

**Modificaciones de la lignina y formación
de material húmico en el tracto digestivo de los
rumiantes**

*por Eduardo Zorita
Andrés Suárez y
María Luisa Calvo*

1. INTRODUCCION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La lignina constituye, junto con los polisacáridos complejos, el material de sostén vegetal. Su estudio ha sido realizado principalmente desde tres puntos de vista: el de la investigación sobre la madera y sus derivados, que se ha centrado en el problema de su formación y propiedades; el de la ciencia del suelo que versa preferentemente sobre el problema de su descomposición en el suelo y su papel en la formación del humus y en tercer lugar la ciencia de la alimentación animal que ha fijado su atención sobre su digestibilidad.

La bibliografía más extensa se encuentra, quizás, sobre el proceso de la humificación.

Pudiéramos decir que en nutrición se ha estudiado el problema desde el punto de vista cuantitativo y en edafología en su aspecto cualitativo.

A pesar de su persistencia ante los agentes degradativos la química de la lignina ha comprobado innumerables veces que es muy fácilmente modificable; aún empleando los métodos de extracción más suaves⁴⁵ no se ha conseguido aislar lignina que presente las mismas propiedades que la lignina nativa en la planta. Por diversos autores^{45 67 85}

se ha intentado por procedimientos químicos, o biológicos, transformar la lignina aislada en ácidos humínicos sin conseguirlo, lo cual demuestra que aún aislada por procedimientos suaves no continúa siendo tan capaz de reacción como la lignina genuina en la planta.⁴⁵

El proceso de humificación de la lignina se caracteriza por una pérdida de grupos metoxilo, un enriquecimiento en nitrógeno y la liberación de cuerpos fenólicos.^{40 28 74 50}

Por otra parte, como insistiremos más adelante, el proceso de humificación no se circunscribe al suelo. También en el organismo de los animales superiores e inferiores pueden formarse sustancias húmicas, y se han logrado aislar ácidos humínicos de las heces de diversas especies.^{62 63 78 86}

Que una fijación de nitrógeno puede tener lugar en el organismo animal ha sido estudiado por uno de nosotros en la rata en un trabajo previo.⁸⁹ En el presente trabajo se investiga el problema de la fijación del nitrógeno en la lignina y la formación de ácidos humínicos en el transcurso de la digestión en los rumiantes, partiendo del supuesto de que al ser más intensa en estas especies la descomposición de los polisacáridos de acompañamiento y ser su alimentación más rica en sustancias de sostén, una gran cantidad de lignina nativa es "liberada" en el tracto digestivo donde está expuesta por más tiempo a las acciones del medio.

2. DISCUSION DE LA BIBLIOGRAFIA

2.1. LA LIGNINA DESDE EL PUNTO DE VISTA DE LA CIENCIA DEL SUELO

2.1.1. *Estado actual de la investigación sobre la lignina*

Las consideraciones que figuran a continuación tienen el objeto de procurar una visión de conjunto sobre la investigación que durante los últimos años se viene realizando sobre el problema de la lignina. Por lo demás nos remitimos a las revisiones últimamente aparecidas sobre el tema.^{10 87 35}

La lignina se encuentra muy repartida en el reino vegetal y representa un componente primordial del leño en las plantas superiores. Su función consiste en rellenar y fortalecer los espacios intersticiales de la matriz de polisacáridos que constituyen la pared celular. Su acumu-

lación origina la muerte fisiológica del tejido. El contenido en lignina de las diversas especies vegetales es muy variable alcanzando un máximo de un 30 por 100 en las coníferas.

El problema de la unión entre la lignina y los carbohidratos en la pared celular no está todavía aclarado. SCHUBERT y NORD⁷⁶ son de la opinión de que la lignina sólo está unida físicamente. Se basan en el hecho de que tras una descomposición parcial de tipo enzimático de los carbohidratos se puede obtener por medio de disolventes orgánicos una fracción de lignina, que en sus propiedades no se diferencia en nada de la lignina nativa extraída directamente de la madera. Sin embargo, trabajos posteriores^{47 68} señalan que es muy posible que exista una unión química entre la lignina y los carbohidratos, sobre todo con las pentosanas. En apoyo de esto puede aducirse el reciente hallazgo de BJORJMAN, el cual ha conseguido aislar un complejo lignina-carbohidrato por medio de la dimetil-formamida a partir de madera de pino muy finamente molida. Tras hidrólisis pudieron identificarse los mismos azúcares que entran a formar parte de la hemicelulosa.

2.1.2. *Definición y aislamiento de la lignina*

Siguiendo a FREUDENBERG³⁴ se puede definir la lignina como "una sustancia polímera, en su mayor parte insoluble en agua y en los disolventes orgánicos ordinarios, que se acumula en el tejido lignificado de las plantas, posee un espectro ultravioleta característico, contiene el 59 al 67 por 100 de carbono, mediante procedimientos oxidativos adecuados proporciona alrededor de un 25 por 100 de aldehído aromático, contiene metoxilo en cantidad variable y reacciona de un modo característico con el bisulfito y el ácido tioglicólico. En el ácido sulfúrico concentrado es insoluble en su mayor parte o en su totalidad."

Según SCHRAMECK⁷⁵ existen tres posibilidades para el aislamiento de la lignina una vez que se han separado los componentes accesorios (grasas, resinas, proteínas):

a) Solubilización de los carbohidratos mediante solución de óxido de cobre amoniacal o mediante hidrólisis con ácidos minerales fuertes (ácido sulfúrico al 72 por 100 o clorhídrico al 42 por 100) con lo cual la lignina queda como residuo.

b) Disolver o dispersar la lignina con medios adecuados como hidróxido sódico, dioxano, bisulfito, etc.; en este caso son los carbohidratos los que permanecen como residuo.

c) Preparación de derivados acetilados de carbohidratos y lignina realizando la separación a continuación a favor de las distintas solubilidades en los solventes orgánicos.

Hasta el momento presente no existe ningún procedimiento que permita extraer con solventes indiferentes la lignina total sin recurrir al calentamiento o a los catalizadores.¹¹ A lo más que se ha llegado es a aislar una pequeña parte mediante extracción con solventes orgánicos (dioxano, acetona), sin el empleo de catalizadores. Esta fracción soluble representa del 1 al 2 por 100 de la lignina total. Se la conoce con el nombre de "lignina soluble o lignina de Braun".⁹

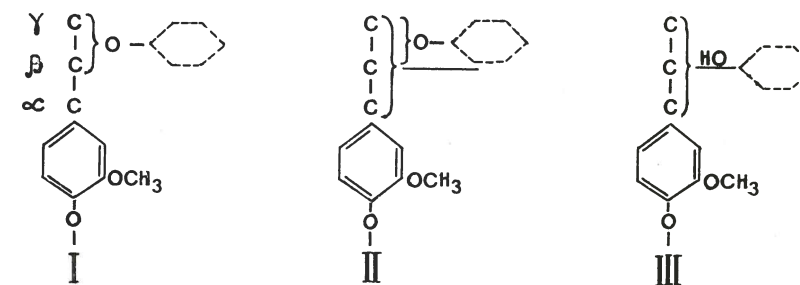
2.1.3. Propiedades físicas y químicas

No se ha logrado fijar exactamente todavía la forma y el tamaño de la molécula de lignina. El peso molecular oscila entre 1.000 y 10.000. Según los últimos estudios roent-genográficos la lignina está constituida por cadenas entrelazadas tridimensionalmente que como paquete amorfo rodea a las fibrillas de celulosa.⁷ En tanto que no sea modificada es insoluble, casi absolutamente, en el agua y en los solventes orgánicos. Las ligninas aisladas en forma soluble y que por lo tanto han sufrido ya ciertas reacciones de degradación tienen, como es lógico, una viscosidad específica más baja y constante, probablemente, de cinco a seis unidades de fenilpropano.⁷⁷

Con la ayuda de la ultracentrífuga se ha establecido un peso molecular de 6.000-7.000 para la lignina de madera de pino aislada con el ácido tioglicólico.³⁷ Cuando el material se trata con el ácido clorhídrico en caliente el peso molecular se eleva aproximadamente hasta 34.000. Los pesos moleculares obtenidos por métodos crioscópicos se encuentran la mayoría entre 800 y 900, lo cual concuerda bastante bien con los "pesos moleculares" calculados a partir de la fórmula empírica. Se cree, por tanto, que este valor representa el peso de una de las unidades de las que por unión de varias resulta la molécula de lignina.

La lignina presenta un máximo típico en el espectro ultravioleta entre 270-280 milimicras.

Según PLETZ⁶⁵ a pesar de su naturaleza hidrofoba la capacidad de fijación de agua de la lignina es especialmente grande y de gran significación para explicar sus propiedades mejoradoras del suelo (suelos ligeros). El modelo del "cemento armado" de Freudenberg hace comprender, porque tras de la desaparición de las "barras" de polisacárido queda un resto esponjoso, que encierra un enorme espacio vacío. FREUDENBERG compara la estructura de la pared celular con el cemento armado: el lugar de las barras de hierro lo ocupan los polisacáridos, jugando la lignina el papel del cemento. Por ello al desaparecer los polisacáridos se produce una superficie extraordinariamente grande, que es la causa de la enorme capacidad de adsorción de la lignina. Estas propiedades se conservan mucho mejor cuando la lignina se obtiene de un modo enzimático en lugar de con rudos tratamientos térmicos. Está perfectamente establecido, sobre la base de un gran número de trabajos^{33 40 83} que la lignina posee una estructura fundamental aromática en la cual interviene primordialmente el guayaquilpropano. Según ADLER y colaboradores⁴ los monómeros fenil-propano pueden estar ligados por uniones etéras (I), pero también mediante uniones etéras y C-C (II), y en parte solamente, mediante uniones C-C (III).



Puesto que la lignina contiene pocos fenólicos libres³ se deduce que el tipo III se presenta raras veces, con lo cual la mayor parte de los monómeros deben estar ligados por uniones aril-etéreas (I + II).

Una de las reacciones más importantes para esclarecer la constitución de la lignina consiste en la formación de aldehídos aromáticos por la oxidación alcalina con nitrobenzol. La lignina de las diferentes plantas presenta una composición característica según su origen, v. g. la lignina de pino origina preferentemente vanilina. En la lignina de otras especies, especialmente de las gramíneas, se originan p-oxi-ben-

zaldehído y se sabe que además de estos productos de descomposición de tipo aromático se obtiene por procedimientos adecuados compuestos de tipo alifático como el formaldehído, acetaldehído, ácido fórmico, ácido oxálico, etc., que sin embargo tienen mucha menor importancia.

En sentido puramente químico FREUDENBERG define la lignina como heteropolimerizados de derivados del fenilpropano. El bromuro de acetilo disuelve la lignina vegetal pero no la que ha sido más o menos modificada, así por ejemplo la lignina aislada con ácido sulfúrico es insoluble en este producto y, asimismo, a medida que se va transformando en el suelo o en el estiércol, se va haciendo progresivamente insoluble. La solubilidad en el bromuro de acetilo es uno de los indicios de la transformación de la lignina en el organismo animal como ya veremos más adelante.

PLOETZ ⁶⁵ señala que la lignina aislada muestra un claro efecto bacteriostático, seguramente debido a la formación de un complejo estable lignina-proteína del cual se hablará posteriormente.

2.1.4. Descomposición biológica de la lignina

La lignina presente en el material vegetal puede ser degradada por la acción de una serie de microorganismos en tanto que la lignina aislada o purificada en el laboratorio ofrece una gran resistencia a dichos microorganismos. Solamente en época muy reciente se ha conseguido mediante ensayos de adaptación obtener buen desarrollo de hongos destructores de la madera en cultivos en que la lignina aislada constituía la única fuente de carbono.⁶⁶

Como sucede en la descomposición de los carbohidratos, de las proteínas y de las grasas, los fermentos juegan un papel muy importante en la descomposición de la lignina.⁴⁴

Según LINDBERG ⁵⁴ los organismos destructores de la lignina segregan fenoloxidasas. El grupo de las fenoloxidasas comprende dos tipos de enzimas principalmente: tirosinasas y lacasas.⁵⁵ Estos fermentos oxidan los grupos hidroxilos en posición orto.

Diversos autores han logrado oxidar la lignina en el aparato de Warburg mediante preparados obtenidos de los cultivos de *Poliporus versicolor* ²¹ o de *Agaricus campestris*.³⁹

Las transformaciones originadas por enzimas y microorganismos consisten, en primer lugar, en una separación de grupos metoxilo ^{73 15} y seguidamente, según BARTLETT y NORMAN,⁶ aumenta el con-

tenido de N en la lignina. Posteriormente parece que se forman grupos carboxilos por oxidación de las cadenas laterales.⁷¹

Según SCHEFFER ⁷² la lignina vegetal es muy lentamente transformada por las bacterias y más rápidamente por los hongos (Basidiomicetos). También señala, lo que es muy importante para nuestro trabajo, que puede oxidarse fácilmente a temperaturas superiores a 30°.

2.1.5. Teoría de la formación del humus

La desintegración biológica de la materia orgánica en el suelo conduce a una acumulación de aquellas materias más difíciles de descomponer (ligninas, taninos). Este proceso es conocido con el nombre de humificación. Una condición previa para la transformación de las materias iniciales del humus en material húmico es la existencia de complejos ricos en nitrógeno, una reacción entre neutra y alcalina y escaso O₂ para la autooxidación. Cuando se dan estas condiciones se forman ácidos humínicos libres o pardos.

Numerosísimas investigaciones realizadas con los más diversos materiales vegetales han coincidido todas en señalar que los carbohidratos son descompuestos relativamente deprisa, en tanto que la lignina, en unión con ciertos complejos nitrogenados, se va acumulando paulatinamente.⁷⁹ Todos los autores, con casi absoluta unanimidad, están de acuerdo en adscribir a la lignina una posición central en la formación del humus. Según FLAIG ²⁵ la descomposición de la lignina sólo comienza en su parte principal cuando la celulosa de incrustación ha sido desalojada por la actividad de los microorganismos.

El conjunto de las materias de coloración oscura o húmicas ha sido desglosado en varios grupos con arreglo a su solubilidad en distintas soluciones. Con mucho, el más importante de estos grupos es el de los ácidos humínicos, caracterizados esencialmente por su propiedad de ser extraíbles del suelo mediante soluciones alcalinas diluidas y ser precipitables por los ácidos minerales. Los ácidos humínicos son amorfos, de alto peso molecular, de color marrón oscuro y representan un producto relativamente estable, resultado de las transformaciones químicas y biológicas de la materia orgánica en el suelo. Muchos trabajos señalan la propiedad que poseen de activar el crecimiento de las plantas.^{26 70} Los productos que se obtienen en las reacciones de descomposición de los ácidos humínicos señalan claramente el paren-

tesco, y la dependencia, de ellos con respecto a la lignina. Según FLAIG²⁵ se ha comprobado en la degradación microbiana de la lignina una disminución del contenido en metoxilo, lo cual no es sino una confirmación de trabajos anteriores.²⁷ Después tiene lugar una separación de éteres fenólicos y los productos se tornan más ácidos. Como ya veremos, algo de esto parece también ocurrir en el organismo animal.

Resumiendo con NEHRING⁶³ diremos que en lo esencial la humificación consiste en una oxidación de la lignina con fijación de nitrógeno, que puede proceder de las proteínas o sus productos de degradación, acompañada de una saponificación parcial de los grupos metoxilo.

2.1.6. *Papel del nitrógeno en la descomposición de la lignina y en la formación de los ácidos humínicos*

Ya hemos señalado que una condición previa para la formación del humus es la existencia de complejos ricos en nitrógeno. Según SCHEFFER⁷² las ligninas aisladas con esmero son capaces de reaccionar con compuestos nitrogenados fijándose éste de tal manera que solamente puede ser separado por procedimientos hidrolíticos muy intensos, por lo cual debe considerarse a este complejo lignina-proteína como una fuente de N que influye lentamente para ser utilizada por los microorganismos. Las investigaciones realizadas por este autor demuestran claramente que los aminoácidos de elevado peso molecular son fijados con más fuerza que los de peso molecular reducido. Así, por ejemplo, el aminoácido glicocola apenas es fijado por la lignina. Las combinaciones lignina-proteína obtenidas de esta manera se asemejan mucho a las sustancias humínicas pero como quiera que presentan una gran solubilidad en bromuro de acetilo y un escaso poder colorante en lejía sódica, sólo pueden ser consideradas, sin embargo, como fases previas.

En las investigaciones fundamentales realizadas por HOBSON y PAGE⁴³ quedó demostrado que el nitrógeno no puede ser separado por la acción de los enzimas proteolíticos, no sólo en los ácidos humínicos naturales sino incluso de una mezcla de albúmina de huevo y ácidos humínicos artificiales preparados a partir de la lignina.

Los ácidos humínicos naturales contienen cantidades apreciables de nitrógeno⁶⁴ con un valor medio del 5,36 por 100 en el caso de

productos aislados del suelo. El cuidadoso método de aislamiento y purificación a que estas preparaciones son sometidas hace muy improbable que el N esté presente en la forma de una simple contaminación o impureza.

Uno de los primeros investigadores sobre este tema DETMER²⁰ logró preparar un ácido húmico conteniendo solamente 0,179 por 100 de N. Esto se tomó en principio como una prueba de que el "ácido húmico puro" no contiene N en su molécula. Pero este autor solamente obtuvo 1,7 gramos del producto purificado a partir de 30 gramos de ácido húmico bruto y por tanto el resultado no puede ser considerado tan definitivo.

De acuerdo con HILGARD⁴² el ácido húmico bruto contiene N en la proporción del 1,7 por 100 al 7 por 100 en los suelos húmedos y posteriormente muchos investigadores han llegado a la conclusión de que el ácido húmico contiene el N en su propia estructura.⁵⁸ EGGERTZ²² encontró que el N no puede ser separado del ácido húmico por solución y reprecipitación continuadas.

En las investigaciones ya citadas de HOBSON y PAGE⁴³ quedó establecido que el nitrógeno contenido en las preparaciones purificadas de ácidos húmicos de suelos de Rothamsted no puede ser eliminado por métodos que serían capaces de separar las simples impurezas nitrogenadas. La distribución del N en los productos de la hidrólisis por ácido clorhídrico de estas preparaciones es semejante a la que se encuentra en los hidrolizados de las proteínas.

BREMNER¹³ estudia el contenido en aminoácidos de los ácidos humínicos de estreptomicetos llegando a identificar, junto con FLAIG y KÜSTER, 17 aminoácidos distintos. A conclusiones semejantes llegó el mismo autor¹⁴ al estudiar la fracción nitrogenada de los ácidos húmicos de las tierras negras.

LAATSCH⁵² señala que en los ácidos humínicos obtenidos en cultivos de microorganismos el N está incluido en forma de N amínico. Muchas de las propiedades de estos productos no pueden explicarse sin admitir la presencia del N en su molécula.²⁷

NEHRING⁶³ observó que la mayor o menor intensidad de la fijación del N en los ácidos humínicos depende de la "edad" de dichos compuestos. Así, por ejemplo, por hidrólisis ácida se puede separar hasta un 50 por 100 del N de los ácidos humínicos del estiércol lo cual indica que en el estiércol las transformaciones no han llegado aún a su final. En los ácidos humínicos de las tierras negras sólo se puede

separar por hidrólisis de 9,5 por 100 del N. Este elemento está, en este último caso, mucho más fijamente unido a la molécula.

2.1.7. *Formación de materia húmica en el organismo animal*

SCHEFFER⁷² demostró que las heces de los animales pueden contener hasta un 40 por 100 de materias insolubles en bromuro de acetilo. Según este autor, como la alimentación de los animales está exenta prácticamente de sustancias insolubles en este disolvente es evidente que se trata de materias indigestibles, pero que bajo la acción de los jugos se han transformado en material húmico.

WELTE⁸⁶ señala que el color marrón oscuro de la masa fecal animal indica ya la posibilidad de que en el tracto intestinal de los animales superiores pueda tener lugar una especie de formación de ácidos húmicos. Este autor supone que la lignina puede ser modificada hasta un cierto grado por el ataque de los enzimas y jugos digestivos actuando a la temperatura del cuerpo y que junto con derivados protéicos da complejos oscuros de lignina-proteína. Estos complejos con casi totalmente insolubles en bromuro de acetilo y por lo tanto deben ser considerados como material húmico. Este mismo autor indica que también es posible que en el proceso digestivo aparezcan productos intermedios de tipo fenólico o quinónico, que junto con la presencia constante de sustancias con grupos amínicos conduciría a la formación de ácidos húmicos ricos en nitrógeno. Con ello se demuestra que la formación biológica del humus no está reservada exclusivamente al suelo, sino que también puede tener lugar en el tracto digestivo de los animales superiores.

O. SIEGEL⁸⁶ demostró en el estiércol vacuno fresco la presencia de un contenido en materiales insolubles en bromuro de acetilo superior al 20 por 100 (referido a materia orgánica) demostrando además que tales sustancias procedían en su mayor parte de las heces de los animales.

En relación con la suposición de WELTE, anteriormente citada, sobre la formación de cuerpos fenólicos en el tubo digestivo es oportuno mencionar aquí la observación de ELY y colaboradores²³ de que vacas lecheras alimentadas con determinados forrajes verdes presentaban una excreción urinaria de ácido benzoico proporcional a la lignina consumida; según estos autores parte de la lignina del forraje era digerida por la vaca.

NEHRING⁸³ ha efectuado el aislamiento de ácidos húmicos de las heces frescas de ganado vacuno encontrando estos productos en una proporción del 10 al 12 por 100 referido a la materia orgánica. Dicho autor sugiere que las condiciones del tracto intestinal favorecen una transformación conducente a la formación de humus (reacción débilmente alcalina, presencia de determinadas formas de nitrógeno y simultáneo ataque bacteriano a los componentes de la pared celular). Esto es tanto más posible cuanto que la lignina en estado nativo se encuentra en forma esencialmente más activa para reaccionar que cuando ha sido aislada por la hidrólisis con ácidos minerales.

Una prueba indirecta e involuntaria de la transformación de la lignina y consiguiente fijación de N en el tracto digestivo la proporcionan los trabajos de BALCH y colaboradores.⁵ Estos autores comparando los distintos métodos de determinación de la lignina empleados en nutrición animal creen que el nitrógeno presente en la lignina lo está como una contaminación proteica (contaminating protein) y realizando una corrección para la lignina (corrected lignin) sustrayendo de la cifra de lignina bruta el producto de multiplicar N por 6,25; pues bien, con dos de los tres métodos empleados encontraron que el porcentaje de N en la lignina aislada de las heces era mayor que en la aislada de los alimentos correspondientes. Debido a ello los coeficientes de digestibilidad determinados por estos autores son más altos empleando la "lignina corregida" que las cifras de lignina bruta.

2.2. LA LIGNINA EN NUTRICION ANIMAL

2.2.1. *Generalidades*

El papel de la lignina en la nutrición animal es un tema muy discutido, sobre el que existen las más diversas opiniones, habiéndose publicado resultados francamente contradictorios.

En nutrición animal el problema se ha centrado en la digestibilidad de la lignina y el hecho de que algunos autores propusieran a esta sustancia como "indicador natural indigestible" para la determinación de la digestibilidad de otros componentes de la ración ha contribuido, a nuestro juicio, a oscurecer la cuestión.

Al fijarse la atención sobre la existencia, o no, de una pérdida cuantitativa en el proceso digestivo se han perdido de vista fenómenos de tipo cualitativo que también pueden resultar interesantes en la alimentación de los animales domésticos.

Como muchos autores reconocen, al no estar la lignina aún perfectamente definida como entidad química y al no existir métodos de determinación que no originen alguna modificación de esta sustancia, se comprende fácilmente la naturaleza del problema, máxime considerando el enorme número de métodos de determinación propuestos, cuyos resultados no son en absoluto comparables.

2.2.2. Pruebas aducidas en favor de la estabilidad de la lignina

BONDI y col.⁸ encontraron que la tasa de grupos metoxilo en la lignina aislada de los alimentos es idéntica a la de la lignina aislada en las heces correspondientes. Estos resultados fueron confirmados posteriormente por FORBES y GARRIGUS.³⁰

PALOHEIMO, ROGOZINSKI y col.⁶⁹ sostienen, como resultado de sus experimentos, que la lignina es prácticamente indigestible.

GRAY³⁸ encontró que la lignina en una ración de paja de trigo y heno de alfalfa no era digerida por la oveja en cantidad apreciable.

CRAMPTON y col.¹⁷ recuperaron en las heces del conejo y el novillo el 97,8 y 99,3 por 100 respectivamente de la lignina de la dieta. Estos datos, según ellos, soportan la opinión de que la lignina alimenticia no es metabolizada en cantidades apreciables. Sin embargo conviene destacar que entre sus experimentos hay uno en el que sólo se logró recuperar el 93,3 por 100.

COOK y col.,¹⁶ como resultado de sus experimentos, sostienen que desde un punto de vista práctico la lignina puede cumplir el papel de indicador indigestible en las pruebas de digestibilidad y señalan, incluso, una superioridad de esta sustancia sobre la técnica de los pigmentos vegetales.

ELLIS y col.²⁴ utilizan la lignina como indicador encontrando que los coeficientes de digestibilidad para la lignina fluctúan ligeramente por encima y por debajo de cero y que la media tiende a cero. A las mismas conclusiones llegan posteriormente FORBES y GARRIGUS.²⁹

BALCH y col. realizaron un estudio extensivo sobre muestras de alimento y heces de ocho experimentos de digestibilidad con vacas lecheras que recibieron una ración de heno y concentrados, llegando a la conclusión de que con el método Armitage la lignina presenta una digestibilidad despreciable y que por tanto podía servir como base para el empleo de la técnica de la relación lignina (lignin ratio technique).

2.2.3. Pruebas aducidas en favor de la digestibilidad de la lignina

KANE y col.⁴⁶ señalan la digestibilidad aparente de parte de la lignina en el dactilo (*Dactylis glomerata*) indicando que el contenido en grupos metoxilo disminuía durante la digestión en una extensión del 50 por 100, en experimentos con rumiantes.

ELY y col.³² en experimentos con ganado lechero encontraron que la lignina es parcialmente digerida y en algunos animales su digestibilidad llega a ser del 14 por 100. La lignina aislada por estos autores del heno de dactilo de la ración presentaba un contenido en metoxilo mayor que la lignina aislada de las heces correspondientes, lo cual indica una degradación de la lignina en el tracto digestivo. En cuanto a la excreción urinaria de ácido benzoico en relación con la ingestión de lignina observada por ellos ya hemos hecho referencia anteriormente.

FRANÇOIS y col.⁶⁹ midieron la desaparición de los radicales metoxilo de las ligninas y pectinas en el curso de la digestión en los bóvidos. La demetoxilación es más intensa en las pectinas que en la lignina, pero llega a ser en esta última de casi un 50 por 100. En razón de la demetoxilación la lignina puede presentar una digestibilidad aparente del 8 por 100 en el heno de alfalfa. Estos autores sugieren que los radicales metoxilo participan en el proceso de formación del metano en el tubo digestivo de los rumiantes.

CSONKA⁴⁸ halló que en la vaca el 37 por 100 de los radicales metoxilo ligados a los alimentos ingeridos desaparecería en el transcurso de la digestión.

De modo análogo BONDI⁸ llega a la conclusión de que la tasa de metoxilo en la lignina aislada de los alimentos es, por término medio, un 25 por 100 mayor que en la lignina aislada de las heces correspondientes.

HALE y col.⁴¹ hallaron que la lignina es digestible en proporción variable (hasta del 24 por 100) y apuntan, como resultado de sus estudios sobre el desarrollo de la digestión, que ello tiene lugar en las últimas porciones del tracto digestivo.

Entre otros autores KONIG⁴⁸, McANALLY⁶¹ y DAVIES¹⁹ sostienen, sobre la base de resultados experimentales, que no se puede considerar a la lignina como una sustancia indigestible. El último de los autores citados impugna la técnica de la "relación lignina" como método de determinación de la digestibilidad. En experimentos llevados a cabo con

óvidos recibiendo forraje de guisantes, o forraje de habas, la lignina presentó un coeficiente de digestibilidad de 16,2 y 10 respectivamente.

MAYNARD⁶⁰ encontró que la digestión de la lignina por los conejos y cobayas alimentados con heno de alfalfa es prácticamente nula, pero un cordero fue capaz de digerir un 28 por 100 de la lignina del mismo heno.

LOUW⁵⁶ atribuye a la lignina de la hierba de un mes de crecimiento una digestibilidad del 24,5 por 100, en la oveja. En esta misma especie la digestibilidad para la hierba de cuatro meses de crecimiento es solamente de un 11,6. Este mismo autor, en un experimento posterior,⁵⁷ encontró para la lignina del heno una digestibilidad porcentual que oscilaba entre 12,4 y 16,4 en los pequeños rumiantes.

Finalmente señalaremos que LANCASTER⁵³ demostró experimentalmente que la oveja es capaz de digerir la lignina de una muestra de nabos en una extensión de hasta el 32,4 por 100.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.3. MATERIAL Y METODOS

Se realizaron pruebas "in vitro" y análisis del contenido del tracto digestivo y heces.

Los estudios "in vitro" tuvieron por objeto determinar la rapidez relativa de degradación de los componentes más importantes del material de sostén vegetal: celulosa, lignina y pentosanas. Para nuestra finalidad la técnica del "rumen artificial" parece especialmente indicada al permitir una determinación cuantitativa precisa, cosa que de ningún modo es posible en grado tan alto en los experimentos de balance o por el uso de indicadores y marcadores "in vivo".

La técnica empleada ha sido ya descrita por uno de nosotros.⁵⁸ El líquido ruminal fue extraído de tres carneros de raza merina, alimentados, desde algunas semanas antes de la extracción por sondaje, con una ración de paja de trigo y 300 gr. de cebada triturada. Los animales recibían alimento a las ocho y diecisiete. La toma del líquido del rumen se realizó siempre antes del primer pienso.

Se llevaron a cabo varias series de fermentación en cada una de las cuales se utilizó como inóculo el líquido procedente de un animal

distinto, en total tres series. Cada una de ellas comprendía 16 botellas montadas en tres circuitos independientes de CO₂. Como sustrato se emplearon, por botella, tres gramos de la misma paja de trigo de la ración, finamente molida, conteniendo, en porcentaje de la materia seca, el 37,2 de celulosa, el 19,2 de lignina y el 20,9 de hemicelulosas.

Cada tres horas, a contar del comienzo de la fermentación, se retiraron dos botellas para ser analizado su contenido como muestras paralelas.

Concluidas las pruebas "in vitro" se sacrificaron los animales a las veinte horas de recibir el último pienso e inmediatamente se recogieron los contenidos de las distintas porciones del tubo digestivo y se tomaron las muestras medias para los análisis.

La determinación de la celulosa se realizó empleando el método de KURSOCHNER y HANAK,⁵¹ utilizando en el ataque, con la mezcla acético-nítrico, refrigerante de aire.

La determinación de la lignina se llevó a cabo con arreglo al método de RITTER, SEBORG y MITCHELL⁶⁸ tal y como ha sido modificado y empleado por SCHOBINGER.⁷¹ Este método se basa en el aislamiento con ácido sulfúrico al 72 por 100. Según ADAMS y CASTAGNE,² que han estudiado el problema de la determinación de lignina en diversos tipos de pajas, el método del ácido sulfúrico al 72 por 100 cumple mejor las condiciones de una lignina "realmente total" que la determinación con ácido clorhídrico al 42 por 100. Con el método utilizado se obtienen valores de un mínimo de lignina con un contenido máximo en metoxilo, lo cual constituye, según FREUDENBERG³⁶ un criterio muy valioso en la determinación de la lignina. De acuerdo con SCHOBINGER⁷¹ en lugar de la extracción previa con alcohol-benzol se utilizó la extracción con éter y seguidamente con agua en caliente. El mismo método ha sido ya aplicado por ZORITA en un trabajo previo sobre este mismo tema.⁸⁰

La determinación de las hemicelulosas en forma de furfural se realizó por el método de ADAMS y CASTAGNE,¹ empleando para la curva patrón furfural comercial purificado por destilación al vacío y midiendo en un espectrofotómetro Beckman D.U. modelo 2.400 a 518 milimicras.

El aislamiento de la lignina para las determinaciones sobre ella llevadas a cabo se realizó con arreglo al método anteriormente citado, únicamente que al llegar a la fase final de la hidrólisis ácida no se filtra a través del crisol de Gooch, sino que se centrifuga durante quince mi-

nutos a 3.000/a.p.m. El sedimento se lava en el mismo tubo de la centrífuga con agua destilada hasta que el agua de lavado dé reacción neutra al amarillo dimetilo. Seguidamente se somete a desecación previa en la estufa a 60°, se pulveriza finamente en el mortero de porcelana y se deseca en la pistola de desecación al vacío a 90° sobre P_2O_5 .

El aislamiento y la determinación de ácidos humínicos se llevó a cabo por el método propuesto por SCHOBINGER⁷¹ que, como la mayoría de los métodos, se basa en la extracción con hidróxido sódico al 0,50 por 100 y precipitación con ácido clorhídrico a pH 1.

La determinación del N total en las muestras de lignina y ácidos humínicos fue realizada por el método de Dumas habiendo sido enviadas las muestras para su análisis al Chemischen Untersuchungs laboratorium del Forschungsantalf für Landwirtschaft, Braunschweig Völknerode.

Para la determinación del contenido en metoxilo se empleó el micrométodo de VIEBOOK y BRECHER,⁸² utilizando como solución de lavado hidróxido sódico 0,1 N. El aparato se comprobó con vanillina.

Para comprobar si el enriquecimiento de N observado en la lignina se debía a proteína o a sus piezas estructurales, se sometieron los diversos preparados de esta sustancia a una hidrólisis con ácido clorhídrico 6 N, para lo cual se calentaron las preparaciones (20 ml de HCl 6N/gr. de sustancia seca) en el baño de arena durante dieciseis horas a 116°, con refrigerante de reflujo. Para separar el clorhídrico del filtrado fue éste evaporado al vacío por tres veces casi hasta desecación total, añadiendo seguidamente 10 ml de agua destilada. La determinación del N alfa-amínico se efectuó por el método de la ninhidrina de VAN SLYKE y col.⁸¹ Se prefirió este método porque parece ser que es más exacto que el método cuantitativo de cromatografía en papel.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla I aparecen los resultados de las fermentaciones en el rumen artificial. A pesar de los inconvenientes y peligros magistralmente descritos por WARNER,⁸⁴ de trasladar los resultados "in vitro" a estudios sobre el animal, las cifras obtenidas guardan proporción con las halladas por GRAY³⁸ para la digestibilidad de la celulosa en el rumen de la oveja y por MARSCHLL⁵⁹ para las pentosanas en esta misma especie.

La digestión de la celulosa progresa a todo lo largo de las veinticuatro horas y la de las pentosanas sigue un curso similar aunque a un nivel inferior. La lignina aparece como indigestible, oscilando los valores obtenidos alrededor de cero. Utilizando el residuo no digerido de una fermentación como sustrato, previo lavado, para fermentaciones subsiguientes hemos conseguido después de setenta y dos horas de fermentación un producto conteniendo el 97,5 por 100 de lignina. Trabajamos actualmente sobre la posibilidad de aislamiento de lignina por la acción de los microorganismos del rumen.

En la tabla II se condensan los resultados de los análisis del contenido del tracto digestivo.

Resulta evidente que a lo largo del mismo tiene lugar una disminución del contenido en metoxilo de la lignina. Las cifras parecen indicar que el lugar donde la demetoxilación es más intensa es el intestino delgado. NEHRING⁶³ ha señalado la posibilidad de que parte de la lignina entre en solución en el medio más alcalino del intestino delgado. En todo caso la lignina aislada de las heces es más pobre en grupos metoxilo que la aislada de la paja alimenticia cuyo contenido, determinado por el mismo procedimiento, es del 15,33 por 100.

El nitrógeno total contenido por la lignina se incrementa grandemente, sin embargo, la fijación de nitrógeno es débil en los preestómagos y parece hacerse más intensa cuando el alimento ha pasado al intestino delgado.

Los datos referentes a la proporción de N alfa-amínico con relación al total presente en la lignina, son demasiado variables para que puedan extraerse conclusiones valederas. BREMNER¹² ha señalado que puede tener lugar una destrucción de aminoácidos en las condiciones de la hidrólisis por el ácido clorhídrico.

En el trabajo citado el autor señala que en la descomposición de la paja en el suelo pueden formarse complejos aminoazúcares que se destruyen en la hidrólisis ácida con formación de amoníaco. Ignoramos si complejos análogos pueden formarse en el aparato digestivo de los mamíferos superiores.

TABLA II

| | Niveles del tubo digestivo | EN LIGNINA | | | Ac. humínico en % de materia orgánica | N. % en ácido humínicos |
|------------|----------------------------|------------|------------|-----------------------------|---------------------------------------|-------------------------|
| | | Metoxilo % | N. total % | N. amínico en % de N. total | | |
| Animal I | Panza | 14,9 | 0,61 | 52,1 | | |
| | Bonete y librillo. | 15,1 | 0,58 | 46,7 | | |
| | Cuajar | 14,8 | 0,57 | 39,5 | | |
| | Intestino delgado. | 11,4 | 0,62 | 70,6 | | |
| | Ciego | 11,2 | 1,25 | 56,8 | 6,8 | 3,4 |
| | Colon | 10,9 | 2,43 | 35,2 | 9,2 | 2,9 |
| | Heces | 10,5 | 2,48 | 44,7 | 8,8 | 3,7 |
| Animal II | Panza | 15,6 | 0,50 | 60,0 | | |
| | Bonete y librillo. | 14,2 | 0,64 | 48,2 | | |
| | Cuajar | 14,2 | 0,52 | 47,8 | | |
| | Intestino delgado. | 12,1 | 0,77 | 62,3 | | |
| | Ciego | 11,7 | 2,8 | 69,9 | 5,7 | 2,9 |
| | Colon | 11,8 | 2,71 | 71,3 | 5,6 | 3,2 |
| | Heces | 10,1 | 2,53 | 68,6 | 6,8 | 3,1 |
| Animal III | Panza | 15,3 | 0,67 | 58,7 | | |
| | Bonete y librillo. | 15,4 | 0,67 | 67,5 | | |
| | Cuajar | 15,3 | 0,72 | 48,6 | | |
| | Intestino delgado. | 10,9 | 1,42 | 54,3 | | |
| | Ciego | 11,0 | 2,13 | 47,0 | 4,3 | 2,0 |
| | Colon | 9,9 | 1,98 | 72,6 | 7,7 | 3,1 |
| | Heces | 9,2 | 1,71 | 68,2 | 7,2 | 3,2 |

TABLA X

| | ANIMAL | HORAS DE FERMENTACION | | | | | | | |
|-------------------------|--------|-----------------------|-------|------|------|------|------|------|------|
| | | 3 | 6 | 9 | 12 | 15 | 18 | 21 | 24 |
| CELULOSA | I | 9,8 | 12,2 | 20,1 | 26,9 | 30,2 | 34,7 | 40,0 | 44,1 |
| | II | 10,1 | 12,0 | 18,4 | 23,2 | 34,8 | 39,3 | 48,2 | 51,6 |
| | III | 8,0 | 11,1 | 15,0 | 22,7 | 30,2 | 33,1 | 39,7 | 41,6 |
| | M | 9,6 | 12,1 | 17,8 | 24,3 | 31,7 | 35,7 | 42,6 | 45,8 |
| HEMICELULOSA (furfural) | I | 8,2 | 9,1 | 12,9 | 19,8 | 22,1 | 28,5 | 32,7 | 33,2 |
| | II | 7,4 | 10,1' | 16,7 | 20,0 | 21,3 | 34,8 | 36,1 | 39,3 |
| | III | 6,3 | 8,7' | 9,9 | 15,9 | 23,7 | 30,5 | 34,0 | 34,8 |
| | M | 7,3 | 9,3 | 13,2 | 18,6 | 24,4 | 31,3 | 34,3 | 35,8 |
| LIGNINA | I | 2,1 | 1,7 | -2,4 | -2,2 | 0,8 | 2,1 | -0,8 | -2,0 |
| | II | 0,8 | 1,7 | 0,2 | 1,0 | 0,9 | -3,3 | 0,1 | 1,9 |
| | III | -0,6 | 1,1 | 2,2 | -2,1 | 1,7 | -2,9 | -0,8 | -1,9 |
| | M | 0,76 | 1,5 | 0,0 | -1,1 | 0,53 | -1,4 | -0,5 | -0,7 |

Para adquirir una idea sobre el número de aminoácidos presentes en la fracción alfa-amínica del nitrógeno fijado a la lignina, se investigó mediante cromatografía en papel el hidrolizado de algunas muestras de lignina aisladas del contenido intestinal. La partición se realizó por el procedimiento ascendente con n-butanil-ácido acético glacial-agua (70:20:10) empleando papel de cromatografía Schleicher & Schull (2043b). Una vez pasado el solvente se desecan los cromatogramas y se repite por tres veces en la misma dirección. El revelado se efectuó pulverizando el cromatograma con solución al 0,4 por 100 de ninhidrina en metanol. De este modo se determinó con seguridad la presencia de, por lo menos, 15 aminoácidos distintos. El porcentaje de N. alfaamínico con relación al N total de la lignina de la paja alimenticia es de 58,1 determinado, como es lógico, sobre las muestras de paja fresca por el mismo procedimiento utilizado para las muestras del contenido gastro-intestinal.

Los ácidos humínicos se encuentran ya presentes en el ciego y su proporción parece incrementarse en las heces. El contenido en nitrógeno total de los ácidos humínicos, es, en términos generales, más alto que el de la lignina.

El fenómeno fundamental observado consiste en un enriquecimiento de la lignina en nitrógeno. Esto supone una pérdida de este elemento para el organismo debida a una acción específica de la lignina, que no debe ser considerada como una sustancia inerte, independientemente de su mayor o menor digestibilidad.

El contenido de nitrógeno total de la lignina de la paja alimenticia es de 0,54 por 100; el de la lignina aislada de las heces 2,53, 1,71 y 2,48 por 100; para cada uno de los tres animales. Esto supone un incremento medio de 1,7 por 100, que es bastante mayor que el encontrado por uno de nosotros cuando la lignina pasa a través del tubo digestivo de la rata.⁵⁹

Si a efectos prácticos de alimentación animal se multiplica este valor por el factor 6,25 se obtiene la cifra de 10,6 gr. de proteína bruta por cada 100 gr. de lignina en la ración. Esto contribuye a que la digestibilidad aparente de la proteína de los forrajes, henos y pajas, alimentos de elevado contenido en lignina sea muy baja, y a explicar el efecto depresor sobre la digestibilidad de la proteína de las raciones en que tales productos intervienen.

Creemos que habrá que estudiar este "efecto específico" de la lignina en los distintos alimentos, puesto que la naturaleza de esta sustancia varía en las distintas especies vegetales y los sucesivos estudios de su ciclo vegetativo, para realizar posteriormente las oportunas correcciones en el racionamiento.

Si esta fijación de nitrógeno tuviese cierta especificidad, es decir, que se ejerciese preferentemente sobre algunos aminoácidos, posibilidad que no está excluida además del aspecto cuantitativo de la cuestión, digno de tenerse en cuenta, su importancia sobre otras cuestiones del metabolismo proteico (piénsese por ejemplo en el valor biológico) pudiera llegar a ser decisiva. Los grandes rumiantes pueden ingerir diariamente, con raciones normales, cantidades superiores al kilogramo de lignina.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ADAMS, G. A., and CASTAGNE, A. E. (1948).—*Canad. J. Res. Sect. B.*, 26-341.
- 2) ADAMS, G. A., and CASTAGNE, A. E. (1949).—*Canad. J. Res. Sect. B.*, 27, 915.
- 3) ADLER, E. und HERNESTAM, S. (1955).—*Acta Chem. Scan.*, 9, 319.
- 4) ADLER, E., LINDGREN, B. O. y SAEDEN, U. 1958 (1952).—*Svensk. Papperstidn.*, 55, 245 (Cit. por U. Schobinger, Diss, E. T. H. Zurich).
- 5) BALCH, D. A., BALCH, C. C., ROWLAND, S. J. (1954).—*J. Sci. of Food and Agric.*, 5, 12.
- 6) BARTLETT, J. B., NORMAL, A. G. (1939).—*Proc. Soil Sci. Soc. American*, 3, 210.
- 7) BECHERER, G., und VOITGLANDER-TETZNER, G. (1955).—*Naturwiss.*, 42, 577.
- 8) BONDI, A., MEYER, H., (1943).—*J. Agric. Sci.* 33, 123.
- 9) BRUNS, F. E. (1939).—*J. Amer. Chem. Soc.*, 6, 2120.
- 10) BRAUNS, F. E. (1952).—*The Chemistry of Lignin*, New York; Ac. Press.
- 11) BRAUNS, F. E. (1953).—*Papier*, 7, 446.
- 12) BREMNER, J. M. (1955).—*J. Agric. Sci.*, 45, 469.
- 13) BREMNER, J. M., FLAIG, W., y KUSTER, E. (1955).—*Z. Pflanzenernahr., Dung. Bodenkunde*, 71, 116.
- 14) BREMNER, J. M. (1955).—*Z. Pflanzenernahr., Dung. Bodenkunde*, 69, 32.
- 15) BROADBENT, F. E. (1954).—*Proc. Soil Sci. Soc. American*, 18, 165.
- 16) COKK, C. W. and HARRIS, L. E. (1951).—*J. Anim. Sci.* 10, 555.
- 17) CRAMPTON, E. W. and MAYNARD, L. A. (1938).—*J. Nutr.* 51, 383.
- 18) CSONKA, F. A., PHILLIPS, M., and JONES, D. B. (1929).—*J. Biol. Chem.*, 85, 65.
- 19) DAVIS, R. E., MILLER, C. O., and LINDAHL, I. L. (1947).—*J. Agr. Res.*, 74, 285.

- 20) DETMER, W. (1871).—*Landw. Ver. Stat*, 14, 248.
- 21) DION, W. M. (1952).—*Cand. J. Bot.*, 30, 9.
- 22) EGGERTZ, C. G., JAHRESBER, (1889).—*Agrikultur*, 47.
- 23) ELY, R. E., JACOBSON, W. C. and KANE, E. A. (1951).—*J. Dair. Sci.*, 34, 493.
- 24) ELLIS, G. H., MATRONE, G., and MAYNARD, L. A. (1946).—*J. An. Sci.*, 5, 285.
- 25) FLAIG, W. (1955).—*Holzforschung*, 9, 1.
- 26) FLAIG, W. (1955).—*Forschung Landwirtschaft*, 8, 133.
- 27) FLAIG, W., SCHULZE, H., KUSTER, E., BIERGANS, H. (1954).—*Landbouwkundig Tijdschrift*, Mai-Juin, 66.
- 28) FISCHER, F. (1928).—*Biochem. Z*, 203, 351.
- 29) FORBES, R. M., and GARRIGUS, W. P. (1948).—*J. Anim. Sci.*, 7, 373.
- 30) FORBES, R. M., and GARRIGUS, W. P. (1950).—*J. Anim. Sci.*, 9, 537.
- 31) FORBES, R. M., and GARRIGUS, W. P. (1950).—*J. Anim. Sci.*, 9, 537.
- 32) FRANCOIS, M., LEROY, A. M. et LERY, G. (1951).—*Comp. Rendus Hebd. Acad. Sci.* 232, Jan-Marz.
- 33) FREUDENBERG, K. (1944).—*Cellulosechemie*, 22, 117.
- 34) FREUDENBERG, K. (1954).—*En Moderne Methoden der Pflanzen Analyse*. Cap. Lignin, Springer-Verlag.
- 35) FREUDENBERG, K. (1954).—*Chem. Org. Naturstoff*, 11, 43.
- 37) GRALEN, N. (1946).—*J. Colloid. Sci.* 1, 453.
- 38) GRAY, F. V. (1947).—*J. Exp. Biol.*, 24, 1.
- 39) GOTTLIEB, S., und GELLER, S. G. (1949).—*Geller Science*, 110, 189.
- 40) GROSSKOPF, (1926).—*Brennstoff-Chem*, 7, 293.
- 41) HALE, E. B., DUNCAN, N. W., and HUFFMAN, C. F. (1940).—*J. Dairy Sci.* 23, 953.
- 42) HILGARD, E. W. (1911).—*Int. Mitt. Bodenk.*, 1, 415.

- 43) HOBSON, R. P. y PAGE, J. H. (1931).—*J. Agric. Sci.* 22, 497.
- 44) HOFMANN, E. (1955).—*Dung. Bodenkunde*, 69, 165.
- 45) KANE, E. A., ELY, R. E., JACOBSON, W. C., and MOORE, L. A. (1951).—*J. Dairy. Sci.*, 34, 492.
- 47) KAWAMURA, L. und HIGUCHI, T. (1953).—*J. Soc. Textile and Celulose Ind. Japan.*, 9, 157.
- 48) KONING, J. (1907).—*Landw. Ver. Stat.* 65, 55.
- 49) KRATZL, K. (1950).—*Internat. Holzmarkt*, 2, 7.
- 50) KUKHARENKO, A. (1950).—*Ref. en Chem. Abs.*, 44, 9147 g.
- 51) KURSCHNER, K., und HANAK, A. (1930).—*Z. Untersuch. Lebensm.*, 59, 484.
- 52) LAATSCH, W., (1948).—*Beitr. z. Agrarwiss.*, 3, 3.
- 53) LANCABTER, R. J. (1943).—*New Zeal. J. Sci. and Technol.*, 25, 137.
- 54) LINDEBERG, G. (1948).—*Physsl. Plant.*, 1, 196.
- 55) LINDEBERG, G. (1955).—*Z. Pflanzenernahr. Dung. Bodenkunde*, 69, 142.
- 56) LOUW, J. G., ONDERST, J., (1941).—*J. Vet. Sci. and Anim. Indus.*, 17, 165.
- 57) LOUW, J. G., ONDERST, J. (1944).—*J. Vet. Sci., and Anim. Indus.*, 20, 85.
- 58) MAILLARD, L. C. (1917).—*Ann. Chem. Phys.*, 7, 113.
- 59) MARSCHALL, R. A. (1949).—*Brit. J. Nutrit.*, 3, 1.
- 60) MAYNARD, L. A. (1940).—*Agr. Chem. J.*, 23, 156.
- 61) MCANALLY, H. A. (1942).—*Biochem. J.*, 36, 392.
- 62) MEYER, L. (1943).—*Pflanzenernahrung*, 29, 119.
- 63) NEHRING, K., SCHIEMANN, R. (1952).—*Pflanzenernahrung. Dung., Bodenkunde*, 57, 193.
- 64) PAGE, J. H. (1931).—*J. Agric. Sci.* 22, 291.
- 65) PLOETZ, TH. (1954).—*Landbauforschung-Volkenrode*, 4, 4.
- 66) PELCZAR, M. L., GOTTLIEB, S. and DAY, W. O. (1950).—*Day Ar. Biochem.*, 25, 449.

- 67) PERRENOUD, H. (1944).—Diss. E. T. H. Zurich.
- 68) RITTER, J. G., SEGORB, R. M., MITCHELL, R. L. (1932).—*Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 4, 202.
- 69) ROGOZINSKI, F., STAREWAKA, M., (1927).—*Intern. Rev. Agr.* 18, 413.
- 70) SAALBACH, E. (1956).—VI Intern. Congr. Sci. du Sol. Paris, IV, 17, 107.
- 71) SCHOBINGER, U. (1958).—Diss. E. T. H. Zurich.
- 72) SCHEFFER, F. (1944).—*Ann. Edaf. Ecol. Fisiol. Veg.*, 3, 161.
- 73) SCHEFFER, F., und WELTE, E. (1950).—*Naturwiss.* 37, 321.
- 74) SCHRADER, H. (1922).—*Brennstof-Chem.*, 3, 161.
- 75) SCHRAMECK, H. (1944).—Diss. E. T. H. Zurich.
- 76) SCHUBERT, W. J. und NORD, F. F. (1950).—*J. Amer. Chem. Soc.* 72, 977.
- 77) SIEGE, S. M. (1956).—*Quart. Rev. Biol.* 31, 1.
- 78) SIEGEL, O. (1936).—*Z. Pflanzenernahr. Bodenkunde und Pflanzenernahrung*, 16, 168 (1940).
- 79) SPRINGER, U. (1945-45).—*Praktische Blatter f. Pflanzenbau und Pflancenschutz*, 21-22, 1
- 80) TRAYNARD, P. H., et AYROUD, A. M. (1954).—*Bull. Sco., Chim. Fr.* 345.
- 81) VAN SLYKE, D. D., MACFADYEN, D. A., and HAMILTON, P. (1941).—*J. Biol. Chemistry*, 141, 671.
- 82) VIEBOCK, F., und BRECHER, C., PREGL, F., (1949).—*Quantitative Organische Mikroanalyse*, revisada por H. Roth, Springer Verlag Wien (p. 266).
- 83) WACEK, A. v. und. KRATZL, K. (1943).—*Ber. Dtsch. Chem. Gest.*, 76, 891.
- 84) WARNER, A. C. I. (1956).—*Gen. Microbiol.* 14, 733.
- 85) WEHRMANN, J. (1956).—*Z. Pflanzenernahr. Dung. Bodenkunde*, 70, 34.
- 86) WELTE, E. (1952).—*Pflanzenernahr. Dung., Bodenkunde*, 56, 105.

87) WISE, L. E. und JAHN, E. C. (1952).—*Wood Chemistry* New York, Reinhold Publ. Co.

88) ZORITA, E. und CALVO, M. L. (1956).—*Z. Tierernah. Futtermittelk.* 11, 323.

89) ZORITA, E. und SCHOBINGER, U. (1955).—*Arch. f. Tierernahrung*, 8, 255.