

Aspectos antinutritivos de algunas fuentes proteicas de origen microbiano: estudios de realimentación proteica *

J. Bello, J. Larralde y M.^a R. Villanueva **

Departamento de Investigaciones Fisiológicas
Sección de Nutrición Animal
C.S.I.C.
Universidad de Navarra
Pamplona

(Recibido el 11 de febrero de 1974)

J. BELLO, J. LARRALDE and M.^a R. VILLANUEVA. *Antinutritive Effects in Single-Cell Proteins (SCP): Studies on the Starvation and Refeeding in Rats*. Rev. esp. Fisiol., 30, 103-110. 1974.

The chemical composition and biological quality of *Saccharomyces cerevisiae* grown on molasses and dried afterwards, of *Candida utilis* grown on waste liquors from extraction of olive oil and of *Candida lipolytica* grown on pure n-paraffins were investigated.

Amino-acid analysis showed a deficiency in sulphur aminoacids. Growth and proteins metabolism of male rats promoted by yeast's proteins was compared with that promoted by casein. The Biological Values obtained from single-cell proteins comes out much below that which could be expected from its content in essential aminoacids.

The effect of starvation and refeeding on liver and on serum proteins was studied in rats receiving high and low protein diets. During refeeding, the rats fed yeast protein diets showed some significant differences in serum protein fractions and in liver proteins.

Diversos trabajos han puesto de manifiesto que la ingestión periódica de levaduras como fuente total o parcial de proteínas en la alimentación de los animales

lleva consigo la aparición de una serie de trastornos más o menos tóxicos (9, 17, 23, 28). Para explicar esos trastornos suele admitirse una acción antinutritiva que, actuando sobre el fisiologismo del animal, produce efectos nocivos de interpretación difícil y aún no aclarada.

En trabajos anteriores (4, 5, 6) hemos obtenido con la ingestión de diversas le-

* Trabajo realizado con cargo al Fondo de Ayuda a la Investigación del M.E.C.

** Con una Beca de Formación de Personal Investigador.

vaduras índices nutritivos deficientes, que no se corresponden con lo que cabría esperar del análisis de su composición aminoacídica cuali y cuantitativa.

Dado el enorme interés que actualmente existe en promocionar la obtención industrial de proteínas, a partir de organismos unicelulares (Single-cell Proteins), hemos creído interesante, de acuerdo con los planteamientos y metodología de MÉNDEZ *et al.* (13) y TASKER *et al.* (26), aportar nuevos datos sobre la influencia de algunas de estas levaduras alimenticias en la recuperación de animales sometidos a un estado de hipoproteinemia provocada.

Material y métodos

El análisis químico de las materias primas fue obtenido mediante los métodos aconsejados por la A.O.A.C. (2). El análisis cuantitativo de los aminoácidos de las proteínas se llevó a cabo por el método cromatográfico de MOORE y STEIN (18). Para el triptófano se realizó una hidrólisis con Ba(OH)₂ a 110° C, empleando doble tubo de teflón cerrados herméticamente, con adición, en uno de ellos, de una cantidad estándar de triptófano a fin de compensar, en los cálculos, las interferencias propias del sustrato.

Para determinar los índices nutritivos, Valor Biológico y Utilización Proteica Neta, se realizaron balances de nitrógeno con grupos de 6 ratas alimentadas de modo racionado durante una semana con dietas equilibradas que contenían 12 % de proteínas, según la metódica de SCHILLER (23), aportadas por cada una de las cinco materias primas siguientes: *a*) harina de huevo total desecado y desengrasado, empleada para la dieta estándar; *b*) caseína Hammarsten, escogida como proteína de referencia en virtud de su característica común con las levaduras alimenticias del reducido contenido en aminoácidos azufrados; *c*) levadura de panadería desecada, obtenida mediante cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* en melazas de remola-

cha; *d*) levadura de alpechín, procedente de cultivos de *Candida utilis* en el agua de vegetación de las aceitunas empleadas en las molinerías de aceite; *e*) levadura de petróleo, obtenida por cultivos de *Candida lipolytica* en sustratos de hidrocarburos saturados de cadena normal, previamente desengrasada.

Para conocer los efectos provocados en el organismo animal por la ingestión de estas fuentes proteicas se llevaron a cabo experiencias de realimentación, con dietas elaboradas de acuerdo con los criterios establecidos en un trabajo anterior (10).

Grupos de 6 ratas, alimentadas desde su destete con una dieta estándar a base de 20 % de proteína de huevo, se sometieron a una semana de ayuno proteico con una dieta isocalórica carente de nitrógeno. Posteriormente, cada uno de los grupos fue realimentado con una dieta de bajo (12 %) o alto (20 %) nivel proteico, durante otro período de siete días, al cabo del cual se determinaron los parámetros fisiológicos más afectados por el stress nutricional: peso del hígado, proteínas hepáticas (11), lípidos hepáticos (22) y fracciones proteicas séricas, separadas por electroforesis en acetato de celulosa. Además, se determinó el Coeficiente de Conversión Proteica (3) presentado por cada dieta ensayada a lo largo del período de realimentación, en función de la proteína ingerida e incrementada.

Resultados

La composición química de las fuentes proteicas, así como el contenido aminoacídico de las levaduras estudiadas se incluyen en las tablas I y II.

En la tabla III se han reunido los resultados obtenidos para los índices nutritivos, determinados a partir del balance de nitrógeno (23) y a partir del análisis de sus aminoácidos esenciales, de acuerdo con la modificación introducida por MITCHELL (15) para el Índice de OSER (IAE). En la tabla IV se han indicado los Coefi-

Tabla I. Composición química (%) de las fuentes proteicas empleadas.

	Huevo total desengrasado	Caseína	S. cerevisiae	C. utilis	C. lipolytica
Humedad	5,0	10,5	5,4	10,2	4,5
Proteína total	62,6	86,8	41,5	30,2	63,2
Extracto etéreo	0,1	0,2	9,4	5,0	2,4
Cenizas	6,0	2,4	6,1	7,5	6,2
M.E.L.N. *	26,3	0,1	37,6	47,1	23,7

* Materias extractivas libres de nitrógeno.

Tabla II. Contenido en aminoácidos (g/100 g de proteína) de las levaduras alimenticias estudiadas.

Aminoácidos	S. cerevisiae	C. utilis	C. lipolytica
Acido aspártico	9,12	7,80	9,02
Treonina	4,93	4,42	4,86
Serina	4,64	4,15	4,68
Prolina	2,36	2,04	3,98
Acido glutámico	11,55	10,00	11,85
Glicina	4,44	3,97	4,18
Alanina	5,44	5,75	7,40
Valina	4,88	4,14	5,43
Metionina	1,07	1,66	1,70
Isoleucina	4,42	4,82	4,60
Leucina	7,23	6,74	6,93
Tirosina	4,17	3,27	3,55
Fenilalanina	5,31	4,78	4,69
Lisina	6,59	4,97	6,11
Histidina	2,22	1,73	2,02
Arginina	7,08	3,02	4,93
Cistina	0,97	0,92	0,95
Triptófano	1,51	0,87	1,36

cientes de Conversión Proteica obtenidos para cada una de las dietas basales en el período de realimentación. El peso corporal — reducido durante el ayuno proteico en un 30 % — se recupera, al menos en parte, con las dietas ensayadas, con la excepción de la levadura de alpechín, que produce en los animales un fuerte stress.

La pérdida de peso durante el ayuno se acompaña de una reducción del peso del

hígado en cada animal, así como de alteraciones en su contenido proteico y graso: las proteínas hepáticas se reducen a un 58 % del nivel primitivo y los lípidos se elevan hasta un 377 %. La recuperación de estos parámetros fisiológicos mediante la realimentación se ha recogido en la tabla V.

También el ayuno proteico (tabla VI) altera las fracciones de las proteínas séricas de los animales y la vuelta a los valores normales es una función de la proteína incluida en la dieta de realimentación y del nivel proteico de la misma.

Discusión

En trabajos anteriores (4-6) se ha comprobado que el nitrógeno aportado por las levaduras alimenticias es utilizado por el organismo animal de modo poco eficaz y bastante por debajo de lo que cabría esperar de su composición aminoacídica. Los resultados que se obtuvieron en los balances de nitrógeno no se justificaron ni por la reducción de la ingesta, ni por la escasa digestibilidad de estas proteínas. Por ello, para juzgar de la verdadera capacidad nutritiva de estas materias alimenticias resulta de particular interés considerar los resultados obtenidos en las experiencias de realimentación.

En estas condiciones de stress nutricional es muy significativo la determinación del Coeficiente de Conversión Proteica, que relaciona la proteína incrementada por el animal con la proteína que ingiere. Los animales, sometidos a una semana de ayuno proteico, sufrieron una reducción de su peso corporal, de igual magnitud que la indicada por otros autores (26). La realimentación con dietas a base de caseína — independientemente de su nivel proteico —, recupera el peso de los animales con una capacidad de conversión proteica semejante a la presentada por la dieta estándar, en las condiciones normales de alimentación. Sin embargo, esto no ocurre con las dietas que contienen levaduras de

Tabla III. *Indices nutritivos (*) de las proteínas: caseína, levadura de panadería desecada, levadura de alpechín y levadura de petróleo.*Valores medios \pm error estándar.

Fuente proteica	Caseína	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. utilis</i>	<i>C. lipolytica</i>
Peso medio (g)	53,51 \pm 0,28	60,73 \pm 3,17	54,34 \pm 2,02	51,62 \pm 1,61
Incremento de peso (g)	15,14 \pm 0,96	1,82 \pm 0,06	-8,86 \pm 0,54	5,30 \pm 0,58
Nitrógeno ingerido (g)	1,35 \pm 0,01	0,96 \pm 0,05	0,64 \pm 0,04	1,16 \pm 0,03
Nitrógeno absorbido (g)	1,30 \pm 0,01	0,81 \pm 0,05	0,37 \pm 0,02	0,92 \pm 0,02
Nitrógeno retenido (g)	0,91 \pm 0,01	0,31 \pm 0,03	0,04 \pm 0,01	0,50 \pm 0,01
Valor biológico (%)	69,52 \pm 0,62	38,27 \pm 3,91	11,00 \pm 2,69	52,83 \pm 0,69
Utilización proteica neta (%)	66,85 \pm 0,89	32,18 \pm 3,32	6,46 \pm 0,74	42,95 \pm 0,50
Valor biológico teórico (**) (%)	87,74	75,70	60,83	71,43

(*) Balance de nitrógeno realizado con grupos de seis ratas alimentadas racionadamente durante siete días con dietas de 12 % de proteínas.

(**) Deducido del Índice de Aminoácidos Esenciales, IAE, según la correlación establecida por Oser:
VB = 1,09 · IAE - 11,73.

panadería o de petróleo: para niveles altos de proteína en la dieta, el Coeficiente de Conversión Proteica representa un 72-74 % del obtenido para el grupo control, en tanto que para niveles bajos, este porcentaje alcanza solamente el 47 y 36 % para una u otra fuente proteica.

Estos resultados parecen indicar una simple influencia de la calidad proteica de la dieta, pero el cuadro de total ineficacia que presentan las dietas con levadura de alpechín especialmente a mayor concentración en la dieta, hace pensar en la exis-

Tabla IV. *Coeficientes de Conversión Proteica (CCP) obtenidos en las experiencias de realimentación (*)*

Fuente proteica	Nivel proteico (%) de la dieta de realimentación	
	12	20
Caseína	17,8 \pm 1,37	22,0 \pm 1,38
<i>S. cerevisiae</i>	10,8 \pm 0,76	17,2 \pm 1,27
<i>C. utilis</i>	2,3 \pm 0,31	0,0 \pm 0,00
<i>C. lipolytica</i>	8,3 \pm 0,56	16,4 \pm 1,07

(*) CCP del grupo patrón con alimentación estándar: 22,7 \pm 0,92.Tabla V. *Variación de los parámetros hepáticos con el ayuno proteico y la realimentación con dietas de alto o bajo nivel proteico.*

Fuente proteica	Nivel proteico %	Peso del hígado g	Proteínas hepáticas g/100 g de tejido fresco	Lípidos hepáticos g/100 g de tejido fresco
Huevo total desengrasado ^a	20	3,32 \pm 0,12	19,30 \pm 0,43	2,04 \pm 0,04
Ayuno proteico	—	2,96 \pm 0,03 ^b	11,25 \pm 0,22 ^b	7,70 \pm 0,24 ^b
Caseína	20	3,32 \pm 0,06	14,45 \pm 1,25 ^b	6,00 \pm 0,22 ^b
Caseína	12	3,37 \pm 0,17	14,40 \pm 0,52 ^b	6,80 \pm 0,11 ^b
<i>S. cerevisiae</i>	20	4,18 \pm 0,04 ^b	22,83 \pm 0,39 ^c	3,48 \pm 0,26 ^c
<i>S. cerevisiae</i>	12	3,31 \pm 0,05	16,00 \pm 0,34 ^c	6,48 \pm 0,29 ^b
<i>C. utilis</i>	20	2,34 \pm 0,03 ^b	13,38 \pm 0,73 ^b	1,78 \pm 0,30
<i>C. utilis</i>	12	3,73 \pm 0,12	18,15 \pm 0,71	5,00 \pm 0,20 ^b
<i>C. lipolytica</i>	20	3,52 \pm 0,13	18,15 \pm 0,46	4,70 \pm 0,21 ^b
<i>C. lipolytica</i>	12	4,00 \pm 0,10 ^c	18,95 \pm 1,09	5,44 \pm 0,33 ^b

(a) Grupo control de alimentación estándar.

(b) Diferencia significativa con el grupo de alimentación estándar, $P \leq 0,001$.(c) Diferencia significativa con el grupo de alimentación estándar, $P \leq 0,01$.

Tabla VI. Variación de las distintas fracciones de proteínas séricas con el ayuno proteico y la realimentación con dietas de alto o bajo nivel proteico, expresadas en tanto por ciento de los valores obtenidos para el grupo control de alimentación estándar.

Fuente proteica	Nivel prot. %	albúminas	α_1 -globulinas	α_2 -globulinas	β -globulinas	γ -globulinas
Grupo control	20	4,2 \pm 0,08 ^a	0,4 \pm 0,03 ^a	0,9 \pm 0,07 ^a	1,25 \pm 0,07 ^a	0,6 \pm 0,05 ^a
Ayuno proteico	—	63,5 \pm 0,69 ^b	96,5 \pm 10,97	53,3 \pm 4,32 ^b	100,1 \pm 4,32	250,6 \pm 6,33 ^b
Caseína	20	99,8 \pm 2,24	95,4 \pm 16,57	82,2 \pm 10,94	93,0 \pm 6,54	106,8 \pm 9,28
Caseína	12	100,7 \pm 2,60	99,5 \pm 3,16	87,2 \pm 9,31	95,4 \pm 2,07	113,0 \pm 3,46
<i>S. cerevisiae</i>	20	95,0 \pm 2,65	31,6 \pm 4,93 ^b	47,0 \pm 1,93 ^b	86,6 \pm 3,44 ^c	179,7 \pm 9,86 ^b
<i>S. cerevisiae</i>	12	71,4 \pm 2,72 ^b	82,7 \pm 18,68 ^b	54,7 \pm 3,19 ^b	95,1 \pm 5,97	235,1 \pm 19,45 ^b
<i>C. utilis</i>	20	61,7 \pm 2,97 ^b	55,0 \pm 2,64 ^b	60,1 \pm 5,69 ^b	48,6 \pm 1,13 ^b	135,9 \pm 3,86 ^c
<i>C. utilis</i>	12	90,1 \pm 1,04 ^c	40,0 \pm 7,32 ^b	52,4 \pm 3,56 ^b	90,4 \pm 5,17	241,9 \pm 4,11 ^b
<i>C. lipolytica</i>	20	92,7 \pm 3,32	64,8 \pm 1,65 ^b	27,1 \pm 4,32 ^b	74,9 \pm 4,20 ^c	132,9 \pm 8,35 ^c
<i>C. lipolytica</i>	12	95,8 \pm 2,16	80,0 \pm 6,47 ^c	38,3 \pm 2,47 ^b	79,6 \pm 3,94 ^c	156,9 \pm 10,97 ^c

(a) g proteínas/100 ml de suero.

(b) diferencia significativa con el grupo control de alimentación estándar, $P < 0,001$

(c) diferencia significativa con el grupo control de alimentación estándar, $P < 0,01$

tencia de algún otro factor y plantea la necesidad de considerar los efectos ejercidos por las dietas sobre otros parámetros fisiológicos.

El ayuno proteico con dieta isocalórica origina diversas alteraciones en el hígado de los animales —reducción de peso, disminución del contenido en proteínas, aumento del porcentaje de lípidos—, y la recuperación de estos parámetros depende tanto de la fuente proteica como del nivel proteico de la dieta aplicada en la realimentación.

Se ha comprobado que el contenido en metionina y cistina es uno de los factores que controlan el nivel de los lípidos hepáticos (8), con independencia de la relación entre ambos (1). La metionina y cistina presentan un efecto antilipotro que provoca el incremento de lípidos en el hígado, contrario al que producen otros aminoácidos esenciales, como leucina y fenilalanina (28). Aunque todas nuestras dietas ensayadas adolecen de una deficiencia en aminoácidos azufrados sin embargo la recuperación de los lípidos hepáticos es diversa para caseína y levaduras, especialmente con dietas de alto nivel proteico. En estos casos, se observa que las dietas son tanto más capaces de redu-

cir el elevado porcentaje de lípidos hepáticos consecuente al ayuno, cuanto menor es la eficacia presentada por su proteína para el crecimiento animal y la retención proteica.

Respecto de la recuperación del peso del hígado y las proteínas hepáticas, hay que señalar que la realimentación con dietas de levaduras ofrece un incremento anormal de las proteínas, correlativo a un desproporcionado aumento del peso del hígado, que no se da con caseína, sin que se pueda atribuir a una degeneración de tipo graso.

Estos resultados sobre recuperación hepática tienen su correspondencia con los obtenidos para la recuperación de las proteínas séricas totales (fig. 1).

El estudio de las distintas fracciones de proteínas séricas ofrece también cierto interés. La alimentación de los distintos grupos de animales con una dieta carente de nitrógeno, durante siete días, da lugar a una reducción —también indicada por otros autores (27)— de las fracciones albúminas y α_2 -globulinas, a la vez que se elevan las γ -globulinas, para contrarrestar, según algunos (24), la caída de la presión osmótica.

En nuestras experiencias, la realimenta-

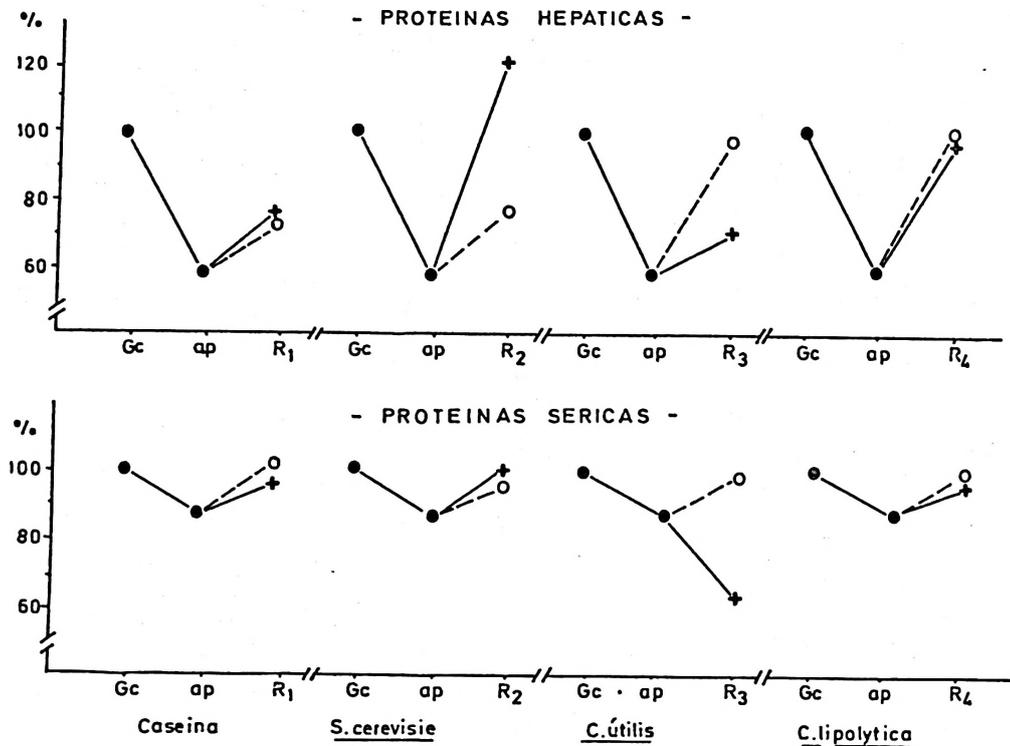


Fig. 1. Variación de las proteínas hepáticas y séricas con el ayuno proteico y la realimentación con dietas de alto nivel proteico (●—+) o bajo nivel proteico (●---○).

G_c: grupo control de alimentación estándar.

ap: grupo control de ayuno proteico.

R_n: grupos de realimentación.

ción con caseína presenta una recuperación dentro de toda normalidad, especialmente para la dieta de alto nivel proteico. El ligero aumento observado para las α_1 -globulinas con dietas de bajo nivel proteico, también se encuentra indicado en la bibliografía (13). Frente a este patrón ofrecido por la caseína, las levaduras presentan valores diferentes. La levadura de petróleo recupera la albúmina hasta su valor normal y consigue reducir en gran parte las γ -globulinas, a la vez que aparece una disminución de la fracción alfa, que se corresponde con el aumento anormal de proteínas hepáticas. También con la levadura de panadería se registra esta relación con las anomalías hepáticas, pero solamente la dieta de alto nivel es capaz de una recuperación de las fraccio-

nes como lo hace la de petróleo. En una y otra levadura se da una significativa reducción de las fracciones β -globulinas, tal vez ligada al efecto lipotrope de estas levaduras, puesto que este cambio, tan poco frecuente, sólo se ha observado en relación con alteraciones de lipoproteínas.

Como se sabe, la mayor parte de las proteínas séricas, con excepción de las γ -globulinas, se sintetizan en el hígado (14), por lo que cualquier stress que afecte a este órgano se deberá reflejar en la concentración de cada una de las fracciones séricas (7, 20, 25). Los resultados obtenidos en nuestras experiencias hacen pensar en una alteración del metabolismo hepático, especialmente en los casos de *S. cerevisiae* cultivada en melazas y de *C. utilis* crecida en alpechín de aceituna,

ya que la reducción de las fracciones alfa sólo se han indicado en enfermedades relacionadas con anomalías de tipo hepático, tales como cirrosis o hepatitis vírica (12) y, del mismo modo, la fracción gamma se suele incrementar en las necrosis hepáticas (19) y otras enfermedades de hígado (7).

Resumen

Se han estudiado la composición química y los índices nutritivos de tres fuentes proteicas de origen microbiano: *S. cerevisiae*, crecida en melazas; *C. utilis*, cultivada en alpechín, y *C. lipolytica*, desarrollada en cultivos base de hidrocarburos saturados.

El análisis cuantitativo de sus aminoácidos pone de manifiesto una deficiencia en metionina y cistina en todas ellas. Aparte de su desequilibrio aminoácido, estas fuentes proteicas presentan algún otro factor que provoca anomalías nutricionales: el Valor Biológico obtenido por balance nitrogenado es muy inferior al que cabría esperar de su composición aminoácida y el crecimiento animal se halla notablemente reducido. Las experiencias de realimentación señalan una alteración de la síntesis proteica en hígado, así como en los lípidos hepáticos y fracciones de proteínas séricas, como consecuencia de la ingestión de estas levaduras.

El stress nutricional apenas se acusa en la levadura de petróleo (*C. lipolytica*), en tanto que se hace notar en la levadura de panadería desecada (*S. cerevisiae*), para ser particularmente intenso en la levadura de alpechín (*C. utilis*).

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a D. L. M.^a Jáuregui y a D. J. Iriarte, Ayudantes Técnicos de Laboratorio, la colaboración prestada en la realización práctica de este trabajo.

Bibliografía

1. AOYAMA, Y., YOSHIDA, A. y ASHIDA, K.: *J. Nutr.*, **97**, 348-352, 1969.
2. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS: «Official Methods of Analysis» (10.^a edic.). Edit. A.O.A.C., Washington, 1965.
3. BELLO, J., BARROS, M.^a L. y LARRALDE, J.: *Rev. Nutr. Animal*, **5**, 101-109, 1967.
4. BELLO, J., LARRALDE, J. y VILLANUEVA, R.: *An. Bromatol.*, **25**, 197-214, 1973.
5. BELLO, J., LARRALDE, J. y VILLANUEVA, R.: *An. Bromatol.*, **25**, 215-234, 1973.
6. BELLO, J., LARRALDE, J. y VILLANUEVA, R.: *Rev. Nutr. Animal*, **11**, 77-86, 1973.
7. GUTMAN, A. B.: *Adv. Protein Chem.*, **4**, 155-250, 1948.
8. HARPER, A. E., WINJE, M. E., BENTON, D. A. y ELVEHJEM, C. A.: *J. Nutr.*, **56**, 187-198, 1965.
9. HOCK, A. y FINK, H.: *Z. Physiol. Chem.*, **279**, 187-206, 1943.
10. LARRALDE, J., BELLO, J. y RODRÍGUEZ, C.: *An. Bromatol.*, **16**, 302-321, 1964.
11. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, F. L., FARR, A. L. y RANDALL, R. S.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
12. MARTIN, N. H.: *Brit. J. Exptl. Pathol.*, **30**, 231-236, 1949.
13. MÉNDEZ, J. y MENCHU, M. T.: *J. Nutr.*, **88**, 365-369, 1966.
14. MILLER, L. L. y BALE, W. F.: *J. Exp. Med.*, **99**, 125-133, 1954.
15. MITCHELL, H. H.: *Wiss. Abh. Deutsch. Akad. Landwirtschaft.*, Berlín, **5**, 279-325, 1954.
16. MITCHELL, H. H.: Symposium on Methods for the Evaluation of Nutritional Adequacy and Status (Edit. H. Spector, M. S. Peterson y T. E. Friedeman). National Research Council, Washington, D.C., 1954, p. 13.
17. NICKERSON, W. J. y BROWN, R. G.: *Adv. Appl. Microbiol.*, **7**, 225-273, 1965.
18. MOORE, S. y STEIN, W. H.: *J. Biol. Chem.*, **192**, 663-681, 1954.
19. PRENDERGAST, J. J., FENICHEL, R. L. y DALY, B. M.: *Arch. Surg.*, **64**, 733-744, 1952.
20. RICKETTS, W. E., STERLING, K., KIRSNER, J. B. y PALMER, W. L.: *Gastroenterology*, **13**, 205-211, 1949.
21. ROTHSCHILD, M. A., ORATZ, M., MONGELLI, J. y SCHREIBER, S. S.: *J. Lab. Clin. Med.*, **66**, 733-740, 1965.
22. SANTIAGO, E., GUERRA, F. y MACARULLA, J. M.: *Rev. esp. Fisiol.*, **24**, 25-29, 1968.
23. SCHILLER, K.: *Ztschr. Tierphysiol. Tierernährung Futtermittelk.*, **15**, 305-308, 1960.
24. SINDRANSKY, H., VERNEY, E. y LOMBARDI, B.: *J. Nutr.*, **81**, 348-356, 1963.

25. STERLING, K., RICKERTTS, W. E., KIRSNER, J. B. y PALMER, W. L.: *J. Clin. Invest.*, **28**, 1236-1245, 1949.
26. TASKER, P. K., PRASAD, D. S., DANIEL, V. A., ACHARAYA, V. S., JOSEPH, A. A., VENKAT, RAD S., NARAYANA, RAD M., RAJALAKSHMI, D., SWAMONATHAN, M. y SREENIVASANN, A.: *J. Nutr. Diet.*, **1**, 73-80, 1964.
27. WEIMER, H. E.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **94**, 225-249, 1961.
28. WILLIAMS, J. M., JR. y HURLEBAUS, A.: *J. Nutr.*, **85**, 82-88, 1965.
29. WINDMUELLER, H. G.: *J. Nutr.*, **85**, 221-229, 1965.