

# EFFETTO DELL'INTEGRAZIONE CON PROBIOTICI, PREBIOTICI ED ESTRATTI D'ERBE SULLA DIGERIBILITÀ IN VIVO DI CAVALLI ALIMENTATI CON FIENO

EFFECT OF SUPPLEMENTATION WITH PROBIOTICS, PREBIOTICS AND PHYTOTERAPIC EXTRACTS ON APPARENT DIGESTIBILITY OF HORSES FED HAY

DOMENICO BERGERO<sup>1</sup>, EMANUELA VALLE<sup>1</sup>, NICOLETTA MIRAGLIA<sup>2</sup>, PIER GIORGIO PEIRETTI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Via L. da Vinci 44, 10095 Grugliasco (Torino)

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Animali, Vegetali e dell'Ambiente, Via De Sanctis, 86100 Campobasso

<sup>3</sup>Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via L. da Vinci 44, 10095 Grugliasco (Torino)

## Riassunto

Per il cavallo il corretto funzionamento dell'apparato intestinale è considerato un elemento fondamentale per il benessere. I carboidrati strutturali come cellulosa ed emicellulosa resistono all'idrolisi degli enzimi digestivi propri dell'organismo e possono essere demoliti soltanto dai processi fermentativi che avvengono ad opera dei microrganismi che risiedono nel lume intestinale e producono acidi grassi volatili (AGV) utilizzati dall'organismo a scopi energetici. L'utilizzo di prebiotici e probiotici per modulare le fermentazioni intestinali si rivela di estremo interesse anche per il cavallo, soprattutto perché abbinati possono dare un'azione complementare più marcata o effetto simbiotico. Un integratore di tipo simbiotico ha differenti effetti positivi sull'ospite in quanto garantisce un maggior impianto e sopravvivenza dei microrganismi utili per le fermentazioni intestinali. L'obiettivo di questo lavoro è dunque quello di valutare gli effetti dell'utilizzo di un integratore simbiotico di nuova concezione, contenente prebiotici, probiotici, L-glutammina ed estratti d'erbe sulla digeribilità di razioni composte da fieno di qualità mediocre, nel tentativo di ricalcare le classiche condizioni di campo, frequenti nelle scuderie italiane. L'integratore da noi testato, somministrato in dosi pari a 48 g/capo/giorno, a cavalli alimentati con solo fieno, ha provocato un aumento statisticamente significativo della digeribilità apparente della sostanza secca, sostanza organica, energia e frazioni fibrose (NDF ed ADF).

## Summary

*A properly running gut is a key point for the welfare of the horse. In particular the use of prebiotics and probiotics for the modulation of the large intestine fermentations is very important in many field situations. Structural carbohydrates such as cellulose and hemicelluloses cannot be digested by the horse's digestive enzymes, but can be fermented by fermentative micro organisms in the large intestine, thus providing volatile fatty acids (VFA) that are used as a fuel source by the horse. The use of prebiotics and probiotics association increases the beneficial effects of these compounds in the gut, thus obtaining a "symbiotic" effect: in this way there is an increase of the fermentative microorganisms survival with an important positive effect on the fermentations. The main objective of this study was to evaluate the effect of a new symbiotic supplement, containing prebiotics, probiotics, L-glutamine and herbal extracts, on the digestibility of a poor quality hay, typical feeding basis of Italian stables. The supplement we tested, fed at a 48 g/horse/day level to horses fed hay only, increased the apparent digestibility of dry matter, organic matter, energy and fiber fractions (NDF and ADF).*

## INTRODUZIONE

Per il cavallo il corretto funzionamento dell'apparato intestinale è più che mai considerato un elemento fondamentale per il benessere. Dai processi fermentativi intestinali

vengono prodotti acidi grassi volatili (AGV) come acido acetico, propionico e butirrico, utilizzati dall'organismo a scopi energetici. Ad esempio nel caso di soggetti a riposo, alimentati con diete ricche di foraggi, gli AGV possono addirittura coprire il 50% dei fabbisogni energetici.

Tuttavia l'introduzione di cospicue quantità di concentrati a scapito delle quantità di foraggio può mutare le condizioni dell'ambiente intestinale modificando il comportamento alimentare (Bergero, 1998). Un eccesso di cereali può ad esempio indurre uno squilibrio nella produzione di AGV e acido lattico con eccessiva acidificazione del mezzo intestinale. In particolare l'utilizzo di diete ricche di cereali interferisce con l'ecosistema e la digeribilità dei nutrienti, modificando la produzione di AGV e deprimendo la digeribilità della fibra (Julliand *et al.*, 2001).

La modificazione del mezzo intestinale è tra le principali cause di disordini digestivi e predispone all'insorgenza di problemi colici ed enterotossiemie (Bergero, 1998) ed alterazioni comportamentali come il wood-chewing.

La modulazione delle fermentazioni è quindi di estrema importanza al fine di evitare lo sviluppo di effetti indesiderati anche in virtù del fatto che il cavallo sportivo è spesso mantenuto in condizioni molto distanti da quelle naturali con tempi di digiuno prolungati, razioni ricche di concentrati e cambi repentini di alimentazione.

In queste situazioni appare di estremo interesse lo studio di nuovi prodotti o integratori che possano avere un effetto positivo sulle fermentazioni microbiche, manipolando le condizioni del mezzo intestinale nel tentativo di limitare le conseguenze negative del management del cavallo sportivo e aumentare la digeribilità dei nutrienti. In particolar modo l'utilizzo di prebiotici e probiotici si rivela di estremo interesse anche per il cavallo (Julliand *et al.*, 2001).

I prebiotici sono definiti da Gibson (2004) come "ingredienti selettivamente fermentati che permettono cambiamenti specifici sia nella composizione che nell'attività della microflora gastrointestinale, apportando benefici all'ospite in termini di benessere e di salute".

In particolare i prebiotici sono in grado di aumentare il numero di Lattobacilli e Bifidobatteri a scapito di batteri patogeni come i Clostridi. Essi sono costituiti da piccole molecole zuccherine resistenti all'idrolisi degli enzimi digestivi, ma facilmente utilizzabili dai microrganismi simbiotici ad azione positiva (Julliand, 2005). Diversi oligo-saccaridi possiedono questa caratteristica come quelli derivati dal mannosio (MOS) e del fruttosio (FOS). Quest'ultimi sono costituiti da molecole di fruttosio unite con legami  $\beta$  2-1 glicosidici (Fig. 1) resistenti all'idrolisi degli enzimi digestivi, ma prontamente utilizzabili da parte dei microrganismi fermentatori. Secondo differenti studi queste molecole producono effetti positivi sui microrganismi simbiotici in differenti specie come uomo, ratto, suino (Berg *et al.*, 2005) aumentando la produzione di AGV e acido lattico, che contribuiscono ad abbassare il pH nel grosso intestino e ad inibire la crescita di microrganismi patogeni. Wolter (1994) osservò una diminuzione del rischio di colica in cavalli integrati con FOS a medio grado di polimerizzazione (3-7 molecole di fruttosio) ed evidenziò una forte diminuzione dei composti putrefattivi nelle feci.

La modulazione delle fermentazioni intestinali può tuttavia essere ottenuta utilizzando anche i cosiddetti probiotici, conosciuti come bioregolatori digestivi o direct-fed microbials. Questi composti sono preparazioni di microrganismi vivi che posseggono effetti benefici migliorando la gestione e l'igiene intestinale.

I primi studi incoraggiano ulteriori approfondimenti sugli effetti di queste sostanze ed in particolare è neces-

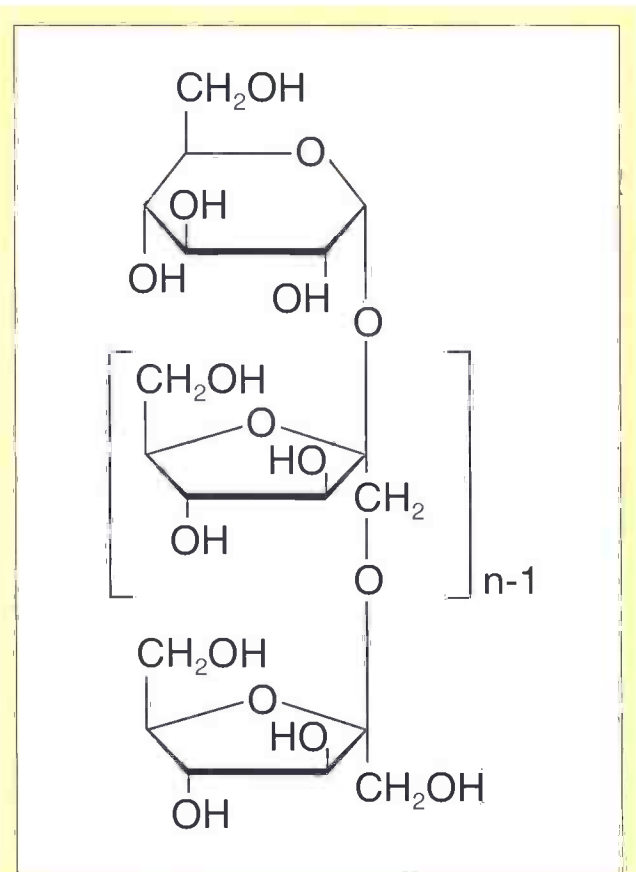


FIGURA 1 - Struttura chimica dei fruttoligosaccaridi.

sario valutare gli effetti combinati di prebiotici e probiotici, che uniti insieme possono dare un'azione complementare più marcata od effetto simbiotico. Questo tipo di approccio, adottato da alcuni anni in ambito umano (Tuohy *et al.*, 2004), prevede lo studio di prodotti costituiti da miscele di prebiotici e probiotici che insieme possono influenzare in modo positivo l'ospite. I prebiotici ed i probiotici, se assunti da soli, hanno infatti modalità d'azione differente sull'apparato digerente, mentre l'utilizzo accoppiato garantisce un maggior impianto e sopravvivenza dei microrganismi positivi, in quanto si ha un effetto combinato dato dalla stimolazione selettiva della crescita e dall'attivazione del metabolismo dei batteri probiotici aggiunti, ottenendo un effetto sinergizzante sui processi fisiologici a livello gastro-intestinale (Julliand, 2005).

Accanto all'utilizzo di queste sostanze appare sempre più di maggior importanza studiare gli effetti della L-glutammina, che è indispensabile per mantenere il metabolismo delle proteine e degli altri amminoacidi, nonché di integratori contenenti estratti d'erbe, che possono completare l'effetto simbiotico. Quest'ultimi hanno conosciuto negli ultimi tempi una grande diffusione non solo in ambito umano, ma anche sul mercato degli integratori destinati ai cavalli.

L'obiettivo di questo lavoro è di valutare gli effetti sulla digeribilità di razioni composte da solo fieno di un nuovo integratore presente in commercio contenente probiotici, prebiotici, L-glutammina ed estratti d'erbe ed appositamente formulato per ottenere un effetto simbiotico a livello dell'apparato digerente del cavallo.

## MATERIALI E METODI

Per la prova sono stati utilizzati 6 cavalli da sella di età compresa tra 4 e 8 anni in buono stato di salute, dal peso medio di  $458 \pm 35$  kg.

I soggetti, mantenuti in box individuali con lettiera in trucioli e libero accesso all'acqua, sono stati ripartiti casualmente in due gruppi contenenti 3 cavalli ciascuno.

La prova è stata eseguita secondo uno schema sperimentale di cross-over: dopo un primo periodo di adattamento all'alimento di 14 giorni, in accordo con la metodica di Martin-Rosset *et al.* (1984), è seguito un periodo di 6 giorni per la raccolta delle feci.

A tutti i soggetti è stata somministrata una razione a base di solo foraggio calcolata in base al peso e in modo da soddisfare i fabbisogni energetici, proteici e di minerali in funzione del livello nutritivo pari al mantenimento.

Nella prima prova un gruppo di cavalli riceveva solo fieno (100% della razione giornaliera), mentre il secondo gruppo riceveva fieno e l'integratore in esame. Successivamente è seguito un periodo wash out di 14 giorni in cui tutti i cavalli hanno ricevuto una razione a base di fieno ed orzo fioccolato (50:50) per evitare un condizionamento del successivo ciclo di digeribilità. Si è quindi proceduto all'inversione dei trattamenti tra i due gruppi prima di iniziare la seconda prova ed alla raccolta totale delle feci per sei giorni consecutivi.

### Alimenti utilizzati

Foraggi: per le due prove è stato utilizzato un fieno di prato polifita di primo taglio la cui composizione centesimale è riportata nella Tabella 1, alla dose di mantenimento.

### Integratore

L'integratore (Enter-prize®, Candioli Farmaceutici S.p.A.) risultava contenere, in ordine di importanza: Fruttoligosaccaridi, L-glutammina, lievito di birra inattivato non irradiato, estratto secco di *Glycyrrhiza glabra* (tit. ac. Glicirrizico 20%) estratto secco di *Zingiber officinalis* (tit. gingeroli 5%), *Lactobacillus sporogenes* (15 miliardi di spore/g). Il prodotto è stato somministrato in ragione di 8 compresse (pari a 48 g di prodotto) al giorno.

### Analisi effettuate

Per la determinazione della sostanza secca (SS) e la preparazione per le analisi, i campioni di fieno e di feci sono stati seccati in stufa ad aria forzata a  $65^{\circ}\text{C}$  per 48 ore fino a peso costante.

Sui campioni cumulativi di fieno e di feci, preventivamente equilibrati e macinati, sono state quindi eseguite le seguenti analisi:

- Energia grezza (EG, MJ/kg), mediante bomba calorimetrica adiabatica (IKA C7000, Staufen, Germany);
- Ceneri, proteina grezza (PG), fibra grezza (AOAC, 1990);
- Fibra resistente al detergente neutro (NDF), fibra resistente al detergente acido (ADF) e lignina (ADL) secondo Van Soest *et al.* (1991).

**Tabella 1**  
Composizione chimica (% s.s.) del fieno utilizzato nelle due prove

	Prova 1	Prova 2
Sostanza secca	89,8	91,6
Sostanza organica	92,0	92,1
Ceneri	8,0	7,9
Proteina grezza	5,9	6,2
Fibra grezza	38,0	38,2
NDF <sup>1</sup>	70,4	69,5
ADF <sup>2</sup>	46,0	46,9
ADL <sup>3</sup>	6,7	6,8
Cellulosa (ADF-ADL)	39,3	40,1
Emicellulosa (NDF-ADF)	24,4	22,6
Estrattivi inazotati	46,6	46,0
Estratto etereo	1,5	1,7
CAI <sup>4</sup>	2,3	2,4
EG (MJ/kg)	17,6	17,4

<sup>1</sup> Fibra resistente al detergente neutro.

<sup>2</sup> Fibra resistente al detergente acido.

<sup>3</sup> Lignina.

<sup>4</sup> Ceneri acido insolubili.

**Tabella 2**  
Coefficienti di digeribilità apparente (media  $\pm$  e.s.) della razione a base di solo fieno (F) e a base di fieno+integratore (F+I) determinati con il metodo delle ceneri acido insolubili

	F	F+I	Significatività
Sostanza secca	44,71 $\pm$ 1,58	52,56 $\pm$ 1,21	*
Sostanza organica	45,29 $\pm$ 1,70	53,25 $\pm$ 1,19	*
Proteina grezza	24,38 $\pm$ 4,66	34,89 $\pm$ 2,73	NS
NDF	37,33 $\pm$ 1,69	46,60 $\pm$ 1,15	*
ADF	34,98 $\pm$ 2,06	48,31 $\pm$ 1,44	*
EG	39,25 $\pm$ 1,80	48,15 $\pm$ 1,19	*

Legenda: \* =  $P < 0,05$

- Ceneri acido insolubili (CAI) secondo Van Keulen e Young (1977).

Gli estrattivi inazotati+estratto etereo e la sostanza organica (SO) sono stati ottenuti per calcolo dai dati di analisi centesimale. La cellulosa e l'emicellulosa sono state calcolate dai dati di NDF, ADF e lignina. Basandosi sul metodo delle ceneri acido insolubili sono stati calcolati, per ciascun soggetto e per ciascuna prova, i coefficienti di digeribilità apparente relativi a SS, SO, EG, PG, NDF e ADF.

### Analisi statistica

I valori di digeribilità delle due razioni sono stati sottoposti ad analisi della varianza ad una via per evidenziare



l'effetto dell'integrazione, utilizzando SPSS (v 11.5, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Le differenze sono state considerate significative per valori di P inferiore o uguale a 0,05.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Lo studio della digeribilità in vivo, ricorrendo al metodo di stima della digeribilità con indicatore interno (ceneri acido insolubili), permette di studiare come varia la digeribilità ricreando le condizioni fisiologiche dell'animale e le condizioni di campo in modo perfetto. È importante valutare gli effetti sulla digeribilità soprattutto del fieno di prato polifita di primo taglio, che costituisce la base dell'alimentazione nella maggior parte delle scuderie italiane. Le analisi effettuate sui fieni utilizzati per la prova indicano che il prodotto utilizzato possedeva qualità mediocri, situazione frequente in seguito alle condizioni di fienagione spesso non ottimali. Infatti i valori di proteina grezza si aggiravano intorno al 5,9 e 6,2% rispettivamente nella prima e nella seconda prova mentre i valori di ADL e ADF si presentavano elevati, indice della cospicua presenza di lignina. Secondo i dati INRA (1988) un buon fieno di prato polifita di primo taglio possiede valori di proteina grezza intorno al 8-10%, mentre i valori di ADF si stabilizzano intorno al 36,4-38,4%.

Nel nostro studio l'utilizzo dell'integratore ad azione simbiotica ha provocato un aumento statisticamente significativo dei coefficienti di digeribilità apparente della SS, SO, EG, NDF e ADF nei cavalli trattati, nonostante le caratteristiche del fieno di partenza fossero scarse. Hill *et al.* (2001) notano come il cambiamento della microflora ciecolica nel cavallo sportivo comporti una migliore utilizzazione dei nutrienti della razione.

Nel nostro lavoro, l'utilizzo del prodotto ha provocato un miglioramento della digeribilità delle frazioni fibrose con aumento del 9% per NDF e del 13% per ADF, migliorando dunque il processo di trasformazione della fibra. L'aumento della digeribilità dell'NDF e dell'ADF riflette le dinamiche di cambiamento della microflora (Hill *et al.*, 2001), importante sia nel caso in cui venga utilizzato un fieno di scarsa qualità, sia per contrastare gli effetti negativi prodotti da razioni costituite essenzialmente da concentrati amilacei. Va ricordato infatti che il cavallo è essenzialmente un erbivoro dunque l'ecosistema fibrolitico va mantenuto nelle condizioni ottimali. L'utilizzo di un prodotto simbiotico si rivela di fondamentale importanza non solo per trattare cavalli con problemi quali il dismicrobismo, ma il suo uso può essere utilissimo anche per affrontare le comuni condizioni di campo che spesso prevedono l'utilizzo di fieni di scarsa qualità anche associate a cospicue quantità di cereali, che deprimono l'attività dei microrganismi.

I risultati statisticamente significativi ottenuti nel nostro studio sono verosimilmente imputabili all'effetto simbiotico della composizione dell'integratore utilizzato.

Il meccanismo attraverso il quale i FOS agiscono a livello intestinale è stato ben chiarito sul piano scientifico da Roberfroid (1997), infatti i FOS vengono digeriti solo in piccolissima parte nel tratto gastrointestinale superiore (stomaco e intestino tenue) e passano praticamente indigeriti nel colon, dove fermentando sono utilizzati come nutrimento dai batteri probiotici. Nel cavallo i FOS aumenta-

no i quantitativi fecali di AGV e lattato in maniera direttamente proporzionale al grado di inclusione nella dieta (Berg *et al.*, 2005). Oli *et al.* (1998) hanno evidenziato effetti addizionali dei FOS sulla funzionalità intestinale e sulla regolarizzazione del transito e della consistenza delle feci. Altre ricerche indicano che i FOS promuovono l'assorbimento a livello intestinale di ferro e calcio aiutando così a prevenire l'anemia e la perdita di densità ossea (Ohta *et al.*, 1998). Tuttavia non tutti gli studi nel cavallo sono concordi nell'affermare che i FOS agiscono sul numero totale di lattobacilli. Secondo Berg *et al.*, (2005) l'integrazione nei puledri con 8 oppure 24 g/die di FOS non comporta un aumento significativo di questi batteri, nonostante riduca il numero di *Escherichia coli*.

Si può ipotizzare dunque che l'utilizzo di un prebiotico di provata efficacia anche nel cavallo come i FOS vada accoppiato all'utilizzo di un probiotico per garantire un effetto più completo grazie alla stimolazione selettiva della crescita e attivazione del metabolismo di batteri probiotici aggiunti (Jullian, 2005). Microrganismi appartenenti al genere *Lactobacillus* e *Saccharomyces* possono svolgere la loro azione positiva mediante differenti meccanismi come quello di adesione competitiva nei confronti di eventuali patogeni o migliorando la digeribilità degli alimenti. Nel caso specifico il prodotto simbiotico testato ha apportato cospicui miglioramenti ai parametri della digeribilità ed in particolare quelli riferibili alle frazioni fibrose, anche per l'azione del *Saccharomyces*. Secondo Jullian (2005) questo lievito contribuisce a migliorare la digeribilità totale delle frazioni fibrose, ma la sua capacità di migliorare la digestione della SS dipende dal rapporto foraggio/concentrato. Secondo lo stesso autore, infatti, diete basate essenzialmente sul foraggio (0,95:0,05) potrebbero incidere sulla capacità di questo lievito nell'influenzare la digeribilità della SS, in quanto questo tipo di razioni non apportano quantità di amido sufficienti all'attività dei microrganismi.

Nel nostro studio si è verificato un aumento statisticamente significativo della digeribilità della SS: si può verosimilmente ipotizzare che l'attività dei probiotici, e del lievito in particolare, sia supportata da quantità adeguate di prebiotici, che costituiscono un substrato prontamente fermentescibile per i microrganismi. L'utilizzo di diete a base di solo foraggio di prato polifita di scarsa qualità contenenti fibra scarsamente fermentescibile nel cavallo favorisce inoltre l'esfoliazione della mucosa intestinale, mentre le diete che favoriscono una fermentazione moderata, come quelle addizionate di FOS, la proteggono (Mussa, 1997).

Le differenze indotte dal trattamento sui parametri della digeribilità inducono a pensare che un simbiotico di nuova concezione costituito da prebiotici, probiotici e estratti d'erbe sia utile in tutte le "border conditions" che spesso sono determinate dal management di scuderia. Cambi bruschi di alimentazione, utilizzo di alimenti di scarsa qualità, diete con sproorzionati rapporti foraggio/concentrato, stress e competizioni possono diminuire l'efficienza del mezzo digestivo. In queste condizioni l'utilizzo di un simbiotico può contribuire al mantenimento della normale fisiologia digestiva e migliorare la digeribilità dei principi nutritivi.

In particolare, la più volte riscontrata scarsa qualità media dei foraggi reperibili nelle nostre scuderie e l'aumento delle condizioni favorevoli al dismicrobismo intestinale

(stress, incremento del lavoro, invecchiamento) conferma l'utilità dell'uso di prodotti in grado di prevenire possibili problemi, in particolare quando la percentuale di foraggi nella dieta è molto elevata.

## Parole chiave

*Cavallo, digeribilità apparente, simbiotico, prebiotico, probiotico, estratti d'erbe.*

## Key words

*Horse, apparent digestibility, symbiotic, prebiotic, probiotics, herbal extract.*

## Bibliografia

1. AOAC (1990) Official Methods of Analysis of the AOAC. AOAC, Arlington, VA.
2. Berg EL, Fu CJ, Porter JH, Kerley MS (2005) Fructooligosaccharide supplementation in the yearling horse: effects on fecal pH, microbial content, and volatile fatty acid concentrations. *J. Anim. Sci.* 83, 1549-1553.
3. Bergero D (1996) Determinazione indiretta del peso del cavallo da sella. *Obiettivi e Documenti Veterinari* 17, 81-85.
4. Bergero D (1998) Ruolo dei fruttoligosaccaridi nel cavallo. *Riv. Zoot. Vet.* 26, 31-37.
5. Gibson GR, Probert HM, Van Loo J, Rastall RA, Roberfroid MB (2004) Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* 17, 259-275.
6. Hill J, Tracey, S V, Willis, M, Jones, L, Ellis, AD (2001) Yeast culture in equine nutrition and physiology. Science and technology in the feed industry. *Proceedings of Alltech's 17th Annual Symposium: a time for answers*, 97-114.
7. Julliard V, de Fombelle A, Drogoul C, Jacotot E (2001) Feeding and microbial disorders in horses: Part 3 - Effects of three hay:grain ratios on microbial profile and activities. *J. Eq. Veter. Sci.* 21, 543-546.
8. Julliard V (2005) Impact of nutrition on the microflora of the gastrointestinal tract in the horse. In *the Applied equine nutrition (ENUCO)*, 169 pp.
9. Martin-Rosset W, Andrieu J, Vermorel M, Dulphy JP (1984) Valeur nutritive des aliments pour le cheval. In: Jarrige, R., Martin-Rosset, W. (Eds.) *Le Cheval. Reproduction, Sélection, Alimentation, Exploitation*, Inra, Paris, pp. 209-238.
10. Mussa PP (1997) Gli oligosaccaridi nell'alimentazione dei carnivori domestici. *Riv. Zoot. Vet.* 25, 39-45.
11. Ohta A, Ohtsuki M, Uehara M, Hosono A, Hirayama M, Adachi T, Hara H (1998) Dietary fructooligosaccharides prevent postgastrectomy anemia and osteopenia in rats. *J. Nutr.* 128 (3), 485-490.
12. Oli MW, Petschow BW, Buddington RK (1998) Evaluation of fructooligosaccharide supplementation of oral electrolyte solutions for treatment of diarrhea: recovery of the intestinal bacteria. *Dig. Dis. Sci.* 43(1), 138-147.
13. Roberfroid MB (1997) Health benefits of non-digestible oligosaccharides. *Adv. Exp. Med. Biol.* 427, 211-219.
14. Tuohy KM, Kolida S, Gibson GR (2004) Use of probiotics and prebiotics for improving gut health. *Agro Food Industry Hi-Tech* 15, 33-35.
15. Van Keulen J, Young BA (1977) Evaluation of acid-insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. *J. Anim. Sci.* 44, 282-287.
16. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583-3597.
17. Wolter R (1994) *Alimentation du cheval*. Ed. France Agricole, Paris.