



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“PRODUCCION DE GAS FECAL *in vitro* DE SEIS  
INGREDIENTES USADOS EN LA ALIMENTACION DE  
CABALLOS CON LA ADICION DE *Saccharomyces cerevisiae*”

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

**MARICRUZ BONAGA AGUIRRE**

**ASESORES:**

Dr. ABDEL FATTAH ZEIDAN MOHAMED SALEM

Dra. MONA MOHAMED MOHAMED YASSEEN ELGHANDOUR



Toluca, México Junio de 2018

## **DEDICATORIAS**

De manera especial, a mis padres, Mario Bonaga Ramírez y María Aguirre Olvera, por haberme dado la mejor herencia que puede dársele a una hija y por haber hecho de mí una persona de provecho, por su cariño y amor.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quisiera agradece a Dios, porque ha hecho de mí una persona de bien y me ha guiado por el camino correcto.

Agradezco al Dr. Abdel Fattah Z. M. Salem y a la Dra. Mona Mohamed Mohamed Yasseen Elghandour, por la dirección de esta tesis, por su apoyo, confianza y conocimientos brindados a través del tiempo que duro la elaboración de la misma.

Mi agradecimiento a la comisión revisora M. en C. Adriana Díaz Archundia y Dr. En C. Juan Edrei Sánchez Torres, por las observaciones y sugerencias que contribuyeron a la calidad de la presente.

Agradezco a la M. en A. Teresita Burgos González por su incondicional apoyo como tutora a lo largo de mi carrera y por ser un modelo de inspiración para mi formación profesional, gracias

A los maestros y doctores de esta casa de estudios por sus enseñanzas, compañía, apoyo y por ser parte fundamental de mi formación como Medica Veterinaria y Zootecnista, gracias.

A mis amigos y compañeros de carrera, por aquellos agradables momentos que compartí con ustedes.

## TÍTULO

PRODUCCIÓN DE GAS FECAL *in vitro* DE SEIS INGREDIENTES USADOS EN LA ALIMENTACIÓN DE CABALLOS CON LA ADICIÓN DE *Saccharomyces cerevisiae*.

## Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo el evaluar el valor nutritivo de seis alimentos (granos y forrajes) usados comúnmente en México para la alimentación de caballos, analizando la base de su composición química y mediante la técnica de producción de gas *in vitro* estimar la cinética de fermentación de cada uno de los ingredientes sin adición y bajo la adición de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) a 2mg/g Materia Seca (MS). El inóculo fecal fue obtenido de un caballo de la raza árabe alimentado con una cantidad restringida de alimento concentrado y heno de avena *ad libitum*. Respecto a los alimentos probados como sustratos corresponden a tres concentrados los cuales incluyeron maíz roado (*Zea mays*), cebada rolada (*Hordeum vulgare*) y salvado de trigo (*Triticum aestivum*), y tres forrajes que incluyeron cascara de soya (*Glycine max*), rastrojo de maíz (*Zea mays*) y heno de avena (*Avena sativa*), la levadura *S. cerevisiae* corresponde a un producto en forma de polvo que contiene  $1 \times 10^{10}$  células/g del producto, se utilizó a 0 y 2mg/ g MS del alimento.

La producción de gas (PG) fue registrada a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 24, 48 y 70 horas utilizando para esta técnica un transductor de presión. Las interacciones de la adición de levadura a los ingredientes corresponden ( $P \leq 0.020$ ) para Producción de Gas (PG) asintótico y PG a las 48 y 70 horas de incubación. La adición de levadura aumento ( $P < 0.001$ ) la PG asintótico de concentrados comparado con forrajes. Los alimentos concentrados registraron más ( $P < 0.05$ ) PG y menor ( $P < 0.001$ ) tasa de PG en comparación con los forrajes sin levadura.

Desde 24 a 70 horas de incubación, forrajes con o sin levadura tuvieron una PG menor ( $P < 0.05$ ) en comparación con concentrados adicionados con *S. cerevisiae*.

Los forrajes presentaron un pH de fermentación más alto comparado con concentrados pero menor energía metabolizable ( $P < 0.05$ ), Digestibilidad de Materia Orgánica *in vitro* (IVOMD) y producción de proteína microbiana en comparación con los concentrados. La suplementación con *S. cerevisiae* aumento ( $P < 0.05$ ) la PG asintótico de cebada rolada, maíz roado, salvado de trigo, rastrojo

de maíz y heno de avena, sin afectar la tasa de PG o el tiempo de retraso del salvado de trigo, rastrojo de maíz y heno de avena. Además la suplementación con *S. cerevisiae* aumento ( $P < 0.05$ ) la energía metabolizable, IVOMD y la producción de proteínas microbianas de cebada rolada, salvado de trigo y rastrojo de maíz, sin afectar la fermentación de otros alimentos ( $P < 0.05$ ). La suplementación con *S. cerevisiae* mejora la fermentación de los alimentos con mayores efectos en concentrados que en forrajes, concluyendo que, *S. cerevisiae* mejora principalmente la utilización del concentrado por los caballos, también mejora la digestión de la fibra cuando la dieta usada en caballos es alta en forraje.

## INDICE

DEDICATORIAS .....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
Resumen .....	v
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
2.1 La alimentación en los equinos. ....	3
2.2 Generalidades de levaduras.....	3
2.3 Tipos de levaduras .....	4
2.4 Mecanismo de acción de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en especies monogástricas. ....	5
2.4.1 Estimulación de las disacaridasas del borde en cepillo.....	5
2.4.2 Propiedades antiadhesivas .....	6
2.4.3 Estimulación de la inmunidad .....	6
2.4.4 Inhibición de la acción de toxinas .....	6
2.5 Mecanismo de acción de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en caballos. ....	7
2.6 Alimentos para equinos .....	8
2.7 Principales alimentos para el caballo .....	8
2.7.1 Forrajes .....	9
2.7.2 Praderas.....	9
2.7.3 Ensilados.....	10
2.7.4 Henos.....	11
2.7.5 Pajas .....	11
2.7.6 Granos y sus derivados .....	12
2.7.7 Alimentos suculentos .....	15
2.7.8 Suplementos proteínicos.....	16
2.8 Producción de gas <i>in vitro</i> .....	17
2.8.1 Origen del gas.....	18
2.8.2 Medición de la presión del gas.....	19
2.8.3 Preparación para la inoculación.....	19
2.8.4 Secado de las muestras.....	19
2.8.5 Molienda de los sustratos .....	19
2.8.6 Preparación del medio .....	20
2.8.7 Obtención del inoculo.....	20
2.8.8 Preparación del inoculo.....	20
2.8.9 Blancos.....	21
2.9 Método de digestibilidad <i>in vitro</i> .....	21
2.10 Cinética de fermentación <i>in vitro</i> .....	22
2.11 Digestibilidad .....	22
III. JUSTIFICACIÓN.....	24
IV. HIPÓTESIS .....	25
V. OBJETIVOS .....	26
5.1 General.....	26

5.2 Específicos .....	26
VI. MATERIAL .....	27
6.1 Material experimental .....	27
6.2 Material biológico.....	27
6.3 Tipo de sustratos y levadura.....	27
VII. MÉTODO.....	29
7.1 Metodología.....	29
7.1.1Tratamientos .....	29
7.1.2 Inoculo de equino, inoculación para producción de gas <i>in vitro</i> .....	30
7.1.3 Análisis químico .....	31
7.1.4 Análisis estadístico.....	31
7.2 Modelo estadístico.....	32
VIII. LÍMITE DE ESPACIO .....	33
8.1 Localización del área experimental .....	33
IX. LÍMITE DE TIEMPO .....	34
X. RESULTADOS .....	35
XI. DISCUSIÓN .....	43
XII. CONCLUSIONES.....	47
XIII. SUGERENCIAS .....	48
XIV. LITERATURA CITADA.....	49

## I. INTRODUCCIÓN

El caballo (*Equus caballus*) ha evolucionado para la vida en pastoreo y ramoneo (Frape, 1992). En libertad, los caballos pasan pastando de 12 a 16 horas diarias en períodos de 2 a 3 horas alternados con momentos de descanso e interacción social (Ralston, 1984). Así pues, el aparato digestivo de los caballos se ha adaptado para poder ingerir grandes cantidades de hierba de manera frecuente distribuidas a lo largo del día y obtener energía eficientemente de la misma (Hussein y Vogedes, 2007).

El aparato digestivo es un conducto tubular músculo-membranoso que se extiende de la boca al ano. En la parte anterior del aparato digestivo, la producción de grandes cantidades de saliva (10-12 L / día) ayudan a transportar el alimento a través del esófago (Cunha, 1991). A medida que la ingesta ácida alcanza el duodeno, el pH se neutraliza a 7.0 ó 7.4 por la bilis y las grasas se emulsionan (Colville y Bassert, 2008). Las proteínas son digeridas para producir aminoácidos y la grasa se convierte en ácidos grasos y glicerol (Pagan, 1998). El elevado desarrollo del intestino grueso le permite obtener energía en forma de ácidos grasos volátiles mediante la fermentación microbiana de la fibra y de la fracción del alimento no digerida enzimáticamente (Harris, 2007; Pagan, 1998).

No obstante, precisamente las particularidades anatomofisiológicas del intestino predisponen a los caballos al padecimiento de trastornos digestivos y metabólicos, sobre todo, cuando es imposible basar la alimentación en el pastoreo, el consumo de forraje es limitado y/o cuando una elevada demanda nutricional hace necesaria la utilización de abundantes alimentos concentrados (Harris, 2007). En base a las predisposiciones propias del caballo y el medio donde se desarrollan, se plantea el uso de probióticos con el objetivo de restaurar el equilibrio microbiano dentro del intestino del caballo (Gorbach, 2002). De manera específica la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) administrada a los caballos potencializa la digestión de las fibras (Jouany *et al.*, 2009), incluyen la digestión mejorada de la celulosa (Jouany *et al.*, 2008), la digestión mejorada de la hemicelulosa (Glade y

Biesik, 1986) y el aumento del número de bacterias anaerobias en el sistema digestivo disminuyendo con ello el padecimiento de trastornos digestivos y metabólicos en los caballos (Medina *et al.*, 2002).

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 La alimentación en los equinos.

El caballo es considerado un herbívoro monogástrico en donde su proceso digestivo es fundamentalmente de tipo enzimático. El alimento se hidroliza primero en el estómago y en el intestino delgado y se fermenta después en el ciego y en el colon (Real, 1990).

Para el caso de la alimentación de caballos se efectúa frecuentemente en forma empírica, en parte por el hecho de que la productividad de la especie no se mide en parámetros como ganancia diaria de peso o producción de leche, como ocurre con las demás especies pecuarias, sino en el trabajo físico que desempeñan de acuerdo a su condición zootécnica (Shimada, 2009).

### 2.2 Generalidades de levaduras

Las levaduras son hongos microscópicos, considerados de tipo facultativo y anaeróbico, lo cual significa que pueden sobrevivir y crecer con o sin oxígeno (García, 2001); son microorganismos eucariotas su tamaño varía alrededor de 5 x 10  $\mu\text{m}$  y son significativamente más grandes que una bacteria (0.5 x 5  $\mu\text{m}$ ) cuyas propiedades son completamente diferentes a las de microorganismos bacterianos. Por ejemplo, las levaduras tienen la propiedad de ser resistentes a los antibióticos, sulfamidas y otros agentes antibacteriales. De tal manera que esta resistencia es genéticamente natural, sin embargo no es susceptible a ser modificada o transmitida a otros microorganismos (Auclair, 2001; Lázaro, 2005)

La propagación de las levaduras es un proceso de metabolismo oxidativo mediante el cual la levadura transforma al oxígeno y al azúcar. La levadura en sí, proporciona vitaminas del complejo B y minerales, teniendo así una buena fuente de proteína y de aminoácidos. Aproximadamente el 40% del peso de la levadura seca consiste en proteína de alta digestibilidad. Sin embargo las levaduras no son un ingrediente proteico como tal, la parte proteica de sus células en su gran

mayoría está compuesta por aminoácidos de tipo esencial (Lisina, Metionina, Triptófano, entre otros) (García, 2007 y García, 2001).

### **2.3 Tipos de levaduras**

Las descripciones más acordes y afines a producción animal sobre los tipos de levaduras corresponden a las realizadas por García (2007), siendo las siguientes:

#### **Levadura inactiva o muerta**

Comprende una mezcla física de granos de fermentación y levadura viva. Al ser una levadura de tipo inactivo contiene reducido número de Unidades Formadoras de Colonias/g (UFC/g), ( $1.0 \times 10^2$  UFC/g), además de no presentar viabilidad.

#### **Levadura activa o viva**

Es un producto compuesto tanto de levadura viva como de productos de fermentación, posee  $1.0$  a  $2.0 \times 10^2$  (UFC/g), teniendo una alta viabilidad. Con la factibilidad de cambiar el tipo y número de microorganismos presentes, a manera de mejorar el patrón de fermentación.

#### **Levadura mineralizada**

Por medio de la fermentación se obtiene un producto, en este caso una levadura que es sometida a un medio alto de un determinado mineral de interés, mediante este proceso la levadura absorbe el mineral, dando como resultado un mineral ligado a una levadura. Algunos productos pueden contener hasta  $1.0 \times 10^4$  (UFC/g) sin embargo la mayoría de minerales en levadura no contiene células vivas.

#### **Levadura de cerveza**

La levadura de cervecería (*Saccharomyces cerevisiae*) es un subproducto derivado de la producción de cerveza. Su principal función es aportar proteína de alta digestibilidad, un adecuado perfil de aminoácidos esenciales, minerales y vitaminas del grupo B. Ha sido considerada como un probiótico en especies de producción. En algunos trabajos de investigación se ha demostrado que puede

actuar como un inmuno estimulador e inmuno regulador y puede además incrementar la resistencia inespecífica para un gran número de bacterias que afectan el tracto respiratorio y digestivo. Sin embargo en condiciones normales, *Saccharomyces cerevisiae* no puede colonizar el tracto digestivo, pero una parte significativa de las levaduras ingeridas pueden ser encontradas vivas en las heces de los animales. Estableciendo una diferencia con otros probióticos como bacterias ácido lácticas en las que su efecto biológico está estrechamente relacionado con su adhesión a la mucosa intestinal.

## **2.4 Mecanismo de acción de *Saccharomyces cerevisiae* en especies monogástricas.**

Los beneficios obtenidos de la suplementación con levaduras (*S. cerevisiae*) en especies monogástricas son la estimulación del borde de cepillo disacárido, los efectos anti adhesivos contra patógenos, la estimulación de una inmunidad no específica, la inhibición de la actividad de las toxinas y el efecto antagonista contra microorganismos patógenos (Auclair, 2001; Lázaro, 2005).

### **2.4.1 Estimulación de las disacaridasas del borde en cepillo.**

Buts *et al.*, (1986) demostraron que la ingestión oral de *S. cerevisiae* por humanos voluntarios y ratas destetadas da como resultado un marcado incremento específico y total de la actividad disacáridasa de la membrana del borde en cepillo, incluyendo sacarasa, lactasa y maltasa. De tal manera que este efecto resulta interesante si consideramos que algunas diarreas son asociadas a una disminución de la actividad disacáridasa. De hecho, en el caso de las ratas, un estudio posterior sugirió que el efecto trófico sobre la mucosa digestiva podía ser mediado por el estímulo en la producción y liberación endoluminal de spermina y spermidina por parte de la levadura (*S. cerevisiae*) (Buts *et al.*, 1994).

#### **2.4.2 Propiedades antiadhesivas**

De manera normal la flora bacteriana existente en el tracto digestivo actúa como una barrera de defensa al impedir que el espacio del epitelio celular quede disponible para los patógenos (Fox, 1994). La administración de *S. cerevisiae* genera un efecto de adhesión de los patógenos a la pared celular de las levaduras e induce un efecto de protección, de tal manera que el complejo levadura/patógeno es rápidamente eliminado por el tracto digestivo. La competencia entre levaduras y patógenos por adherirse a las células intestinales ayuda a explicar el efecto benéfico de las levaduras debido a que la adhesión es crucial para la expresión de efectos de protección (Gedek, 1987).

#### **2.4.3 Estimulación de la inmunidad**

Estudios recientes han atribuido a los probióticos el mecanismo de acción de inmunoestimulación. El mecanismo de respuesta ante estímulos inflamatorios ha sido caracterizado e involucra un glucano receptor específico el cual es presentado por leucocitos de sangre periférica y macrófagos extravasculares. Así mismo la activación de este glucano receptor estimula la amplificación de las defensas del hospedero, las cuales involucran una cascada de interacción primaria derivada por macrófagos como citocinas (Cuaron, 1999). Según Song y Di Luzio, 1979, citado por Cuaron (1999), los glucanos pueden ser considerados como inmunoamplificadores.

#### **2.4.4 Inhibición de la acción de toxinas**

La administración de *S. cerevisiae* en ratones ha mostrado un efecto de protección contra *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri*. Sin embargo el efecto de protección puede no estar relacionado a la reducción de la población de gérmenes patógenos (bacterias) en el intestino, sino más bien a la reducción de la cantidad disponible de toxinas secretadas por patógenos. Generalmente las toxinas se unen a receptores específicos en las células del epitelio intestinal e inducen

cambios, resultando en una pérdida de agua y electrolitos (Auclair, 2001; Lázaro, 2005).

## **2.5 Mecanismo de acción de *Saccharomyces cerevisiae* en caballos.**

A pesar de su sabor amargo, por la presencia de restos de lúpulo, *Saccharomyces cerevisiae* tiene una elevada palatabilidad en todas las especies. El efecto de acción de *S. cerevisiae* en caballos es maximizar la digestibilidad, mejorar el patrón de fermentación a nivel del ciego, reducir la acumulación de ácido láctico (AL) e incrementar la síntesis tanto de energía como de proteína (Pagan, 1998).

El suministro de granos de cereales en la alimentación de caballos es una práctica común, mediante la cual el animal obtiene la energía complementaria para cubrir sus requerimientos cuando su alimentación es a base de forrajes (Potter *et al.*, 1992).

Los caballos tienen una limitada capacidad para digerir las grandes cantidades de almidón contenidas en los granos y de manera común cierta cantidad de almidón, que llega a nivel de intestino delgado no es digestible en su totalidad, Potter *et al.*, (1992). Señalan que la cantidad de almidón no digestible en el intestino delgado altera la relación forraje-grano e induce a un disturbio del balance microbiano por tal motivo el efecto adverso de la baja capacidad de digestión de almidones a nivel del intestino delgado conlleva a una alta producción de AL, el cual origina de manera proporcional una baja en el pH, disminuye la motilidad intestinal alterando el balance y reduciendo la población de bacterias celulóticas a nivel intestinal, esto incrementa la posibilidad de incidencia de cólicos, úlceras gástricas y laminitis (Kronfeld y Harris, 1997; Real, 1990).

Una de las estrategias nutricionales con mayor eficacia para contrarrestar dichos problemas ha sido el uso de levaduras vivas *S. cerevisiae*. Medina *et al.*, (2002) señalan que el suministro de levaduras vivas mejora el balance microbiano a nivel

intestinal, estimula la actividad de bacterias celulóticas e incrementa la digestibilidad de los nutrientes.

## **2.6 Alimentos para equinos**

Idealmente la forma de alimentar a los caballos sería en praderas fertilizadas, cuya composición botánica sea acorde con cada especie y región. Y por ende la complementación en praderas va a depender de los siguientes factores:

- Calidad de forraje (que comprenderá su estado de crecimiento y composición botánica).
- Etapa productiva del animal (ya sea crecimiento, gestación o lactación).
- Condición corporal.
- Comportamiento esperado entre otros.

El principal componente del alimento para caballos en confinamiento es el forraje, el cual puede ofrecerse heno o en ocasiones fresco. La conservación en forma de ensilaje tiene menos aceptación, por la posible presencia de hongos y metabolitos indeseables del producto (Ragnarsson y Lindberg, 2008).

Algunos excesos alimenticios en los que se incurren son de energía, que crea problemas de obesidad; vitamina D, que causa depósitos de calcio en músculos y vasos sanguíneos; de yodo, que causa bocio en potros. Deben evitarse los alimentos polvosos, con presencia de hongos o contaminados ya que aumentan las posibilidades de aparición de cólicos (Shimada, 2009).

## **2.7 Principales alimentos para el caballo**

Dentro de la clasificación según Shimada, (2009). Los alimentos empleados en la formulación de dietas para caballos se les puede clasificar en: forrajes, granos y sus derivados, alimentos succulentos y suplementos proteínicos.

### 2.7.1 Forrajes

Los forrajes se componen de contenido celular (proteína, grasa, carbohidratos solubles) y paredes celulares (celulosa, hemicelulosa, Lignina). El contenido celular es altamente digestible (80-100%), mientras que la verdadera digestibilidad de la pared celular es más limitada (40-50%) (Fonnesbeck, 1968, 1969).

Al seleccionar un forraje de alta calidad (alto contenido energético), las proporciones requeridas de forraje y concentrado pueden ejercer un efecto favorable respecto al consumo voluntario de alimento y la función digestiva (Willard et al 1977, Julliard *et al* 2001). En las dietas de forraje y cereal forrajero, el contenido dietético de K será superior a los requisitos, mientras el contenido dietético de Cu y Zn puede ser limitado. De tal manera que, la energía y el valor nutritivo de los forrajes puede variar considerablemente y será, en gran medida, determinado por el contenido de fibra y la calidad (Van Soest, 1994; Ragnarsson y Lindberg, 2008, 2010). Por ello se debe buscar forrajes con poca celulosa o lignificados para facilitar su digestión y su aprovechamiento (Shimada, 2009), (NRC, 2007).

### 2.7.2 Praderas

El forraje obtenido del pastoreo forma la base de las dietas para los caballos salvajes y puede constituir la dieta completa para los caballos domesticados (NRC, 2007). El uso de praderas naturales resulta importante en cualquier programa de alimentación equina variando las especies vegetales presentes ya que son dependientes de las condiciones climáticas y del suelo (Shimada, 2009).

En los pastizales empleados para caballos pueden usarse muchas especies diferentes, de los géneros *Dactylis*, *Bromus* y *Poa*, como el tradicional pasto azul de Kentucky (*Poa Pratensis*) y leguminosas entre las más utilizadas se incluye diferentes especies de alfalfa (genero *Medicago*) y los tréboles (genero *Trifolium*) (Shimada, 2009). Siendo indispensable tener variedad en los vegetales para lograr

un alto valor nutritivo; la mezcla de diversas gramíneas o aún mejor de gramíneas y leguminosas es muy recomendada, ya que las leguminosas dan mayor rendimiento por hectárea, son más apetecibles que las gramíneas, su proteína compensa las deficiencias que hay en la pradera, se consideran ricas en calcio y poseen un excelente contenido de  $\beta$ -caroteno (vitamina A) y  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) (Real, 1990; Shimada, 2009).

### 2.7.3 Ensilados

En muchos países europeos con las condiciones climáticas adversas para la conservación del forraje durante la cosecha, se optó por la preservación mediante el ensilaje para proporcionar una fuente de fibra y de energía, que puede suministrarse de 15 a 20 Kg a un caballo con un peso más o menos de 450 Kg durante todo el año (McDonald *et al.*, 1991; Müller 2005; Shimada, 2009). De manera específica en México el ensilado se utiliza poco en las raciones para caballos (Shimada, 2009).

Cabe destacar que durante la conservación el contenido tanto de  $\beta$ -caroteno como de  $\alpha$ -tocoferol se ve reducido (Müller *et al.*, 2007), de la misma manera se ha demostrado que la palatabilidad del forraje puede verse afectada por el método de conservación (Müller y Udén, 2007). Por ello el empleo de forraje ensilado en la alimentación de caballos, conlleva a determinar el impacto del proceso de ensilaje sobre la calidad nutricional. Existen varios indicadores que se usan regularmente para evaluar la calidad del ensilaje en la alimentación de rumiantes (es decir, pH, ácidos orgánicos, amoníaco), lo que también puede ser útil para evaluar las propiedades nutricionales del ensilado de caballos (McDonald *et al.*, 1991; Müller 2005).

El nivel de amoníaco en el forraje ensilado puede usarse como un indicador de la calidad del ensilaje y también indicará si la fracción proteica en el forraje ensilado ha sido sometida a degradación durante el proceso (McDonald *et al.*, 1991).

#### **2.7.4 Henos**

Históricamente, el secado al sol en el campo para producir heno fue el método predominante para la conservación del forraje (Wilkins, 1988). La etapa de madurez en el momento del corte, así como los diferentes métodos de conservación y procesamiento, influyen en el contenido nutritivo de estos forrajes, los henos de leguminosas son más digeribles para los caballos y tienen una mayor riqueza en cuanto a proteínas, calcio y carotenos, como es el caso de la alfalfa achicalada. En cambio, las gramíneas son menos apreciadas, sobre todo aquellas que se lignifican rápidamente después del espiguelo. (Shimada, 2009). Coleman, (1989) determina una ganancia diaria y una eficiencia en la alimentación menor al 18 %, cuando los animales son alimentados en el piso, aún en condiciones ideales.

Es importante proveer el heno de una manera que minimice el desperdicio (particularmente de las partes nutritivas y frondosas), la contaminación urinaria y fecal (pérdidas de forraje como un aumento de parasitismo intestinal). Alimentar a un caballo con heno mohoso puede provocar cólicos y el heno polvoriento puede causar problemas respiratorios (Coleman, 1989).

#### **2.7.5 Pajas**

Las pajas tienen un valor nutritivo muy modesto, se utilizan especialmente como alimento de lastre, muchos caballos y ponis no necesitan altos valores de energía o proteína, y para ellos la paja es una fuente de fibra perfectamente adecuada, proporciona a la dieta diaria la cantidad necesaria de fibra que estimula el tránsito digestivo y favorece una adecuada actividad microbiana en el intestino grueso. Además, el consumo de paja al libre acceso desempeña una función muy importante en el estado psíquico del animal (Shimada, 2009; Bishop, 2003).

Existen tres tipos de pajas: avena, cebada y trigo. La paja de avena es la que más se utiliza como alimento y se recomienda su empleo porque contiene una menor cantidad de fibra, lo que la hace más digerible que otras pajas siendo una alternativa práctica ya sea como sustituto total o parcial (Bishop, 2003).

### **2.7.6 Granos y sus derivados**

Los granos son aquellos ingredientes de las comidas para caballos, considerados como alimentos energéticos debido a su elevada concentración de almidones digestibles, que pueden adquirirse por separado y no solamente mezclados en productos de marca registrada, son necesarios cuando los nutrientes requeridos para una etapa fisiológica específica, son más altos que los nutrientes provistos por cantidades adecuadas de forraje (Scott y Potter., 1989; Shimada, 2009). Esto ocurre durante el crecimiento, la lactancia y una carga de trabajo de moderada a intensa (Scott y Potter, 1989).

Los derivados de cereales como el salvado de trigo, el salvado de arroz y el maíz molido son más altos en proteína cruda, grasa y fibra cruda, y más bajos en almidón. Debido al aumento del contenido de fibra en los subproductos de los cereales, el valor energético disminuirá en comparación con el cereal de origen.

El reemplazo de cereales con salvado de trigo mejorará el contenido dietético de la mayoría de los minerales, en particular con respecto a P, Mg, Fe, Mn, Cu y Zn, pero tiene el potencial de resultar en una relación Ca: P invertida (Meyer *et al*, 1993).

#### **Avena**

La avena (*Avena sativa*), es el grano común en la alimentación de caballos y el preferido de los criadores, su menor concentración de energía digestible lo transforma en un grano de menores efectos nocivos y menores restricciones en la incorporación a dietas por lo que las impactaciones gástricas y otros trastornos digestivos son menos frecuentes (Ensminger, 1973; Shimada, 2009). Sin embargo, cuando la avena está descascarada hay un aumento marcado en el contenido de almidón y una marcada disminución en la fibra (Shimada, 2009).

El almidón de la avena se compone principalmente de amilosa, que lo hace digestible más rápidamente en glucosa en el intestino delgado (Lindner, 2002).

En comparación con otros cereales (trigo, centeno y cebada), la avena presenta un alto contenido de lisina y lípidos, se distingue de otros cereales por su menor

proporción de prolaminas (10-16%) y glutelinas (5%) y su alta concentración de globulinas (Agama, 2011). Destaca también su elevada concentración de cistina 3% respecto al total de proteína bruta (PB). Es un cereal pobre en calcio y en vitaminas D, B2 y niacina, respecto al contenido en proteína se sitúa en un 9%, pero es altamente variable (6-17%) (Ensminger, 1973).

## **Maíz**

El maíz (*Zea mays*), pertenece a la familia de las gramíneas, El maíz como grano interviene, aproximadamente, en el 50% en las raciones para animales (Somarriba, 1996). Además subproductos de ciertas industrias del maíz también intervienen como ingredientes (por ejemplo, corn gluten feed, corn gluten meal y residuos de industrias fermentativas). Siendo un cereal con un alto valor energético, proporcionándole a los equinos almidones fácilmente digestibles, tiene poca riqueza en fibra, proteína y algunos minerales (Shimada, 2009; Betran *et al.*, 2001).

Sin embargo la calidad del grano de maíz como cualquier otro grano, está determinada principalmente por su estructura y composición (Betran *et al.*, 2001). Las diferencias en estructura y composición dependen del cultivo así como de las prácticas de manejo, el clima, el suelo y los métodos de cosecha y poscosecha (Galarza, 2011). Por ello la calidad requerida por la industria varía según el tipo de alimento a elaborar por ejemplo los fabricantes de alimentos avícolas requieren maíz de tipo colorado por su alto contenido de pigmentos lo cual evita o reduce el agregado de pigmentos sintéticos (Méndez *et al.*, 2005).

El maíz puede ser administrado de las siguientes formas:

- En la mazorca:  
Que es alta en fibra y baja en energía. Esta forma es recomendable para caballos que comen demasiado rápido. Tiene en su contra que algunos granos pueden pasar sin ser masticados y provocar problemas digestivos (Archer, 2006; Kamphues, 2000).

- Maíz machacado:  
Es más digestible y guarda todas las propiedades. Aumenta la digestibilidad al permitir que los jugos digestivos penetren en la base del grano (Archer, 2006).
- Maíz Vaporizado:  
Por el método de procesamiento en grano se humedece y se aplana. Aumenta la digestibilidad al haber más superficie para que actúen los jugos gástricos (Kamphues, 2000).
- Maíz triturado o molido:  
Este tipo de procesamiento hace que el grano quede demasiado fino y podría pasar a través del intestino delgado rápidamente, lo que puede conducir a la fermentación en el intestino grueso. Esto puede conducir a un cólico en el caballo (Archer, 2006).

#### Contaminación del grano con micotoxinas:

El maíz es susceptible a diversos hongos productores de micotoxinas provocando graves efectos sobre la salud del caballo (Coenen, 2000). Este peligro es más frecuente en los estados con climas cálidos y húmedos durante el período vegetativo del maíz. Las micotoxinas se producen durante el crecimiento de la planta y dependen de manipulación o almacenamiento después de la cosecha (Coenen, 2000; Kamphues, 2000).

#### **Cebada**

La cebada (*Hordeum vulgare*), es una planta anual monocotiledónea, gramínea. Comparada con la avena contiene cantidades menores de fibra, siendo alta en energía, pero la dureza del grano y la resistencia de su cascarilla dificultan su digestión, por lo que es conveniente remojarla, rolarla o triturarla previamente al suministro, lo cual facilita el contacto de las enzimas digestivas con los almidones del cereal y, por lo tanto, mejora su digestibilidad (Shimada, 2009). Al igual que otros cereales la cebada no tiene los niveles de calcio y fósforo recomendados, ni

los minerales ni micronutrientes adecuados, siendo necesario equilibrar la ración correctamente con otros productos alimenticios (McDonald, 1993).

### **Salvado de trigo**

El salvado es la capa externa y fibrosa del trigo, desecha en el proceso de fabricación de harina, es altamente palatable y de elevada disponibilidad en el mercado. Su principal componente es la fibra (35-40% FND en salvado) que es también el principal factor limitante para su inclusión en piensos por sus propiedades emolientes en el tubo digestivo. La fibra está compuesta fundamentalmente de hemicelulosas y celulosa y está relativamente poco lignificada (2,5-3% lignina acido de detergente) (Goodband *et al.*, 1995).

El contenido en calcio es mínimo y en comparación, el contenido en fosforo es relativamente elevado, que es justo lo contrario que necesita el caballo en su régimen de alimentación (dos veces más calcio que fosforo) a fin de absorber de manera óptima el calcio dentro del organismo y retenerlo, si el caballo ingiere grandes cantidades de salvado, es posible que el equilibrio calcio-fosforo sufra alguna alteración (Shimada, 2009).

#### **2.7.7 Alimentos suculentos**

Las raíces y los tubérculos en la ración tienen por objeto provocar el apetito y refrescar al animal (Shimada, 2009). Según Warrens (1979), raíces y tubérculos frescos como zanahorias suelen servir como obsequios para los caballos aunque son alimentos pobres en energía porque contienen casi el 90 % de agua. Su digestibilidad es alta como consecuencia de su baja cantidad de celulosa; por el contrario son pobres en materiales nitrogenados y en algunos elementos minerales (calcio, especialmente) (Shimada, 2009).

### 2.7.8 Suplementos proteínicos

Los suplementos proteicos son alimentos, más altos en proteína que otros alimentos (granos y forrajes), con el potencial de aumentar la concentración de proteína en la dieta.

Los alimentos que contienen más de un 20% de proteína se clasifican como suplementos proteicos (Shimada, 2009).

Hay diferentes tipos de suplementos proteicos clasificados según su origen (Mc Donald, *et al.*, 1995; Pike y Tatterson., 1980):

- Vegetal
- Animal
- Unicelular
- Nitrógeno no-proteico.

La proteína de origen vegetal, animal, y unicelular se utiliza en alimentos para caballos. Respecto al nitrógeno no-proteico, generalmente resulta dañina o tóxica (Mc Donald, *et al.*, 1995).

La proteína de plantas es la usada comúnmente, y se origina de las oleaginosas como el girasol, la soya, semilla de algodón y linaza. Todas son procesadas para la extracción del aceite, dando como resultado la harina oleaginosa alta en proteína (Shimada, 2009).

Particularmente la harina de soya contiene mayor cantidad de proteína y es muy utilizada en la dieta de los caballos. Sin embargo se debe ofrecer en pequeñas cantidades para evitar problemas en el organismo por sobrecargarlo. En cuanto a la linaza se recomienda en los animales que sufren trastornos digestivos o en los animales convalecientes porque ayuda a evacuar el tracto digestivo sin dificultad, sin embargo, se debe ofrecer en pequeñas cantidades pues contiene sustancias que consumidas en exceso pueden intoxicar al animal (Mc Donald, *et al.*, 1995; Shimada, 2009).

Las fuentes de proteína animal incluyen alimentos a base de harina de sangre, harina de pescado y harina de hueso sin embargo muy poco se usa en caballos, debido a su sabor (Gómez, 1986).

Soya por su riqueza en materia nitrogenada y sobre todo en aminoácidos esenciales, es el suplemento proteínico que más se utiliza en las dietas para caballos. En general la inclusión de suplementos proteicos en las dietas no debe ser alta (alrededor de 4 - 10% de MS total) (Buitrago, 1978).

## **2.8 Producción de gas *in vitro***

La técnica de producción de gases es un método *in vitro* que permite determinar la extensión y la cinética de degradación del alimento mediante el volumen de gas producido durante el proceso fermentativo (Theodorou, *et al.*, 1994). Una de las múltiples ventajas de este procedimiento es que el curso de la fermentación y el papel de los componentes solubles del sustrato puede ser cuantificado (Pell, *et al.*, 1997).

La técnica de producción de gas *in vitro* ha sido usada para la evaluación de alimento para ganado, principalmente porque pueden estimarse las tasas de fermentación vía acumulación de gas. Aunque los productos de desecho, gases fermentados (principalmente dióxido de carbono y metano) representan parte del alimento que ha sido degradado (Makkar, 2001; Posada y Noguera, 2005).

La técnica de producción de gas *in vitro* originalmente desarrollada por Menke y Steingass (1988), se ha utilizado para determinar el valor nutritivo de los forrajes. El principio fundamental de la técnica es la cantidad de gas liberado, cuando una muestra de alimento es incubada *in vitro* con líquido ruminal, es directamente proporcional con la digestibilidad o la degradación del sustrato de la muestra y por lo tanto con el valor energético del alimento (Makkar, 2001).

Los métodos *in vitro* tienen la ventaja de utilizar un mayor número de alimentos y repeticiones de los mismos, además, el mantenimiento de las condiciones

experimentales permite controlar una serie de factores extrínsecos (eliminar efecto animal) (Davies, *et al.*, 1995).

### 2.8.1 Origen del gas

La energía para el crecimiento microbiano deriva de la fermentación de los carbohidratos, principalmente almidón y celulosa, cuya digestión anaerobia produce ácidos grasos volátiles (AGV), succinato, formiato, generando, etanol, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>), y trazas de hidrógeno (H<sub>2</sub>); sin embargo, ellos también aportan esqueletos de carbono esenciales para la síntesis de biomasa microbiana (Opatpatanakit *et al.*, 1994; Schofield *et al.*, 1994). La producción de gas desde la fermentación de la proteína es relativamente pequeña (Makkar, 2001).

En la prueba de producción de gas *in vitro* usando solución buffer de bicarbonato, el CO<sub>2</sub> es también producido en la neutralización de los AGV generados (Pell y Schofield, 1993). Para los forrajes, cuando la solución buffer de bicarbonato es usado, alrededor del 50% del volumen total de gas producido tiene este origen, y puede aproximarse al 60% en dietas con alta proporción molar de propionato (Getachew *et al.*, 1998). El CO<sub>2</sub> producido desde la solución buffer puede encontrarse asumiendo que por cada mmol de AGV producido se libera 0.8-1.0 mmol de CO<sub>2</sub>, dependiendo de la cantidad de solución buffer de fosfato presente (Opatpatanakit *et al.*, 1994; Makkar, 2001).

En conclusión, la técnica de producción de gas mide la cantidad de gas liberado directamente como un producto de la fermentación e indirectamente desde el fluido ruminal neutralizado o del contenido fecal (Schofield *et al.*, 1994; Elghandour *et al.*, 2016).

El gas es producido principalmente cuando el sustrato es fermentado hasta acetato y butirato. La fermentación del sustrato hasta propionato produce gas solamente desde la neutralización del ácido; por consiguiente, una menor

producción de gas es asociada con la fermentación propiónica (Getachew *et al.*, 1998).

### **2.8.2 Medición de la presión del gas**

La cinética de producción de gas puede medirse de una forma más precisa empleando transductores de presión y variantes del sistema descritos por Pell y Schofield (1993), Theodorou *et al.* (1994), Davies *et al.* (1995) y Cone *et al.* (1996).

### **2.8.3 Preparación para la inoculación**

La técnica de producción de gas al igual que otros procedimientos de digestibilidad usan sustratos molidos, medio anaeróbico, temperatura de 39°C e inóculo fecal (Williams, 2000).

### **2.8.4 Secado de las muestras**

El contenido y la naturaleza de varios constituyentes del alimento y por consiguiente, la cinética de fermentación, pueden ser influenciados por la temperatura y el proceso de secado del sustrato. La mayoría de los grupos hacen secado en el horno a baja temperatura (60 o 70°C) (Williams, 2000; Rosero, 2002).

### **2.8.5 Molienda de los sustratos**

La cantidad de material requerido para evaluar la cinética de fermentación varía desde 0.1 a 1 g (Williams, 2000). Con un aumento en el tamaño de la muestra se produce una disminución en la producción de gas por cada gramo de MS, debido a la baja proporción de microorganismos en relación al sustrato o al agotamiento de la solución buffer (Getachew *et al.*, 1998).

### **2.8.6 Preparación del medio**

Todos los medios en uso tienen en común solución buffer de bicarbonato y fosfato, un agente reductor, una fuente de nitrógeno, varios minerales, y resazurina como indicador de potencial redox. En todos los casos, el CO<sub>2</sub> es usado durante la preparación del medio para asegurar un bajo potencial redox al momento de la inoculación, ya que la ausencia de anaerobiosis resulta en pérdidas de bacterias celulolíticas y amilolíticas (Williams, 2000). Grant y Mertens (1992) indican que el gaseo continuo con CO<sub>2</sub> y los agentes reductores promueven un menor tiempo de colonización y una más rápida digestión de la fibra neutro detergente (FDN).

### **2.8.7 Obtención del inóculo**

Williams, (2000) determina que el fluido ruminal tomado después del ayuno es menos activo que el colectado dos horas después de alimentar, pero es más consistente en su composición y actividad. Para el empleo de contenido fecal se recomienda obtenerlo directamente del recto de los caballos y antes de ofrecer alimento (Lowman *et al.*, 1999). Como regla general, se recomienda colectar el inóculo antes de la alimentación y de por lo menos tres animales consumiendo la misma dieta (Williams, 2000). La incubación de un mismo sustrato puede conducir a diferente producción de gas si el fluido ruminal es tomado en diferentes días lo mismo sucede con el uso de contenido fecal, situación que deberá corregirse por la introducción de estándares de conocida producción de gas (Getachew *et al.*, 1998; Lowman *et al.*, 1999).

### **2.8.8 Preparación del inóculo**

El licuado incrementa en el inóculo el número de bacterias previamente adheridas a la fibra, la mayoría celulolíticas, pero también el número de partículas pequeñas del alimento, por lo que la producción de gas en los frascos de incubación y en los blancos se hace mayor (Pell y Schofield, 1993). El procedimiento de licuado puede

también aumentar el riesgo de exposición al oxígeno si el flujo de CO<sub>2</sub> no es suficientemente fuerte (Williams 2000).

### **2.8.9 Blancos**

Una serie de botellas blanco conteniendo medio e inóculo pero no sustrato, es rutinariamente incluida en cada corrida. El promedio de gas registrado por los blancos, que normalmente corresponde al 13-27% de la lectura final, es substraído desde el total de gas producido por los sustratos evaluados, obteniendo así el total de gas realmente derivado desde la fermentación del sustrato (Pell y Schofield, 1993; Schofield, 2000).

### **2.9 Método de digestibilidad *in vitro***

A través de los métodos *in vitro* se simulan las condiciones controladas, la fermentación que se produce en el ciego en las cuales se obtiene contenido fecal. Después de que se elimina la mayor parte de partículas fecales, se coloca el líquido en un recipiente con una solución amortiguadora buffer (para simular la saliva) y la muestra de prueba. Continuamente se hace fermentar esta mezcla a 39 °C que es la temperatura del ciego en un lapso de tiempo determinado dependiendo del tipo de alimento (Church, *et al.*, 2004).

Los métodos *in vitro* miden la fermentación microbiana de los alimentos a partir del volumen de gas *in vitro*. Debido a esto se necesita usar animales como donantes de inóculo, además de solución buffer, reactivos y equipo que garantice el pH, mantener un ambiente anaeróbico, optima concentración microbiana de ingredientes esenciales para los microorganismos, con la finalidad de evitar todos aquellos factores que limiten la cinética de degradación cecal durante el tiempo que transcurra para la toma de datos necesarios (Vieyra y Martínez, 2001).

## **2.10 Cinética de fermentación *in vitro***

Expresiones cuantitativas de la cinética de digestión son necesarias para estimar de una forma más precisa la cantidad de nutrientes digeridos desde los alimentos y las propiedades intrínsecas de éstos que limitan su disponibilidad para animales con sitios de fermentación (López, *et al.*, 2008).

La cinética de producción de gas depende de las proporciones de partículas solubles, insolubles pero degradables, y no degradables del alimento (Getachew, *et al.*, 1998). Para aplicar este principio en formulación de alimentos, se necesitan datos sobre las tasas de degradación de las proteínas y de fermentación de los carbohidratos. Las técnicas de producción acumulativa de gas pueden ser usadas para generar esta información (Williams 2000). La producción de gas podría también ser potencialmente usada para comparar la cinética de fermentación desde el rumen o el intestino grueso de diferentes especies y/o del resultado de diferentes dietas (Williams, 2000).

En resumen, la técnica producción de gas *in vitro* fue descrita por Theodorou, *et al.*, (1994) con base en un transductor (Druck Incorporated DPI 701 555 in H<sub>2</sub>O/20 psi), para medir la presión generada por la producción de CO<sub>2</sub> y jeringas de plástico para medir el volumen de gas (milímetros).

La preparación del medio según Menke y Steingass (1988) consideró diversos componentes: Solución de microminerales, solución buffer, solución de macrominerales, solución reductora, cisteína, indicador anaerobio y resazurina.

## **2.11 Digestibilidad**

La digestibilidad es una forma de medir el aprovechamiento de un alimento, es decir, la facilidad con que es convertido en el aparato digestivo en sustancias útiles para la nutrición. Comprende dos procesos, la digestión que corresponde a la hidrólisis de las moléculas complejas de los alimentos, y la absorción de

pequeñas moléculas (aminoácidos, ácidos grasos) en el intestino (Manríquez, 1994).

En los caballos se realiza la digestión de la fibra en orden inverso a los rumiantes (Manríquez, 1994). Los caballos tienen particularidades en cuanto a su digestión enzimática que es relativamente limitada sin embargo es abundante la fermentación cecal (Wilson y Reeder, 2005). La digestión enzimática comienza en el estómago y continúa en intestino delgado, donde se da el proceso de absorción de los primeros productos de la digestión como son los aminoácidos, ácidos grasos y glucosa. Posteriormente, en el ciego, el contenido intestinal que no fue digerido y absorbido en el intestino delgado, es fermentado por la flora microbiana, favorecido por el tránsito lento, mantención del pH y remoción continua de los productos de la fermentación, originando como producto final, los ácidos grasos volátiles, que son absorbidos y/o metabolizados por la pared intestinal. Mediante este proceso de fermentación se logra degradar parcialmente la celulosa y otros carbohidratos estructurales, como hemicelulosas y pectinas, además de las proteínas no digeridas en el intestino delgado y la fermentación de algunos homopolisacáridos, como el almidón y finalmente, en el colon pequeño, se reabsorbe la mayor parte del agua y la fracción indigestible se expulsa en la materia fecal (Cunningham, 2003).

La digestibilidad por lo tanto es uno de parámetros utilizados para medir el valor nutricional de los alimentos, debido a que no basta que la proteína u otro elemento se encuentre en altos porcentajes en el alimento, sino que debe ser digerible para que pueda ser asimilado y, por consecuencia, aprovechado por el animal (Manríquez, 1994).

### III. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a las particularidades anatomofisiológicas del tubo digestivo de los equinos, que los predisponen a trastornos digestivos y metabólicos sobre todo, cuando el fin zootécnico, el área geográfica y las estaciones del año hacen imposible basar la alimentación en el pastoreo y por ende generan un consumo de forraje limitado, una elevada demanda nutricional hace necesaria la utilización de abundantes alimentos concentrados. En base a lo anterior el uso de *Saccharomyces cerevisiae* en dietas para caballos, ha tomado auge en los últimos años por los resultados positivos, como una mejor salud, optimización de procesos digestivos, incremento en la utilización de los nutrimentos, mayor producción de energía y síntesis de proteína. Por ello resulta interesante realizar el presente trabajo, donde mediante el método de producción de gas *in vitro*, en tres forrajes (cascara de soya, rastrojo de maíz, heno de avena) y tres granos (maíz rolado, cebada rolada, salvado de trigo), todos comúnmente usados en la alimentación de caballos. Permitirá determinar mediante el volumen de gas producido durante el proceso fermentativo, la cinética de degradación de los ingredientes adicionados con *Saccharomyces cerevisiae*, estimando el valor nutritivo y energético de cada ingrediente.

#### **IV. HIPÓTESIS**

La inclusión de *Saccharomyces cerevisiae* en Cascara de soya (*Glycine max*), Rastrojo de maíz (*Zea mays*), Heno de avena (*Avena sativa*), Maíz rolado (*Zea mays*), Cebada rolada (*Hordeum vulgare*) y Salvado de trigo (*Triticum aestivum*) mejora la fermentación de la fibra presente, aumentando la degradación y producción de energía.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 General

Evaluar el efecto de la adición de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando contenido fecal de equino en cascara de soya, rastrojo de maíz, maíz rolado, cebada rolada, heno de avena y salvado de trigo, sobre la cinética de fermentación *in vitro*.

### 5.2 Específicos

- Determinar la composición química de la cascara de soya, rastrojo de maíz, heno de avena, maíz rolado, cebada rolada y salvado de trigo.
- Analizar la producción de gas *in vitro* utilizando contenido fecal de equino en las seis muestras adicionadas con *Saccharomyces cerevisiae*.
- Evaluar la cinética de fermentación *in vitro* en las seis muestras adicionadas *Saccharomyces cerevisiae* utilizando contenido fecal equino.

## VI. MATERIAL

### 6.1 Material experimental

### 6.2 Material biológico

Para la realización experimental se tomará como donante de contenido fecal a un equino de 3 años de edad, de la raza árabe de 400 Kg de peso. Clínicamente sano, sin reporte de trastornos digestivos, ni intervenciones quirúrgicas por síndrome abdominal agudo o alguna otra patología. Se encuentra desparasitado (IVERFULL® en pasta). Su función zootécnica corresponde a un caballo de paseo el cual tiene implementada una dieta a base de heno de avena en dos raciones la primera durante la mañana y la segunda ración por la tarde y concentrado OMOLIN® de la marca comercial PURINA® se proporciona a razón de 2 Kg únicamente en la mañana y agua a libre acceso.

El caballo estará dentro de las instalaciones del Hípico Universitario de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México. Ubicado en el Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México.

### 6.3 Tipo de sustratos y levadura

Se utilizaron seis alimentos comunes para caballos como sustratos de incubación (Cuadro 1). Los granos incubados fueron maíz roado (*Zea mays*), cebada rolada (*Hordeum vulgare*) y salvado de trigo (*Triticum aestivum*) y los forrajes cascara de soya (*Glycine max*), rastrojo de maíz (*Zea mays*) y heno de avena (*Avena sativa*). El producto de *S. cerevisiae*, Procreatin 7® (Safmex/Fermex S.A. de C.V., Toluca, México) en forma de polvo contiene  $1 \times 10^{10}$  células/g del producto, se utilizó a 0 y 2mg/ g de MS del alimento.

Cuadro 1: Alimentos que se utilizaran en los tratamientos

	Nombre común	Nombre científico
Granos	Maíz rolado	<i>Zea mays</i>
	Cebada rolada	<i>Hordeum vulgare</i>
	Salvado de trigo	<i>Triticum aestivum</i>
Forrajes	Cascara de soya	<i>Glycine max</i>
	Rastrojo de maíz	<i>Zea mays</i>
	Heno de avena	<i>Avena sativa</i>

## VII. MÉTODO

### 7.1 Metodología

#### 7.1.1 Tratamientos

Cuadro 2. Tratamientos con y sin la adición de *Saccharomyces cerevisiae* en las seis muestras de alimentos.

Ingrediente	0= sin adición de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2= con la adición de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (2mg)
Cascara de soya	0
	0
	0
	2
	2
	2
Rastrojo de maíz	0
	0
	0
	2
	2
	2
Maíz rolado	0
	0
	0
	2
	2
	2
Cebada rolada	0
	0
	0
	2
	2
	2
	0

Heno de avena	0
	0
	2
	2
	2
Salvado de trigo	0
	0
	0
	2
	2
	2

### 7.1.2 Inoculo de equino, inoculación para producción de gas *in vitro*

El contenido fecal será recolectado antes de su alimentación por la mañana, se obtendrá aproximadamente 400 g de contenido fecal vía rectal. La mezcla de contenido fecal se colocara a 39 °C en baño maría, y se diluirá en un medio de cultivo depositándose en un vaso de precipitado graduado y calentándose a 39°C, se saturara con CO<sub>2</sub> durante 20 minutos posteriormente se filtrara a través de cuatro capas de gasa (Makkar, 2001; FAO/IAEA, 2000). El medio de cultivo obtenido se usara para inocular tres ciclos idénticos de incubación a una solución de 50 ml en botellas de 120 ml que contendrán 0.5g de MS de sustrato y *Saccharomyces cerevisiae* a 0 o 2mm/g MS. Un total de 108 botellas (2 niveles de levadura por 3 repeticiones por tres carreras por 6 sustratos) y 4 botellas como blancos. Después del llenado las botellas se cerraran con tapones de caucho y se agitaran suavemente para integrar el sustrato y la levadura al inoculo, se mantendrán en una incubadora a 39°C durante 70 horas. La producción de gas se registrara a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 24, 48 y 70 horas post incubación utilizando el transductor de presión (equipo Extech, Waltham), de la técnica de Theodorou et al., (1994). Al final de la incubación después de 70 horas las botellas se abrirán para la medición de pH inmediaamente, utilizando el medidor de pH digital (equipo Hanna®, Italia).

### 7.1.3 Análisis químico

Los alimentos usados como sustratos se analizaran para determinar MS (# 934.01), ceniza (# 942.05), N (# 954.1) y extracto etéreo (EE) (# 920.39), de acuerdo con AOAC., (1997). La fibra detergente neutro (FDN) (Van *et al.*, 1991) y fibra detergente acido (FDA) se determinaran usando bolsas ANKOM<sup>200</sup> (ANKOM Technology Corp., Macedon, NY). La alfa amilasa se utilizó para determinar la FDN y FDA de los granos usados como ingredientes y sin alfa amilasa para forrajes pero con sulfito sódico en la solución detergente neutro. La materia organica (MO) y los Carbohidratos no estructurales (CNE) se calcularan como:

MO (%)=100-cenizas (%); y CNE (%)=100-humedad (%)-proteína cruda (%)-grasa cruda (%)-FDN-cenizas (%).

Para estimar los parámetros cinéticos de PG, los resultados de PG (mL/gMS) se ajustaron mediante la opción NLIN de SAS (SAS., 2001) de acuerdo con la ecuación de France *et al.*, (2000) como:

$$A = b \times (1 - e^{-c(t-L)})$$

Donde:

A es el volume de PG al tiempo t; b es PG asintotico (mL/g MS); c es el ritmo de PG (/h) de la fraccion de b de alimento fermentable lentamente y L (h) es el intervalo discontinuo antes de la PG

La energía metabolizable (EM, MJ/kg MS) y digestibilidad *in vitro* de la materia organica (IVOMD, g/ kg DM) se estimaron de acuerdo con Menke *et al.*, (1979).

### 7.1.4 Análisis estadístico

Los datos de cada una de las tres carreras dentro de las mismas 6 muestras individuales de ingredientes se promediaran antes del análisis. Los valores medios de cada muestra individual serán utilizados como la unidad experimental.

Los datos de los parámetros medidos se analizaran mediante la opción PROC GLM de SAS (SAS., 2001).

## 7.2 Modelo estadístico

$$Y_{ijk} = \mu + F_i + D_j + (F \times D)_{ij} + E_{ijk}$$

### Donde:

$Y_{ijk}$ = Variable de respuesta

$\mu$ = Media general

$F_i$ = Con nivel de levadura

$D_j$ = Alimentos usado como ingredientes

$(F \times D)_{ij}$ = Interacción entre el alimento usado como ingrediente y el nivel de levadura

$E_{ijk}$ = error experimental

Se declaró significancia estadística en  $P < 0.05$ .

El coeficiente de regresión entre el tipo de alimento (granos y forrajes) en ausencia o presencia de levadura con la PG asintótico fueron estimados utilizando el programa de Microsoft Excel

## VIII. LÍMITE DE ESPACIO

En el departamento de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México. Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México.

### 8.1 Localización del área experimental

Los análisis químicos proximales de cada ingrediente así como, la producción de gas fecal *in vitro* se realizó en el laboratorio de bromatología del departamento de nutrición animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México. Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México.

### IX. LÍMITE DE TIEMPO

Actividad	Meses									
	Enero 2016	Febrero 2016	Marzo 2016	Abril 2016	Septiembre 2016	Octubre 2016	Junio 2017	Julio 2017	Diciembre 2017	
Entrega y redacción de protocolo de tesis	X	X	X	X	X	X	x			
Colecta y selección de muestras	X									
Molienda de las muestras	X	X	X							
Preparación de reactivos				X	X					
Incubación de las muestras <i>in vitro</i> y medición de pH					X					
Aprobación de protocolo							X			
Redacción de tesis								x	X	

## X. RESULTADOS

### Composición química

La composición química de los ingredientes difiere entre el concentrado y los alimentos forrajeros (Cuadro 3). Un elevado contenido de PC se observó con salvado de trigo (concentrado), cascara de soya (forraje) y la cebada rolada (concentrado). Por otro lado se observaron mayores contenidos de FND (Fibra Neutra Detergente) en los forrajes en comparación con los concentrados, el rastrojo de maíz, cascara de soya y heno de avena reportan un mayor contenido de FND (700, 637 y 530), respectivamente. Comparado en volumen los concentrados presentan un elevado contenido de CNE (Carbonos no estructurales) respecto a los forrajes. Los contenidos más altos de CNE se observaron en maíz rolado, y cebada rolada (672, 423) respectivamente, para el caso de los forrajes con el contenido más alto de CNE es el heno de avena (309). Sin embargo la composición química de todos ingredientes fue comparable con los reportados en el consejo de investigación para la nutrición del caballo (NRC., 2007).

### Producción de gas *in vitro*

Las interacciones entre ingredientes por el nivel de levadura fueron ( $P \leq 0.020$ ) para el GP asintótico y GP en 48 horas y 70 horas de incubación (Cuadro 4). Por otra parte, la GP asintótica, la tasa de GP a las 24, 48 Y 70 horas de incubación, pH de fermentación, ME, IVOMD y producción de proteínas microbianas (MCP) fueron diferentes ( $P < 0.05$ ) entre los forrajes y concentrados. La suplementación de levadura aumento ( $P < 0.001$ ) la GP asintótico de los concentrados en comparación con los forrajes con o sin la adición de levadura. Sin embargo la suplementación con levadura disminuyo ( $P < 0.001$ ) la tasa de GP de concentrados y forrajes en comparación con el forraje sin levadura, sin efecto ( $P > 0.05$ ) en el tiempo de retardo. Durante la fermentación (2 horas de incubación), con adición de levadura se concentra la mayor PG ( $P < 0.05$ ) en comparación con los concentrados sin levadura, sin diferencias ( $P > 0.05$ ) en comparación con los

forrajes con o sin levadura; sin embargo durante la incubación de 24 a 70 horas forrajes con o sin levadura registran menor GP ( $P<0.05$ ) en comparación con los concentrados con levadura. Sin efecto de levadura ( $P=0.574$ ), el forraje aumento la fermentación del pH en comparación con los concentrados. Los concentrados con levadura tuvieron un mayor ( $P<0.05$ ) ME, IVOMD y MCP comparado con concentrados sin levadura y en comparación con forrajes con o sin adición de levadura.

### **Análisis de regresión de datos**

Los datos de la cuadro cinco muestran la ocurrencia del ingrediente por la interacción de levadura ( $P<0.01$ ) para la PG asintótica PG, ME, IVOMD y MCP. Todos los parámetros medidos difieren ( $P<0.002$ ) entre los ingredientes incubados. Además la suplementación de levadura afecta ( $P<0.01$ ) todas las variables medidas excepto el tiempo de retraso y el pH de fermentación. La suplementación con levadura aumento ( $P<0.05$ ), la GP asintótico de la cebada rolada, maíz rolado, salvado de trigo, rastrojo de maíz y heno de avena. Además, la adición de levadura no tuvo ningún efecto ( $P>0.05$ ) sobre la tasa de PG o tiempo de retraso de salvado de trigo, rastrojo de maíz y heno de avena. La suplementación de levadura incrementa ( $P<0.05$ ) durante la fermentación a 24-70 horas de incubación. Sin embargo la levadura no afecto a PG ( $P>0.05$ ) de la cascara de soya. La adición de levadura aumento ( $P<0.05$ ) ME, IVOMD y MCP de cebada rolada, salvado de trigo y rastrojo de maíz, sin efecto ( $P>0.05$ ) en la cinética de fermentación de otros alimentos usados como ingredientes.

El análisis de regresión (Cuadro 6) mostro una relación fuerte entre el PG asintótico y CP para el forraje sin adición de levadura ( $R^2=0.87$ ), entre el GP asintótico y NSC para forrajes sin adición de levadura ( $R^2=0.64$ ), entre la GP asintótica y NDF de forraje con adicción de levadura ( $R^2=0.62$ ). La suplementación con levadura aumento la correlación entre la PG asintótico y CP de concentrados, PG asintótico y NDF de forrajes y GP asintótico y NSC de concentrados pero

disminuye la asociaci3n entre la PG asint3tica Y CP y PG asint3tico y NSC del forraje. Hubo una fuerte relaci3n ( $R^2=0.79$ ), entre GP a las 24 horas de incubaci3n y en el contenido de PC de forrajes, una buena relaci3n ( $R^2=0.75$ ), entre GP en 24 horas de incubaci3n y contenido de NSC de forraje y relaci3n moderada ( $R^2=0.45$ ), entre PG en 24 horas de incubaci3n y contenido de FDN de forrajes en la ausencia de levadura.

### Cuadro 3

Composici3n qu3mica (g/kg MS) de cada uno de los ingredientes usados como sustratos.

	Concentrado			Rastrojo		
	Ma3z rolado	Cebada rolda	Salvado de trigo	Cascara de soya	Rastrojo de ma3z	Heno de avena
Material org3nica	989	979	877	952	941	940
Prote3na cruda	76	132	168	121	65	83
Extracto et3reo	6.5	14.3	53.	8.3	11.2	18.3
Fibra neutro detergente	234	410	429	637	700	530
Fibra acido detergente	21	53	126	438	385	361
Carbohidratos no estructurales	672	423	227	185	164	309

**Cuadro 4.**

La cinética de los gases fecales *in vitro* y la producción acumulativa de gas de algunos concentrados y forrajes durante 70 horas de incubación, afectada por la adición de 2 mg / g de MS (+) o sin adición (-) de cultivos de levadura.

	Concentrado		Rastrojo		SEM	Ingrediente	levadura	Ingrediente x levadura
	-	+	-	+				
Parámetros de producción de Gas <sup>1</sup>								
<i>B</i>	181.4b	301.8a	137.2b	182.9b	13.44	<.001	<.001	.007
<i>C</i>	0.043bc	0.033c	0.075 <sup>a</sup>	0.054b	0.0037	<.001	<.001	.166
<i>L</i>	1.33	1.13	1.29	1.27	0.156	.760	.479	.568
<i>Producción de gas In vitro</i> (ml/g DM) at:								
2 h	14.7b	17.7ab	18.3a	18.2ab	0.93	.032	.132	.100
4 h	28.1	34.19	34.1	34.4	1.71	.079	.066	.100
6 h	40.4b	49.6a	47.6ab	48.9ab	2.37	.172	.031	.104
8 h	51.6b	63.9a	59.3ab	62.0ab	2.93	.334	.014	.104
10 h	61.9b	77.4a	69.4ab	73.6ab	3.39	.584	.005	.103
12 h	71.3b	89.9a	78.1ab	84.1ab	3.79	.899	.002	.102
14 h	80.0b	101.6a	85.7b	93.5ab	4.12	.773	.007	.098
24 h	113.5b	150.0a	110.8b	128.1b	5.24	.022	<.001	.070
48 h	154.2bc	219.6a	131.5c	164.6b	6.69	<.001	<.001	.020
70 h	169.1b	252.3a	135.7c	175.7b	7.96	<.001	<.001	.009
Cinética de fermentación <sup>2</sup>								
Ph	6.41b	6.52ab	6.80a	6.59ab	0.086	.012	.574	.069
ME	6.35b	7.35a	5.78b	6.25b	0.247	.001	.005	.293
IVOMD	437.7b	502.7a	394.9b	425.5b	18.23	.002	.011	.350
MBP	488.2b	556.5a	483.3b	515.5b	9.79	.023	<.001	.070

*Diferentes superíndices siguientes medios en la misma fila indican diferencias en  $P < .05$ .*

SEM= Error estándar de la media

<sup>1</sup> *b* es la producción asintótica de gas (mL/g DM), *c* es la tasa de producción de gas (/h), *L* es el retraso inicial antes de que comience la producción de gas (h).

<sup>2</sup> abreviaturas: IVOMD, digestibilidad in vitro de la materia orgánica (mg/g DM); MCP, producción de proteínas microbianas (mg/g DM); ME, metabolizable energía (MJ/kg DM).

**Cuadro 5**

La cinética de gases fecales *in vitro* y la producción de gas acumulativo de seis ingredientes durante 70 horas de incubación afectada por la adición de 2 mg / g de MS (+) o ninguna adición (-) de cultivos de levadura.

Tipo de alimento	Ingrediente del alimento	Levadura	Parámetros de producción de gas <sup>1</sup>			Producción de gas <i>In vitro</i> (ml/g DM) at:											Cinetica de fermentación <sup>2</sup>			
			B	c	L	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	14 h	24 h	48 h	70 h	pH	ME	IVOMD	MCP	
Concentrado	Cebada rolada	-	195.6	0.037	1.82	13.8	26.5	38.4	49.4	59.7	69.2	78.0	113.6	160.7	179.5	6.13	5.87	397.7	488.5	
		+	420.7	0.019	1.05	14.9	29.3	43.1	56.3	69.1	81.3	93.1	145.6	237.4	292.4	6.35	6.74	454.6	548.3	
		SEM	38.18	0.0035	0.109	1.35	2.55	3.58	4.49	5.25	5.92	6.47	7.94	6.19	3.12	0.088	0.217	14.12	14.85	
		P-value	.014	.025	.008	.574	.490	.412	.341	.274	.221	.176	.046	.009	<.001	.152	.047	.047	.046	
	Maíz rolado	-	185.6	0.036	1.09	12.7	24.4	35.4	45.6	55.1	63.9	72.1	105.4	150.2	168.5	5.83	5.53	373.4	473.1	
		+	339.7	0.020	0.33	13.5	26.5	38.9	50.8	62.3	73.3	83.8	130.6	210.5	256.2	6.19	6.22	418.2	520.2	
		SEM	17.01	0.0033	0.185	0.87	1.65	2.36	3.02	3.61	4.16	4.66	6.70	9.90	11.87	0.275	0.181	11.92	12.53	
		P-value	.003	.026	.044	.550	.425	.354	.287	.228	.186	.149	.057	.013	.006	.411	.055	.057	.057	
	Salvado de trigo	-	150.5	0.056	1.66	15.8	29.9	42.6	53.9	64.0	73.1	81.2	110.7	139.9	147.4	6.47	6.23	431.0	483.0	
		+	238.4	0.047	1.43	21.5	41.1	58.8	75.0	89.6	103.0	115.1	161.0	212.8	228.9	6.62	7.61	520.6	577.2	
		SEM	13.93	0.0030	0.225	1.85	3.43	4.80	5.99	6.97	7.83	8.57	11.00	12.97	13.55	0.182	0.298	19.55	20.56	
		P-value	.011	.123	.515	.095	.082	.075	.068	.060	.054	.049	.032	.017	.013	.592	.031	.032	.032	
Forraje	Rastrojo de maíz	-	96.1	0.076	1.30	13.3	24.7	34.5	42.9	50.0	56.2	61.5	78.8	92.4	95.1	6.51	4.68	320.2	423.4	
		+	152.4	0.065	1.28	18.4	34.5	48.6	61.0	71.9	81.5	89.9	119.0	144.7	150.3	6.40	5.77	391.7	498.6	
		SEM	6.02	0.0090	0.326	1.13	1.89	2.37	2.58	2.64	2.57	2.38	1.16	3.66	5.17	0.121	0.030	2.07	2.18	
		P-value	.003	.437	.968	.034	.022	.014	.008	.004	.002	.001	<.001	.005	.002	.545	<.001	<.001	<.001	
	Heno de avena	-	109.5	0.088	1.13	17.4	31.9	44.0	54.1	62.6	69.8	75.8	94.3	106.9	109.0	7.33	5.02	340.9	452.4	

Produccion de gas fecal *in vitro* de seis ingredientes usados en la alimentacion de caballos con la adiccion de *Saccharomyces cerevisiae*

	+	186.2	0.049	0.52	17.5	33.3	47.5	60.4	72.0	82.5	92.1	127.7	166.8	178.8	6.77	5.93	400.2	514.8
	SEM	4.21	0.0110	0.255	1.92	3.28	4.26	4.94	5.39	5.64	5.76	5.29	3.27	3.10	0.080	0.144	9.42	9.89
	P-value	.002	.067	.167	.963	.778	.589	.419	.285	.185	.117	.011	.002	<.001	.007	.011	.011	.011
Cascara de soya	-	153.7	0.077	1.82	21.6	40.1	56.0	69.7	81.4	91.4	100.1	128.2	149.3	152.8	6.68	6.38	434.5	515.7
	+	165.0	0.065	2.11	20.2	37.9	53.5	67.1	79.1	89.6	98.8	130.4	157.6	163.2	6.55	6.44	438.4	519.8
	SEM	7.55	0.0053	0.640	0.52	0.87	1.14	1.38	1.63	1.91	2.21	3.90	6.54	7.27	0.141	0.107	6.96	7.33
	P-value	.350	.203	.331	.139	.144	.190	.254	.374	.527	.692	.715	.419	.369	.551	.711	.712	.713
SEM agrupado		17.22	0.0056	0.279	1.38	2.51	3.44	4.23	4.89	5.45	5.93	7.60	9.56	10.57	0.126	0.206	13.51	14.20
Ingrediente		<.001	<.001	.002	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001
Levadura		<.001	<.001	.308	.008	.002	.003	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	.769	<.001	<.001	<.001
Ingrediente x levadura		<.001	.121	.244	.003	.002	.002	.001	.001	.009	.008	.006	.003	<.001	.075	.006	.006	.006

<sup>1</sup> *b* es la producción asintótica de gas (mL/g MS), *c* es la tasa de producción de gas (/h), *L* es el retraso inicial antes de que comience la producción de gas (h).

<sup>2</sup>Abreviaturas: IVOMD, digestibilidad in vitro de la materia orgánica (mg/g MS); MCP, producción de proteínas microbianas (mg/g MS); ME, energía metabolizable (MJ/kg MS); PF, factor de reparto a las 24 h de incubación.

**Cuadro 6.**

Coefficientes de regresión ( $R^2$ ) entre algunos nutrientes de 6 ingredientes y la producción asintótica de gas y producción de gas a las 24 h de incubación

Grupo de ingrediente	levadura	Variable 1	Variable 2	Ecuación	Coefficiente de regresión
Concentrado	-	CP	<i>B</i>	$y = -0.3915x + 188.6$	$R^2 = 0.02$
	+	CP	<i>B</i>	$y = -3.8787x + 373.01$	$R^2 = 0.30$
Forraje	-	CP	<i>B</i>	$y = 5.9365x + 64.592$	$R^2 = 0.87$
	+	CP	<i>B</i>	$y = 4.1984x + 131.53$	$R^2 = 0.48$
Concentrado	-	CP	GP at 24 h	$y = 0.7778x + 99.188$	$R^2 = 0.15$
	+	CP	GP at 24 h	$y = 0.4877x + 141.05$	$R^2 = 0.14$
Forraje	-	CP	GP at 24 h	$y = 3.825x + 64.054$	$R^2 = 0.79$
	+	CP	GP at 24 h	$y = 0.8428x + 117.74$	$R^2 = 0.12$
Concentrado	-	NDF	<i>B</i>	$y = 0.3985x + 168.13$	$R^2 = 0.01$
	+	NDF	<i>B</i>	$y = 0.1121x + 298.06$	$R^2 = 0.02$
Forraje	-	NDF	<i>B</i>	$y = -2.0236x + 248.74$	$R^2 = 0.53$
	+	NDF	<i>B</i>	$y = -2.0844x + 297.77$	$R^2 = 0.62$
Concentrado	-	NDF	GP at 24 h	$y = 1.0578x + 78.216$	$R^2 = 0.20$
	+	NDF	GP at 24 h	$y = 0.4875x + 133.76$	$R^2 = 0.10$
Forraje	-	NDF	GP at 24 h	$y = -1.2665x + 180.64$	$R^2 = 0.45$
	+	NDF	GP at 24 h	$y = -0.3485x + 147.26$	$R^2 = 0.10$
Concentrado	-	NSC	<i>B</i>	$y = 0.5637x + 144.45$	$R^2 = 0.07$
	+	NSC	<i>B</i>	$y = 4.0262x + 37.806$	$R^2 = 0.57$
Forraje	-	NSC	<i>B</i>	$y = -6.2904x + 412.57$	$R^2 = 0.64$
	+	NSC	<i>B</i>	$y = -4.216x + 367.44$	$R^2 = 0.32$
Concentrado	-	NSC	GP at 24 h	$y = -0.5397x + 148.86$	$R^2 = 0.13$
	+	NSC	GP at 24 h	$y = -0.5937x + 188.93$	$R^2 = 0.35$
Forraje	-	NSC	GP at 24 h	$y = -4.6211x + 313.13$	$R^2 = 0.75$
	+	NSC	GP at 24 h	$y = -1.1753x + 179.5$	$R^2 = 0.15$

## XI. DISCUSIÓN

La técnica *in vitro* de Theodorou et al., 1994 ha sido utilizada con éxito para estudiar el valor nutritivo de los alimentos en rumiantes. Respecto, a la nutrición equina, la técnica de Theodorou se ha empleado con éxito para evaluar el valor nutricional de los alimentos usados para su alimentación (Elghandour et al., 2016; Lattimer et al., 2005), el uso de la técnica de fermentación *in vitro* tiene como única diferencia entre rumiantes y equinos el uso de heces como la fuente de inóculo en estudios equinos en lugar de líquido ruminal (Elghandour et al., 2016; Lattimer et al., 2005). El uso de fluido ruminal o heces como fuente de inóculo mostraron las mismas cantidades de gases en los alimentos (Paya et al., 2007).

### Composición química

Dentro de las raciones (concentrados vs. forrajes) y también entre diferentes ingredientes de piensos, la composición es ampliamente variada debido a la naturaleza de la alimentación, las condiciones de producción y la interacción entre el medio ambiente y la alimentación (Welch., 1995). Variaciones climáticas, suelo, condiciones de cosecha y tratamientos pos cosecha son condiciones que no pueden ser ignoradas (Welch., 1995). Estas características se reflejaron en la fermentación con los diferentes sustratos.

### Fermentación *in vitro*

Las interacciones entre el tipo de alimento y la suplementación de levadura reveló que el PG asintótico y el PG acumulado de 48 a 70 horas de incubación diferían entre los alimentos y la adición de levadura. Junto al PG asintótico, la tasa de PG y la cinética de fermentación incluyendo pH, ME, IVOMD y MCP fueron diferentes entre forrajes y concentrados. Por lo tanto, el efecto principal en la alimentación con levadura será discutido en alimentos individuales. La composición química varía ampliamente entre concentrados y forrajes y también entre alimentos individuales, esto explica las diferentes cinéticas de fermentación. La composición

química y la cinética de fermentación *in vitro* donde los concentrados tenían un valor nutritivo más alto (es decir, la disponibilidad de nutrientes para la actividad de la microflora presente en el inóculo) que forrajes (Elghandour *et al.*, 2016; Elghandour *et al.*, 2014b; Lowman *et al.*, 1999). La disponibilidad de nutrientes esenciales requeridos para la actividad de los microorganismos estimula la degradabilidad de los diferentes nutrientes (Radhakrishnan *et al.*, 2007). La producción de gases de los forrajes depende de la proteína y la fibra contenida en el forraje (Radhakrishnan *et al.*, 2007). El incremento del contenido de CP de los alimentos es relacionado inversamente al contenido de fibra como se ha observado previamente (Lowman *et al.*, 1999; Yalçın *et al.*, 2011). Este fenómeno tuvo un gran efecto en la PG asintótico y la PG *in vitro* a diferentes horas de incubación.

Mayor PG de concentrados en comparación con forrajes revela el contenido más elevado de componentes altamente fermentables en concentrados en comparación con los fermentados de los forrajes. Además, el efecto de la suplementación de levadura en la PG asintótico fue más evidente en concentrados que en con forrajes. El análisis de regresión mostro una fuerte relación entre los contenidos de CP y NSC de concentrados y una relación débil entre PG y contenido de FDN en forrajes. La respuesta de los alimentos a la adición de la levadura depende de muchos factores incluyendo la fuente de levadura, tipo de alimento y composición método de aplicación y el nivel de levadura (Lowman *et al.*, 1999; Patra., 2012; Glade., 1991). Además, la suplementación de levadura aumento la PG asintótico de la cebada rolada, maíz rolado, salvado de trigo, rastrojo de maíz y heno de avena, sin efecto en otros alimentos probados. Esto, está relacionada con la composición química de cada ingrediente (Elghandour *et al.*, 2016; Elghandour *et al.*, 2014b; Lowman *et al.*, 1999). *Saccharomyces cerevisiae* tiene la capacidad de estimular el crecimiento y la actividad de las bacterias celulolíticas en el intestino posterior, resultando en una digestión

mejorada de la fibra (Salem *et al.*, 2016; Jouany *et al.* 2009). Los principales productos finales de la fermentación de los carbohidratos son acetato, propionato y butirato así como gases tales como hidrogeno, dióxido de carbono y metano (Makkar., 2001). La levadura o solo tiene la capacidad de incrementar la PG también puede inducir cambios cualitativos en la producción de gases; disminución de la producción de metano y amoníaco (Hristov *et al.*, 2013).

Callaway y Martin., 1997) sugieren que *S. cerevisiae* tiene la capacidad de proporcionar a la microflora importantes nutrientes y cofactores nutricionales necesarios para sus actividades. Algunos autores han validado la capacidad de *S. cerevisiae* para eliminar el exceso de oxígeno en el ciego creando un ambiente anaeróbico óptimo para las bacterias (Newbold *et al.*, 1996; Jouany., 2001). Además *S. cerevisiae* tiene la capacidad de proporcionar un punto focal para el desarrollo de un consorcio microbiano y un entorno que promueva el crecimiento de microorganismos benéficos alrededor de los sustratos (Jouany., 2001). Las levaduras vivas alteraron positivamente el equilibrio microbiano en el intestino grueso de los caballos (Elghandour *et al.*, 2014a). Además la alimentación con levadura estimula la población de bacterias celulolíticas y sus actividades (Medina *et al.*, 2002). En su experimento, Lattimer *et al.*, (2005) sugirieron que *S. cerevisiae* causó una mejora energética de la microflora, lo que resulta en un mejor equilibrio microbiano, en el intestino posterior se estimuló la actividad de las bacterias celulolíticas aumenta la digestibilidad de nutrientes y aumento de la PG. En el presente estudio IVOMD y MCP fueron mayores para la cebada rolada, salvado de trigo, y rastrojo de maíz con *S. cerevisiae* y con concentrados que con forrajes.

Los forrajes aumentaron el pH de la fermentación en comparación con concentrados, sin efecto de la suplementación con levadura de esta variable. Además, para los piensos individuales, la levadura no afecta el pH de fermentación y el tiempo de retardo. Los concentrados comprados con los forrajes

mostraron un pH de fermentación aumentado sin efecto de la levadura antes de la incubación revelando que el pH fecal depende del sustrato fermentado (Lowman *et al.*, 1999).

La fermentación de concentrados produjo mayor concentración de lactato que se sabe baja el pH en comparación con los forrajes que producen menos lactato, para mantener un pH deseable en el ciego (Jouany *et al* 2009; Hall y Miller., 2005).

La suplementación con levadura fue más efectiva de 24 a 70 horas de incubación. Esto puede deberse al tiempo necesario para la liberación de materiales lentamente fermentados de los forrajes en comparación con los concentrados. Para forrajes es más el tiempo que se necesita para la hidrolisis de sus nutrientes y por lo tanto se produce menos gas en las primeras horas de incubación. Esto está en línea con las observaciones anteriores mostrando un menor volumen de gas a medida que aumenta el nivel de forraje en la dieta (Reddy., 2003; Elghandour *et al.*, 2015). Los aumentos de los componentes de la pared celular de los forrajes comparado con los concentrados fueron considerados supresores de la actividad microbiana mediante una reducción en la disponibilidad de los hidratos de carbona rápidamente fermentables (Wilson y Hatfield., 1997). La levadura aumento la ME de la cebada rolada, salvado de trigo y rastrojo de maíz. El aumento de las concentraciones de ME es asociado a la actividad de los microorganismos presentes en el sitio de fermentación cuando la levadura es adicionada (Elghandour *et al.*, 2015).

## **XII. CONCLUSIONES**

El contenido de nutrientes IVOMD y PG de diferentes alimentos utilizados en la dieta de equinos con o sin la suplementación de *S. cerevisiae* vario ampliamente. El efecto de la suplementación con *S. cerevisiae* fue mayor en los concentrados que con forrajes. Sin embargo, la adición de *S. cerevisiae* mejoro la cinética de fermentación y PG de los tres forrajes probados.

### **XIII. SUGERENCIAS**

De acuerdo a los resultados de la presente investigación se permite sugerir que la cepa *S. cerevisiae* puede mejorar la fermentación de los forrajes a nivel del intestino grueso de caballos a 2g/kg MS. Sugiriendo pruebas *in vivo*, con la finalidad de identificar específicamente las mejoras en parámetros productivos y reproductivos en caballos.

#### XIV. LITERATURA CITADA

- Agama, E. 2011. Características físicas y químicas de dos razas de maíz azul. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 3:317-329.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1997. Official methods of analysis. 16th ed. Arlington, VA, USA.
- Archer D.C, Proudman C.J., 2006. Epidemiological clues to preventing colic. The Veterinary Journal; 172: 29-39.
- Hall MM, Miller-Auwerda PA., 2005 Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* pelleted product on cecal pH in the equine hindgut. Proceedings of the 19th Equine Science Society Symposium. Arizona State University, AZ. p. 45–46.
- Auclair E., 2001. Yeast as an example of the mode of action of probiotics in monogastric and ruminant species. Feed manufacturing in the Mediterranean Region. Reus, Spain: CIHEAM-IAMZ, p.45–53.
- Betran, F., Bockholt, A. y Rooney, L. 2001. Blue corn in specialty corns. Food Hydrocolloids. 5: 455-467.
- Bishop, R., 2003. Manual de Nutrición del Caballo, Una Guía Completa para Alimentar correctamente a su Caballo., 2 ed. Barcelona: Omega.
- Buitrago, J.A., R. Portela e I. Jiménez., 1978. Semilla y torta (harina) de soja en alimentación de cerdos. 3º curso de Post Grado en Producción Porcina CIAT. Cali, Colombia.
- Buts J. P., Bernasconi P., Van Craynest MP., Maldague P., De Meyer R., 1986. Response of human and rats small intestinal mucosa to oral administration of *Saccharomyces boulardii*. Pediatr. Res., 20(2): 192-196.
- Buts J. P, De Keyser N, De Reademaeker L., 1994. *Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines. Pediatr. Res., 36: 522- 527.
- Callaway ES, Martin S A., 1997. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. J Dairy Sci; 80:2035 -44.

- Church D.C., Pond G.W., Pond R., 2004. Fundamentos de Nutrición y Alimentación de Animales. México, Ed. Limusa, 113 - 325.
- Coenen M., 2000. Dem Pferd auf's Maul geschaut. Ernährungs physiologische Grundlagen. Dem Pferd auf's Maul geschaut. Coenen M and Vervuert I (eds). 1-8. ISBN 3-00-006832-5.
- Coleman R J., Milligan JD., Burwash LD., 1989. The effect on daily gain in horses from feeding hay on the ground. Proc Equine Nutr & Physiol Soc Symp, pp164 - 168.
- Colville, T., Bassert, J.M., 2008. Clinical Anatomy and Physiology for Veterinary Technicians, 2<sup>nd</sup> ed., Mosby Elsevier, St. Louis, Missouri.
- Cone, J. W., Van Gelder, A. H., Visscher, G. J. and Oudshoorn, L., 1996. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. Animal Feed Science and Technology. 61, 113-128.
- Cuaron P., 1999. Live yeast use in growing and finishing swine. Development of a study model. In: Proc. 3rd Mexico SAF-AGRI Symposium on Biotechnology Applied to Animal Nutrition.
- Cunha, T.J., 1991. Horse feeding and nutrition, 2<sup>nd</sup> ed., Academic Press, Inc., San Diego, California.
- Cunningham, J., 2003. Fisiología Veterinaria. 3ra Ed. Elsevier, Madrid, España. pp. 298- 303.
- Davies, D. R., Theodorou, M. K., Baughan, J., Brooks, A. E. and Newbold, J. R., 1995. An automated Pressure Evaluation System (APES) for determining the fermentation characteristics of ruminant feeds. Annales de Zootechnie. 44, 36- 45.
- Elghandour M. M, Kholif A. E, Lopez S, Mendoza G. D, Odongo N. E, Salem A. Z. M., 2016. In vitro gas, methane and carbon dioxide productions of high fibrous diet incubated with fecal inocula from horses fed live yeasts in

response to the supplementation with different yeast additives. *J Equine Vet Sci*; 38: 64–71.

- Elghandour MMY, Chagoyán JCV, Salem AZM, Kholif AE, Castañeda JSM, Camacho LM, Cerrillo-Soto MA., 2014 (a). Effects of *Saccharomyces cerevisiae* at direct addition or pre-incubation on *in vitro* gas production kinetics and degradability of four fibrous feeds. *Ital J Anim Sci*; 13:295–301.
- Elghandour MMY, Kholif AE, Márquez-Molina O, Vazquez-Armijo JF, Puniya AK, Salem AZM., 2015. Influence of individual or mixed cellulase and xylanase mixture on *in vitro* rumen gas production kinetics of total mixed rations with different maize silage and concentrate ratios. *Turk J Vet Anim Sci*; 39: 435-42.
- Elghandour MMY, Vázquez Chagoyán JC, Salem AZM, Kholif AE, Martínez Castañeda JS, Camacho LM, Buendía G., 2014 (b). *In Vitro* Fermentative capacity of equine fecal Inocula of 9 fibrous forages in the presence of different levels of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Equine Vet Sci*; 34:619–25
- Ensminger, M. E. 1973. Producción Equina. “El Ateneo”, Pedro García S. A. Librería, Editorial e Inmobiliaria. Argentina.
- Fannesbeck, P.V., 1968a. Digestion of soluble and fibrous carbohydrates of forages by horses. *Journal of Animal Science* 27, 1336–1344.
- Fannesbeck, P.V., 1969b. Partitioning the nutrients of forage for horses. *Journal of Animal Science* 28, 624–638.
- Fox S., 1994. Probióticos en la nutrición animal. *Mundo Porcino*. 28-32p.
- Frape, D., 1992. Nutrición y alimentación del caballo. Zaragoza (España): Editorial Acribia. ISBN 84-200-0724-2.
- Galarza, J. M., 2011. Situación actual y perspectivas del maíz en México. SIAP.
- García, A. E., 2007. Importancia de los concentrados de levadura viva (*Saccharomyces cerevisiae*) en el desempeño productivo y la calidad de la canal de bovinos de engorda. Memorias de XL Seminario Internacional de

Actualización Sobre Engorda de Ganado Bovino en Corral. Monterrey, México.

- García, R. S., 2001. Las levaduras para la alimentación de los cerdos (*Saccharomyces cerevisiae*). Publicado en [www.engormix.com](http://www.engormix.com)
- Gedek, B., 1987. Interaktion zwischenlebeden Hefezellen und darmpathogen *Escherichia-coli* keimen In: Okosystem Darm, Morphologie, Mikrobiologie, Immunologie, (eds). Springer Verlag, pp. 135-139.
- Getachew G., M. Blummel, H. P. S. Makkar, K. Becker., 1998. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. Anim. Feed Sci. Tech.72: pp. 261-281.
- Glade MJ. 1991. Dietary yeast culture supplementation of mares during late gestation and early lactation: effects on dietary nutrient digestibilities and fecal nitrogen partitioning. J Equine Vet Sci.
- Glade, M. J., Biesik, L. M., 1986. Enhanced nitrogen retention in yearling horses supplemented with yeast culture. J. Anim. Sci. 62, 1635-140.
- Gómez, A. R., 1986. Harinas de origen animal.
- Goodband, R., M. Tockach y J. Nilssen., 1995. The effects of diet particles size on animal performance. Cooperative Extension Service, Kansas State University, Manhattan, USA
- Gorbach, S. I., 2002. Probiotics in the third millennium. Digestive and Liver Disease 34 (2), s2-7.
- Grant R. J and Mertens D. R., 1992. Impact of *in vitro* fermentation techniques upon kinetics of fiber digestion. Journal of Dairy Science. 75: 1263-1272.
- Harris, P.A., 2007. How understanding the digestive process can help minimise digestive disturbances due to diet and feeding practices.
- Hristov AN, Oh J, Firkins JL, Dijkstra J, Kebreab E, Waghorn G, Makkar HPS, Adesogan A, Yang W, Lee C, Gerber PJ, Henderson B, Tricarico J., 2013. Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal

operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *J Anim Sci*; 91:5045–69.

- Hussein, H.S., Vogedes, L.A., 2007. Forage nutritional value for equine as affected by forage species and cereal grain supplementation.
- Jouany, J.-P., Gobert, J., Medina, B., Bertin, G., Julliand, V., 2008. Effect of live yeast culture supplementation on apparent digestibility and rate of passage in horses fed a high-fiber or high-starch diet. *J. Anim. Sci.* 86, 339-347.
- Jouany, J.-P., Medina, B., Bertin, G., Julliand, V., 2009. Effect of live yeast culture supplementation on hindgut microbial communities and their polysaccharidase and glycoside hydrolase activities in horses fed a high-fibre or high-starch diet. *J. Anim. Sci.* 87, 2844-2852.
- Jouany, J.P., 2001. A new look to at yeast culture as probiotics for ruminants. *Feed Mix* 9:17-9.
- Julliand, V., de Fombelle, A., Drogoul, C., 2001. Feeding and microbial disorders in horses: Three, Effects of three hay: grain ratios on microbial profile and activities. *Journal of Equine Veterinary Science* 21, 543–546.
- Kamphues J., 2000. Die Bedeutung der Fütterung für die Gesundheit des Atmungstraktes von Pferden. In: *Dem Pferd auf´s Maul geschaut*. Coenen M and Vervuert I (eds). 72-79. ISBN 3-00-006832-5.
- Kronfeld, D. S. and Harris P., 1997. Feeding the athletic horse. Pages 61-77- in the *Veterinarians Practical Reference to Equine Nutrition*. K. N. Thompon, ed. Purina Mills Inc. AAEO, St. Louis MO.
- Lattimer JM, Cooper SR, Freeman DW, Lalman DA. 2005. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on *in vitro* fermentation of a high concentrate or high fiber diet in horses. *Proceedings of the 19<sup>th</sup> Symposium of the Equine Science Society*, Tucson, AZ; p. 168–73.

- Lázaro C., 2005. Efecto de probióticos en el alimento de marranas sobre los parámetros productivos de lechones. Rev. investig. Vet. Perú, 16(2), pp.97102.
- Lindner, A. 2002. ¿Cuándo y que dar que de comer al caballo de deporte?.
- López, A. D., 2008. Ruminial inoculums and digestibility in situ of three browse foliages contain tannins. In 9th International Conference on Goats. Vázquez, M. O. V. Camacho, D. L. M., Albarrán, P. B. Vázquez, A. J. F., Rojo, R. R.
- Lowman R. S, Theodorou M. K, Hyslop J. J, Dhanoa M. S, Cuddeford D., 1999. Evaluation of an in vitro batch culture technique for estimating the in vivo digestibility and digestible energy content of equine feeds using equine faeces as the source of microbial inoculum. Anim Feed Sci Technol; 80: 11–27.
- Makkar H., 2001. Recent advances in *in vitro* gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources.
- Manríquez H. J. A., 1994. La digestibilidad como criterio de evaluación de alimentos. Depósito de documentos de la FAO. 269 p.
- Mauricio, R. M., Mould, F. L., Dhanoa, M. S., Owen, E., Channa. K. S. and Theodorou, M. K., 1999. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. Animal Feed Science and Technology. 79, 321-330.
- Mc Donald, P.; Edwards, R.A.; Greenhalgh, J.F.D.; Morgan, CA., 1995. Animal Nutrition. Longman Scientific and Technical. 607 pp.
- Mc Donald, P. 1993. Nutrición Animal. Ed. Acribia. Zaragoza.
- Mc Donald, P., Henderson, N., Heron, S., 1991. The Biochemistry of Silage, second ed. Chalcombe Publications, Canterbury, UK.
- Medina M, Girard ID, Jacotot E, Julliand V., 2002. Effect of a preparation of *Saccharomyces cerevisiae* on microbial profiles and fermentation patterns in

the large intestine of horses fed a high fiber or a high starch diet. J Anim Sci; 80:2600–9.

- Medina, B., Girard, I. D., Jacotot, E., Julliand, V., 2002. Effect of a preparation of *Saccharomyces cerevisiae* of horses def a high fiber or a high starch diet. J. Anim. Sci. 80, 2600-2609.
- Mendez, G., Solorza, J. Y Paredes, O., 2005. Composición química y colorimétrica de hibridos y variedades de maíz. Revista Agrocienca. 39:267-274.
- Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W. 1979 The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. J Agr Sci; 92: 217–22.
- Menke, K. H., Steingass, H., 1988. Estimations of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. Animal Research and Development 28, 7-55.
- Meyer H., Radicke S., Kienzle E., 1993. Investigations of preileal digestion of oats, corn and barley starch in relation to grain processing. Proc Equine Nutr & Physiol Soc Symp, pp 92 - 97.
- Müller, C.E., 2005. Fermentation pattern of small-bale silage and haylage as a feed for horses. Grass and Forage Science 60, 109–118.
- Müller, C.E., Möller, J., Krogh Jensen, S., et al., 2007. Tocopherol and carotenoid levels in baled silage and haylage in relation to horse requirements. Animal Feed Science and Technology 137, 182–197.
- Müller, C.E., Udén, P., 2007. Preference of horses for grass conserved as hay, haylage or silage. Animal Feed Science and Technology 132, 66–78.
- Newbold CJ, Wallace RJ, McIntosh FM., 1996. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. Br J Nutr; 76:249–61.

- NRC, 2007. Nutrient Requirement of Horses, 6th revised edition. National Academies Press, Washington D C, USA.
- Opatpatanakit, Y., Kellaway, R. C., Lean, I. J., Annison, G., Kirby, A., 1994. Microbial fermentation of cereal grains *in vitro*. Australian Journal of Agricultural Research. 45, 1247-1263.
- Pagan, J. D., 1998. Advances in Equine Nutrition, 1<sup>st</sup> ed. Nottingham University Press, Thrumpton, Nottingham, UK.
- Patra AK., 2012. The use of live yeast products as microbial feed additives in ruminant nutrition. Asian J Anim Vet Adv; 7:366–75.
- Paya H, Taghizadeh A, Janmohammadi H, Moghadam GA., 2007. Nutrient digestibility and gas production of some tropical feeds used in ruminant diets estimated by the *in vivo* and *in vitro* gas production techniques. Am J Anim Vet Sci; 2:108–13.
- Pell, A. N. and Schofield, P., 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. Journal of Dairy Science. 76, 1063-1073.
- Pell, A. N., Doane, P. H., Schofield, P., 1997. *In vitro* digestibility and gas production. In: Simposio sobre Tópicos Especiales en Zootecnia, Lavras, MG, 109-132.
- Pike, I. H y Tatterson, I. N., 1980. The utilization of fish by-products and waste in animal feeding. In. By products and wastes in animal feeding. Edited by E.R. Orskov. British Society of Animal Production. Occassional Pubiication. N° 38. 85 - 90.
- Posada, S. L. y Noguera, R. R., 2005. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. Livestock Research for Rural Development. 17, 4.
- Potter, G. D., Arnold, F. F., Householder, D. D., Hansen D. H. and Brown K. M., 1992 Digestion of starch in the small and large intestine of the equine. Pp 107-111. Hanover-Germany.

- Radhakrishnan L, Murugan M, Sivakumar T., 2007. Biomass yield, chemical composition and nutritive value of *Desmanthus virgatus* (hedge lucerne) for sheep. *Anim Feed Sci Technol*;7 :119–23.
- Ragnarsson, S., Lindberg, J. E., 2008a. Nutritional value of timothy haylage in Icelandic horses. *Livestock Science* 113, 202–208.
- Ragnarsson, S., Lindberg, J.E., 2010b. Nutritional value of mixed grass haylage in Icelandic horses. *Livestock Science* 131, 83–87.
- Ralston, S. L., 1984. Controls of feeding in horses. *J. Anim. Sci.*, vol. 59, p. 13541361.
- Real Venegas C. O., 1990. *Zootecnia Equina México Trillas*.
- Reddy B., 2003. Utilization of red gram (*Cajanus cajan*) by-products for intensive goat production. PhD, Ranga Agricultural University, Hyderabad, India.
- Rosero J. R., 2002. Estudio químico, "*in situ*", "*in vitro*" y microscópico da pared celular de cinco genotipos de sorgo recogidos en tres épocas de corte. *Ph. D. Thesis*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. 148p.
- Salem AZM, Elghandour MMY, Kholif AE, Barbabosa A, Camacho LM, Odongo NE., 2016. The Effect of feeding horses a high fiber diet with or without live yeast cultures supplementation on feed intake, nutrient digestion, blood chemistry, fecal coliform count and *in vitro* fecal fermentation. *J Equine Vet Sci*; 39:12–9.
- SAS. 2002. User's guide: statistics, version 9.0. Cary, NC: SAS Institute.
- Schofield, P., 2000. In farm animal metabolism and nutrition. CABI Publishing, Wallingford, UK. 209-232.
- Schofield, P., Pitt, R. E. and Pell, A. N., 1994. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. *Journal of Animal Science*. 72, 2980-2991.

- Scott, BD, Potter, GD., 1989. Rate of feed consumption and chewing by mature horses fed diets with varying amounts of fiber. Proc Equine Nutr & Physiol Soc Symp, pp274 – 278.
- Shimada M. A., 2009. Nutrición Animal. Trillas, S.A. de C.V. México, D.F. 397 p.
- Somarriba R. E., 1996. Texto basico de granos basicos. UNA, Facultad de Agronomia, Managua, Micaragua. 196p.
- Song, M. and Di Luzio, N. R., 1979. Yeast gluca and immunotherapy of infectious diseases. In: Lysosomes in Applied Biology and Therapeutics, Dingle, J.T., Jacques, P.J. and Shaw, I.H. (eds). North Holland Press, Amsterdam, pp. 533-547.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., Mc Allan, A. B and France, J., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Anim. Feed Sci. Tech. 48: pp 185-197.
- Van Soest, P. J., 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant, second ed. Comstock, Ithaca, London.
- Vieyra S. A., Martínez, S. N. V., 2001. Determinación de las características de degradación ruminal, a través de técnica de producción de gas *in vitro*, Tesis de Maestría, UAEM, CICA, Toluca, México.
- Warrens, Evans. 1979. El Caballo. Ed. Acribia.
- Welch RW., 1995. The chemical composition of oats. In: Welch R, editor. The oat crop: production and utilization. London: Chapman & Hal.
- Wilkins, R. J., 1988. The preservation of forages. In: Ørskov, E.R. (Ed.), Feed Science, World Animal Science, B4. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, the Netherlands, pp. 231–255.
- Willard, J. G., Willard, J. C., Wolfram, S. A., 1977. Effect of diet on cecal pH and feeding behaviour of horses. Journal of Animal Science 45, 87–93.

- Williams, B. A., 2000. Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. In: Givens, D. I., Owen, E., Omed, H. M. and Axford, R. F. E. (editors). Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. Wallingford (UK). CAB International. 475.
- Wilson JR, Hatfield RD., 1997. Structural and chemical changes of cell wall types during stem development: consequences for fibre degradation by rumen microflora. Aust J Agric Res; 48:165–80.
- Wilson, D., Reeder, M., 2005. Equus caballus. Mammal species of the world. a taxonomic and geographic reference. Johns Hopkins University Press. 12<sup>a</sup> Ed, pp. 629.
- Wolter, R., 1976 Alimentation et pathologie chez le cheval. Rec. Méd. Vet., vol. 152, n<sup>o</sup> 6, p. 377-384.
- Yalçın S, Yalçın S, Can P, Gürdal AO, Bağcı C, Eltan Ö., 2011. The nutritive value of live yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) and its effect on milk yield, milk composition and some blood parameters of dairy cows. Asian-Aust J Anim Sci; 24:1377–85.