

## Effect of the enzymatic hydrolyzate of *Saccharomyces cerevisiae* yeast on the kinetics of ruminal degradation of nutrients of *Cenchrus purpureus* cv. OM - 22 (*Cenchrus purpureus* x *Cenchrus americanus*) forage

### Efecto del hidrolizado enzimático de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la cinética de degradación ruminal de nutrientes del forraje de *Cenchrus purpureus* vc. OM – 22 (*Cenchrus purpureus* x *Cenchrus americanus*)

Daiky Valenciaga Gutiérrez, José Raúl López Álvarez, Álvaro Delgado García, Juana Luz Galindo Blanco, Magaly Herrera Villafranca and Fidel Monteagudo

*Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de Las Lajas, Mayabeque, Cuba.*

*Email: dvalenciaga@ica.co.cu*

In order to determine the effect of the enzymatic hydrolyzate of *Saccharomyces cerevisiae* yeast on the kinetics of rumen degradation of nutrients of *Cenchrus purpureus* cv. OM - 22 from the forage of, four Holstein cows were used, cannulated in rumen which intake fresh forage at will and commercial concentrate, offered once a day, according to a 4 x 4 Latin square design. The treatments were: Control (forage + 2 kg commercial concentrate) and treatments 2, 3 and 4 (forage + 2 kg commercial concentrate + 50 mL, 100 mL or 150 mL of hydrolyzate.kg of concentrate.day<sup>-1</sup>, respectively). The best use of the forage was obtained in the treatment with 150 mL of hydrolyzate, with the maximum degradation (P<0.0001) of the DM, OM, NDF and ADF in all incubation time. However, after 48 hours it did not differ from the treatment with 100 mL of hydrolyzate. There was a tendency to increase fraction B, the potential degradability and the degradation rate of nutrients, with the increase in the amount of hydrolyzate in the diet. An increase in the ruminal Effective Degradability was observed, which fluctuated between 41.44 and 56.44 % for the DM of the evaluated forage, between 38.87 and 56.70 % for the OM, 33.55 and 48.92 % for the NDF and 25.79 and 44.44 % for the ADF. It is concluded that the addition of the hydrolyzate had a positive effect on the kinetics of ruminal degradation of the forage. It is recommended the use of 100 mL level of enzymatic hydrolyzate. kg of concentrate. day<sup>-1</sup> in ruminants which consume diets with high fiber content.

**Key words:** *zootechnical additive, degradation rate, ruminal degradability, fibrous diet*

The advance in the knowledge of ruminal microbiology and the potential of modification of it is of transcendancy in the obtaining of healthy products, safe, environmentally acceptable and that simultaneously contemplate the productivity and profitability of the ruminants production systems (Hassan and Mohammed 2016 and Rossow *et al.* 2018). Zootechnical additives are one of the groups of greatest interest from this point of view (Patra 2012).

Among the zootechnical additives are yeasts, whose use in ruminant diets has a long history. However, in recent years several researches have been dedicated to clarifying how low levels of yeasts supplemented

Con el objetivo de determinar el efecto del hidrolizado enzimático de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la cinética de degradación ruminal de nutrientes del forraje de *Cenchrus purpureus* vc. OM – 22, se utilizaron cuatro vacas Holstein, canuladas en rumen que consumieron forraje fresco a voluntad y concentrado comercial, según tratamiento, ofrecidos una vez al día, según diseño cuadrado latino 4 x 4. Los tratamientos fueron: Control (forraje + 2 kg concentrado comercial) y tratamientos 2, 3 y 4 (forraje + 2 kg concentrado comercial + 50 mL, 100 mL o 150 mL de hidrolizado. kg de concentrado.día<sup>-1</sup>, respectivamente). El mayor aprovechamiento del forraje se obtuvo en el tratamiento con 150 mL de hidrolizado, con la degradación máxima (P<0.0001) de la MS, MO, FDN y FDA en todos los horarios de incubación. Sin embargo, a partir de las 48 horas no difirió del tratamiento con 100 mL de hidrolizado. Hubo tendencia al incremento de la fracción B, la degradabilidad potencial y la tasa de degradación de los nutrientes, con el aumento de la cantidad de hidrolizado en la dieta. Se observó incremento de la degradabilidad efectiva ruminal, que fluctuó entre 41.44 y 56.44 % para la MS del forraje evaluado, entre 38.87 y 56.70% para la MO, 33.55 y 48.92 % para la FDN y 25.79 y 44.44 % para la FDA. Se concluye que la adición del hidrolizado tuvo efecto positivo en la cinética de degradación ruminal del forraje. Se recomienda la utilización de 100 mL de hidrolizado enzimático. kg de concentrado. día<sup>-1</sup> en rumiantes que consumen dietas con alto contenido de fibra.

**Palabras clave:** *aditivo zootécnico, tasa de degradación, degradabilidad ruminal, dieta fibrosa*

El avance en los conocimientos de la microbiología ruminal y el potencial de modificación de la misma, resulta de transcendencia en la obtención de productos sanos, seguros, ambientalmente aceptables y que simultáneamente contemplen la productividad y rentabilidad de los sistemas de producción de rumiantes (Hassan y Mohammed 2016, Rossow *et al.* 2018). Los aditivos zootécnicos son uno de los grupos que suscita mayor interés desde este punto de vista (Patra 2012).

Dentro de los aditivos zootécnicos se encuentran las levaduras, cuya utilización en dietas de rumiantes tiene una larga historia. Sin embargo, en los últimos años se han dedicado varias investigaciones a dilucidar cómo

in the diet can stimulate the ruminants productivity (Chaucheyras-Durand *et al.* 2008, Bayat *et al.* 2015, Öztürk *et al.* 2015 and Zhu *et al.* 2017).

Similarly, researches has developed with yeast hydrolysates, residues that are obtained in the industry and which can constitute a highly polluting element of the environment, which could be avoided by using it as a supplement for animal feeding. In Cuba, Pérez *et al.* (2006) described the methodology for obtaining an enzymatic hydrolyzate of *Saccharomyces cerevisiae* yeast that showed probiotic effects on monogastric animals, with excellent results in immunological, productive and health indicators.

However, there are few studies related to the use of hydrolyzate in ruminant species. Galindo *et al.* (2010) showed that this product exerts an activating effect on the populations of total viable and cellulolytic bacteria of the rumen, under *in vitro* conditions. On the other hand, Díaz *et al.* (2017) with their use obtained modification of the *in vitro* fermentative pattern towards a more efficient fermentation, due to the increase of the proportion of propionic acid and the reduction of the methane: SCFA ratio.

These antecedents show the possibility that the enzymatic hydrolyzate of *S. cerevisiae* yeast increases ruminal degradability in animals that intake fibrous diets. However, studies of this nature have not been carried out yet. That is why the objective of this study was to determine the effect of the enzymatic hydrolyzate of *S. cerevisiae* yeast on the kinetics of *in situ* ruminal degradation of nutrients from the forage of *Cenchrus purpureus* cv. OM - 22.

## Materials and Methods

**Experimental procedure.** The evaluated material was *Cenchrus purpureus* cv. OM - 22 (*Cenchrus purpureus* x *Cenchrus americanus*), previously established in a forage area of the Institute of Animal Science, located in San José de las Lajas municipality, Mayabeque province, in Ferric Red-eutric soil, of rapid desiccation, clayey and deep on limestones (Hernández *et al.* 2015), without fertilization or irrigation. A total of 200 samples of 90 days of regrowth were taken, according to a random unrestricted sampling.

Part of the collected material, previously homogenized and dried for 48 hours in a forced air oven at 60 °C, was milled at 1 mm for the determination of the chemical composition and the other part, destined to the studies of *in situ* ruminal degradability, was milled at 2.5 mm in an Arthur H. Thomas mill, Wiley, USA, model 4.

The chemical composition (dry basis) of the evaluated forage showed values of 9.20 % of CP, 91.99 % of OM, 78.07 % of NDF, 44.50 % of ADF, 3 1.50 % of cellulose and 7.25 % of lignin.

A total of four Holstein cows of 480 ± 10 kg of live weight were used, cannulated in rumen and housed in

bajos niveles de levaduras suplementados en la dieta pueden estimular la productividad de los rumiantes (Chaucheyras-Durand *et al.* 2008, Bayat *et al.* 2015, Öztürk *et al.* 2015 y Zhu *et al.* 2017).

De igual forma, han surgido investigaciones con hidrolizados de levaduras, residuos que se obtienen en la industria y que pueden constituir un elemento altamente contaminante del medio ambiente, lo que podría evitarse mediante su utilización como suplemento para la alimentación animal. En Cuba, Pérez *et al.* (2006) describieron la metodología para la obtención de un hidrolizado enzimático de levadura *Saccharomyces cerevisiae* que mostró efectos probióticos en animales monogástricos, con excelentes resultados en indicadores inmunológicos, productivos y de salud.

Sin embargo, son escasos los estudios relacionados con la utilización del hidrolizado en especies rumiantes. Galindo *et al.* (2010) demostraron que este producto ejerce efecto activador de las poblaciones de bacterias viables totales y celulolíticas del rumen, en condiciones *in vitro*. Por su parte, Díaz *et al.* (2017) con su utilización obtuvieron modificación del patrón fermentativo *in vitro* hacia la fermentación más eficiente, debido al aumento de la proporción de ácido propiónico y la reducción de la relación metano: AGCC.

Estos antecedentes indican la posibilidad de que el hidrolizado enzimático de levadura *S. cerevisiae* incremente la degradabilidad ruminal en animales que consumen dietas fibrosas. Sin embargo, estudios de esta índole no se han realizado aún. Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del hidrolizado enzimático de levadura *S. cerevisiae* en la cinética de degradación ruminal *in situ* de nutrientes del forraje de *Cenchrus purpureus* vc. OM - 22.

## Materiales y Métodos

**Procedimiento experimental.** El material evaluado fue *Cenchrus purpureus* vc. OM - 22 (*Cenchrus purpureus* x *Cenchrus americanus*), previamente establecido en un área forrajera del Instituto de Ciencia Animal, situado en el municipio de San José de las Lajas, provincia Mayabeque, en suelo Ferrálico Rojo Éutrico, de rápida desecación, arcilloso y profundo sobre calizas (Hernández *et al.* 2015), sin fertilización ni riego. Se tomaron 200 muestras de 90 días de rebrote, según muestreo irrestricto aleatorio.

Parte del material colectado, previamente homogenizado y secado durante 48 h en estufa de aire forzado a 60 °C, se molió a 1 mm para la determinación de la composición química y, la otra parte, destinada a los estudios de degradabilidad ruminal *in situ*, se molió a 2.5 mm en un molino marca Arthur H. Thomas, Wiley, USA, modelo 4.

La composición química (base seca) del forraje evaluado mostró valores de 9.20 % de PB, 91.99 % de MO, 78.07 % de FDN, 44.50 % de FDA, 31.50 % de celulosa y 7.25 % de lignina.

individual cubicles with free access to drinking water and food, according to a 4 × 4 Latin square design. The animals intake fresh forage of *C. purpureus* cv.OM - 22 *ad libitum* and commercial concentrate for dairy cows, according to treatment, offered once a day (8:00 am).

The treatments were the following:

- Treatment 1 (Control). Forage + 2 kg commercial concentrate.day<sup>-1</sup>

- Treatment 2. Forage + 2 kg comercial concentrate + 50 mL of enzymatic hydrolyzate of *Saccharomyces cerevisiae* yeats .kg de concentrate.day<sup>-1</sup>

- Treatment 3. Forage + 2 kg commercial concentrate + 100 mL of enzymatic hydrolyzate of *Saccharomyces cerevisiae* yeats .kg of concentrate .day<sup>-1</sup>

- Treatment 4. Forage + 2 kg commercial concentrate + 150 mL of enzymatic hydrolyzate of *Saccharomyces cerevisiae* yeats, kg of concentrate.day<sup>-1</sup>

The chemical composition of the offered food is shown in table 1.

Se utilizaron cuatro vacas Holstein de 480 ± 10 kg de peso vivo, canuladas en rumen y alojadas en cubículos individuales con libre acceso a agua potable y los alimentos, según diseño cuadrado latino 4 x 4. Los animales consumieron forraje fresco de *C. purpureus* vc.OM - 22 a voluntad y concentrado comercial para vacas lecheras, según tratamiento, ofrecidos una vez al día (8:00 am).

Los tratamientos fueron los siguientes:

- Tratamiento 1 (Control). Forraje + 2 kg concentrado comercial.día<sup>-1</sup>

- Tratamiento 2. Forraje + 2 kg concentrado comercial + 50 mL de hidrolizado enzimático de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, kg de concentrado.día<sup>-1</sup>

- Tratamiento 3. Forraje + 2 kg concentrado comercial + 100 mL de hidrolizado enzimático de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, kg de concentrado.día<sup>-1</sup>

- Tratamiento 4. Forraje + 2 kg concentrado comercial + 150 mL de hidrolizado enzimático de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, kg de concentrado.día<sup>-1</sup>

Table 1. Chemical composition of the food offered to animals (% DM). (n=6)

Indicators	<i>Cenchrus purpureus</i> cv. OM - 22 forage	Commercial concentrate
CP	10.04 ± 0.20	17.03 ± 1.33
OM	92.40 ± 0.72	92.62± 0.49
NDF	79.99 ± 0.48	31.09 ± 9.74
ADF	48.80 ± 1.14	11.99 ± 6.63
Lignin	7.50 ± 0.56	-
Ash	7.60 ± 0.72	9.38 ± 0.49

The mixture of the commercial concentrate and the enzymatic hydrolyzate of *S. cerevisiae* yeast were daily prepared.

The yeast hydrolyzate used was obtained according to the Pérez *et al.* (2006) methodology from the *S. cerevisiae* yeast cream from the alcohol distillery plant belonging to the Complejo Agroindustrial "Jesús Rabí", Calimete, Matanzas province. The hydrolyzate showed DM and OM values of 19.39 and 82.17 %, respectively. The Crude and True Protein was 40.28 and 38.58 % of the DM, respectively. The ash values were in the range of 12.3 %, while the concentration of reducing sugars and total carbohydrates was 7.93 and 6.09 %, respectively.

The experimental periods consisted of 14 adaptation days to the diet and 5 sampling days.

**Chemical composition.** The content of dry matter (DM), ash, organic matter (OM) and crude protein (CP) according to the techniques described by AOAC (2016) was determined in the samples of the offered food and the evaluated forage in each period. The content of neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF), celluloses, hemicelluloses and lignin was determined by the Goering and Van Soest (1970) method.

La composición química de los alimentos ofertados se muestra en la tabla 1.

La mezcla del concentrado comercial y el hidrolizado enzimático de levaduras *S. cerevisiae* se preparó diariamente.

El hidrolizado de levadura utilizado se obtuvo según la metodología patentada por Pérez *et al.* (2006) a partir de la crema de levadura *S. cerevisiae* de la planta de destilería de alcohol perteneciente al Complejo Agroindustrial "Jesús Rabí" de Calimete, provincia de Matanzas. El hidrolizado presentó valores de MS y MO de 19.39 y 82.17 %, respectivamente. La Proteína Bruta y Verdadera fue de 40.28 y 38.58 % de la MS, respectivamente. Los valores de cenizas estuvieron en el rango de 12.3 %, mientras que la concentración de azúcares reductores y carbohidratos totales fue de 7.93 y 6.09 %, respectivamente.

Los períodos experimentales consistieron en 14 días de adaptación a la dieta y 5 días de muestreos.

**Composición química.** A las muestras de los alimentos ofertados y del forraje evaluado en cada período se le determinó el contenido de materia seca (MS), cenizas, materia orgánica (MO) y proteína bruta (PB) de acuerdo con las técnicas descritas por AOAC (2016). El contenido de fibra detergente neutro (FND) y fibra ácido detergente (FAD), celulosas, hemicelulosas y lignina se determinó

*In situ* ruminal degradability. The determination of the *in situ* ruminal degradability of the DM, OM, NDF and ADF of *C. purpureus* cv. OM-22 was performed according to the nylon bag or *in situ* procedure described by Mehrez and Ørskov (1977).

The bags containing the forage to be evaluated were placed in 25 x 35 cm mesh bags with plastic zipper and were introduced into the ventral compartment of the rumen of the cannulated animals, in reverse order of their incubation time at 12, 24, 48, 72 and 96 h and then were simultaneously removed at 96 hours. Two unincubated bags were left to determine the rapidly soluble fraction (A), which was obtained by incubating the sample in a water bath at 39°C for 30 minutes. After being extracted from the rumen, we proceeded as indicated by Valenciaga *et al.* (2018) to determine the DM, OM, NDF and ADF degraded in the rumen.

*Estimation of degradation.* To determine the degradative characteristics, the exponential model proposed by Ørskov and McDonald (1979) was used, assuming that the degradation curves of the DM and the OM over time follow a first order kinetic process that is described in the following way:

$$P = A \text{ for } t_0 = 0$$

$$P = a + b(1 - e^{-ct}) \quad t > t_0$$

And the degradation curves of the NDF and ADF are described according to Dhanoa (1988) by the formula:

$$P = A \text{ for } t = t_0$$

$$P = a + b(1 - e^{-c(t-L)}) \quad t > t_0$$

Where:

- P: Ruminal degradation. It is the ruminal degradation of the evaluated indicator in the time "t" of permanence in the rumen.

- a: Intercept

- b: Fraction that degrades in time t.

- c: Degradation rate of the fraction "b".

- t: Incubation time.

- L: Latency time or "lag" (hours). Time spent by the rumen microorganisms to colonize the cell walls of the forages and adhere to them.

- A: Easily soluble fraction.

In order to determine the ruminal Effective Degradability (ED) the McDonald (1981) model was used

$$ED = A + \left( \frac{B \cdot c}{c+k} \right)$$

Where:

- k: Fractional rate of ruminal passage. It assumes k value (0.044 fraction/h) (NRC 2001)

- B: Insoluble fraction but potentially degradable. (Ørskov 2002)

- c: Degradation rate of fraction B.

*Statistical analysis.* To determine the effect of enzymatic hydrolyzate of *S. cerevisiae* yeast in the

por el método de Goering y Van Soest (1970).

*Degradabilidad ruminal in situ.* La determinación de la degradabilidad ruminal *in situ* de la MS, MO, FDN y FDA de *C. purpureus* vc. OM – 22 se realizó según el procedimiento de las bolsas de nylon o *in situ* descrito por Mehrez y Ørskov (1977).

Las bolsas que contenían el forraje a evaluar se colocaron en sacos de malla de 25 x 35 cm con cierre plástico y se introdujeron en el compartimento ventral del rumen de los animales canulados, en orden inverso a su tiempo de incubación a las 12, 24, 48, 72 y 96 h y luego se retiraron de forma simultánea a las 96 horas. Se dejaron dos bolsas sin incubar para determinar la fracción rápidamente soluble (A), que se obtuvo mediante la incubación de la muestra en un baño de agua a 39 °C durante 30 minutos. Después de extraídas del rumen se procedió según lo indicado por Valenciaga *et al.* (2018) para determinar la MS, MO, FDN y FDA degradada en el rumen.

*Estimación de la degradación.* Para determinar características degradativas se utilizó el modelo exponencial propuesto por Ørskov y McDonald (1979), asumiendo que las curvas de degradación de la MS y de la MO en el tiempo, siguen un proceso cinético de primer orden que se describe de la forma:

$$P = A \text{ para } t_0 = 0$$

$$P = a + b(1 - e^{-ct}) \quad t > t_0$$

Las curvas de degradación de la FDN y FDA se describen según Dhanoa (1988) por la fórmula:

$$P = A \text{ para } t = t_0$$

$$P = a + b(1 - e^{-c(t-L)}) \quad t > t_0$$

Donde:

- P: Degradación ruminal. Es la degradación ruminal del indicador evaluado en el tiempo "t" de permanencia en el rumen.

- a: Intercepto

- b: Fracción que se degrada en el tiempo t.

- c: Tasa de degradación de la fracción "b".

- t: Tiempo de incubación.

- L: Tiempo de latencia o "lag" (horas). Tiempo que emplean los microorganismos del rumen para colonizar las paredes celulares de los forrajes y adherirse a ellas.

- A: Fracción rápidamente soluble.

Para la determinación de la Degradabilidad Efectiva ruminal (DE) se empleó el modelo de McDonald (1981)

$$ED = A + \left( \frac{B \cdot c}{c+k} \right)$$

Donde:

- k: Tasa fraccional de pasaje ruminal. Se asume valor de k (0.044 fracción/h) (NRC 2001)

- B: Fracción insoluble pero potencialmente degradable. (Ørskov 2002)

- c: Tasa de degradación de la fracción B.

*Análisis estadístico.* Para determinar el efecto del hidrolizado enzimático de levadura *S. cerevisiae* en

*in situ* ruminal degradation of the evaluated forage nutrients, analysis of variance according to 4x4 Latin Square Design was performed. Statistical analyzes were performed for the comparison between the means of each treatment, for each incubation time, using the statistical processor InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2011) and, when necessary, Duncan (1955) test was used for the comparison of means. For the mathematical estimation of the ruminal degradation parameters of the DM, OM, NDF and ADF of the evaluated forage, the NEWAY EXCEL program was used according to Chen (2000).

### Results and Discussion

The lowest DM rumen degradability was verified in each incubation time evaluated, for the control treatment ( $P < 0.0001$ ) (table 2), followed by the treatment of 50 mL of yeast hydrolyzate.kg of concentrate.day<sup>-1</sup>. In the treatment with 150 mL of yeast hydrolyzate showed the highest ruminal degradability values ( $P < 0.0001$ ), at each incubation time. However, only differed ( $P < 0.0001$ ), from the treatment of 100 mL of hydrolyzate in the first incubation times (12 and 24 hours), after 48 hours the degradability values were similar in both treatments.

la degradación ruminal *in situ* de los nutrientes del forraje evaluado se realizó análisis de varianza según diseño Cuadrado Latino 4x4. Los análisis estadísticos se realizaron para la comparación entre las medias de cada tratamiento, para cada horario de incubación, utilizando el procesador estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2011) y en los casos necesarios, se utilizó la dócima de Duncan (1955) para la comparación de las medias. Para la estimación matemática de los parámetros de degradación ruminal de la MS, MO, FDN y FDA del forraje evaluado, se empleó el programa NEWAY EXCEL según Chen (2000).

### Resultados y Discusión

Se verificó la menor degradabilidad ruminal de la MS en cada horario de incubación evaluado, para el tratamiento control ( $P < 0.0001$ ) (tabla 2), seguido por el tratamiento de 50 mL de hidrolizado de levadura.kg de concentrado.día<sup>-1</sup>. En el tratamiento con 150 mL de hidrolizado de levadura mostró los mayores valores de degradabilidad ruminal ( $P < 0.0001$ ), en cada horario de incubación. Sin embargo, solamente difirió ( $P < 0.0001$ ), del tratamiento de 100 mL de hidrolizado en los primeros horarios de incubación (12 y 24 horas), a partir de las 48 horas los valores de degradabilidad fueron similares en ambos tratamientos.

El mayor aprovechamiento del forraje evaluado se obtuvo en los tratamientos con 100 y 150 mL

Table 2. Effect of the enzymatic hydrolyzate of *Saccharomyces cerevisiae* yeast on *in situ* ruminal degradation of the DM (%) of *Cenchrus purpureus* vc. OM - 22 forage.

Treatments	mL of enzymatic hydrolyzate of <i>S. cerevisiae</i> yeast/kg concentrate.day <sup>-1</sup>				SE(±) Signif.
	0	50mL	100mL	150mL	
Hours					
12	24.09 <sup>d</sup>	35.11 <sup>c</sup>	42.88 <sup>b</sup>	44.61 <sup>a</sup>	0.46 $P < 0.0001$
24	38.47 <sup>d</sup>	48.33 <sup>c</sup>	60.95 <sup>b</sup>	64.43 <sup>a</sup>	0.79 $P < 0.0001$
48	57.81 <sup>c</sup>	69.31 <sup>b</sup>	80.91 <sup>a</sup>	81.69 <sup>a</sup>	0.44 $P < 0.0001$
72	66.37 <sup>c</sup>	74.30 <sup>b</sup>	82.44 <sup>a</sup>	83.48 <sup>a</sup>	0.45 $P < 0.0001$
96	67.73 <sup>c</sup>	76.23 <sup>b</sup>	84.26 <sup>a</sup>	86.00 <sup>a</sup>	0.62 $P < 0.0001$

<sup>Abcd</sup>Values with different letter per dow differ at  $P < 0.05$  (Duncan 1955)

The best use of the evaluated forage was obtained in the treatments with 100 and 150 mL of yeast hydrolyzate, where the maximum DM degradation at 96 hours was 84.26 and 86.0 %, respectively, compared to the 50 mL treatment which recorded value of 76.23 % and the control treatment that only increase at 96 hours to 67.63 % of ruminal degradation of the DM ( $P < 0.0001$ ).

On the other hand, the lower ruminal degradability of OM was verified in each incubation time in the control treatment (table 3)

The treatments with 100 and 150 mL of yeast hydrolyzate showed the highest values of the OM degradation in all incubation times, being similar

de hidrolizado de levadura, donde la degradación máxima de la MS a las 96 horas fue de 84.26 y 86.0 %, respectivamente en comparación con el tratamiento de 50 mL que registró valor de 76.23 % y el tratamiento control que solo ascendió a las 96 horas a 67.63 % de degradación ruminal de la MS ( $P < 0.0001$ ).

Por su parte, se verificó la menor degradabilidad ruminal de la MO en cada horario de incubación para el tratamiento control (Tabla 3)

Los tratamientos con 100 y 150 mL de hidrolizado de levadura mostraron los valores más altos de degradación de la MO en todos los horarios de incubación, siendo estos similares en ambos tratamientos y superiores ( $P < 0.05$ ), al resto.

Los resultados obtenidos coinciden con los alcanzados

Table 3. Effect of enzymatic hydrolyzate of *Saccharomyces cerevisiae* yeast on the *in situ* ruminal degradation of OM (%) of *Cenchrus purpureus* cv. OM - 22 forage.

Treatments Hours	mL of enzymatic hydrolyzate of <i>S. cerevisiae</i> yeast.kg concentrate.day <sup>-1</sup>				SE(±) Signif.
	0	50mL	100mL	150mL	
12	22.50 <sup>c</sup>	33.92 <sup>b</sup>	44.79 <sup>a</sup>	47.96 <sup>a</sup>	2.74 P=0.0022
24	37.07 <sup>c</sup>	47.40 <sup>b</sup>	62.43 <sup>a</sup>	66.52 <sup>a</sup>	2.08 P=0.0002
48	54.01 <sup>c</sup>	66.59 <sup>b</sup>	79.66 <sup>a</sup>	81.96 <sup>a</sup>	2.03 P=0.0002
72	59.57 <sup>c</sup>	70.60 <sup>b</sup>	81.72 <sup>a</sup>	83.33 <sup>a</sup>	2.51 P=0.0017
96	60.15 <sup>c</sup>	71.38 <sup>b</sup>	82.34 <sup>a</sup>	84.23 <sup>a</sup>	2.45 P=0.0015

<sup>Abcd</sup>Values with different letter per dow differ at P < 0.05 (Duncan 1955)

in both treatments and higher (P < 0.05), to the rest.

The obtained results coincide with those achieved by other authors in researches of *in vitro* and *in situ* ruminal degradation, when evaluating live strains of *Saccharomyces cerevisiae* as an additive in fibrous diets for ruminants.

Sauvant *et al.* (2004) observed increase of the *in situ* ruminal degradability of DM and OM in Holstein cows that received culture of live *S. cerevisiae* yeast in their diet, with respect to the control group. On the other hand, Fadel El-Seed *et al.* (2004) showed that supplementation with cultures of this yeast in Nubian kids breed increased the *in situ* degradability of OM in their diet by 12.1 % with respect to the control diet. While El-Waziry and Ibrahim (2007) found increases in the ruminal degradation of the DM hay of *Trifolium alexandrinum* with the addition of the yeast in fattening lamb diets.

The highest percentage in the ruminal degradability of the NDF (P < 0.0001) of the evaluated forage (table 4), in each incubation time, was obtained with the treatment of 150 mL of yeast hydrolyzate. This did not differ from the treatment with 100 mL of yeast hydrolyzate at 48, 72 and 96 incubation hours.

On the other hand, the lower degradability of the ADF was verified in each incubation time for the control treatment (P < 0.0001) (table 5).

por otros autores en investigaciones de degradación ruminal *in vitro* e *in situ*, al evaluar cepas vivas de *Saccharomyces cerevisiae* como aditivo en dietas fibrosas para rumiantes.

Sauvant *et al.* (2004) observaron incremento de la degradabilidad ruminal *in situ* de la MS y MO en vacas Holstein que recibieron cultivo de levaduras de *S. cerevisiae* vivas en su dieta, con respecto al grupo control. Por su parte, Fadel El-Seed *et al.* (2004) indicaron que la suplementación con cultivos de esta levadura en cabritos de la raza Nubia incrementaron la degradabilidad *in situ* de la MO en su dieta en 12.1 % respecto a la dieta control. En tanto que El-Waziry y Ibrahim (2007) encontraron incrementos en la degradación ruminal de la MS de heno de *Trifolium alexandrinum* con la adición de la levadura en dietas de corderos de ceba.

El mayor porcentaje en la degradabilidad ruminal de la FDN (P < 0.0001) del forraje evaluado (tabla 4), en cada horario de incubación, se obtuvo con el tratamiento de 150 mL de hidrolizado de levadura. Este no difirió del tratamiento con 100 mL de hidrolizado de levadura a las 48, 72 y 96 horas de incubación.

Por su parte, se verificó la menor degradabilidad de la FDA en cada horario de incubación para el tratamiento control (P < 0.0001) (tabla 5).

La degradación ruminal *in situ* mostró mayor aprovechamiento de la FDN y FDA del forraje evaluado, con el tratamiento de 150 mL de hidrolizado de levadura.kg de concentrado<sup>-1</sup> en todos los horarios de incubación, ya que con este tratamiento se obtuvieron los valores más altos de degradación (P < 0.0001).

Table 4: Effect of the enzymatic hydrolyzate of *Saccharomyces cerevisiae* yeast on the *in situ* ruminal degradation of the NDF (%) of *Cenchrus purpureus* cv. OM - 22 forage.

Treatments Hours	mL of enzymatic hydrolyzate of <i>S. cerevisiae</i> yeast.kg concentrate.day <sup>-1</sup>				SE(±) Signif.
	0	50mL	100mL	150mL	
12	24.66 <sup>d</sup>	35.09 <sup>c</sup>	42.43 <sup>b</sup>	43.81 <sup>a</sup>	0.25 P<0.0001
24	39.58 <sup>d</sup>	47.78 <sup>c</sup>	61.18 <sup>b</sup>	64.00 <sup>a</sup>	0.51 P<0.0001
48	58.35 <sup>c</sup>	69.15 <sup>b</sup>	80.50 <sup>a</sup>	82.00 <sup>a</sup>	0.52 P<0.0001
72	64.98 <sup>c</sup>	74.44 <sup>b</sup>	82.92 <sup>a</sup>	83.81 <sup>a</sup>	0.28 P<0.0001
96	65.53 <sup>c</sup>	75.34 <sup>b</sup>	83.44 <sup>a</sup>	84.29 <sup>a</sup>	0.43 P<0.0001

<sup>Abcd</sup>Values with different letter per dow differ at P < 0.05 (Duncan 1955)

Table 5: Effect of the enzymatic hydrolyzate of *Saccharomyces cerevisiae* yeast on the *in situ* ruminal degradation of the ADF (%) of *Cenchrus purpureus* cv. OM - 22 forage.

Treatments	mL of enzymatic hydrolyzate of <i>S. cerevisiae</i> yeast.kg concentrate.day <sup>-1</sup>				SE(±) Signif.
	0	50mL	100mL	150mL	
Hours					
12	16.61 <sup>d</sup>	27.83 <sup>c</sup>	38.12 <sup>b</sup>	39.77 <sup>a</sup>	0.07 P<0.0001
24	32.13 <sup>d</sup>	42.02 <sup>c</sup>	54.11 <sup>b</sup>	56.28 <sup>a</sup>	0.34 P<0.0001
48	51.91 <sup>c</sup>	62.84 <sup>b</sup>	76.75 <sup>a</sup>	77.41 <sup>a</sup>	0.26 P<0.0001
72	57.88 <sup>c</sup>	69.43 <sup>b</sup>	79.53 <sup>a</sup>	80.61 <sup>a</sup>	0.33 P<0.0001
96	58.60 <sup>c</sup>	70.34 <sup>b</sup>	80.54 <sup>a</sup>	81.27 <sup>a</sup>	0.38 P<0.0001

<sup>Abcd</sup>Values with different letter per row differ at P < 0.05 (Duncan 1955)

The *in situ* ruminal degradation showed higher use of NDF and ADF of the evaluated forage, with the treatment of 150 mL of yeast hydrolyzate.kg concentrate<sup>-1</sup> in all incubation times, since with this treatment the highest degradation values were obtained (P < 0.0001). However, after 48 hours similar values were observed with the treatment of 100 mL of the supplement, being higher (P < 0.0001) than the rest of the treatments.

These results coincide with those obtained by Biricik and Türkmen (2001), who reported increases in the ruminal degradability of NDF and ADF, both *in vivo* and *in vitro*, in diets with different proportion of forage: concentrate and *S. cerevisiae* yeast. On the other hand, Kholif and Khorshed (2006) observed a positive effect of yeast supplementation on the ruminal degradation of NDF, ADF, cellulose and hemicellulose in buffaloes diets.

El-Waziry and Ibrahim (2007) found increases in the ruminal degradation of the NDF and ADF of *Trifolium alexandrinum* hay with the addition of *S. cerevisiae* yeast in fattening lambs diets, while Olmedo *et al.* (2015) showed increases in the *in situ* ruminal degradability of NDF in fibrous diets for sheep when was supplemented with strain *S. cerevisiae* yeast. Recently, Martínez *et al.* (2017) obtained improvements in the ruminal degradation of the NDF of different forages with the addition of yeasts in finished steer diets, by providing sufficient energy and protein, which was reflected in an increase in the concentration of SCFA.

The increase of the rumen degradability of the forage nutrients evaluated, with the increase of the amount of yeast enzymatic hydrolyzate added to the diet, could be related to what is stated in the scientific literature about the activating effect of the yeast strains on the populations of total viable bacteria and of cellulolytic bacteria, when these strains are used as additives in ruminants diets (Chiquette 2009, Herrera-Torres *et al.* 2014, Zhu *et al.* 2017 and Casas Rodríguez 2018).

Sin embargo, a partir de las 48 horas se observó valores similares con el tratamiento de 100 mL del suplemento, siendo superiores (P < 0.0001) al resto de los tratamientos.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Biricik y Türkmen (2001), quienes reportaron incrementos en la degradabilidad ruminal de la FDN y FDA, tanto *in vivo* como *in vitro*, en dietas con diferente proporción de forraje: concentrado y levadura *S. cerevisiae*. Por su parte, Kholif y Khorshed (2006) observaron efecto positivo de la suplementación con la levadura en la degradación ruminal de la FDN, FDA, celulosa y hemicelulosa en dietas para búfalos.

El-Waziry y Ibrahim (2007) encontraron incrementos en la degradación ruminal de la FDN y FDA de heno de *Trifolium alexandrinum* con la adición de levadura *S. cerevisiae* en dietas de corderos de ceba, en tanto que Olmedo *et al.* (2015) indicaron aumentos en la degradabilidad ruminal *in situ* de la FDN en dieta fibrosa para ovinos cuando se suplementó con cepa de levadura *S. cerevisiae*. Recientemente, Martínez *et al.* (2017) obtuvieron mejoras en la degradación ruminal de la FDN de diferentes forrajes con la adición de levaduras en dietas para novillos en finalización, al proporcionar suficiente energía y proteína, lo cual se reflejó en aumento en la concentración de AGCC.

El incremento de la degradabilidad ruminal de los nutrientes del forraje evaluado, con el aumento de la cantidad de hidrolizado enzimático de levadura adicionado a la dieta, pudiera estar relacionado con lo planteado en la literatura científica acerca del efecto activador de las cepas de levaduras en las poblaciones de bacterias viables totales y de bacterias celulolíticas, cuando estas cepas se emplean como aditivos en dietas para rumiantes (Chiquette 2009, Herrera-Torres *et al.* 2014, Zhu *et al.* 2017 y Casas Rodríguez 2018).

Múltiples han sido los mecanismos descritos por los cuales pequeñas dosis de levaduras adicionadas a la dieta pueden estimular el crecimiento microbiano en el rumen. Uno de ellos explica que el efecto activador tiene su origen en los factores de crecimiento

Many mechanisms have been described by which small doses of yeast added to the diet can stimulate microbial growth in the rumen. One of them explains that the activating effect has its origin in the growth factors that the yeasts have for the ruminal microorganisms, such as the B complex vitamins, the short chain fatty acids (SCFA) and the branched chain, the provitamins and micronutrients (Newbold *et al.* 1996, Dawson and Girard 1997, Fonty and Chaucheyras-Durand 2006).

Dawson and Girard (1997) suggested that the stimulation of microbial growth may be associated with the presence of two growth factors located in the different cellular fractions of the yeast, one of them thermolabile of lipid origin and the other thermostable with a possible peptide origin. Subsequently, Rossi *et al.* (2004) isolated from *S. cerevisiae* two peptide fractions rich in lysine and histidine, which were effective in stimulating the growth of ruminal bacteria *Megasphaera elsdenii*.

On the other hand, Chaucheyras-Durand *et al.* (2008) showed the effectiveness of yeasts to influence on the growth and enzymatic activity of fiber-degrading microorganisms in the rumen and reported the *in vitro* stimulation of the fungus *Neocallimastix frontalis*, by the thiamine supplied by yeasts, which is a vitamin required by the rumen fungi for zoosporogenesis. In addition, these authors showed that yeasts stimulate the growth and enzymatic activity of glycosidases and hydrolases enzymes in bacteria responsible for the digestion of fiber such as *Fibrobacter succinogens*, *Ruminococcus spp.* and *Butyrivibrio fibrosolven*, for the supply of nutrients and vitamins they make for this fibrolytic population.

In general, few studies have analyzed the effect of yeast hydrolysates on ruminant animals. The specific mechanisms of action of these have not been clearly defined. Galindo *et al.* (2010) when evaluating the effect of two levels of enzymatic hydrolyzate of the *S. cerevisiae* yeast on the ruminal microbial population of animals that intake *C. purpureum* cv. Cuba CT-115 observed an increase in the populations of total viable bacteria and of cellulolytic bacteria under *in vitro* conditions. The level of 100 mL. kg of concentrate. day<sup>-1</sup> was the one that allowed to obtain the highest increase of the population of total viable bacteria.

Kettunen *et al.* (2016) and Oeztuerk *et al.* (2016) reported the efficacy of two hydrolysates of *S. cerevisiae* yeast, which stimulated the *in vitro* fermentation of different substrates and increased the production of SCFA. Recently, Díaz *et al.*

que proveen las levaduras para los microorganismos ruminales, tales como las vitaminas del complejo B, los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y de cadena ramificada, las provitaminas y los micronutrientes (Newbold *et al.* 1996, Dawson y Girard 1997 y Fonty y Chaucheyras-Durand 2006).

Dawson y Girard (1997) sugirieron que la estimulación del crecimiento microbiano puede estar asociado a la presencia de dos factores de crecimiento localizados en las diferentes fracciones celulares de la levadura, uno de ellos termolábil de origen lipídico y otro termoestable con un posible origen peptídico. Posteriormente, Rossi *et al.* (2004) aislaron a partir de *S. cerevisiae* dos fracciones peptídicas ricas en lisina e histidina, las que fueron efectivas en estimular el crecimiento de las bacterias ruminales *Megasphaera elsdenii*.

Por su parte, Chaucheyras-Durand *et al.* (2008) demostraron la eficacia de las levaduras para influir en el crecimiento y la actividad enzimática de los microorganismos degradadores de la fibra en el rumen y reportaron la estimulación *in vitro* del hongo *Neocallimastix frontalis*, por el suministro que realizan las levaduras de tiamina, vitamina requerida por los hongos del rumen para la zoosporogénesis. Además, estos autores indicaron que las levaduras estimulan el crecimiento y la actividad enzimática de enzimas glicosidasas e hidrolasas presentes en bacterias encargadas de la digestión de la fibra tales como *Fibrobacter succinogens*, *Ruminococcus spp.* y *Butyrivibrio fibrosolven*, por el suministro que hacen de nutrientes y vitaminas para esta población fibrolítica.

En general, son pocos los trabajos que han analizado el efecto de los hidrolizados de levaduras en animales rumiantes. Los mecanismos de acción específicos de estos no han sido claramente definidos. Galindo *et al.* (2010) al evaluar el efecto de dos niveles de hidrolizado enzimático de la levadura *S. cerevisiae* en la población microbiana ruminal de animales que consumen *C. purpureum* vc. Cuba CT-115 observaron incremento de las poblaciones de bacterias viables totales y de bacterias celulolíticas en condiciones *in vitro*. El nivel de 100 mL. kg de concentrado.día<sup>-1</sup> fue el que permitió obtener el mayor incremento de la población de bacterias viables totales.

Kettunen *et al.* (2016) y Oeztuerk *et al.* (2016) informaron la eficacia de dos hidrolizados de levadura de *S. cerevisiae*, que estimularon la fermentación *in vitro* de diferentes sustratos y aumentaron la producción de AGCC. Recientemente, Díaz *et al.* (2017), evaluaron el efecto de la suplementación con hidrolizado de levadura *S. cerevisiae* en los parámetros fermentativos en fermentadores RUSITEC que recibieron heno de alfalfa y concentrado en relación 1:1. Estos autores constataron incrementos en el crecimiento microbiano en rumen, especialmente de



(2017) evaluated the effect of supplementation with hydrolyzate of *S. cerevisiae* yeast on the fermentative parameters in RUSITEC fermenters that received alfalfa hay and concentrate in a 1:1 ratio. These authors found increases in the microbial growth in rumen, especially of cellulolytic bacteria, with the addition of the hydrolyzate in the diet.

If it is taken into account that the enzymatic hydrolyzate of *Saccharomyces cerevisiae* consists mainly of low molecular weight peptides, oligosaccharides of glucans and manans, vitamins, amino acids, nitrogenous bases, nucleosides and nucleotides, among other components (Barton *et al.* 2010), then it is evident that it can exert a stimulating effect on the ruminal microbial population as well as live yeast strains, due to the presence of these substances in the enzymatic hydrolyzate, which could directly affect the increase of the ruminal degradability of the forage nutrients evaluated in this research.

With respect to the parameters of the ruminal degradation of the DM and OM of the evaluated forage (table 6), it should be highlighted that the model used had high goodness of fit, since  $R^2$  was high, ranging between 0.99 and 0.96 for all treatments, which shows that this model explains a high variation percentage of the real data of ruminal degradability.

The same value of fraction A was considered

bacterias celulolíticas, con la adición del hidrolizado en la dieta.

Si se tiene en cuenta que el hidrolizado enzimático de *Saccharomyces cerevisiae* está constituido fundamentalmente por péptidos de bajo peso molecular, oligosacáridos de glucanos y mananos, vitaminas, aminoácidos, bases nitrogenadas, nucleósidos y nucleótidos, entre otros componentes (Barton *et al.* 2010), entonces es evidente que puede ejercer efecto estimulador de la población microbiana ruminal al igual que las cepas de levaduras vivas, por la presencia de estas sustancias en el hidrolizado enzimático, lo que pudiera incidir directamente en el incremento de la degradabilidad ruminal de los nutrientes del forraje evaluado en la presente investigación.

Con respecto a los parámetros de la degradación ruminal de la MS y MO del forraje evaluado (tabla 6), se debe destacar que el modelo utilizado tuvo alta bondad de ajuste, ya que el  $R^2$  fue alto, oscilando entre 0.99 y 0.96 para todos los tratamientos, lo que indica que este modelo explica alto porcentaje de la variación de los datos reales de degradabilidad ruminal.

Se consideró igual valor de la fracción A para cada tratamiento, teniendo en cuenta que el sustrato incubado fue el mismo en todos, mientras que se constató tendencia al incremento de la fracción B y de la degradabilidad potencial de la MS y MO del forraje evaluado, con el aumento de la cantidad de hidrolizado enzimático adicionado a la dieta.

Table 6 Effect of the enzymatic hydrolyzate of *Saccharomyces cerevisiae* yeast on the parameters of the ruminal kinetics and Effective Degradability of the DM and OM of the *Cenchrus purpureus* cv. OM - 22 forage.

Parameter	Treatments			
	mL of enzymatic hydrolyzate of <i>S. cerevisiae</i> yeast.kg concentrate.day <sup>-1</sup>			
	0	50 mL	100 mL	150 mL
	DM			
A (%)	17.60	17.60	17.60	17.60
B (%)	53.80	61.30	67.30	68.30
(A+B)(%)	71.40	78.90	84.90	85.90
C (Fraction/ h <sup>-1</sup> )	0.035	0.037	0.052	0.058
RSD	1.09	1.35	1.49	1.15
R <sup>2</sup>	0.98	0.97	0.96	0.99
ED (%)k= 0.044	41.44	45.60	54.05	56.44
	OM			
A (%)	16.60	16.60	16.60	16.60
B (%)	45.60	56.90	66.70	68.10
(A+B)(%)	62.10	73.50	83.30	84.70
C (Fraction/ h <sup>-1</sup> )	0.042	0.043	0.056	0.063
RSD	1.12	1.04	1.41	1.02
R <sup>2</sup>	0.96	0.98	0.97	0.99
ED (%)k= 0.044	38.87	44.39	53.95	56.70

RSD: Residual standard deviation

R<sup>2</sup>: Coefficient of determination belonging to the model

for each treatment, taking into account that the incubated substrate was the same in all, while a tendency to increase fraction B and the potential degradability of DM and OM of the evaluated forage was observed, with the increase of the amount of enzymatic hydrolyzate added to the diet.

In the case of DM, there was a tendency to increase the degradation rate with the increase in the amount of enzymatic hydrolyzate (0.035, 0.037, 0.052 and 0.058 fraction % h<sup>-1</sup> for the treatments of 0, 50, 100 and 150 mL of enzymatic hydrolyzate of yeasts, respectively). Similar performance had this parameter for the OM that increased from 0.042 to 0.063 fraction % h<sup>-1</sup> with the increase of enzymatic hydrolyzate of yeasts in the diet.

On the other hand, when analyzing the parameters of the ruminal degradation of the NDF and ADF of the evaluated forage (table 7), it was verified that the addition of increasing levels of enzymatic hydrolyzate of yeast in the concentrate resulted in an improvement in both indicators and a tendency to increase fraction B and the potential degradability of both indicators was observed.

In the case of NDF, the degradation rate increased from 0.038 to 0.060 fraction %h<sup>-1</sup> with

Para el caso de la MS se evidenció tendencia de aumento de la tasa de degradación con el incremento de la cantidad de hidrolizado enzimático (0.035, 0.037, 0.052 y 0.058 fracción % h<sup>-1</sup> para los tratamientos de 0, 50, 100 y 150 mL de hidrolizado enzimático de levaduras, respectivamente). Comportamiento similar tuvo este parámetro para la MO que incrementó de 0.042 a 0.063 fracción % h<sup>-1</sup> con el aumento del hidrolizado enzimático de levaduras en la dieta.

Por su parte, al analizar los parámetros de la degradación ruminal de la FDN y FDA del forraje evaluado (tabla 7), se verificó que la adición de niveles crecientes de hidrolizado enzimático de levadura en el concentrado resultó en mejora en ambos indicadores y se observó tendencia al incremento de la fracción B y de la degradabilidad potencial de ambos indicadores.

Para el caso de la FDN la tasa de degradación aumentó de 0.038 a 0.060 fracción %h<sup>-1</sup> con el incremento del hidrolizado enzimático de levaduras y para la FDA incrementó de 0.037 a 0.045 fracción % h<sup>-1</sup>. Se observó menor período de latencia (L), para los tratamientos de 100 y 150 mL de hidrolizado de levadura.kg de concentrado.día<sup>-1</sup>, siendo estos similares entre ambos tratamientos e inferiores al resto.

Por otra parte, se observó incremento de la DE con

Table 7 Effect of the enzymatic hydrolyzate of *Saccharomyces cerevisiae* yeast on the parameters of ruminal kinetics and Effective Degradability of the NDF and ADF of *Cenchrus purpureus* vc.OM – 22 forage.

Parameter	Treatments			
	mL of enzymatic hydrolyzate of <i>S. cerevisiae</i> yeast.kg concentrate.day <sup>-1</sup>			
	0	50 mL	100 mL	150 mL
	NDF			
A (%)	16.10	16.10	16.10	16.10
B (%)	52.10	62.40	68.60	69.10
(A+B)(%)	68.20	78.50	84.70	85.20
C (Fraction/ h <sup>-1</sup> )	0.038	0.040	0.055	0.060
L (h)	7.70	4.30	3.30	3.30
RSD	1.46	2.29	1.71	1.41
R <sup>2</sup>	0.98	0.97	0.99	0.97
ED (%)k= 0.044	33.55	41.31	48.92	49.02
	ADF			
A (%)	7.50	7.50	7.50	7.50
B (%)	53.50	66.00	75.10	77.00
(A+B)(%)	61.00	73.70	82.60	84.50
c(Fraction/ h <sup>-1</sup> )	0.037	0.041	0.045	0.045
L (h)	7.80	4.60	2.60	2.40
RSD	1.59	2.00	1.30	1.04
R <sup>2</sup>	0.97	0.99	0.98	0.99
ED (%)k= 0.044	25.79	34.61	44.44	44.40

RSD: Residual standard deviation

R<sup>2</sup>: Coefficient of determination belonging to the model

the increase of the enzymatic hydrolyzate of yeasts and for the ADF increased from 0.037 to 0.045 fraction %  $h^{-1}$ . A shorter latency period (L) was observed for 100 and 150 mL treatments of yeast hydrolyzate.  $kg\ concentrate \cdot day^{-1}$ , being similar between both treatments and lower to the rest.

On the other hand, an increase in ED was observed with the increase in the amount of the supplement evaluated in the diet for all the nutrients under study (table 6 and 7). This result is of great importance since the feeding strategies of ruminants in the tropics have to be based on the capacity of this species to efficiently use the grasses and forages and, to take advantage of fibrous resources, optimizing the efficiency of the ruminal fermentative activity, with a view to increase the intake and use of the staple food, and only to supplement with those nutrients that are deficient for the host animal (Barahona Rosales and Sanchez Pinzón 2005). It is evident that the addition of 100 and 150 mL of enzymatic hydrolyzate of yeast / $kg\ concentrate/day$  increase the use of the *C. purpureus* vc.OM-22 forage.

The increase in the population of bacteria and cellulolytic fungi in the rumen and their fermentative patterns, with the addition of the enzymatic hydrolyzate, could explain the increase in the degradability of nutrients, as well as the degradation rate and the ED which has been verified in the research. However, it is probable that the polysaccharides components of the cell wall of *S. cerevisiae* yeast also exert stimulatory effects on the ruminal microbial population by certain mechanisms that should be studied in future researches.

The cell walls of the yeasts can constitute approximately 30 % of the cell dry matter. On a structural scale, the cell wall of the yeasts is constituted by three groups of polysaccharides: mannose polymers or manane-protein, up to 50 % of the DM; polymers of glucose or  $\beta$ -glucans (1.3/1.6), up to 55 % of the DM; and to a lower extent, polymers of N-acetyl-glucosamine or chitin in 6 % of the DM of the yeast cell wall (Aguilar-Uscanga and Francois 2003 and Díaz *et al.* 2017)

Since the past decade there has been increasing interest in the use of yeast cell wall fractions diet as sources of polysaccharides of  $\beta$ -glucans and manane-oligosaccharide (OSM). This type of polysaccharides are recognized as natural additives able of exerting beneficial effects on the health and productivity of animals (Hooge 2004 and Pérez *et al.* 2016), mainly because they stimulate the immune response and prevent infectious diseases due to their great antibacterial potential (Rodríguez *et al.* 2015).

However, there are very few studies that have

el aumento de la cantidad del suplemento evaluado en la dieta para todos los nutrientes bajo estudio (tablas 6 y 7). Este resultado reviste gran importancia ya que las estrategias de alimentación de los rumiantes en el trópico tienen que basarse en la capacidad de esta especie para utilizar eficientemente los pastos y forrajes y, aprovechar recursos fibrosos, optimizar la eficiencia de la actividad fermentativa ruminal, con miras a incrementar el consumo y utilización del alimento base, y solamente suplementar con aquellos nutrientes que resulten deficitarios para el animal hospedador (Barahona Rosales y Sanchez Pinzón 2005). Es evidente que la adición de 100 y 150 mL de hidrolizado enzimático de levaduras/kg de concentrado/día incrementan la utilización del forraje de *C. purpureus* vc. OM-22.

El aumento en la población de bacterias y hongos celulolíticos en el rumen y sus patrones fermentativos, con la adición del hidrolizado enzimático, pudieran explicar el incremento en la degradabilidad de los nutrientes, así como la tasa de degradación y la DE que se ha verificado en la investigación. Sin embargo, es probable que los polisacáridos componentes de la pared celular de la levadura *S. cerevisiae* también ejerzan efectos estimuladores de la población microbiana ruminal por determinados mecanismos que deben ser objeto de estudio en investigaciones futuras.

Las paredes celulares de las levaduras pueden constituir aproximadamente el 30 % de la materia seca de la célula. A escala estructural, la pared celular de las levaduras está constituida por tres grupos de polisacáridos: polímeros de manosa o manano-proteínas, hasta 50 % de la MS; polímeros de glucosa o  $\beta$ - glucanos (1.3/1.6), hasta 55 % de la MS y en menor proporción, polímeros de N-acetil-glucosamina o quitina en 6% de la MS de la pared celular de la levadura (Aguilar-Uscanga y Francois 2003 y Díaz *et al.* 2017)

Desde la pasada década se ha incrementado el interés por la utilización en la dieta de fracciones de paredes celulares de levaduras como fuentes de polisacáridos de tipo  $\beta$ -glucanos y manano-oligosacáridos (MOS). Este tipo de polisacáridos son reconocidos como aditivos naturales capaces de ejercer efectos beneficiosos en la salud y productividad de los animales (Hooge 2004 y Pérez *et al.* 2016), principalmente porque estimulan la respuesta inmunológica y previenen enfermedades infecciosas por su gran potencial antibacteriano (Rodríguez *et al.* 2015).

Sin embargo, son muy escasos los trabajos que han analizado el efecto de estos componentes en animales rumiantes y los mecanismos de acción específicos no han sido claramente definidos. A pesar de esto, los beneficios obtenidos en la salud y productividad de los animales por su aplicación en la dieta están bien documentados.

analyzed the effect of these components on ruminant animals and the specific mechanisms of action have not been clearly defined. In spite of this, the benefits obtained in the health and productivity of animals by their application in the diet are well documented.

Gomez-Basauri *et al.* (2001) observed an increase in milk production and a lower DM intake in cows that intake OSM in their diet, which generated higher efficiency in the foods conversion, showing possible positive effect of OSM on the ruminal microflora. In dairy cattle, supplementation with polysaccharides  $\beta$ -glucans and OSM has been associated with the reduction of the negative impact of heat stress in cattle, with increases in milk production, improvements in immune status, and decrease in incidence of mastitis, reducing the somatic cell count (Salinas-Chavira *et al.* 2015)

However, studies to evaluate the impact of these fractions of yeast cell walls in the fermentation and kinetics of ruminal degradation were not found in the available consulted literature, so it is of great interest to continue the studies to elucidate the action mechanisms of these components, which can constitute nutrients able of stimulating the microbial populations of the rumen and directly influence on the fermentative processes, with the consequent positive effect on the ruminal degradation of nutrients from animals that intake fibrous diets.

The obtained results allow to concluding that the addition of enzymatic hydrolyzate of *Saccharomyces cerevisiae* yeast in the diet had a positive effect on the kinetics of ruminal degradation of nutrients of *C. purpureus* vc.OM - 22 forage. It is recommended to use the level 100 mL of enzymatic hydrolyzate/kg concentrate/day in ruminants that intake diets with high fiber content and it is suggested to continue the studies to clarify the action mechanisms of polysaccharides  $\beta$ -glucan and manane-oligosaccharides of yeast cell walls, in the kinetics of ruminal degradation of low quality forages.

#### Acknowledgments

The authors thank the technicians María Elena González and Osvaldo Tuero, for conducting with responsibility and quality the samplings throughout the experimental period and Marbelis Domínguez Sierra, for the collaboration in the chemical analysis. Also, they made a special recognition to the staff of the Unidad de Atención a Experimentos de la Dirección de Innovación y Tecnologías Aplicadas del Instituto, who with their hard and dedicated work guaranteed the animals feeding throughout the research stage.

Gomez-Basauri *et al.* (2001) observaron incremento en la producción de leche y menor consumo de MS en vacas que consumieron MOS en su dieta, lo cual generó mayor eficiencia en la conversión de los alimentos, indicando posible efecto positivo de los MOS en la microflora ruminal. En el ganado lechero, la suplementación con polisacáridos de tipo  $\beta$ -glucanos y MOS se ha asociado con la reducción del impacto negativo del estrés por calor en el ganado, con incrementos en la producción de leche, mejoras del estado inmune, disminución de la incidencia de mastitis y reducción del recuento de células somáticas (Salinas-Chavira *et al.* 2015)

Sin embargo, estudios para evaluar el impacto de estas fracciones de paredes celulares de levaduras en la fermentación y cinética de degradación ruminal no se encontraron en la literatura disponible consultada, por lo que resulta de gran interés continuar los estudios para dilucidar los mecanismos de acción de estos componentes, que pueden constituir nutrientes capaces de estimular las poblaciones microbianas del rumen e influir de forma directa en los procesos fermentativos, con el consiguiente efecto positivo en la degradación ruminal de nutrientes de animales que consumen dietas fibrosas.

Los resultados obtenidos permiten concluir que la adición de hidrolizado enzimático de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la dieta tuvo efecto positivo en la cinética de degradación ruminal de los nutrientes del forraje de *C. purpureus* vc.OM - 22. Se recomienda la utilización del nivel de 100 mL de hidrolizado enzimático/kg de concentrado/día en rumiantes que consumen dietas con alto contenido de fibra y se sugiere continuar los estudios para dilucidar los mecanismos de acción de los polisacáridos de tipo  $\beta$ -glucanos y manano-oligosacáridos de paredes celulares de levaduras, en la cinética de degradación ruminal de forrajes de baja calidad.

#### Agradecimientos

Los autores agradecen a los Técnicos María Elena González y Osvaldo Tuero, por conducir con responsabilidad y calidad los muestreos en todo el periodo experimental y Marbelis Domínguez Sierra, por la colaboración en los análisis químicos. Además, realizan un reconocimiento especial a los obreros de la Unidad de Atención a Experimentos de la Dirección de Innovación y Tecnologías Aplicadas del Instituto, quienes con su arduo y consagrado trabajo garantizaron la alimentación de los animales durante toda la etapa de investigación.

## References

- Aguilar Uscanga, B. & Francois, J. M. 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in applied microbiology*. 37(3): 268–274, ISSN: 0266-8254.
- AOAC. 2016. AOAC Official Methods of Analysis. Association of Official Agricultural Chemists. Washington, D.C., ISSN: 1424-8220, DOI: 10.3390/s150304766.
- Barahona Rosales, R. & Sanchez Pinzon, S. 2005. Physical and chemical limitations to the digestibility of tropical forages and strategies to overcome them. *Revista Corpoica Ciencia y Tecnologia Agropecuaria (Colombia)*. 6(1): 69-82. ISSN: 0122-8706.
- Barton, M. D., Delneri, D., Oliver, S. G., Rattray, M. & Bergman, C. M. 2010. Evolutionary systems biology of amino acid biosynthetic cost in yeast. *PloS one*, 5(8): e11935, ISSN: 1932-6203.
- Bayat, A. R., Kairenius, P., Stefański, T., Leskinen, H., Comtet-Marre, S., Forano, E., Chaucheyras-Durand, F. & Shingfield, K. J. 2015. Effect of camelina oil or live yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) on ruminal methane production, rumen fermentation, and milk fatty acid composition in lactating cows fed grass silage diets. *Journal of Dairy Science*. 98(5): 3166–3181, ISSN: 0022-0302.
- Biricik, H. & Türkmen, İ. İ. 2001. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* on *in vitro* rumen digestibilities of dry matter, organic matter and neutral detergent fiber of different forage: concentrate ratios in diets. *J. Fac. Vet. Med.* 20: 29-33.
- Casas Rodríguez, S. 2018. *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus oryzae*: estimuladores y modificadores de la fermentación y crecimiento microbiano ruminal. Artículo de revisión. *Revista de Producción Animal*. 30(2): 1–8, ISSN: 2224-7920.
- Chaucheyras-Durand, F., Walker, N. D. & Bach, A. 2008. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Animal Feed Science and Technology*. 145(1–4): 5–26, ISSN: 0377-8401.
- Chen, X. B. 2000. NEWAY: Curve fitting programme software for Orskov's model (DOS version). International Feed Resources Unit, Macaulay Land Use Research Institute, Aberdeen, Scotland.
- Chiquette, J. 2009. The role of probiotics in promoting dairy production. *WCDS Advances in Dairy Technology*. 21(1): 143-157.
- Dawson, K. A. & Girard, I. D. 1997. Biochemical and physiological basis for the stimulatory effects of yeast preparations on ruminal bacteria. In: *Proceedings of Alltech's 13th Annual Symposium on Biotechnology in the Feed Industry*. Nottingham University Press, Loughborough, Leics. UK, pp. 34–36.
- Dhanao, M. S. 1988. On the analysis of dacron bag data for low degradability feeds. *Grass and Forage Science*. 43(4): 441–444, ISSN: 0142-5242.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M. & Robledo, y C. W. 2011. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>, 8: 195–199.
- Díaz, A., Ranilla, M. J., Saro, C., Tejido, M. L., Pérez-Quintana, M. & Carro, M. D. 2017. Influence of increasing doses of a yeast hydrolyzate obtained from sugarcane processing on *in vitro* rumen fermentation of two different diets and bacterial diversity in batch cultures and Rusitec fermenters. *Animal Feed Science and Technology*. 232: 129–138, ISSN: 03778401, DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2017.08.011.
- Duncan, D. B. 1955. Multiple Range and Multiple F Tests. *Biometrics*, 11(1): 1–42, ISSN: 0006341X, DOI: 10.2307/3001478.
- El-waziry, A. M. & Ibrahim, H. R. 2007. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* of Yeast on Fiber Digestion in Sheep Fed Berseem (*Trifolium alexandrinum*) Hay and Cellulase Activity. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 1(4): 379–385.
- Fadel El-Seed, A., Sekine, J. & Kamel, H. E. M. 2004. Changes with time after feeding in ruminal pool sizes of cellular contents, crude protein, cellulose, hemicellulose and lignin. *Indian Journal of Animal Sciences (India)*. (74): 205-210., ISSN: 0367-8318.
- Fonty, G. & Chaucheyras-Durand, F. 2006. Effects and modes of action of live yeasts in the rumen. *Biologia*. 61(6): 741–750, ISSN: 0006-3088.
- Galindo, J., Díaz, A., Gonzalez, N., Sosa, A., Marrero, Y., Aldana, A. I., Moreira, O., Bocourt, R., Torres, V., Sarduy, L. & Noda, A. 2010. Effect of hydrolyzed enzymatic product of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts on the ruminal microbial population with substrate of *Pennisetum prupureum* vs. Cuba CT-115 under *in vitro* conditions. *Cuban Journal of Agricultural Science*. 44(3): 275–279.
- Goering, H. K. & Van Soest, P. J. 1970. Forage Fiber Analysis. USDA Agricultural Research Service. Handbook number 379. US Department of Agriculture. Superintendent of Documents, US Government Printing Office, Washington, DC.
- Gomez-Basauri, J., De Ondarza, M. B. & Siciliano-Jones, J. 2001. Intake and milk production of dairy cows fed lactic acid bacteria and mannanoligosaccharide. *J. dairy Sci.* 84(Suppl 1): 283-285.
- Hassan, S. A. & Mohammed, S. F. 2016. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on rumen characteristics in awassi lambs fed diets with different roughage to concentrate ratios. *The Iraqi Journal of Agricultural Science*. 47(7-special issue): 1–11, ISSN: 0075-0530.
- Hernández, J. A., Pérez, J. J. M., Bosch, I. D. & Castro, S. N. 2015. Clasificación de los suelos de Cuba 2015. Mayabeque, Cuba: Ediciones INCA.
- Herrera-Torres, E., Murillo, M., Berumen, L., Páez, J. & Villarreal, G. 2014. Efecto de *Sacharomyces cerevisiae* y *Kluyveromices marxianus* durante el tiempo de fermentación en la calidad nutritiva del nopal forrajero. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*. 1(1): 33–40, ISSN: 2007-9028.
- Hooge, D. M. 2004. Meta-analysis of broiler chicken pen trials evaluating dietary mannan oligosaccharide, 1993-2003. *Int. J. Poult. Sci.* 3(3): 163–174. DOI: 10.3923/ijps.2004.163.174
- Kettunen, H., Vuorenmaa, J., Gaffney, D. & Apajalahti, J. 2016. Yeast hydrolysate product enhances ruminal fermentation *in vitro*. *Journal of Applied Animal Nutrition*. 4, ISSN: 2049-257X. doi:10.1017/jan.2015.14
- Kholif, S. M. & Khorshed, M. M. 2006. Effect of yeast or selenized yeast supplementation to rations on the productive

- performance of lactating buffaloes. *Egyptian Journal of Nutrition and Feeds*. 9: 193–205. ISSN:1110-6360
- Martínez, B. H., Ortiz, M. M., Carrasco, G. P., Estrada, O. R. & Torres, E. H. 2017. Parámetros de fermentación y cinética ruminal en novillos suplementados con diferentes aditivos. *Investigación y Ciencia*. 25(72): 5–11, ISSN: 1665-4412.
- McDonald, I. 1981. A revised model for the estimation of protein degradability in the rumen. *The Journal of Agricultural Science*. 96(1): 251–252, ISSN: 1469-5146.
- Mehrez, A. Z. & Ørskov, E. R. 1977. A study of artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. *The Journal of Agricultural Science*. 88(3): 645–650, ISSN: 1469-5146.
- Newbold, C. J., Wallace, R. J. & McIntosh, F. M. 1996. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *British Journal of Nutrition*. 76(2): 249–261, ISSN: 1475-2662.
- NRC 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle Seventh. ed. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 401 p., ISBN: 0309069971.
- Oeztuerk, H., Emre, B. & Breves, G. 2016. Effects of hydrolysed yeasts on ruminal fermentation in the rumen simulation technique (Rusitec). *Veterinarni Medicina*. 61(4): 195–203, ISSN: 0375-8427, DOI: 10.17221/8820-VETMED.
- Olmedo, A., Rojo Rubio, R., Arece García, J., Salem, A. Z. M., Morales Almaraz, E., Albarrán Portillo, B., Lee Rangel, H. A. & Vázquez Armijo, J. F. 2015. Extracto de *Lysiloma acapulcensis* en la digestibilidad y fermentación ruminal de una dieta para ovinos. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*. 2(5): 173–182, ISSN: 2007-9028.
- Ørskov, E. R. 2002. *Trails and trails in Livestock Research*. 204, Aberdeen. Garamond.
- Ørskov, E. R. & McDonald, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *The Journal of Agricultural Science*. 2009/03/01 ed., 92(2): 499–503, ISSN: 0021-8596, DOI: 10.1017/S0021859600063048.
- Öztürk, H., Demirbaş, Y. S. Y. S., Aydın, F. G., Pişkin, İ., Ünler, F. M. & Emre, M. B. 2015. Effects of hydrolyzed and live yeasts on rumen microbial fermentation in a semicontinuous culture system (Rusitec). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 39(5): 556–559, ISSN: 1300-0128, DOI: 10.3906/vet-1506-16.
- Patra, A. K. 2012. The use of live yeast products as microbial feed additives in ruminant nutrition. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 7(5): 366–375. DOI: 10.3923/ajava.2012.366.375.
- Pérez, M. P., Milián, G. F., Boucourt, R. S. & Reynaldo, A. P. 2016. *In vitro* evaluation of prebiotics in hydrolysates of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) prepared by different methods. *Revista La Técnica*. 16: 64–75. ISSN: 1390-6895, 2477-8982.
- Pérez, M.Q., Milián, G., Piad, R. B., González, R.C., Bocourt, R. S. & Savón, V. 2006. Hidrolizado de fondaje de cubetas de destilerías de alcohol con un crudo enzimático de la cepa de *Bacillus licheniformis* E-44 y su procedimiento de obtención. Patente concebida. No.23179. (Int.cl.8) A 23 J 1/00, 3/30, C 12N 9/56. Volume: 001, Folio: 01
- Rodríguez, M., Milián, G., Rondón, A. J., Bocourt, R., Laurencio, M., Portilla, Y. & Beruvides, A. 2015. Enzymatic hydrolyzed preparation of *Saccharomyces cerevisiae*: an additive with antibacterial potential for animal feeding. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 49(3):389-397. ISSN: 0034-7485.
- Rossi, F., Di Luccia, A., Vincenti, D. & Cocconcelli, P. S. 2004. Effects of peptidic fractions from *Saccharomyces cerevisiae* culture on growth and metabolism of the ruminal bacteria *Megasphaera elsdenii*. *Animal Research*. 53(3): 177–186, ISSN: 1627-3583.
- Rossow, H. A., Riordan, T. & Riordan, A. 2018. Effects of addition of a live yeast product on dairy cattle performance. *Journal of Applied Animal Research*. 46(1): 159–163, ISSN: 0971-2119, DOI: 10.1080/09712119.2017.1281810.
- Salinas-Chavira, J., Arzola, C., González-Vizcarra, V., Manríquez-Núñez, O. M., Montaña-Gómez, M. F., Navarrete-Reyes, J. D., Raymundo, C. & Zinn, R. A. 2015. Influence of Feeding Enzymatically Hydrolyzed Yeast Cell Wall on Growth Performance and Digestive Function of Feedlot Cattle during Periods of Elevated Ambient Temperature. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 28(9): 1288–1295, ISSN: 1011-2367, DOI: 10.5713/ajas.15.0061.
- Sauvant, D., Giger-Reverdin, S. & Schmidely, P. 2004. Rumen acidosis: modeling ruminant response to yeast culture. In: *Re-imagining the feed industry. Nutritional biotechnology in the feed and food industries. Proceedings of Alltech's 20th Annual Symposium*. Nottingham University Press, UK, pp. 221–229.
- Valenciaga, D., López, J. R., Galindo, J., Ruiz, T. & Monteagudo, F. 2018. Cinética de degradación ruminal de materiales vegetales de *Tithonia diversifolia* recolectados en la región oriental de Cuba. *Livestock Research for Rural Development*. 30 (11). <http://www.lrrd.org/lrrd30/11/daiky30186.html>
- Zhu, W., Wei, Z., Xu, N., Yang, F., Yoon, I., Chung, Y., Liu, J. & Wang, J. 2017. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products on performance and rumen fermentation and microbiota in dairy cows fed a diet containing low quality forage. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 8(1): 36, ISSN: 2049-1891.

Received: May 20, 2019