacen.

Las diferencias anotadas en los análisis del producto seco sin desengrasar y desengrasado, son las lógicas debido a la eliminación de los componentes no proteicos y a una sensible baja de la humedad, que permiten un apreciable aumento de proteínas y cenizas y produciendo en éstas buenos valores de los iones Ca y P, lo que, por otra parte, ratifica lo expresado por Pariser (35).

Los valores obtenidos en la extracción de la proteína *solubilizada* * o hidrolizada, varían según la temperatura utilizada, dando como valor más bajo, la llevada a cabo a 25° C.

Los valores de calcio y fósforo presentan la relación de 1:1,69, aunque ésta es variable según las especies de pescado utilizadas por una parte y la eliminación de importantes fuentes de estos minerales por la otra, en base a la preparación de la materia prima (eliminación de cabeza, aletas y escamas).

Las pruebas de toxicidad indican que tanto la fermentación biológica como el solvente no dejan a "prima-facie" residuo deletéreo perjudicial para los animales de laboratorio.

Las pruebas bacteriológicas dan valores dentro de los propuestos (18) en lo referente a gérmenes aerobios, siendo negativas para *Salmonella spp.* y *Escherichia coli*, hecho que ya conocíamos desde antiguo, por la demostrada acción de la levadura y sus productos de fermentación sobre las bacterias Gram negativas comunes del mucus, branquias e intestino del pescado, que según hemos comprobado, desaparecen totalmente a las 48 horas.

Por otra parte, el desecado y desengrasado a fondo del producto por acción químico-mecánica, ofrece un margen de seguridad que debe mantenerse a toda costa durante el molido, embolsado, almacenamiento y transporte.

Muestras representativas del producto, mantenidas en bolsas de polietileno, durante seis meses, han mostrado a la investigación bacteriológica que la cuenta bacteriana se mantiene en un nivel normal.

Finalmente, el pH pasa del producto en bruto al desengrasado, de 4,9 a 5,8, lo que posiblemente sea debido a cierto arrastre de ácido láctico y probablemente de ácido málico, que efectúa el solvente, así como también a ciertas pérdidas que se producirían durante el secado.

Este punto será estudiado en detalle y hemos de correlacionarlo con la temperatura de secado y el color final que adquiere el hidrolizado seco.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1º) Se estudia desde el punto de vista de su preparación, características y análisis bromatológico, el hidrolizado de pescado para uso

* Entendemos por *proteína solubilizada*, para distinguirla de *proteína soluble*, aquella que por hidrólisis, pasa a integrar la facie acuosa, bajo forma de polipéptidos y aminoácidos.

humano, utilizando como materia prima la Merluza (*Merluccius merluccius hubbsi*), especie muy abundante en la zona del Atlántico sudoccidental y de amplia distribución mundial.

2º) El producto preparado con solo el cuerpo de la Merluza, luego de su hidrólisis, secado y desengrasado, presenta un color blanco amarillento, con leve olor a levadura, pareciendo que no se presenta reversión del olor, luego de seis meses de observación.

3º) Se utiliza como solvente el isopropanol, que parecería ser en los presentes momentos el más apropiado y que no deja trazas de productos deletéreos, lo que fue comprobado por pruebas de investigación toxicológica en ratas y ratones, blancos.

4º) Del 75 % de la proteína bruta que tiene el producto, se ha comprobado una hidrólisis que fluctúa entre el 38 y 49 % de aquélla y que varía según el método utilizado.

5º) La humedad en el hidrolizado seco desengrasado, llega al 5,58 %, la materia grasa al 0,35 % y las cenizas al 12,32 %, de las cuales el 3,17 % es calcio expresado como Ca y el 5,28 % es fósforo, expresado como P_2O_5 .

6º) Las pruebas microbiológicas dieron sólo una cuenta de 500 gérmenes aerobios por gramo de producto y fueron negativas para *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*.

7º) El pH final de producto llegó a 5,80.

8º) Los rendimientos, calculados en base a partidas experimentales y que, por lo tanto, sólo pretenden dar una idea de los mismos, son del orden del 16-18 % de producto seco desengrasado comparado a Merluza sin limpiar, estimándose que para obtener 1 kg. del producto con una humedad promedio del 6 %, se necesitan entre 5,6 a 6,3 kgs. de Merluza fresca.

Agradecimiento.— El autor desea dejar expresa constancia de la ayuda prestada por el Q. F. Sr. Carlos Alvarez en los análisis bromatológicos que se llevaron a cabo.

SUMMARY

1st.) The author studies the fish silage for human consumption, from the point of view of preparation, characteristics and bromatological analysis, using as raw material the Merluza (*Merluccius merluccius hubbsi*) and abundant specimen of South-Occidental Atlantic Sea and of wide world distribution.

2nd.) The product, prepared only with the body of the fish, after hydrolysis, drying and defatting, presents a white-yellowish color, with a slight yeast smell, seeming that it does not present color reversion after six months observation.

3rd.) Isopropanol is used as solvent, seeming to be at the present time, one of the most appropriate, because it does not leave traces of deleterious substances as was shown by toxicological tests in white rats and mice.

4th.) From the 75 % of crude protein of the product, the author found that the hydrolysed protein varies from 38 to 49 % depending of the method of analysis.

5th.) In the dried, defatted fish hydrolysate, humidity is 5,58 %; fat value, 0,35 %; ashes, 12,32 %. In those, Calcium amount, 3,17 % expressed as Ca and Phosphorus 5,28 % expressed as P_2O_5 .

6th.) Microbiological tests gave a value of 500 aerobic germs per gram, being negative for *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*.

7th.) The final pH was of 5,80.

8th.) The yield, calculated on the basis of experimental batches, was of 16-18 % of dried, defatted product. It is estimated that with a humidity of 6 %, there is necessary for obtaining one kg. of product, to process 5,6-6,3 kgs. of raw Hake.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. ADGER SMYTH, J.— *World production and trade in fish meal and oil*. U. S. Dept. of the Interior. Fish & Wildlife Service. Bureau of Comm. Fish. Leaflet, 507; 1961.
2. ANGELESCU, V.; GNERI, F. S. y NANI, A.— *La Merluza del mar argentino*. Biología y Taxonomía. Rep. Argentina, Secret. de Marina. Serv. Hidrog. Naval H. 1004; 1958.
3. A. O. A. C.— *Official Methods of Analysis*. Ninth Ed., 1960.
4. BAKKEN, K.— *Fish flour*. Technological Development in Scandinavia. *FAO Int. Conf. on Fish in Nutr.* Wash. D. C., Sept. 19-27. V. R/V. 2.5: 2.31. 1-11; 1967.
5. BERTULLO, V. H. y PEREZ HETTICH, F.— *Ensilado de pescado*. Variaciones en la fuente energética. *An. Fac. Vet. Montevideo*, VIII (6): 121-132; 1958.
6. -----— *Protein Hydrolysis*. U. S. Patent Off. Nº 3.000.789. Sept. 19, 1961.
7. -----— *Ensilado de pescado en la nutrición animal*. *II Semana del S. E. N. A.*, 7-11 Oct. 1959. Valladolid, 1: 309-312; 1959.

8. BERTULLO, V. H.—Hidrólisis o bioprotecatenólisis de carne de ballena, por medio de una levadura proteolítica. *Rev. Inst. Invest. Pesq., Fac. Vet. de Montevideo*, 1 (1): 7-12; 1962.
9. BIGELOW, H. B. y WELSH, W. W.—Fishes of the Gulf of Maine. *Bull. Bureau of Fish.*, XL (1924). Bureau of Fish. Document N° 965; 1925.
10. BROCK, J. F. y AUTRET, M.—El Kwashiorkor en Africa. *FAO. Estudios de Nutrición*, N° 8; 1951.
11. CREAC'H, P. V.—Role des farines du poisson dans l'alimentation du betail. *Congres des Peches et des Pecheries dans l'Union Française d'outre-mer*, Marseille, 298-307; Oct. 11-14, 1950.
12. BABSCH, V. M.—Description of the Babsch process ("System Daco") for processing fish flour for human consumption. *FAO Div. of Nutr.*, Panel R. 8/add., 4: 1-9; 1957.
13. DAMBERGS, N.—Extractions of fish muscle. 2: Solvent water ratio in extraction of fat and water-solubl. *J. Fish. Re. Bd. Can.*, 16 (1): 63-71; 1959.
14. DE CASTRO, J.—*Geografía del hambre*. Ed. Peuser, Bs. As., Argentina, 1950.
15. DREOSTI, G. M.; MERWE, Van de, R. P. y DREYER, J. J.—Fish flour. Technological Development in South Africa. *FAO Int. Conf. on Fish in Nutr.*, Wash. D. D., Sept. 19-27. V. R./V. 2/3. 34: 1-9; 1961.
16. FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO).—*Reunión Internacional sobre Harina de Pescado*, Roma, 20-29 de marzo. Empleo de concentrados de proteínas de pescado ("fish flour" y "fish meal") para consumo humano, I: 28-34; 1961.
17. ---.—*Reunión Internacional sobre Harina de Pescado*, Roma, 20-29 de marzo. Harina comestible de pescado. Avances y posibilidades. Dirección de Nutrición de FAO, II (Apéndice H): 293-307; 1961.
18. ---.—*Ibid.* Avances y posibilidades. Addendum. Dirección de Nutrición de FAO y Dirección de Conservación de Alimentos de UNICEF, II (Apéndice I): 309-314; 1961.
19. ---.—*Ibid.* Proyecto de informe del grupo de trabajo sobre especificaciones del concentrado proteínico de pescado (Comité B). II (Apéndice J): 315-319; 1961.
20. *Fiskeriministeriets Forsogslaboratorium*, Copenague, Dinamarca. Comunicación personal del Director, 1954.
21. FOUGERE, H.—Fish Flour. Technological Development in Canada. *FAO Int. Conf. on Fish in Nutr.*, Wash. D. C., Sept. 19-27, V. R. V. 2/2.2. 33.1-18; 1961.
22. GUTTMANN, A. y VANDENHEUVEL, F. A.—The production od edible fish protein (fish flour) from Cod and Haddock. *Prog. Rep. Atlant. Coast St. Fish. Re. Bd. Can. Biol. St. St. Andrew, N. B., Can.*, N° 67: 29-32; 1957.
23. HANNESSON, G.—Fish Flour. Technological Development in Iceland. *FAO Int. Conf. on Fish in Nutr.*, Wash. D. C., Sept. 19-27, V. R. V. 2/1: 2.32.1-6; 1961.

24. HILDEBRAND, S. F.— A descriptive Catalogue of the shore fishes of Peru. *U. S. National Museum Bull.*, N° 189; 1946.
25. LE DANOIS, E.— *El Atlántico. Historia y vida de un océano*. 2ª ed. Espasa-Calpe, Argentina, 1945.
26. LENGELLE, M.— L'évolution de besoins en produits azotes d'origine animale dans l'alimentation humaine. *Congres des Peches et Pecheries dans l'Union Française d'Outre-Mer*. Marseille, 12-14 Oct., 278-282; 1950.
27. LEVINE, E.— Fish flour and fish meal by azeotropic solvent processing. *Food Tech.*, 13 (2): 132-136; 1959.
28. MAYER, J.— Fish protein in nutrition and their importance in the prevention of protein malnutrition. *FAO Int. Conf. on Fish in Nutr.*, Wash., D. C., Sept. 19-27, III.R/III.2: 2.2.1-16; 1961
29. Mc CANCE, R. A. y SHIP, H. L.— The chemistry of flesh foods and their losses on cooking. *Med. Res. Council. Sp. Rep., Series N° 187*; 1933
30. *Missao Portuguesa de Pesca no Brasil, Relatorio da.*— Introdução ao estudo das pescas no Brasil. Apendice N° 7. Proyecto preliminar para a prospeção da pescada (*Merluccius spp.*) nos mares do Rio Grande do Sul, I: 285-290; 1956.
31. MORRISON, A. B.— The influence of solvent extraction on the nutritive value of fish protein. *FAO Int. Conf. on Fish in Nutr.*, Wash. D. C., Sept. 19-27, II.R./II.5/4:1.16.1-12; 1961.
32. MROCHKOV, K. A.— Changes in the nitrogenous substances of fish meat during meal preparation. *Technology of fish processing. Nat. Sc. Found.*, 112-128; 1960.
33. PARISER, E. R.— Comunicación personal, 1961.
34. - - - -.— Fish Flour. Technological Development in the United States of America. *FAO Int. Conf. on Fish in Nutr.*, Wash. D. C., Sept. 19-27, V.R/V.2/4:2.35.1-11; 1961.
35. - - - -.— Fish protein Concentrate. A high quality animal Protein. *Comm. Fish. Rev.*, 24 (5): 1-5; 1962.
36. RAO, K. K. P. N.— Food Intake Requirements and Incidence of Malnutrition. *FAO Int. Conf. on Fish in Nutr.*, Wash. D. C., Sept. 19-27, III R/III.1.2.1-12; 1961.
37. RODRIGUEZ, O. y ALVARIÑO, A.— *La Merluza, el Bacalao y especies afines*. Inst. Español de Ocean. Serie Informativa, I; 1959.
38. SEN, B. R.— Problems of food and nutrition. View and Programs of FAO. *Federation Procc.*, 20 (1), Part. III, Supp., 384-386; 1961.