



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**

## **MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**EL USO DE POLLOS (*Gallus gallus domesticus*)  
CECOECTOMIZADOS COMO MODELO DE ESTUDIO EN  
LA FERMENTACIÓN DE INULINA.**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**DANIEL ORTEGA ALVAREZ**

**TUTOR: DR. FERNANDO PERÉZ-GIL ROMO**

**COMITÉ TUTORAL:**

**MC. VICTOR MANUEL PETRONE GARCÍA  
MC. ANTONIO DÍAZ CRUZ**

**MÉXICO, DISTRITO FEDERAL**

**2008.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **DEDICATORIA**

A mi Dios, TODOPODEROSO, SOBERANO.

A mis papas, Manuel F. Ortega Alvarez, Luz María Alvarez Rivera.

A mis hermanos, Manuel Carlos, Moisés, David.

A mi hermana Luz María

A mis sobrinos Bruno Asaaf y Carlos Uriel

A mis cuñadas.

A mis amigos Christian Carlin, Miriam Bautista y a cada uno de mis amigos que me apoyaron con sus oraciones para que concluyera este trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al CONACYT por la beca otorgada durante el posgrado cursado.

Al Dr. Luis Alberto Zarco Quintero, por su interés y apoyo para la culminación de este trabajo.

A la Facultad (FMVZ-UNAM) por todas las facilidades de apoyo económico recibido.

Al Posgrado de la FMVZ, por todas las facilidades de apoyo económico recibido.

Al Dr. Fernando Pérez-Gil Romo, jefe del departamento de Nutrición Animal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, por haber aceptado ser el director de esta tesis, brindarme apoyo financiero y apoyarme en todo momento para la realización de este proyecto de maestría.

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), que a través del Dr. Fernando Pérez-Gil Romo, me brindó apoyo económico recibido para la realización de la investigación de este proyecto.

A la empresa Megafarma SA de CV, por proporcionarme la sustancia probada, inulina, utilizada en este proyecto, sin la cual no hubiese continuado y concluido el proyecto, así como por brindarme el apoyo económico para el envío y análisis de las muestras de este proyecto.

A la empresa Orafti, Tienen, Bélgica, que amablemente aceptaron analizar las muestras por medio de HPLC para la cuantificación de inulina.

A Douwina Bosscher, gerente de investigación nutricional de Orafti, Tienen, Bélgica, por la disposición para analizar las muestras remitidas.

Al Dr. Víctor Manuel Petrone García. Por su valiosa contribución tanto económica como de logística en el desarrollo del experimento.

Al Dr. Jaime Alonso Navarro Hernández por su apoyo desinteresado y siempre dispuesto en la asesoría durante el desarrollo del proyecto.

A mis amigos Christian Carlin Valderrabano y Miriam Martínez Bautista por su amistad, ayuda invaluable, paciencia y colaboración.

A los miembros de mí jurado por sus valiosos comentarios, sugerencias, correcciones y tiempo dedicado en la revisión del trabajo escrito.

Al personal del DPA: Aves.

Al personal del Departamento de Nutrición Animal del INCMNSZ

A mi Padre celestial por regalarme la vida, la salvación y bendecirme abundantemente durante la realización de este proyecto.

## RESUMEN

Se utilizaron pollitos a los cuales se les realizó la técnica quirúrgica de cecoectomía a los 6 días para utilizarlos como modelo de estudio de la fermentación de inulina.

La cecoectomía no afectó la cantidad de inulina encontrada a nivel prececal y poscecal ( $P > 0.05$ ).

La cantidad de inulina utilizada en la dieta (5%) fue lo suficientemente alta para no permitir observar diferencias en las heces entre animales cecoectomizados y sin laparotomía (testigos intactos).

La presencia de inulina en sacos ciegos, semejante en promedio a la de los otros segmentos refiere a que este prebiótico puede llegar a este sitio de fermentación.

Se comprueba que los sacos ciegos son el principal sitio de fermentación de la inulina en los pollos. Debido a que en este segmento se encontró el menor contenido de inulina con respecto a los otros segmentos intestinales.

Se define que las propiedades de un prebiótico como la inulina no son las de un promotor de crecimiento de tipo antibiótico, que haga una diferencia radical entre tratamientos, pero si las de un ingrediente que favorece la recuperación intestinal, y esto se ve reflejado en la recuperación del crecimiento.

**Palabras clave:** inulina, pollos, sacos ciegos, cecoectomía, fermentación.

## **ABSTRACT**

Chicks were utilized to which was carried out them the surgical technique of caececetomised to the 6 days to utilize them as model of study of the fermentation of inulin.

No effect of caececetomy on inulin fermentation found at pre-caecal and post-caecal sections ( $P > 0.05$ ).

The quantity of inulin was supplemented in the diet (5%) was sufficient high, was not difference in the feces ( $P > 0.05$ ) between animal caececetomised and without laparotomy (intact controls).

It is concluded that caeca as major site of inulin fermentation in chicks. Due to that in this intestinal segment was found the minimum content of inulin in comparison with others intestinal segments.

It is defined that the properties of a prebiotic as the inulin are not those of an antibiotic growth promoter that do a radical difference among treatments, but if those of an ingredient that favors the intestinal recovery, and this is seen reflected in the recovery of the growth.

**Key words:** inulin, chicks, caeca, caececetomy, fermentation

## ÍNDICE

Resumen	iv
Abstract	v
Introducción	1
Hipótesis	26
Objetivos	27
Material y métodos	28
Resultados	32
Discusión	35
Conclusiones	38
Figuras	39
Cuadros	55
Referencias	60



## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.	Clasificación de los carbohidratos que no son digestibles por las enzimas endógenas de los no rumiantes.	55
Cuadro 2.	Fuentes de carbono y nitrógeno utilizados por las bacterias anaeróbicas de los sacos ciegos del pollo.	56
Cuadro 3.	Concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y valores de pH en el contenido cecal aviar.	56
Cuadro 4.	Contenido de inulina y oligofructosa (en % de materia húmeda) en plantas que son comúnmente utilizadas en la nutrición humana.	57
Cuadro 5.	Dieta basal para el experimento con inulina en pollos de engorda	58
Cuadro 6.	Muestras analizadas para la determinación de inulina a través de HPLC, Laboratorio Orafti, Tienen, Bélgica. Resultados porcentuales.	59

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representación esquemática del ecosistema intestinal.	39
Figura 2.	Propiedades químicas de los carbohidratos.	40
Figura 3.	Ejemplo de los materiales de la pared celular de la avena.	40
Figura 4.	Principales rutas del metabolismo de carbohidratos y sus principales productos de fermentación en el intestino grueso del humano y en el rumen.	41
Figura 5.	Sección de una planta, con una célula empalizada aumentada.	42
Figura 6.	Representación esquemática del metabolismo de carbohidratos en una célula vegetal.	43
Figura 7.	Algunos ejemplos de diversas moléculas de fructanos estructurales encontrados en las plantas.	44
Figura 8	Estructura química de sucrosa y FOS.	45
Figura 9.	Planta de achicoria.	45
Fig. 10.	Movimientos intestinales y cuantificación porcentual de inulina a través de HPLC por sección intestinal.	46
Figura 11.	Inulina en heces por grupo.	47
Figura 12.	Incremento de peso corporal.	48
Figura 13.	Grupos con inulina Día 7 por Cirugía	49
Figura 14.	Grupos con inulina Día 25 por Cirugía	50
Figura 15.	Grupos sin inulina Día 7 por Cirugía	51
Figura 16.	Grupos sin inulina Día 25 por Cirugía	52
Figura 17.	Grupos sin laparotomía Día 7 por Inulina	53
Figura 18.	Grupos sin laparotomía Día 25 por Inulina	54

## INTRODUCCIÓN

### 1.- El sistema digestivo de las aves.

Todas las especies animales tuvieron que adaptarse a su medio ambiente específico y al abastecimiento de energía y nutrientes disponibles. Es lógico asumir que este proceso tuvo una principal influencia en el desarrollo del tipo de sistema digestivo, de tal manera que la disponibilidad de componentes energéticos y nutrientes influyeron en la digestión y absorción de los mismos. El esquema general del tracto digestivo aviar incluye el pico, el esófago, el ingluvies o buche, el proventrículo, el ventrículo o molleja, el intestino delgado, un par de sacos ciegos, el intestino grueso y la cloaca. El pico y, en la mayoría de las especies, las dos regiones del estómago (el proventrículo glandular y la molleja muscular) hace a las aves distintas de los otros animales no rumiantes. El tracto gastrointestinal (TGI) es el principal órgano digestivo y de absorción y juega un papel crucial en el crecimiento de las aves<sup>1</sup>.

Los sacos ciegos están presentes en todas las aves domésticas, pero en algunas especies silvestres están ausentes<sup>2</sup>. En el gallo doméstico (*Gallus gallus domesticus*) donde está la unión del íleon con el recto están los sacos ciegos, región conocida como la unión ileocecolica<sup>3</sup>. Muchos investigadores han estudiado o incluso especulado acerca del papel de los sacos ciegos (SC) en las aves. Algunas características fisicoquímicas y fisiológicas descritas en los SC del gallo doméstico son: el pH del contenido cecal fluctúa entre 5.5 y 7.0<sup>4,5,6</sup>. El tiempo medio de retención del contenido cecal, utilizando marcadores de fase sólida es de 119 minutos<sup>7</sup>. En los SC hay absorción significativa de glucosa<sup>8</sup>. Durante el nacimiento el saco ciego entero es capaz de absorber glucosa pero esta capacidad pronto se limita en la región proximal<sup>9</sup>. La capacidad del ciego para absorber activamente azúcares en bajas concentraciones parece ser mayor que la del yeyuno<sup>10</sup>. Los aminoácidos que son absorbidos de manera importante en los sacos ciegos son: leucina, fenilalanina, prolina, y metionina<sup>11,12</sup>. Los SC tienen una mayor capacidad para absorber aminoácidos en comparación con los azúcares<sup>12</sup>. Existe evidencia que los SC juegan un papel importante en la degradación microbiana de algunos carbohidratos<sup>13,14</sup>, en la absorción y balance de agua<sup>15</sup>. En un estudio realizado por Son JH et al., (2002) informaron que la entrada de agua en los SC es del 17 y 26% en pollos no dietados y dietados respectivamente; así mismo, observaron que la entrada de materia seca en los SC representa el 18% y el 25% de la excreción de la materia seca total en pollos no dietados y dietados respectivamente<sup>16</sup>; de la misma manera, en dicha región anatómica hay síntesis microbiana de vitaminas del complejo B<sup>17</sup>, absorción de vitamina B6, aunque no es suficiente para cubrir los requerimientos de las aves<sup>18</sup>. En los SC existe digestión y absorción de colesterol<sup>19</sup>, y degradación de compuestos de nitrógeno<sup>20</sup>. Está bien aceptado que los SC son la principal cámara de fermentación en el TGI de las aves siendo los ácidos grasos de cadena corta

(AGCC) uno de los bioproductos de descomposición microbiana del ácido úrico, carbohidratos y substratos endógenos, como lo es el moco siendo los SC el principal sitio de absorción de los AGCC<sup>21</sup>.

## 2.- Microbiota normal intestinal

La microbiota puede ser considerada como un “órgano” adquirido postnatalmente, compuesto por una gran diversidad de microorganismos principalmente bacterias que pueden desarrollar diferentes funciones en el hospedero. Esta microbiota es modulada en su composición y funciones por varios factores como lo es la nutrición<sup>22</sup>, el tamaño de las partículas del alimento, así como su presentación en la elaboración del mismo (harina o pellet)<sup>23</sup>, el suministro de antibióticos<sup>23</sup>, probióticos<sup>24</sup>, prebióticos<sup>25</sup>, la edad<sup>23,26,27</sup>, entre otros. Componentes específicos de la microbiota intestinal incluyendo lactobacilos y bifidobacterias han sido asociados con efectos benéficos en el hospedero, tales como la promoción de la maduración e integridad intestinal, antagonismo en contra de patógenos y modulación inmune, entre otros<sup>28</sup>. En adición la microbiota juega un papel significativo en la homeostasis inmune intestinal y en la prevención de la inflamación<sup>29</sup>.

Los primeros estudios sobre la composición de la microbiota intestinal de los pollos fueron realizados antes de 1901<sup>30</sup> y posteriormente otros estudios fueron llevados a cabo en la década de 1940<sup>31</sup>, en estos estudios no fue posible cultivar muchas de las bacterias intestinales debido a las exigencias anaeróbicas para su cultivo. La caracterización de la microflora de los SC en las aves se inició a principios de 1970<sup>32,33,34,35,36</sup>. Se ha estimado que únicamente del 10 al 60% de las bacterias encontradas en los SC pueden ser cultivadas utilizando técnicas de cultivo anaeróbico<sup>32,34,36,27</sup>.

Los SC contienen el mayor número de bacterias en el tracto gastrointestinal de los pollos, ya que un gramo (peso húmedo) de contenido cecal puede contener 10<sup>11</sup> bacterias<sup>32,33,35,37</sup>, la mayoría de estas bacterias son anaerobias estrictas. Al menos 38 diferentes tipos de bacterias anaeróbicas han sido aisladas de los SC de los pollos, incluyendo diferentes cepas bacterianas. Mead, 1989 encontró que cocos Gram positivos como son *Peptostreptococcus* componen un 28% del total de bacterias cultivables, *Bacteroidaceae* (20%), otras bacterias fueron *Eubacterium spp.* (16%), *Bifidobacterium spp.* (9%), cocos en gemación (6%), *Gemmiger formicilis* (5%) y *Clostridium spp.* (5%)<sup>38</sup>. Ésta microflora tiene un papel importante en la nutrición, detoxificación de ciertos compuestos, capacidad de protección en contra de bacterias patógenas. Diversos autores han demostrado que la microflora intestinal influye en la salud y bienestar de las aves<sup>39,37,40,26</sup>.

También es sabido que en la avicultura comercial, la ausencia de microbiota en los SC se ha considerado como un factor principal en la susceptibilidad de los polluelos a las infecciones bacterianas<sup>41</sup>. Se sabe que el tracto gastrointestinal de

los pollitos recién eclosionados es generalmente estéril, los microorganismos rápidamente ganan acceso cuando tienen contacto con la madre y con el medioambiente que los rodea. Se han realizado estudios del cambio de la microbiota durante el periodo post eclosión. Un gran número de bacterias anaeróbicas capaces de descomponer el ácido úrico componen la microbiota cecal de pollos 3 a 6 horas post eclosión<sup>35</sup>. Durante los primeros 2 a 4 días post eclosión, estreptococos y enterobacterias colonizan el intestino delgado y los SC. Después de la primera semana, lactobacilos predomina en el intestino delgado, los SC son colonizados principalmente por anaerobios (*Escherichia coli* y *Bacteroides*) con menor número de aerobios facultativos<sup>42,35</sup>. La microbiota típica de un ave adulta en el intestino delgado se establece a las 2 semanas de vida, sin embargo, se encontró que la microbiota cecal de un adulto conformada principalmente por anaerobios obligados, tomó más de 30 días de desarrollo. A esa edad, bifidobacterias y bacteroides fueron predominantes<sup>32</sup>.

Empleando métodos de aislamiento e identificación a través del cultivo bacteriano más de 200 bacterias diferentes han sido aisladas del TGI de los pollos y ellas pueden ser divididas dentro de tres poblaciones: dominantes, subdominantes, y temporales<sup>34</sup>. Estas poblaciones bacterianas son lábiles y son influenciadas por muchos factores descritos anteriormente. Así, en los primeros días de vida de los pollos sanos las bacterias cecales predominantes son *Enterobacteriaceae spp.*, *Enterococcus spp.* y *Lactobacillus spp.*, mientras que *Bacteroides spp.* y *Eubacterium spp.* son establecidos después de 2 semanas<sup>43</sup>. De acuerdo a Mead (1989), los *Lactobacillus spp.* encontrados en los pollos principalmente incluyen *L. acidophilus*, *L. salivarius*, y *L. fermentum* los cuales están inicialmente ausentes y aparecen en números significantes ( $10^8$ - $10^{10}$  g<sup>-1</sup>) para el 4<sup>o</sup> día de vida<sup>37</sup>. Grandes poblaciones de bacterias anaerobias no formadores de esporas pueden ser aisladas posteriormente. van der Wielen et al., (2001) sugieren que el desarrollo tardío de la microflora cecal en las aves puede ser causado por la ausencia de contacto con la madre<sup>43</sup>. Se cree que en otras especies pecuarias el cuidado y acicalamiento materno y los aerosoles orales (tosido) son vías importantes en la inoculación de la microflora normal intestinal en los animales jóvenes.

Hasta hace poco, la microbiota intestinal era analizada únicamente por métodos basados en su cultivo<sup>41</sup>, los ecologistas microbianos desarrollaron un gran número de requerimientos técnicos para el crecimiento de organismos en medios selectivos. Diversas limitaciones son asociadas con las técnicas basadas en el cultivo, particularmente por la gran diversidad del ecosistema intestinal<sup>44</sup>. En adición al tiempo invertido y a la intensa labor, el uso de medios selectivos específicos para diferentes tipos de bacterias obliga a un prejuicio a priori. Varios intentos se han hecho para determinar la composición de la microbiota cecal en las aves de corral, pero los métodos de aislamiento utilizados no siempre son satisfactorios por ser anaerobios sensibles al oxígeno por lo que muchos microorganismos son difíciles de aislar y mantener<sup>37</sup>.

Recientemente técnicas moleculares han sido utilizadas para examinar la ecología del medio ambiente cecal. Zhu et al., (2002) utilizaron métodos de 16S rARN para examinar la diversidad de bacterias cecales. Un total de 1656 secuencias de nucleótidos fueron recuperadas de bacterias encontradas en contenido cecal y adosadas o embebidas en la capa de mucosa de pollos de engorda. Las secuencias pertenecían a 50 diferentes grupos filogenéticos o subgrupos y no es sorprendente que algunas secuencias pertenecían a bacterias aisladas originalmente utilizando las técnicas tradicionales basadas en el cultivo<sup>27</sup>.

En otro trabajo donde también se emplearon pruebas moleculares para el análisis de la diversidad de la flora bacteriana del ileon y de los SC de pollos que fueron alimentados con una dieta a base de maíz soya, donde no se empleó proteína de origen animal, ni antibióticos promotores de crecimiento, ni coccidiostatos. Se examinaron un total de 1,230 secuencias parciales de genes 16S rARN. Cerca del 70% de las secuencias del ileon estuvieron relacionadas con *Lactobacillus* los demás pertenecían en su mayoría al genero *Clostridiaceae* (11%), *Streptococcus* (6.5%), y *Enterococcus* (6.5%). En los SC se detectaron las secuencias relacionadas con el genero *Clostridiaceae* (65%), las demás secuencias pertenecían al grupo de *Fusobacterium* (14%), *Lactobacillus* (8%), y *Bacteroides* (5%)<sup>45</sup>.

Patógenos potenciales para los humanos como *Salmonella enterica* y *Campylobacter jejuni* son más frecuentemente encontrados en los sacos ciegos de pollos de engorda criados para consumo humano<sup>46,47,48</sup>. Desde hace tiempo se ha conocido que la microbiota madura del tracto gastrointestinal de los pollos confiere resistencia a infecciones por *Salmonella enterica*<sup>49</sup>.

En un trabajo recientemente publicado por Amit-Romach et al., 2004, analizaron la ecología de la microflora del intestino del pollo mediante pruebas moleculares utilizando la subunidad ribosomal 16S del ADN a los 4, 14 y 25 días de vida. En el saco ciego de los pollos de 4 días, la proporción relativa de *Lactobacilli* del total de bacterias examinadas fue cerca del 25% y no fue detectado *Bifidobacterium*. Proporciones relativas de *Salmonella* fueron detectadas (40%) y *Campylobacter* estuvo presente en cantidades menores (2%). Casi un tercio de las bacterias en el ciego a esta edad consistían en especies de *E. coli* y *Clostridium*. A los 14 días de edad, la proporción relativa de *Lactobacilli* y *Bifidobacterium* incrementó y alcanzó un 40% del total de las bacterias. En contraste la proporción relativa de *Salmonella* fue reducida aproximadamente en un 10%. *Campylobacter* estuvo únicamente como vestigio y las proporciones de *E. coli* y *Clostridium* cambiaron un poco. A los 25 días de edad, casi la mitad de las bacterias presentes en los sacos ciegos de los pollos fueron especies de *Lactobacilli* y *Bifidobacterium*. Además la proporción relativa de *Salmonella* había disminuido aproximadamente en un 50% comparado con el día 4. Las proporciones de *Campylobacter* se mantuvieron pequeñas, mientras que la

proporciones de *E. coli* y *Clostridium* permanecieron aproximadamente en un 30%. En cuanto al análisis de la diversidad microbiana a lo largo del tracto digestivo (duodeno, yeyuno e ileon) únicamente *Lactobacillus* fue detectado de manera consistente en todas las regiones del intestino. La proporción de *Lactobacillus* cambio un poco a lo largo del intestino delgado en aves jóvenes. Sin embargo al día 25, el segmento posterior exhibió niveles menores de *Lactobacillus* en comparación con el segmento anterior. A los 25 días *E. coli* y *Clostridium* fueron detectadas en el duodeno y en el ileon. Con la edad, la población bacteriana en el intestino delgado que predominantemente prevaleció fue lactobacilos, mientras que en los SC las Bifidobacterias comenzaron a desarrollarse y alcanzaron una proporción estable entre los 14 y 25 días<sup>50</sup>.

La microflora del buche también ha sido investigada, en un estudio realizado por Petr y Rada en el 2001, donde emplearon métodos de cultivo, informaron que los conteos bacterianos del contenido de *Lactobacillus spp* fueron  $10^8$  UFC/g de contenido y de *Bifidobacterium spp.*  $10^7$  UFC/g de contenido, siendo estos microorganismos los que predominaron en el buche de las gallinas ponedoras adultas, mientras que *Escherichia coli* ( $10^4$  UFC/g de contenido) y *Enterococcus spp* ( $10^3$  UFC/g de contenido)<sup>51</sup>. En cuanto a pollos de engorda en producción, al utilizar pruebas moleculares por PCR en combinación con cultivos bacterianos selectivos para lactobacilos, las poblaciones predominantes alcanzaron  $10^8$  a  $10^9$  UFC por gramo de contenido del buche. Muchos de los lactobacilos presentes en el buche (61.9% de los aislados) pertenecieron a la especie del grupo *Lactobacillus acidophilus*. De manera total, *L. silivarius* estuvo presente desde el día 14 al 42; *L. acidophilus*, estuvo presente desde el día 7 al día 21, *L. johnsonii* estuvo presente desde el día 3 al día 35; *L. reuteri* estuvo presente en todas las edades, como una o más de las especies de *L. acidophilus* del grupo A: *L. gallinarum*, *L. crispatus* y *L. amylovorus*. En aves de 1 día de edad se encontró una concentración de  $(5.8 \pm 1.23 \log_{10} \text{ UFC/g})$ . Del día 1 al día 7, el número de lactobacilos incrementó 1000 veces, encontrándose una población máxima promedio de  $9.00 \pm 0.41 \log_{10} \text{ UFC/g}$  en el día 7. Del día 14 en adelante, el número promedio de lactobacilos se estabilizó entre 8.14 y 8.51  $\log_{10} \text{ UFC/g}$ <sup>52</sup>.

### **3.- Fibra Dietética y salud digestiva**

Las infecciones entéricas por bacterias patógenas y la subsiguiente expresión clínica de la enfermedad ocurren con frecuencia en animales jóvenes, incluyendo a los niños. Estas infecciones pueden causar mortalidad tanto en seres humanos como en animales, y son responsables de tasas de crecimiento reducidas y de pérdidas económicas en la producción animal. Los antibióticos son las herramientas principales para prevenir o para tratar tales enfermedades. En animales, los antibióticos también se agregan en el alimento como promotores del crecimiento, acelerando el crecimiento de animales sanos. Desafortunadamente el uso extenso y a largo plazo de los antibióticos con propósitos médicos y veterinarios puede dar lugar a la selección eventual de especies sobrevivientes o

cepas bacterianas resistentes y los genes que codifican para ésta resistencia también se pueden transferir a otras bacterias que antes eran susceptibles, planteando así una amenaza para la salud animal y humana. Debido a lo anterior, algunos países han prohibido (Suecia, enero 1986) o limitado (Unión Europea en enero 2000, y el retiro total a partir de enero de 2006) el uso general de los antibióticos como promotores del crecimiento en la alimentación de los animales. Por consiguiente, se han investigado numerosos métodos alternativos de control de patógenos bacterianos entéricos, tanto en animales como para el hombre. Un acercamiento es la manipulación dietética de la fermentación en el intestino grueso por el uso de aditivos en la alimentación, o por la elección de materias primas dietéticas, que mejoran la resistencia de la colonización ejercida por la flora comensal para excluir patógenos entéricos y de tal modo mejorar la salud del intestino<sup>53</sup>. El concepto de salud intestinal es complejo y actualmente se tiene una noción mal definida. Según lo propuesto por Conway (1994) hay tres componentes importantes en la salud intestinal, a saber la dieta, la mucosa, y la flora comensal (Fig. 1). La mucosa se compone del epitelio digestivo, del tejido linfoide asociado a intestino (GALT, por sus siglas en inglés) y del moco que cubre al epitelio. El GALT, las bacterias comensales, y las células epiteliales del hospedero actúan recíprocamente formando un equilibrio delicado y dinámico dentro del tracto digestivo asegurando el funcionamiento eficiente del mismo. Se deben seleccionar el alimento y la alimentación para favorecer las condiciones en el intestino que promuevan el crecimiento y establezcan este equilibrio entre el hospedero, la microflora, y el ambiente, y para prevenir el disturbio de la estructura y la función intestinal<sup>55</sup>. A este respecto, el valor relativo de la salud del intestino de un componente dietético debe enfocarse en su capacidad de estabilizar o de perturbar éste equilibrio. La fibra dietética (FD) es el substrato principal para la fermentación bacteriana, particularmente en el intestino grueso de los animales no rumiantes. Mientras que la FD actúa recíprocamente tanto con la mucosa y la microflora, tiene un papel importante en el control de la salud del intestino.

### **3.1 Digestión de de la fibra dietética por los animales no rumiantes**

#### **3.1.1 Estructura química y terminología**

La fibra dietética (FD) fue definida por primera vez en el contexto de la medicina humana por Trowell *et al.* (1976) como la suma de lignina y de los polisacáridos que no son digeridos por secreciones endógenas del tracto digestivo del hombre<sup>56</sup>. Tal definición también se utiliza comúnmente para otras especies animales no rumiantes. En el contexto alimenticio, el término FD incluye cualquier polisacárido que alcanza el intestino grueso y así se incluye el almidón resistente (RS, por sus siglas en inglés), y los polisacáridos no amiláceos solubles e insolubles (PNA). El almidón y los PNA son polisacáridos importantes en las plantas (Cuadro 1). El almidón se compone de la amilosa y de amilopectina, que contienen enlaces  $\alpha$ -(1-4) y  $\alpha$ -(1-6)-glucosídicos respectivamente, son susceptibles a la hidrólisis de la amilasa salival y pancreática en el intestino delgado. Sin embargo, la hidrólisis no siempre es completa, existiendo formas de



almidón, nombrado almidón resistente (RS, escapa de la digestión del intestino delgado, según lo demostraron en seres humanos Englyst y Cummings (1985)<sup>57</sup>. Por ejemplo, los gránulos del almidón en el centro de las partículas del alimento son físicamente inaccesibles a las enzimas digestivas (llamadas RS1)<sup>58</sup>. Además, algunos arreglos de la estructura cristalina dentro del almidón, por ejemplo encontrados en la papa cruda y en el plátano, pueden hacer al gránulo de almidón resistente (RS2). Por otra parte, cuando se calientan y después se enfrían algunos almidones pueden convertirse en un tipo de estructura cristalina (retrogradación) que intrínsecamente resista la digestión enzimática (RS3).

Los polisacáridos principales dentro de los PNA son celulosa, pectinas,  $\beta$ -glucanos, pentosanos y xilanos. Ninguno de éstos son  $\alpha$ -glucanos, no son hidrolizados por ninguna de las enzimas endógenas de los animales no rumiantes. Hay un acuerdo general que una proporción importante de PNA llega al intestino delgado casi intacto, y son fermentados en el intestino grueso (ciego y colon) por la microflora comensal. Los PNA se definen generalmente como solubles en el agua (o solución alcalina débil) o insolubles. Las plantas contienen generalmente una mezcla de PNA solubles e insolubles en una proporción que varía según el tipo y la etapa de madurez<sup>53</sup>.

La FD también incluye a los polisacáridos purificados solubles y viscosos no vegetales tales como alginatos, carrageninas, xantanos de la goma, goma arábiga, que se utilizan comúnmente como aditivos alimenticios para la nutrición humana, así como carboximetilcelulosa (CMC) utilizada como fuente de fibra modelo en estudios con animales. Químicamente, la FD se define a menudo como PNA<sup>59</sup>. Analíticamente, la FD generalmente se considera estar relacionada con los componentes restantes después de la extracción con una solución detergente neutra según el método de Van Soest y Wine (1967), llamada fibra detergente neutra (FDN)<sup>60</sup>.

## **3.2 Fermentación de la Fibra Dietética**

### **3.2.1 Características generales de la microflora comensal**

Como fue mencionado anteriormente existe una gran cantidad y variedad de bacterias encontradas en el intestino grueso, la composición bacteriana (cantidad y proporción) es específica de especie<sup>61</sup> otros factores que influyen en la composición bacteriana son la edad, el estado fisiológico, el sitio intestinal, así como de la composición de la dieta y especialmente la presencia y naturaleza de la FD que es el principal sustrato bacteriano. Esto bajo el entendimiento del grado de control y manipulación sobre el proceso de fermentación intestinal a través de la composición del alimento. Las bacterias existen en diferentes microhábitats incluyendo el lumen del tracto gastrointestinal, la capa de moco y la superficie de la mucosa<sup>36</sup>. Diferencias en las poblaciones bacterianas entre esos micro-hábitat han sido observadas<sup>62</sup>. Debido a la excreción normal de moco, a la renovación epitelial y a los movimientos peristálticos en el tracto gastrointestinal,

se asume generalmente que la microflora del moco y mucosa asociada es un subconjunto de la flora del lumen<sup>63</sup>.

### 3.2.2 Los productos de la fermentación

Los principales productos de la fermentación de la FD son los AGCC, predominando acetato, propionato, butirato, lactato y succinato, así como H<sub>2</sub>O, varios gases (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>) y biomasa bacteriana celular. Los AGCC producidos son rápidamente absorbidos en el lumen del intestino<sup>65</sup>, especialmente cuando el pH del lumen es bajo o cuando hay una alta concentración de AGCC en el lumen<sup>66,67</sup>. Entre el 95 y el 99% del total de los AGCC producidos se absorben antes de alcanzar el recto en muchas especies no rumiantes<sup>66</sup>. Los AGCC individuales son utilizados por el cuerpo de diversas maneras, y tienen funciones específicas. El acetato es llevado al hígado y después actúa como sustrato de energía para el tejido muscular. El propionato se convierte en glucosa en el hígado. El butirato es utilizado principalmente por los colonocitos, y proporciona una fuente importante de energía para sus actividades metabólicas como ha sido demostrado en cerdos, ratas y seres humanos<sup>68,69,70</sup>. Por lo tanto los AGCC contribuyen en una cantidad substancial de energía en el intestino y en el cuerpo entero de los animales no rumiantes<sup>65</sup>. El suministro promedio de la energía neta de AGCC a la energía neta de mantenimiento, es cerca del 15 al 24% para cerdos en crecimiento y finalización<sup>71,72,73</sup> y del 5 al 10% para el hombre<sup>74</sup>.

Los AGCC y en especial el butirato, han sido implicados en las funciones de la salud humana y animal<sup>67</sup>. El butirato estimula el desarrollo y el crecimiento del intestino delgado y grueso, estimulando la proliferación de las células epiteliales<sup>68,75</sup>. En el intestino grueso, los AGCC estimulan la reabsorción del agua y del sodio<sup>76</sup>, y limita el riesgo de diarrea. En un ambiente ácido, los AGCC son capaces de inhibir el crecimiento de algunos patógenos bacterianos intestinales de los alimentos como especies de *Salmonella* y *Clostridium* en ratones<sup>77</sup>, *Escherichia coli* y *Clostridium difficile* en cerdos<sup>78,79</sup> y *E. coli* en conejos<sup>80</sup>.

### 3.2.3. La influencia del tipo de fibra dietética en su fermentación

Los factores más importantes que influyen la fermentabilidad de la FD incluyen la fuente de FD, la solubilidad, el grado de lignificación, el tipo de procesamiento, el nivel de inclusión en la dieta, el tiempo de tránsito intestinal, la edad y el peso del animal así como la composición microbiana<sup>81,82,83,84,85,86,87</sup>. La importancia de la fuente de FD como factor que determina su fermentación y digestibilidad totales se documenta en varios estudios con cereales y legumbres en seres humanos y animales. Por citar un ejemplo en cerdos, el coeficiente de digestibilidad en granos de cebada enteros en el tracto gastrointestinal total, de la celulosa se ha encontrado que varía entre 0.230 y 0.650, en granos de trigo enteros así como sus fracciones es de 0.240 a 0.600, en granos de centeno enteros así como en sus fracciones es de 0.100 a 0.840, en salvado de avena y

avena rodada de 0.780 a 0.830, en salvado de trigo, maíz y avena de 0.130 a 0.420%, y en frijón de soja descascarillado, altramuz y chícharo de 0.020 a 0.840<sup>88</sup>. La solubilidad de la FD es otro factor importante, la solubilidad *in vitro* proporciona una indicación de la fermentabilidad de la FD *in vivo*. La FD soluble, generalmente se fermenta más fácil, rápida y totalmente una vez que llega dentro del intestino grueso en comparación con la FD insoluble<sup>89,82</sup>. La FD soluble aumenta el número y la actividad de microorganismos en el intestino grueso, y los iguala en el ileon<sup>90</sup>. Cuanto más insoluble sea la FD, será la duración para ser degradada y fermentada, dando como resultado una fermentación completa que ocurra a lo largo de la longitud del intestino grueso. Por otra parte, la FD insoluble es utilizada con menor eficiencia por los animales jóvenes en comparación con los más viejos, según lo demostrado por los valores más bajos de digestibilidad en cerdos en crecimiento comparado con cerdas adultas<sup>91,92</sup>. El papel de la lignina está también bien documentado. La fermentación de los PNA es mucho más alta para el material celular no lignificado (harina de trigo, harina de centeno, salvado de avena, pulpa de remolacha) que los materiales lignificados (pericarpio de centeno o de trigo, salvado de trigo), como se ha demostrado en el cerdo<sup>82</sup> y en el hombre<sup>93</sup>.

### **3.3. Los efectos generales de la fibra dietética en la fisiología intestinal**

Los efectos de la presencia de FD en la digestibilidad de aminoácidos, pérdidas endógenas y digestibilidad de otros alimentos han sido bien documentados, especialmente en animales adultos incluyendo al cerdo<sup>94,95,96,97</sup>, aves de corral<sup>98,99</sup>, y en el hombre<sup>100</sup>. Pocos estudios se han realizado en animales jóvenes<sup>101,97</sup>. En términos generales, estos autores divulgan que la fibra soluble aumenta el tiempo del tránsito intestinal, retrasan el vaciado gástrico, retrasan la absorción de la glucosa, aumentan la secreción pancreática, y retardan la absorción, mientras que la fibra insoluble disminuye el tiempo del tránsito, aumenta la retención del agua y ayuda a al vaciado fecal en animales no rumiantes. La FD aumenta a menudo el flujo de la materia seca y pérdidas tanto de fuentes endógenas como exógenas, conduciendo a una disminución de la digestibilidad de energía del contenido de ileon y heces así como de los alimentos incluyendo el almidón, la proteína y los lípidos en los animales no rumiantes<sup>102,103</sup>. La FD se ha reconocido generalmente como antinutritiva para los animales debido a estas influencias negativas en la digestión. Estos efectos antinutritivos parecen ser más importantes en pollos que en los cerdos, donde parece ser más importante en cerditos que en cerdos en crecimiento y finalización<sup>91</sup>. Diversos tratamientos de fuentes de fibra, por ejemplo descortezamiento de las semillas de legumbre, cocimiento, o suministro de enzimas microbianas se han utilizado a veces para mejorar el valor alimenticio de las fuentes ricas en fibra usadas en los animales no rumiantes<sup>96</sup>. En contraste la FD se considera a menudo como beneficiosa para la salud humana debido a su efecto bien conocido de reducir el colesterol sanguíneo, afectando la respuesta glicémica, retrasando el vaciado gástrico, disminuyendo la absorción de nutrientes, promoviendo la motilidad en el intestino delgado y prolongando la saciedad

después de una comida<sup>104,105</sup>. Por otra parte, el consumo de FD también se ha demostrado estar correlacionado con la prevención de muchas enfermedades intestinales, especialmente cáncer<sup>106</sup>. La inclusión de fibra en dietas puede también tener efectos positivos no alimenticios en animales. Como ejemplo, en dietas altas en fibra de cerdas puede reducir la incidencia del comportamiento estereotípico, y aumenta el funcionamiento reproductivo<sup>107</sup>.

### **3.4. Digestión y fermentación de carbohidratos en las aves.**

La mayoría de los carbohidratos que pueden ser fermentados en el TGI aviar son clasificados como fibra dietética (FD). Estos carbohidratos consisten en una compleja mezcla de polímeros que son asociados con un número de otros componentes no carbohidratos (Fig. 2). La FD es predominantemente encontrada en las paredes de las células vegetales (Fig. 3) y consiste en PNA's junto con compuestos no carbohidratos, incluyendo lignina, proteínas, ácidos grasos, y ceras por el cual la FD está intrínsecamente unida<sup>108</sup>. Las propiedades fisicoquímicas de los PNA's en las plantas han sido reconocidas como sustancias importantes en la nutrición humana. Se ha sugerido que la fibra dietética mejora la salud colónica, reduce el colesterol, incrementa el metabolismo de glucosa, mejora la respuesta a insulina, reduce los lípidos sanguíneos, y reduce ciertos tipos de cáncer<sup>109,110,111</sup>. El papel de la FD en la nutrición avícola continua siendo no claro.

Los principales problemas asociados con la alimentación de PNA's en la avicultura son viscosidad y capacidad de retención de agua. Investigaciones han mostrado que la viscosidad es debido a las pectinas solubles o  $\beta$ -glucanos que, aun en pequeñas cantidades, incrementan marcadamente la viscosidad intestinal<sup>113,114</sup>. Polisacáridos insolubles como son la celulosa y los xitanos pueden retener agua, pero sus viscosidades son relativamente bajas<sup>115</sup>.

La adición de ciertos PNA's en las dietas avícolas reduce la digestión del almidón, proteína y lípidos. Se ha sugerido que esto es principalmente asociado con azúcares viscosos que impiden la difusión y el transporte de lipasas, aceites o micelas de sales biliares dentro del quimo intestinal<sup>115</sup>. Sin embargo, la viscosidad puede obstaculizar la interacción entre sustratos en el intestino delgado y las lipasas o sales biliares e impedir el transporte de productos hidrolíticos para la superficie epitelial. Se ha sugerido que los  $\beta$ -glucanos encontrados en el trigo y en la avena crean uniones complejas con las enzimas digestivas y disminuyen sus actividades<sup>116</sup>. Sin embargo, en contraste a estos hallazgos, Ikegami et al., (1990) mostraron que la actividad de las enzimas del TGI en ratas es aumentada después de alimentarlas con dietas que contenían ingredientes viscosos<sup>117</sup>. Por lo tanto, algunas fracciones de PNA's tienen un papel antinutritivo en el metabolismo aviar, pero es posible que algunas propiedades benéficas puedan ser asociadas con los productos terminales de la fermentación. Se necesitan más investigaciones en esta área.

Con base a la diversidad del ecosistema microbiano cecal, las bacterias de los SC son capaces de utilizar una variedad de sustratos comúnmente encontrados en los piensos (Cuadro 2). En adición, la microflora cecal puede también utilizar algunos componentes no digeridos por los animales. En las dietas comerciales para aves, son bajas las cantidades de PNA's, aquellas dietas específicamente basadas en maíz, todavía hay PNA's solubles (10-25 g/kg MS) y mezcla de enlaces 1-3,1-4- $\beta$ -D-glucanos (1-8 g/kg MS) presentes<sup>14</sup>. Por otro lado, el maíz no es el único cereal utilizado en las dietas avícolas.

Como se mencionó anteriormente, fracciones de FD son fermentadas por la microflora cecal hasta la producción de AGCC, amoníaco, dióxido de carbono y metano<sup>118,119,120,13,121,14</sup>. Comparado con otros no rumiantes (p. ej. cerdos, ratas), la microflora cecal en los pollos es menos capaz de fermentar fracciones de FD<sup>122,13</sup>. En adición, Langhout y Schutte (1996) sugieren que no sólo la cantidad sino también el tipo de FD, como lo es el contenido de pectina, juega un papel que puede afectar el desarrollo de los pollos y la fermentación cecal debido al grado de esterificación<sup>123</sup>.

#### **4.- Ácidos grasos de cadena corta en los sacos ciegos de las aves**

Los AGCC que son producidos durante la fermentación cecal son similares a los producidos en el intestino grueso humano o en el rumen (Fig. 4). Esos AGCC incluyen butirato, acetato, lactato, propionato, valetaro, isovalerato<sup>120</sup>. La producción de AGCC esta correlacionada con la composición de la dieta. Langhout y Schutte (1996) concluyen que las concentraciones de AGCC en el quimo cecal disminuyen cuando los pollos consumen dietas que contienen pectina cítrica altamente metilada, mientras que pectina cítrica baja metilada no tiene efecto<sup>123</sup>. Otros componentes dietéticos como son enzimas exógenas pueden también influir en las concentraciones de AGCC<sup>124</sup> (Jamroz et al., 1994). Tsukahara y Ushida (2000) informaron que la alimentación de una dieta para pollos basada en proteína vegetal llevó a una alta producción de AGCC en comparación a una dieta a base de proteína animal<sup>125</sup>.

Estas diferencias son más probables debido a altas concentraciones de FD de los componentes en dietas vegetales y quizás una alta actividad y densidad o ambas de microflora residente.

Cambios en las concentraciones de AGCC cecales han sido observados durante el crecimiento de los pollos<sup>34</sup>.

Esto ha sido soportado por las observaciones de van der Wielen et al., (2000) quien observó que el acetato estuvo presente en pollos de 3 días de edad, mientras que butirato y propionato fueron detectados por primera vez después de 12 días de edad<sup>127</sup>.

En rumiantes, los productos terminales de la fermentación contribuyen en más de un 80% del total de los requerimientos de energía y poca glucosa es utilizada por los animales. Sin embargo, en las aves la glucosa es una fuente de energía importante y es indispensable para las células del cerebro. El nivel de glucosa en la sangre de las aves es de 2-10 veces más alta que en los mamíferos<sup>128</sup>; sin embargo, Kirgchessner et al. (1999) concluyen que los AGCC pueden ser utilizados como una fuente de energía por las aves domésticas de igual forma como la glucosa<sup>129</sup>.

Después de la fermentación, formas protonadas de AGCC son transportados a través de las membranas epiteliales cecales. Morton (1978) concluyó que las cantidades de energía obtenidas de los AGCC son muy bajas para satisfacer todos los requerimientos de energía de las aves domésticas, siendo un 8% para el pollo<sup>130</sup>.

Analizando los beneficios del potencial de energía de la fermentación de carbohidratos en los sacos ciegos debe de ser visto con mucha precaución con tan poca información disponible en cuanto a absorción de los AGCC del TGI de las aves. En rumiantes, es posible determinar la absorción de AGCC a través de la medición de la desaparición neta de AGCC marcados o no radiactivamente en el rumen-retículo llenándolo con un amortiguador artificial. También es posible calcular la absorción por infusión de AGCC marcados radiactivamente junto con marcadores no absorbibles<sup>131</sup> (Gäbel, 1995). En no rumiantes (e.g. cerdos), AGCC no son metabolizados en el epitelio estomacal, por lo que la absorción puede ser medida por análisis de la sangre arterial y portal junto con el flujo de la sangre portal<sup>131</sup> (Gäbel, 1995). Este método puede ser utilizado en pollos o en otras especies de aves, pero es más difícil utilizar un catéter debido al diámetro estrecho de la vena portal. Este factor es una de las razones por lo que las investigaciones en esta área esta limitada en aves.

En adición a la actividad en cuanto al rendimiento de energía, los AGCC en los sacos ciegos de las especies aviares puede proveer otros beneficios. Van derWielen et al. (2000) demostraron que la alta actividad en la fermentación en los sacos ciegos de los pollos fue correlacionada con un pH bajo<sup>127</sup> y este puede inhibir algunas bacterias patogénicas por disipación de las fuerzas motrices de los protones a través de la membrana celular bacteriana<sup>132</sup>. McHan y Shotts (1993) observaron un efecto tóxico de AGCC en algunas Enterobacterias, y estudios in vitro mostraron una disminución del 50-80% en el conteo de *Salmonella typhimurium*<sup>133</sup>.

Mientras que los AGCC tienen un efecto bacteriostático en algunas bacterias entéricas como lo es *S. typhimurium*, estos ácidos orgánicos no inhiben las bacterias benéficas del TGI como son *Lactobacillus*<sup>127</sup>. Marounek et al. (1999) informaron que el propionato fue más efectivo en inhibir bacterias patogénicas<sup>121</sup>.

## 5.- Fructanos

La mayoría de las plantas almacenan almidón o sucrosa como carbohidratos de reserva, pero cerca del 15% de todas las especies de plantas florecientes almacenan fructanos, los cuales son polímeros lineales y ramificados de fructosa. Dentro de las plantas que almacenan fructanos hay muchas de importancia económicamente significativa, tales como cereales (p ej. cebada, trigo y avena), vegetales (p ej. achicoria, cebolla, y lechuga), ornamentales (p ej. dalia y tulipán), y pastos forrajeros (p ej. *Lolium* y *Festuca*)<sup>134</sup>. Los fructanos aislados de estas plantas tienen una variedad de usos. Los fructanos de cadena pequeña tienen un sabor dulce, mientras que los fructanos de cadenas más largas forman emulsiones con una textura parecida a la grasa y un sabor neutral. El tracto digestivo humano no contiene las enzimas capaces de degradar fructanos; por lo tanto, hay gran interés en el sector alimenticio de utilizarlos como ingredientes en alimentos con pocas calorías. En las plantas, los fructanos pueden tener más funciones que las de almacenaje de carbono; han sido implicados en las plantas en la protección contra el déficit del agua causado por la sequía o debido a las bajas temperaturas<sup>134,135</sup>.

El substrato para la síntesis de fructanos es la sucrosa, y como la sucrosa, los fructanos se almacenan en la vacuola (Fig. 5). Aunque la sucrosa se sintetiza en el citoplasma, los fructanos son producidos en la vacuola por la acción de enzimas específicas (fructosiltransferasas) que transfieren fructosa de la sucrosa a la cadena creciente de fructanos. La síntesis de fructanos es modulada por la luz, que cambia la disponibilidad de la sucrosa en la célula (Fig. 6). Las enzimas biosintéticas evolucionalmente se relacionan con las invertasas, enzimas que hidrolizan la sucrosa.

La bioquímica de la síntesis de fructanos ha sido determinada, y los primeros genes que codifican estas enzimas biosintéticas se han reproducido recientemente, por lo que se abren nuevas oportunidades biotecnológicas que para el uso de fructanos. Hasta este momento los obstáculos principales habían sido la disponibilidad limitada de fructanos de cadena larga y la heterogeneidad de fructanos cosechados. Ahora será posible dirigir genéticamente a las plantas para producir grandes cantidades de fructanos con la estructura y del tamaño definido. Además, la acumulación de fructanos en las plantas que no los producen normalmente puede contribuir a la protección contra el estrés ocasionado por situaciones de escasez de agua en estas plantas<sup>137</sup>.

### 5.1 Diversidad estructural de los fructanos

Los fructanos de las plantas muestran una mayor diversidad estructural en comparación con los fructanos bacterianos. La longitud de la cadena del fructosil en las plantas varía grandemente y es mucho más corta que la de fructanos bacterianos. En general, se encuentran en un GP de 30 a 50 residuos de fructosil,

pero ocasionalmente el GP puede exceder de 200. Además, los fructanos de las plantas tienen una mayor variedad en el acoplamiento de los residuos de fructosil. En las plantas superiores, cinco clases importantes de fructanos estructurales diversos pueden ser distinguidos: inulina, mezclados de levano, neoserias de inulina y neoserias de levano (Pollock y Cairns, 1991)<sup>138</sup>.

La inulina consiste en unidades lineales (G1-2F1-2Fn) con enlaces  $\beta$ -D-fructosil 2-1 y se encuentran generalmente en especies de plantas que pertenecen al orden Asterales, tal como la achicoria y la alcachofa de Jerusalén<sup>139,140</sup>. La molécula más corta de la inulina es el trisacárido 1-cestosa, también llamado el isocestosa (fig. 7A). (El tema será descrito con mayor detalle posteriormente)

El levano consiste en unidades lineales (G1-2F6-2Fn) con enlaces  $\beta$ -D-fructosil 2-6 y se encuentran en algunos pastos (p. ej. *Dactylis glomerata*)<sup>142</sup>. La mezcla de levano se compone tanto de unidades con enlaces  $\beta$ (2-1) como de enlaces  $\beta$ -D-fructosil 2-6. Este tipo de fructanos se encuentran en la mayoría de las especies de plantas que pertenecen a los Poales, tal como el trigo y la cebada<sup>141,142</sup>. Un ejemplo de este tipo de fructano es la molécula de bifurcosa (fig. 7B).

Las neoserias de la inulina son unidades lineales con enlaces  $\beta$ -D-fructosil 2-1 que se ligaron al C1 y al C6 del grupo químico de la glucosa de la molécula de la sucrosa. Esto da lugar a un polímero de fructano con una cadena de fructosa (mF2-1F2-6G1-2F1-2Fn) en ambos extremos de la molécula de glucosa. Estos fructanos se encuentran en las plantas que pertenecen a Liliaceae (p. ej. cebolla y espárrago)<sup>143</sup>. La molécula más pequeña de los neoserias de la inulina es el neocestosa (fig. 7C).

Las neoserias del levano son polímeros predominantes de los residuos de fructosil con enlace  $\beta$ (2-6) en cualquier grupo químico de la glucosa terminal de la molécula de sucrosa. Estos fructanos se encuentran en algunas especies de plantas que pertenecen al Poales (p. ej. avena)<sup>144</sup>.

Aunque la mayoría de las moléculas de fructanos consisten en residuos de fructosil ligados a la sucrosa, las moléculas de fructano también se han aislado de las especies Asteraceae que contienen solamente moléculas de fructosa con enlace  $\beta$ (2-1)<sup>145</sup>.

## 5.2 El papel fisiológico de los fructanos en las plantas

El papel fisiológico de los fructanos en las plantas no se entiende completamente. La presencia de fructosiltransferasas y de fructanos en la vacuola se ha demostrado convincentemente; los fructanos se sintetizan probablemente allí también<sup>146,147</sup>. Sin embargo, la síntesis de fructanos en compartimientos con excepción de las vacuolas, tales como compartimientos prevacuolares, no puede



ser todavía eliminada. Además de su papel como principal carbohidrato de reserva, la síntesis de fructanos puede controlar la concentración de la sucrosa en la vacuola. La síntesis de fructanos en vacuolas baja la concentración de la sucrosa en la célula y previene la inhibición de azúcar inducida en la regeneración de la fotosíntesis<sup>148</sup>. La iluminación continua o la alimentación de sucrosa a las hojas suprimidas de plantas que acumulan fructanos induce la síntesis de fructanos, sugiriendo una correlación entre los altos niveles de sucrosa y la inducción de la síntesis de fructanos<sup>146,147</sup>. En la vacuola, la acumulación de fructanos puede alcanzar niveles en exceso del 70% de peso seco sin inhibición de la fotosíntesis. Por otra parte, semejante al almidón, los fructanos son solubles.

Otra razón por la que las plantas utilizan la sucrosa o fructano como carbohidratos principales de almacenaje se relaciona con el clima. La distribución global de las plantas que acumulan fructanos demuestra que son especialmente abundantes en zonas templadas del clima con sequía o helada estacional, pero están casi ausentes en regiones tropicales<sup>134</sup>. Aunque la biosíntesis del almidón disminuye dramáticamente cuando la temperatura cae debajo de 10°C, la fotosíntesis y la producción de fructanos son mucho menos sensibles a la baja temperatura<sup>148</sup>. Por ejemplo, la enzima 1-STT (Sucrosa:Sucrosa 1-fructosiltransferasa) de la alcachofa de Jerusalén conserva el 50% de su actividad en 5°C comparado con su actividad en las temperaturas óptimas de 20°C a 25°C<sup>140</sup>. Por razones antedichas el almacenaje de fructanos sería ventajoso para las plantas que son fotosintéticamente activas durante el invierno o la primavera temprana. La protección del aparato fotosintético y la movilización de las reservas de fructanos almacenadas para el crecimiento rápido cuando aumentan las temperaturas, son factores fuertes que influyen las características de evolución en la acumulación de fructanos.

Se ha sugerido en varias ocasiones la implicación de fructanos en la sequía y en la tolerancia al frío<sup>149</sup> (para una revisión, Wiemken et al., 1995).

## **6.- Inulina y oligofruktosa**

La inulina y la oligofruktosa pertenecen al grupo de carbohidratos conocidos como fructanos, son carbohidratos de reserva para las plantas, los cuales están presentes en muchas plantas, incluyendo a las plantas comestibles para los humanos y los animales como son: espárrago, cebolla, trigo, ajo, alcachofa, achicoria, etcétera<sup>134,150</sup> (Hendry y Wallace, 1993, Van Loo et al, 1995).

La inulina es un fructano polidisperso  $\beta$ -(2,1) (Phelps, 1965)<sup>151</sup>. El cual consiste en una cadena lineal de moléculas de fructosa con una molécula de glucosa terminal. Es una mezcla de oligómeros y polímeros de fructosa con una estructura que puede ser representada por la siguiente fórmula:

GF<sub>n</sub> en la cual

G = unidades glucosil

F = unidades fructosil

n = número de unidades con enlace fructosil (n > 2)

El arreglo básico en la inulina GF<sub>2</sub> es 1-cestosa, por ejemplo, sucrosa la cual es una unidad fructosil unida por un enlace β-(2,1). Las subsiguientes unidades fructosil están unidas por el mismo enlace. La inulina también contiene cantidades menores de F<sub>n</sub> fructanos (n>2), en el cual las unidades terminales glucosil no están presentes.

El GP (grado de polimerización) de la inulina de achicoria es de 2 a 60. Más de la mitad de la materia seca esta compuesta de moléculas con un GP menor a 20.

La distribución de los diferentes GP esta también influenciado por las condiciones de cosecha.

La oligofructosa (un sinónimo de fructooligosacáridos) es una mezcla de fructanos β-(2,1) con una estructura general: GF<sub>n</sub> o F<sub>n</sub> en el cual:

G = unidades glucosil

F = unidades fructosil

n = número de enlaces de unidades fructosil

El GP de la oligofructosa en principio es de 2 a 10. La oligofructosa contiene moléculas tipo GF<sub>n</sub> y moléculas tipo F<sub>n</sub><sup>152</sup>.

## 6.1 Producción

La inulina de origen vegetal principalmente es extraída de las raíz de achicoria (*Cichorium intybus*), es un vegetal conocido también en América como endibia, por un proceso similar a la extracción de sucrosa de la remolacha azucarera (difusión en agua caliente)<sup>154</sup>.

Este proceso de extracción esencialmente no cambia la estructura molecular o la composición de la inulina nativa. Para la producción de oligofructosa, la inulina es parcialmente hidrolizada y purificada utilizando tecnología de las industrias del azúcar y el almidón.

La producción de inulina (un polvo blanco) para el consumo en los alimentos no es nueva. En 1920 algunas pruebas piloto fueron desarrolladas en el Deutsche Kulörfabrik<sup>155</sup>. Durante el periodo de la guerra, la inulina fue extraída en escala industrial.

Belval (1927) informó de esta manera que diferentes refinerías de azúcar alemanas (por ejemplo Tangermünde, Dessau, Hildesheim, Klein-Wanzleben, Welsleben, etc.) extraían inulina de la achicoria, en gran parte de la misma manera como era la extracción de azúcar proveniente de la remolacha<sup>156</sup>.

Las raíces eran lavadas, rebanadas y posteriormente extraídas en un difusor. El extracto era rico en inulina, pero también contenía muchas impurezas, las cuales eran removidas por un proceso de carbonización. Posteriormente la inulina era precipitada por enfriamiento de purificación líquida. El precipitado era secado y finalmente molido para obtener un polvo blanco.

En 1931 se presentó una solicitud de patente donde se describía una mejora en el proceso de extracción (difusión) de la inulina registrada por Raffinerie Tirlemontoise<sup>157</sup>.

## **6.2 Frecuencia Natural**

Es de conocimiento común que la inulina es un carbohidrato ampliamente distribuido en la naturaleza. La inulina funciona como un carbohidrato de reserva en muchas plantas. La hidrólisis interna de la inulina de moléculas de bajo GP permite a las plantas sobrevivir periodos de invierno en regiones frías a moderadamente frías (osmoregulación). La inulina esta presente en muchas familias de plantas, representando más de 36 000 especies de plantas<sup>141</sup>. Muchas de estas plantas son parte de la materia prima de la dieta desde tiempos inmemorables.

De hecho, la inulina y la oligofructosa siempre han estado presentes como un componente natural de la dieta. El primer intento en estudiar el destino de la inulina en el hombre fue Külz (1874) quien investigó su metabolismo en los diabéticos<sup>158</sup>.

Durante el inicio de 1900, diversos intentos fueron hechos para aislar y aun para purificar inulina para utilizarla como suplemento dietético. Estudios nutrimentales y metabólicos tanto en individuos sanos como diabéticos condujeron al entendimiento de esta acción y a la función nutricional como una fibra dietaria.

Al inicio de la década de 1920 se investigó la administración intravenosa de inulina como una sustancia de elección para estudios de eliminación renal y en el diagnóstico de cualquier falla en las funciones renales en humanos<sup>158</sup>.

En nuestros días, la inulina es utilizada en forma pura o como materia prima en muchos alimentos. Muchos vegetales y frutas que comúnmente son utilizados en la nutrición moderna contienen altas cantidades de inulina.

Probablemente el vegetal más consumido que contiene inulina es la cebolla. Dependiendo de la variedad, el tiempo de cosecha, y la manera de ser almacenada<sup>159</sup>, la cantidad de inulina puede ser mayor del 50% de su contenido en materia seca (m.s.)<sup>160</sup>. En promedio, se puede tomar alrededor de 30 gramos de inulina por cada kilogramo de cebollas que consumimos. Otro vegetal de uso frecuente del mismo género de las cebollas, son los puerros (18-60 % de inulina en m.s.) y el ajo (22-40 % de inulina en m.s.)<sup>161,162</sup>.

Además otros vegetales ampliamente distribuidos contienen cantidades considerables de inulina, los espárragos del cual las raíces contienen 30% de inulina (m.s.)<sup>163</sup> y alcachofa bola (65%)<sup>164</sup>. En el salsifí, más del 50% de m.s. es inulina<sup>165</sup>.

Pero estas no son las únicas plantas que contienen inulina en la dieta de los occidentales. Muchos cereales también contienen inulina. Debido a que la inulina es un componente menor en presentación de harina (1-4% en harina de trigo, arroz), es fuertemente degradada por las levaduras en el pan fermentado. Como consecuencia, la inulina es un constituyente de la nutrición diaria a través del pan<sup>166,167</sup>. Aún el trigo duro, el cual es una materia prima para la manufactura de pastas, contiene inulina<sup>168</sup>.

La raíz de achicoria, la cual en nuestros días todavía es utilizada en muchos países para la producción de un sustituto de café, contiene más del 70% de inulina en m.s. Una tasa de café de achicoria puede contener 3 gramos de inulina<sup>169,170</sup>.

Los tubérculos de la alcachofa de Jerusalén contienen 70% de inulina en m.s.<sup>171</sup>, y siempre ha sido un componente alimenticio importante en muchos países europeos. En nuestros días el tubérculo es todavía un ingrediente bien conocido en la cocina Americana<sup>172,173</sup>.

## **6.3 Historia.**

### **6.3.1 Estudios en humanos: expuestos a inulina**

#### **6.3.1.1. Diabéticos.**

Külz (1874) informó que no aparecía azúcar en la orina de los diabéticos quienes habían comido 50 a 120 gramos de inulina<sup>158</sup>. Estos resultados fueron confirmados por Strauss (1911)<sup>174</sup>. Este autor adicionalmente informó que la alimentación de pacientes diabéticos con inulina pura a dosis de 40 a 100 gramos diarios fue “de mucho beneficio”.

En su publicación, Lewis (1912)<sup>175</sup> refirió a Persia (1905) quien recomendó inulina a los diabéticos, así como la condición de que el producto es bien digerido y asimilado por diabéticos en grandes dosis y a través de periodos largos. Esto es

indirectamente confirmado por Schöne (1920) quien menciona que el alimento para diabéticos basado en inulina y más específicamente “pan para diabéticos”<sup>155</sup>. Esta aplicación de la inulina está todavía siendo citada en la farmacopea alemana hoy en día.

Beringer y Wenger (1955) encontraron que no hubo aumento de los niveles de azúcar en un paciente diabético quien consumió 50 g de inulina<sup>176</sup>. Birch y Soon (1973) quienes presentaron una conserva conteniendo 10% de inulina para pacientes diabéticos que consumían *ad libitum*, detectaron únicamente un bajo incremento<sup>177</sup>.

En su patente, Daho (1930) describe un camino para mejorar la producción de alimentos para diabéticos (especialmente productos de panadería y pastas) por la adición de inulina como un extracto no purificado de plantas que contienen inulina como *Heliantus tuberosus*<sup>178</sup>. Beringer y Wenger (1955) recomiendan una mezcla que consista en partes iguales de inulina (como un producto puro), harina de soya y gluten de maíz, para obtener un producto con buena culinaria así como buena propiedad organoléptica<sup>176</sup>.

Más recientemente, la inulina fue adicionada en una concentración del 10% en una conserva para diabéticos. Las propiedades organolépticas de la mermelada fueron satisfactorias, aun a niveles excesivos de consumo, el efecto fisiológico no fue informado<sup>177</sup>.

### **6.3.1.2 Personas saludables**

Desde 1912, Lewis evaluó el valor de la inulina como una sustancia alimenticia<sup>175</sup>. Hoy, sus hallazgos en la digestión de la inulina en hombres saludables (y diabéticos) todavía son aceptados. Las propiedades nutrimentales fueron estudiadas rápidamente por muchos investigadores, muchos de ellos utilizaron modelos animales. Los primeros estudios en humanos fueron realizadas por Okey (1919)<sup>179</sup>, McCance y Lawrence<sup>180</sup> (1929), Wise y Heyl (1931)<sup>181</sup>, Heupke y Blanckenburg (1934)<sup>182</sup> y posteriormente Küppers-Sonnenberg (1952)<sup>183</sup> y Beringer y Wenger (1955)<sup>176</sup>.

### **6.3.1.3 El papel de la inulina en individuos sanos y diabéticos**

La inulina es una fibra dietaria soluble. Su incorporación en la dieta puede tener ventajas que son típicamente ofrecidas por las fibras dietarias: aumento en el volumen de las heces, disminución de pH en el colón, producción de ácidos grasos de cadena corta, disminución del tiempo de tránsito intestinal, influencia benéfica en parámetros sanguíneos, etcétera<sup>184</sup>.

Además, como un carbohidrato bajo en calorías, puede ser utilizado en la formulación de alimentos por las personas que quieren restringir su consumo de calorías. Además de esto, los diabéticos son un grupo muy importante debido a que la inulina no tiene influencia en la glucosa sanguínea o en la insulina.

## **6.4 Aplicaciones**

### **6.4.1 Suplementos dietarios para enriquecer alimentos.**

Lewis (1912) prediciendo posibles aplicaciones en alimentos<sup>175</sup>, hizo referencia de Teyxeira (1905), quien mencionó el enriquecimiento del gluten de trigo con inulina. La inulina también fue utilizada en panadería, después del mezclado con harina<sup>156</sup>.

Küppers-Sonnenberg (1952) obtuvo los mejores resultados tecnológicos y organolépticos al adicionar 1-3 % de inulina en la masa, debido a su alta solubilidad en agua a altas temperaturas, como un concentrado de extracto de alcachofa de Jerusalén<sup>183</sup>. En su libro, Baillargé (1942) escribió que ya en el siglo 19 (alrededor de 1850), la pulpa de alcachofa de Jerusalén, preparada por cocción y secado de los tubérculos, fue agregada en una proporción 50/50 a la harina para cocer pan con el objetivo de abaratar el pan para los obreros<sup>185</sup>.

Otras aplicaciones de la inulina es su uso en la preparación de productos de leche concentrada, para la preparación de huevo y yema deshidratados así como para la preparación de cacao<sup>155,156</sup>. Antes de 1927, la inulina fue utilizada en la preparación de alimentos, recomendando su uso en cualquier aplicación en donde la papa, el maíz o el almidón de trigo no pudiesen ser utilizados debido a la formación de la pasta<sup>156</sup>.

### **6.4.2 Diagnóstico y uso terapéutico**

La función del riñón de manera aproximada, es regular las concentraciones de las sustancias no volátiles en el cuerpo, y es expresada como “clarificación renal”. Esta es una medida de la habilidad del riñón en remover una sustancia de la sangre y liberarla en la orina. Por medición simultánea de la concentración de una sustancia en la sangre y el tiempo de eliminación en la orina, los estudios de clarificación indican la tasa de filtración glomerular (GFR, por sus siglas en Inglés) p. ej. la tasa en la cual el sistema de filtración renal efectúa su función.

Antes de administrar inulina de manera parenteral a los humanos, la toxicidad de la inulina fue extensivamente experimentada en perros y muy diversos animales como ovejas, conejos y cazón<sup>186,187,188,189</sup>. La no toxicidad de los polisacáridos en el hombre fue dramáticamente demostrada por Shannon y Smith (1935) cuando uno de los autores se inyectó a si mismo 160 g de inulina de manera intravenosa<sup>190</sup>. Posterior al desafío ellos describieron en su informe “no hubo disturbios objetivos o subjetivos, no se observó ningún efecto de enfermedad

posterior a la infusión intravenosa (100 g de inulina para la prueba de clarificación) dentro del número de individuos que fue aplicada. En la presente farmacopea alemana<sup>191</sup> todavía se indica como un estudio estándar para estudios de GFR: a pesar de que diversas sustancias han sido estudiadas para la medición de clarificación en riñón, no ha sido superada la amplia aceptación que tiene la inulina. Al producto obviamente cumple con todos los requerimientos para ser considerado como una sustancia ideal y segura para ser empleado en la medición de la función renal. La inulina es también utilizada en soluciones intraoculares y para infusiones intramamarias.

De hecho la inulina es comúnmente utilizada en medicina de manera intravenosa y en algunas otras aplicaciones delicadas, junto con investigaciones toxicológicas construidas a través de los años, soportando la estabilidad del producto<sup>192</sup>.

### **6.5 Inulina y oligofructosa como fibra dietética**

El único aspecto estructural de la inulina son los enlaces  $\beta$ -(2,1)<sup>151</sup>. Estos enlaces evitan que la oligofructosa o la inulina sean hidrolíticamente digeridos en el tracto intestinal superior de animales monogástricos<sup>193</sup>, haciéndolos disponibles para ser fermentados como ácidos grasos de cadena corta (AGCC) por las bacterias intestinales en el colon.

La inulina y la oligofructosa también son clasificados como fibra dietética y son ampliamente utilizados en una variedad de productos alimenticios tanto por sus atributos tecnológicos como nutrimentales. Se ha estimado que en promedio son consumidos diariamente entre 1 y 4 gramos de inulina en la dieta típica de los Estados Unidos de Norteamérica<sup>194</sup> y de 3 a 11 gramos de inulina en la dieta típica Europa<sup>150</sup>.

Con base al papel como fibra dietética, la inulina y la oligofructosa han mostrado inducir interesantes efectos nutrimentales y fisiológicos. Estos efectos están relacionados con la biodisponibilidad del calcio, hipotrigliceridemia e hipoinsulinemia en modelos experimentales. Estos efectos han sido resumidos recientemente<sup>193,195</sup>.

### **6.5. - Inulina y oligofructosa como prebióticos**

El papel de la microflora del colon es de crucial importancia desde cualquier consideración en los ingredientes alimenticios, tanto en la salud como en la enfermedad, debido a que muchos efectos fisiológicos de los compuestos influyen en sus actividades. Los prebióticos son ingredientes alimenticios no digeribles, que estimulan selectivamente el crecimiento y la actividad de las bacterias intestinales, aumentando potencialmente la salud<sup>153</sup>. Quizás el mejor efecto nutrimental

conocido de la inulina y la oligofruktosa es su habilidad por modificar la composición de la flora intestinal (p. ej. al incrementar el número de bifidobacterias y lactobacilos) y su actividad metabólica en el intestino grueso<sup>196,197</sup>.

Los prebióticos oligosacáridos como la inulina y la oligofruktosa son fermentados en el colón de los mamíferos donde ellos promueven el crecimiento de las poblaciones bacterianas asociadas con la salud, así como lo es el buen funcionamiento del colon. Esta estimulación selectiva ocurre debido a que los oligosacáridos son fácilmente fermentados por un tipo de bacterias benéficas del colón y no son tan efectivamente utilizados por especies bacterianas patológicamente potentes. Los tipos de bacterias benéficas incluyen bifidobacterias, lactobacilos y eubacterias. *Staphylococci*, *Salmonella*, *Listeria*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Veillonella*, *Campylobacter* y ciertos clostridios son considerados dañinos, mientras que *Streptococcus* y ciertos Bacteroides son tipos de bacterias más neutrales<sup>153</sup>.

Las bifidobacterias han sido identificadas como un factor de resistencia en contra de microorganismos potencialmente patógenos en humanos<sup>198</sup> y son asociados con una reducción de susceptibilidad para patógenos entéricos y en enfermedades intestinales<sup>28</sup>. Las bifidobacterias también han mostrado inhibir bacterias patogénicas *in vitro* e *in vivo*<sup>199,200,201</sup>. Las bacterias potencialmente patogénas pueden ejercer efectos dañinos sobre el intestino y la salud del hospedero causando diarrea por producción de amoniaco, aminos, indoles, fenoles y otros compuestos putrefactivos<sup>153</sup>. Sin embargo es deseable promover el crecimiento de bacterias benéficas, el cual puede controlar el crecimiento de bacterias invasivas o por otra parte bacterias dañinas. Los cambios en la composición de la microflora (p. ej. el incremento de Bifidobacterias en muestras fecales de log<sub>10</sub> 9.2 a log<sub>10</sub> 10.1/g disminuyó cocos Gram positivos de log<sub>10</sub> 6.0 a log<sub>10</sub> 5.5/g esto ocurrió en estudios en humanos con inulina y oligofruktosa a dosis entre 5 y 20 g/d, en un periodo de 15 a 65 días<sup>202,203</sup>. Sin embargo, el efecto bifidogénico de diferentes formas de oligofruktosa es independiente de la presencia de cadenas de fruktosa únicamente o cadenas de fruktosa con residuos de glucosa terminal. Con un incremento en el largo de la cadena (p. ej. el grado de polimerización de 4 (oligofruktosa), 10 (inulina de achicoria), o 28 (inulina de achicoria de cadena larga) la proporción de fermentación disminuye, pero cualitativamente la modificación de la composición de la flora intestinal es similar (bifidogénica). Estudios en humanos sugieren que el incremento logarítmico en el número de bifidobacterias depende más del número inicial de bifidobacterias, que en sí a la dosis de fruktanos<sup>196</sup>.

La inulina y la oligofruktosa son fermentados por las bacterias que colonizan el intestino grueso como ha sido demostrado en un gran número de estudios *in vitro* e *in vivo*, donde se ha confirmado la producción de lactato y de AGCC (principalmente acetato), y productos terminales de la fermentación<sup>205,206</sup>. Otros



autores han encontrado que el principal AGCC producido en la fermentación de inulina ha sido el propionato<sup>206,207,208</sup>.

## **7.- Apreciación global del papel de las bacterias gastrointestinales en la salud y la enfermedad en los animales**

En perros, gatos y cerdos, el intestino grueso es el sitio primario de fermentación. El intestino grueso de estas tres especies contiene un ecosistema microbiano complejo compuesto de muchos géneros y miles de especies de bacterias, siendo la mayoría anaerobios<sup>209,210</sup>. Sin embargo el ciego de los cerdos es más desarrollado y su contribución en la fermentación bacteriana es mayor que la realizada en el ciego de los perros y de los gatos. Aunque la contribución de energía de la fermentación de la fibra es mínima en perros y gatos, su importancia se incrementa debido a que ésta fermentación contribuye en la salud intestinal de los perros y los gatos<sup>212</sup>. Los AGCC que se derivan de la fermentación de la fibra pueden contribuir en más de un 30% de los requerimientos de energía de mantenimiento en cerdos en crecimiento<sup>212</sup>.

El caballo, el pollo y el conejo son conocidos como fermentadores cecales, y es el caballo el que tiene el más complejo intestino grueso que cualquier animal doméstico<sup>213</sup>. En pollos y conejos, el ciego es el sitio primario de fermentación bacteriana, con mucho menos contribución del colon cuando se compara con el de otras especies monogástricas.

Los rumiantes (p. ej. vacas, ovejas, etc.) desarrollan una fermentación ruminal y posteriormente una digestión hidrolítica intestinal. El estómago glandular verdadero (el abomaso) de los rumiantes es precedido por tres compartimientos proventriculares (el retículo, el rumen y el omaso). Los rumiantes también poseen un intestino grueso que es responsable de la fermentación de nutrimentos que escapan de la fermentación ruminal y de la digestión del intestino delgado. Se estima que el contenido ruminal contiene de 10 a 50 X 10<sup>9</sup> bacterias/g. En menor grado protozoarios y hongos que también contribuyen en la fermentación ruminal<sup>214</sup>.

La diversidad de la microflora del tracto gastrointestinal juega un papel importante en la salud del hospedero. Algunas de estas bacterias son patogénicas mientras que otras promueven la salud, o suprimen patógenos, propiedades atribuidas a ciertas bacterias en particular (p. Ej. *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*)<sup>28</sup>. Los beneficios de la ingestión de fructanos son la habilidad de incrementar la población de bifidobacterias y lactobacilos “silvestres” en el intestino grueso que suprimen la actividad de las bacterias putrefactivas y reducen la formación de productos de fermentación tóxicos<sup>215</sup>.

Diversas consecuencias adversas resultan de los metabolitos tóxicos formados durante la fermentación de los alimentos en el intestino grueso de los

mamíferos. Compuestos tóxicos formados en el sitio incluyen amoniaco (un tóxico para el hígado), aminas (tóxicas para el hígado), nitrosaminas (carcinógenas), fenoles y cresoles (promotores cancerígenos), ácidos biliares secundarios (carcinógenos/ promotores activos de cáncer de colon) y aglicones (substancias mutagénicas). De 40 a 55% de los sólidos del colon son masa bacteriana, la cantidad de metabolitos tóxicos formados por la fermentación del colon no puede ser ignorada. Por citar un ejemplo en 300 g de heces húmedas pueden estar presente 186 mg de amoniaco, 1.4 mg de fenol, 12.2 mg de p-cresol, 8.5 mg de indol, y 3.3 mg de esquetol. Las bacterias conocidas que participan en la formación de estos metabolitos son *Escherichia coli* y clostridios (amoniaco, aminas, nitrosaminas, fenoles, indol, aglicones, y ácidos biliares secundarios), *Bacteroides* spp., *Streptococcus fecalis* (nitrosaminas, aglicones y ácidos biliares secundarios), *Proteus* (amoniaco, aminas e indol)<sup>215</sup>. Las enzimas de bacterias perjudiciales, cuya síntesis dependen las bacterias y la ecología gastrointestinal, forman los metabolitos tóxicos. Clostridia presenta la más alta actividad de azorreductasa y beta-glucoronidasa; bacteriodes, eubacteria y peptostreptococci presentan la menor, y bifidobacteria al menos no presenta actividad de azorreductasa y beta-glucoronidasa. La actividad beta-glucosidasa es alta en clostridias, seguida en orden decreciente por bifidobacteria, bacteriodes, eubacteria, y peptostreptococci<sup>216</sup>.

En adición a la promoción de putrefacción fecal, estas bacterias dañinas a veces causan enfermedad. En cerdos, los agentes etiológicos más comunes en diarreas incluyen *Escherichia coli* enterotóxica, *Clostridium perfringens*, *Salmonella enterica*, y *Brachyspira (Serpulina) spp*<sup>217</sup>. *Salmonella*, *Campylobacter*, *Clostridium perfringens* y *E. coli* enterotóxica son enteropatógenos comunes en la avicultura<sup>218,219</sup>. En ciertas razas de perros, el sobrecrecimiento de bacterias anaeróbicas en el intestino delgado puede ocasionar un problema crónico<sup>220</sup> sin embargo no es claro si es específico de un tipo o tipos de bacterias responsables.

Dentro de los productos finales por el cual los fructanos pueden ejercer un efecto de promoción de la salud es la producción de ácidos AGCC (uno de los productos finales de la fermentación de fructanos). En humanos, dietas altas en fibra y producción de grandes cantidades AGCC ha sido asociado con beneficios en la salud, incluyendo aumento en la morfología y función intestinal. Numerosos estudios han descrito como la fibra dietética y los AGCC han resultado en proliferación epitelial intestinal (p. ej. abundancia en el transporte de nutrientes y actividad) y disminución en el riesgo de cáncer de colon<sup>221,222,223,224</sup>. Un papel similar puede existir para los animales de compañía y en producción.

Muchos estresores ocurren a través de la vida de los animales que pueden comprometer su microbiota normal e incrementar su susceptibilidad a enfermedades entéricas. El empleo de antibióticos en el alimento tiene dentro de sus objetivos contrarrestar la presencia de organismos que causan estas enfermedades. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, esta práctica ha

sido eliminada en ciertas partes del mundo y está siendo considerada ser eliminada (o en intensa regulación) en otras partes. En nuestros días existe un interés considerado en estrategias alternativas al uso de antibióticos en el alimento. El resultado deseado es la salud óptima y el bienestar de las bacterias benéficas a costa de las bacterias patogénicas. Alimentando con prebióticos, como la inulina y la oligofructosa, con o sin la inclusión de probióticos, podría ser una estrategia tal, pero se necesita un esfuerzo considerable en la investigación para probar completamente la eficacia de esta estrategia<sup>225</sup>.

Continúa el entendimiento de la importancia de los SC en el *Gallus gallus domesticus*. Estudios previos realizados en diversas partes del mundo han utilizado el modelo de extirpación de los sacos ciegos, técnica quirúrgica conocida con el nombre de cecoectomía, para tratar de estudiar y comprender las diversas funciones de los SC, en resumen lo que ha resultado es que los SC contribuyen en gran parte en la absorción de agua, energía, nutrimentos en los primeros 14 días de vida del pollito; digestibilidad de fibra cruda y de ciertos aminoácidos, entre otros<sup>16,226,227,228,229,230,231,232,233,234</sup>. Para entender la función de los SC en cuanto a su papel fermentativo se utilizó la técnica de cecoectomía como modelo de estudio en la fermentación de inulina.

## **HIPÓTESIS**

La falta de sacos ciegos en los pollos (cecoectomía) se reflejará en encontrar mayor cantidad de inulina no fermentada en las heces.

## **OBJETIVO**

- Determinar si los sacos ciegos son el principal sitio de fermentación de la inulina en los pollos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Investigar la cantidad de inulina fermentada en los sacos ciegos.
- Investigar cuánta inulina se fermenta a nivel prececal.
- Investigar cuánta inulina se fermenta a nivel postcecal.
- Comparar los pesos corporales de pollos alimentados con y sin inulina sometidos a diferentes tratamientos quirúrgicos para determinar la influencia de la inulina en el peso corporal.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Sustancia probada**

Raftiline™ GR (Orafti, Tienen, Bélgica) fue utilizado como prebiótico en una concentración de 5%, se eligió dicha dosis con base a un estudio previo realizado en el 2001 por Petr y Rada en gallinas de postura adultas. De acuerdo al productor esta es una posible dosis alta. Raftiline™ GR es una inulina granular, con dosis de inclusión recomendada en especies avícolas desde 0.1% hasta 2%. Es declarado como un ingrediente alimenticio que consiste en inulina de achicoria. Raftiline™ GR contiene inulina (>90%), glucosa y fructosa ( $\leq 4\%$ ) y sucrosa ( $\leq 8\%$ ). En promedio el grado de polimerización (GP) fue mayor a 10.

### **Animales**

En el presente experimento se emplearon pollitos de engorda machos, de un día de edad, de la estirpe Ross, clínicamente sanos, a todos los pollitos se les dio un periodo de adaptación de 24 horas. La muestra fue de tipo disponible, y se obtuvo aleatoriamente a partir de los producidos en una incubadora comercial localizada en el estado de Veracruz, México.

### **Criterios de inclusión**

Pollitos de engorda, machos, de un día de edad, de la estirpe Ross, clínicamente sanos provenientes del estado de Veracruz

### **Criterios de exclusión**

Pollitos con malformaciones y aquellos pollitos que presenten signos de deshidratación severa.

### **Criterios de eliminación**

Los individuos que no se recuperaren a los 14 días del postoperatorio.

### **Ambiente de crianza:**

Las aves fueron alojadas en una jaula en batería con piso de alambre, con calentador eléctrico a una temperatura de 32 °C, la cual fue disminuyendo conforme al crecimiento semanal de las aves hasta llegar a una temperatura de 24 °C, y 40% de humedad relativa, ubicada dentro de una unidad de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves (DPAA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en el Distrito Federal, México, respetando las necesidades de limpieza,

espacio, temperatura, agua y alimento, según la edad de los individuos<sup>235,236,237,238</sup>.

### **Dieta:**

Se les proporcionó alimento balanceado a base de maíz, harina de soya, de acuerdo con los requerimientos nutrimentales de energía y proteína, sin antibióticos, ni coccidiostatos. Se utilizó una inclusión de inulina (50g/kg) y se proporcionó desde la recepción. El alimento y el agua se les proporcionó *ad libitum* (Cuadro 5). Un pollo de 25 días de edad consume 122 gramos de alimento por día, lo que corresponde a 6.1 g/inulina.

### **Técnica Quirúrgica**

Cuando las aves tuvieron 6 días de edad se les realizó la técnica quirúrgica de cecoectomía descrita por Parsons, 1985<sup>231</sup> Green, *et al.*, 1987<sup>234</sup> con modificaciones (Carlin-Valderrabano, SCh, 2004)<sup>239</sup>.

### **Conformación de grupos con o sin la adiminsitración de inulina en la dieta**

Para este estudio se utilizaron 84 pollitos, la muestra fue distribuida aleatoriamente en 6 grupos.

### **Conformación de grupos:**

<b>Grupo A Sin Inulina Cecoectomía</b>	<b>n = 15</b>	<b>Grupo D Con Inulina Cecoectomía</b>	<b>n = 15</b>
<b>Grupo B Sin Inulina Laparotomía</b>	<b>n = 9</b>	<b>Grupo E Con Inulina Laparotomía</b>	<b>n = 9</b>
<b>Grupo C Sin Inulina Sin Laparotomía</b>	<b>n = 18</b>	<b>Grupo F Con Inulina Sin Laparotomía</b>	<b>n = 18</b>

Todos los pollitos se alimentaron desde el inicio con una dieta adecuada a su etapa de crecimiento a libre acceso, al igual que el agua, salvo los periodos de ayuno (30 minutos) antes de la cirugía, programada al día 6 de vida. Se mantuvieron desde su llegada en criadoras en batería hasta los 25 días de edad. Todos los pollitos fueron manejados de manera homogénea.

De acuerdo a los porcentajes de viabilidad (Carlin-Valderrabano, SCh, 2004), los grupos sometidos a cecoectomía fueron conformados de 15 pollitos para obtener un mínimo de 6 pollitos por grupo. En el caso de laparotomía la cantidad de individuos operados fue de 9 para garantizar el mínimo de 6 pollitos sobrevivientes.

## **Comportamiento del peso corporal con o sin administración de inulina en la dieta**

Se permitió un período de adaptación de 24 horas. Debido a que la cirugía fue realizada al sexto día de edad, se estableció el registro de peso a partir de un día anterior a la cirugía, es decir diariamente a partir del quinto día y durante 20 días.

La comparación entre grupos para efectos de peso corporal se realizó de la siguiente manera:

<b>Grupo A</b>	<b>vs</b>	<b>Grupo D</b>
<b>Grupo B</b>	<b>vs</b>	<b>Grupo E</b>
<b>Grupo C</b>	<b>vs</b>	<b>Grupo F</b>

### **Toma de muestras**

A las aves se les dió 14 días para recuperación postoperatoria. A todos los individuos a los 25 días de edad, se les aplicó eutanasia por el método físico-mecánico mediante dislocación de la articulación atlanto – occipital<sup>236,240,241</sup>. Cabe señalar que las personas encargadas de la eutanasia tienen amplia experiencia en el método señalado<sup>235,236,242</sup>.

A las aves designadas de cada grupo se tomaron muestras de contenido intestinal del último tercio del ileon (prececal), contenido de sacos ciegos (cecal) del grupo testigo y heces (poscecal) de los tratamientos, dichas muestras fueron almacenadas por separado a -20 °C hasta el momento de ser analizadas, en el laboratorio de la empresa Orafiti, Tienen, Bélgica, para la determinación de inulina la cual fue cuantificada mediante la técnica descrita por Hoebregs H., 1997<sup>243</sup>.

Por motivos económicos no se pudo analizar el contenido intestinal de todos los individuos. El número de muestras autorizadas por el laboratorio para la determinación de inulina fue de 38. Aleatoriamente se designaron muestras de cada grupo tratado con inulina (Ver cuadro 6)

### **Modelo de estudio para la fermentación de inulina**

De las muestras enviadas y analizadas mediante HPLC, las utilizadas para el estudio de la fermentación de inulina fueron:

Grupo D) Con intervención quirúrgica, Cecoectomía (C) = 5 muestras poscecales (heces).

Grupo F) Sin intervención quirúrgica, Sin Laparotomía (SL) = 5 muestras pocecales (heces) (Ver Cuadro 6).



## **Plan de análisis**

Las variables nominales se resumieron en términos de frecuencia, las variables cuantitativas se resumieron en términos perceptivas. Los grupos comparados se analizaron mediante la distribución probabilística binomial y la prueba de suma de los rangos Wilcoxon/Kruskal-Wallis, respectivamente y aproximación Xi cuadrada., con un valor de de  $P < 0.05$  fue considerado como estadísticamente significativo.

Las comparaciones entre los grupos experimentales D y F, se hicieron mediante la distribución probabilística binomial y la prueba de suma de los rangos Wilcoxon/Kruskal-Wallis, respectivamente y aproximación Xi cuadrada. Un valor de  $P < 0.05$  fue considerado como estadísticamente significativo.

Se utilizó el programa estadístico JMP© 5.1.2 SAS Institute (Product)<sup>244</sup>.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos de la cuantificación de inulina a través de HPLC se resumen en el Cuadro 6. De un total de 38 muestras enviadas al laboratorio de análisis de Orafti, Tienen, Bélgica, el laboratorio bajo su propio criterio analizó solamente 23 muestras.

Se obtuvieron promedios de la inulina no fermentada en los diferentes niveles del tracto gastrointestinal cuantificados por medio del método descrito por Hoebregs H., 1997<sup>243</sup>; en individuos con sacos ciegos, en cecoectomizados, laparatomizados y sin cirugía (ver Cuadro 6).

De acuerdo a los resultados obtenidos con base a la cantidad de inulina en el alimento y de acuerdo a la cantidad de inulina encontrada en heces se estimó el porcentaje de inulina que se fermenta en el intestino del pollo.

La cantidad de inulina incluida en el alimento corresponde al 5%. Se observa que la inulina administrada no se fermenta en su totalidad y solamente se acumula, excepto a nivel cecal (0.05% - 9.84 % de inulina). No se pudo determinar la cantidad de inulina fermentada de manera exacta en los SC, ni en el contenido prececal, tampoco en el contenido poscecal. Sólo se pudo estimar, no estadísticamente, los porcentajes promedio.

### Porcentaje de inulina cuantificada a través de HPLC

Clave	Descripción	% de inulina/muestra
x	Inulina en Alimento	5
a	Cecoectomía Prececal	6.37
b	Sin Laparotomía Prececal	8.16
c	Laparotomía Cecal	0.05
d	Sin Laparotomía Cecal	9.84
e	Cecoectomía Poscecal	10.72
f	Laparotomía Poscecal	13.02
g	Sin Laparotomía Poscecal	7.73

Suponiendo que a lo largo del día entrara en ambos sacos ciegos un total de inulina incluida en el alimento:

Inulina fermentada en ciego

$$x - c = 5 - 0.05 = 4.95 \% \text{ fermentado en ciegos}$$

$$d - x = 9.84 - 5 = 4.84 \% \text{ acumulado en ciegos previo a la fermentación.}$$

Estos resultados manifiestan que el llenado y fermentación de inulina en SC no es un evento estático (ver Figura 10). Lo anterior se explica en la sección de discusión.

Respecto al estudio de la fermentación de inulina por medio de las muestras de heces analizadas, no podemos definir una mayor o menor fermentación de inulina en los individuos con sacos ciegos sobre los cecoectomizados debido a que el efecto acumulativo de inulina se presenta en las diferentes porciones analizadas (Ver Figura 10). Lo anterior se aprecia en el cuadro 6, donde los individuos cecoectomizados presenta un porcentaje poscecal de 10.72% de inulina y el cual se encuentra entre el porcentaje de inulina poscecal de los individuos sin laparotomía y el porcentaje poscecal de los individuos con laparotomía, esto es 7.73 % y 13.02% respectivamente.

De todos los resultados del análisis de inulina en heces (Grupo D y F) a través de HPLC y conforme al protocolo del plan de análisis se hizo la comparación mediante la distribución probabilística binomial y la prueba de suma de los rangos Wilcoxon/Kruskal-Wallis, no encontrando evidencia estadística suficiente para decir que existe diferencia entre Grupo D y F (C y SL) ( $P= 0.3472$ ). (Ver Figura 11).

Los promedios de peso expresados de manera porcentual por grupo, se observan en la figura 12.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando los incrementos de peso que presentaron los distintos grupos; cecoectomía, laparotomía, sin laparotomía, con y sin inulina en la dieta.

El análisis estadístico en la interacción de los grupos con inulina, se observa que existe diferencia estadísticamente significativa en el día siete ( $P = 0.0112$ ), el día veintiuno ( $P = 0.0127$ ) y el día veinticinco ( $P = 0.0086$ ) entre el grupo de cecoectomía y el de sin laparotomía. Ver figuras 13 y 14 (Día 7 y 25 con inulina por cirugía).

En la interacción de los grupos sin inulina, se observa que existe diferencia estadísticamente significativa en el día siete ( $P <.0001$ ) entre los grupos de cecoectomía, laparotomía y el de sin laparotomía; al día catorce ( $P = 0.0003$ ), al día veintiuno ( $P = 0.0031$ ) y al día veinticinco ( $P = 0.0128$ ) la diferencia se presenta entre el grupo de cecoectomía con los otros dos grupos (laparotomía y sin laparotomía) sin que exista diferencia entre estos dos últimos. Ver figuras 15 y 16 (Día 7 y 25 sin inulina por cirugía).

El análisis estadístico entre los grupos de cecoectomía con y sin inulina, laparotomía con y sin inulina, no se observó diferencia estadística significativa ( $P>0.05$ ). En los grupos sin laparotomía con y sin inulina la diferencia estadística

solo se observó en el día seis ( $P = 0.0292$ ) y siete ( $P = 0.003$ ). Ver figuras 17 y 18 (Día 7 y 25 sin laparotomía con y sin inulina.)

## DISCUSION

Variaciones interespecíficas en la forma, tamaño y presencia de los sacos ciegos de las aves han sugerido que estos órganos pueden tener diversas funciones y no únicamente que su papel primario entre las especies sea determinado por los alimentos presentes en su hábitat, o por las necesidades de conservación de agua. En un esfuerzo por entender las funciones de los SC en las aves, muchos investigadores han removido quirúrgicamente los SC, técnica quirúrgica que recibe el nombre de cecoectomía, en varias especies de aves, para examinar el efecto del metabolismo energético de los alimentos<sup>245-249</sup>, excreción de ácido úrico<sup>229,250</sup>, síntesis de aminoácidos<sup>230</sup>, susceptibilidad ha enfermedades<sup>251,252</sup>, absorción de agua, consumo y excreción<sup>226,248,253</sup>. Hasta donde se tiene conocimiento este es el primer estudio en el que se emplea la técnica quirúrgica de cecoectomía en pollitos de 6 días de edad, con el fin de entender el papel de los SC en el proceso fermentativo de una fibra soluble prebiótica como lo es la inulina.

Para el ejercicio siguiente se consideró el movimiento antiperistáltico intestinal que se presenta en el pollo de engorda de los segmentos intestino delgado a cavidad gástrica y de colón-recto a sacos ciegos<sup>4</sup>.

De acuerdo a los resultados obtenidos por HPLC en el presente estudio en los diferentes segmentos intestinales analizados se comprobó que los SC en los pollos, son el principal sitio de fermentación de la inulina. Esto es posible ya que la inulina es soluble en agua y una molécula relativamente simple. Lo encontrado concuerda con estudios realizados en humanos donde se ha demostrado que el sitio de mayor fermentación es el intestino grueso; en pacientes con ileostomía los cuales recibieron en la dieta diferentes dosis de inulina, inulina y oligofructosa así como únicamente oligofructosa, con dosis de consumo desde 7 gramos hasta 20 gramos diarios, fue recuperado en promedio un 88% de dichos fructanos en el intestino delgado<sup>254-259</sup>.

Como se mencionó anteriormente en los SC se encuentra la mayor diversidad y cantidad de microflora presente en todo el tracto gastrointestinal<sup>32-37</sup>. Y es sitio primario donde se lleva a cabo la fermentación bacteriana<sup>18-121</sup>.

Como existe un mecanismo de reflujo se puede suponer que también parte de esta inulina no fermentada pueda regresar a intestino delgado y ser fermentada en intestino delgado, en sacos ciegos o en colon-recto.

La razón por la cual se eligió la dosis de 5% en el alimento, tomada de estudios previos realizados por (Petr y Rada, 2001)<sup>51</sup>, fue con el objetivo de garantizar la presencia de inulina en las diferentes porciones del tracto gastrointestinal, se esperaba que el resultado en heces favoreciera en una menor cantidad de inulina en los animales sin laparotomía (con SC), y que los individuos

con cecoectomía al fermentar menos inulina se observara una diferencia estadísticamente significativa que manifestara la capacidad de fermentación de los SC. Al no encontrarla es probable que se haya rebasado la capacidad de fermentación de inulina de los SC, aunado a la fisiología del tránsito intestinal, peristalsis y antiperistalsis, con lo que podemos explicar la ausencia de diferencia de la inulina determinada en heces en Cecoectomizados y Sin Laparotomía. Lo anterior no concuerda con estudios en humanos ya que existen resultados en los cuales se dieron diferentes concentraciones tanto de inulina como de oligofructosa en la dieta desde 5 gramos diarios hasta 120 gramos diarios no encontrando ningún material en las heces de los individuos estudiados<sup>254-259</sup>. Recientemente se realizaron estudios similares en cerdos donde se determinó la digestibilidad percal y fecal de la inulina siendo un 98 y 100% respectivamente<sup>260</sup>.

Al observar los resultados de laboratorio de manera general se aprecia que los SC contienen menos inulina independientemente de la excretada en heces. Es posible que se pueda replantear la dosis suministrada de inulina a los pollos, esto es dosis por debajo del 2% recomendado por el productor, para poder esperar una diferencia de resultados mediante HPLC en la cantidad de inulina entre grupos, principalmente en heces, además de los diferentes segmentos estudiados.

La cantidad de inulina fermentada en la porción prececal no pudo ser determinada en este experimento debido a que no se realizó un muestreo de todos los niveles del tracto gastrointestinal desde el buche y así a todo lo largo del intestino, ya que la cantidad de inulina que está siendo determinada a nivel de íleon constantemente se ve incrementada por la inulina proveniente del consumo de alimento y del reflujo intestinal. De hecho sería más evidente la determinación de la cantidad de inulina fermentada en los diferentes segmentos del TGI si a ésta se le marcara con un isótopo radioactivo.

Los nutriólogos especialistas en aves no toman en cuenta el mecanismo de reflujo en la dieta de los pollos. En la bibliografía revisada no se encontró referencia alguna respecto a la cantidad de inulina fermentada en los SC ni de la relevancia de los SC en las aves de producción como sitio principal de la fermentación de este tipo de carbohidratos de tipo prebióticos lo cual fue el objetivo principal de este trabajo.

Los individuos cecoectomizados que recibieron inulina en la dieta, tuvieron una mejor recuperación del peso sin que se presentara diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo laparatomizado. En el caso de los cecoectomizados que no recibieron inulina en la dieta sí existió diferencia estadística con el grupo laparatomizado. Suponemos que esto se debe al beneficio de la inulina a nivel intestinal de acuerdo a los estudios realizados<sup>261,262</sup>.

Los individuos que fueron cecoectomizados se observaron por debajo del incremento de peso de los individuos sin laparatomía. Lo cual nos sugiere que la

cirugía y la ausencia de sacos ciegos no permiten que el individuo cecoectomizado tenga un ritmo de crecimiento comparable a un individuo intacto. Esto se confirma con los individuos laparatomizados que a diferencia de los cecoectomizados logran recuperar un crecimiento equiparable al de los individuos intactos, destacando la importancia de los sacos ciegos principalmente en pollitos en crecimiento<sup>8-12</sup>.

Donde si se observa diferencia es en los primeros días posquirúrgicos al comparar los individuos laparatomizados con los intactos sin inulina. Esta diferencia no sucede en los individuos laparatomizados con inulina respecto a los intactos con inulina, haciendo notar que la inulina en el caso de la presencia de SC y una manipulación quirúrgica permite una recuperación del incremento de peso sin diferencia estadística con los intactos. Esto concuerda con estudios recientes realizados en perros en crecimiento a los cuales se les realizó la resección de la válvula ileocecal y anastomosis ileocólica, los individuos que recibieron una dosis de inulina donde se observó diferencia estadística en el largo de las vellosidades intestinales en el ileón en comparación con el grupo testigo<sup>263</sup>.

Respecto a la comparación de cada tratamiento (cecoectomía, laparotomía, sin laparotomía) con inulina o sin inulina la única diferencia observada fue en los grupos sin laparotomía y exclusivamente en el día de la cirugía (día 6) y un día después (día 7). Esto puede deberse a la conformación del pollo de engorda de cada grupo, y la ausencia de diferencia estadística se puede asumir como un efecto de la inulina.

Hoy en día se espera que las propiedades de un prebiótico como la inulina sean parecidas a las de un promotor de crecimiento que haga una diferencia radical entre tratamientos, pero como se ha observado, un ingrediente prebiótico es muy distinto a los antibiotico promotores de crecimiento<sup>261-262,265</sup>.

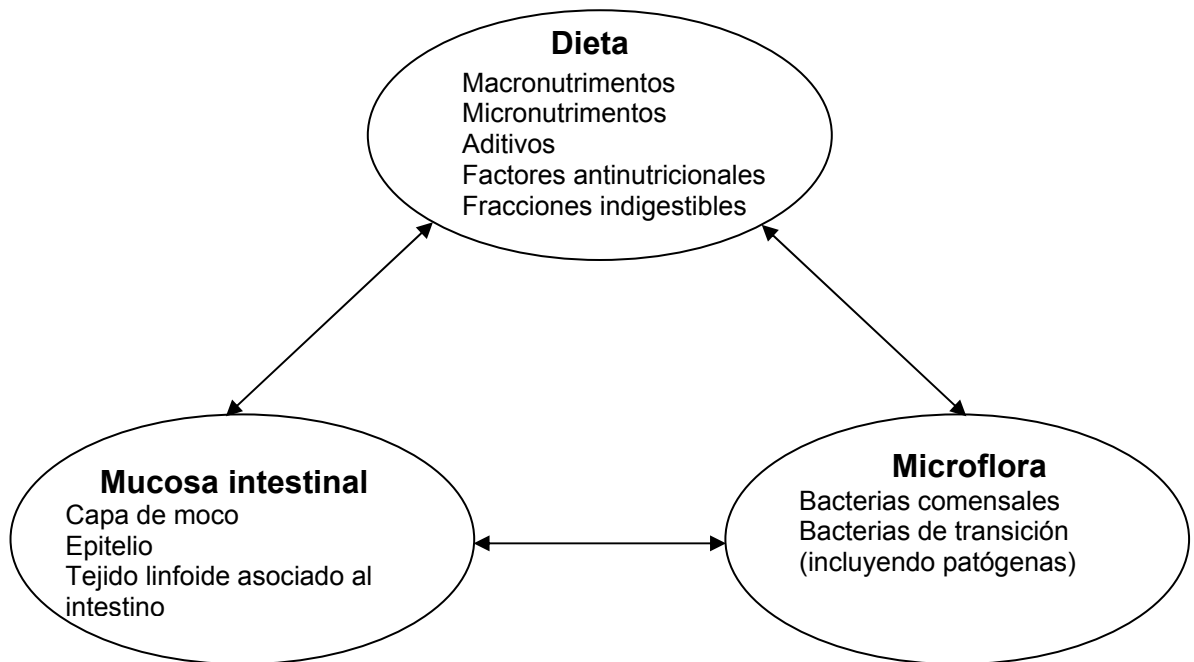
Como se observó en este estudio favorece la recuperación postquirúrgica del individuo, valorado mediante el peso corporal, y que muy probablemente tenga que ver con lo publicado acerca del beneficio a nivel intestinal (microbiota y epitelio)<sup>153,198,221-224</sup> lo anterior ha sido estudiado en diferentes especies y por diferentes grupos de investigadores<sup>263,264</sup>.

## CONCLUSIONES

- La cecoectomía no afectó la cantidad de inulina encontrada prececal y poscecal ( $P > 0.05$ ).
- La cantidad de inulina utilizada en la dieta (5%) fue lo suficientemente alta para no permitir observar diferencias en las heces entre cecoectomizados y sin laparotomía (testigos intactos).
- La presencia de inulina en sacos ciegos, semejante en promedio a la de los otros segmentos refiere a que este prebiótico puede llegar a este sitio de fermentación.
- Se comprueba que los sacos ciegos son el principal sitio de fermentación de la inulina en los pollos. Debido a que en este segmento se encontró el menor contenido de inulina con respecto a los otros segmentos.
- Se define que las propiedades de un prebiótico como la inulina no son las de un promotor de crecimiento de tipo antibiótico, que haga una diferencia radical entre tratamientos, pero si las de un ingrediente que favorece la recuperación intestinal, y esto se ve reflejado en la recuperación del crecimiento.



## FIGURAS



**Figura 1. Representación esquemática del ecosistema intestinal (modificado de Conway, 1994) <sup>54</sup>. Cada elemento actúa recíprocamente uno con el otro para mantener un equilibrio dinámico asegurando el funcionamiento del sistema digestivo y la carencia de enfermedad, un estado definido como salud del intestino.**

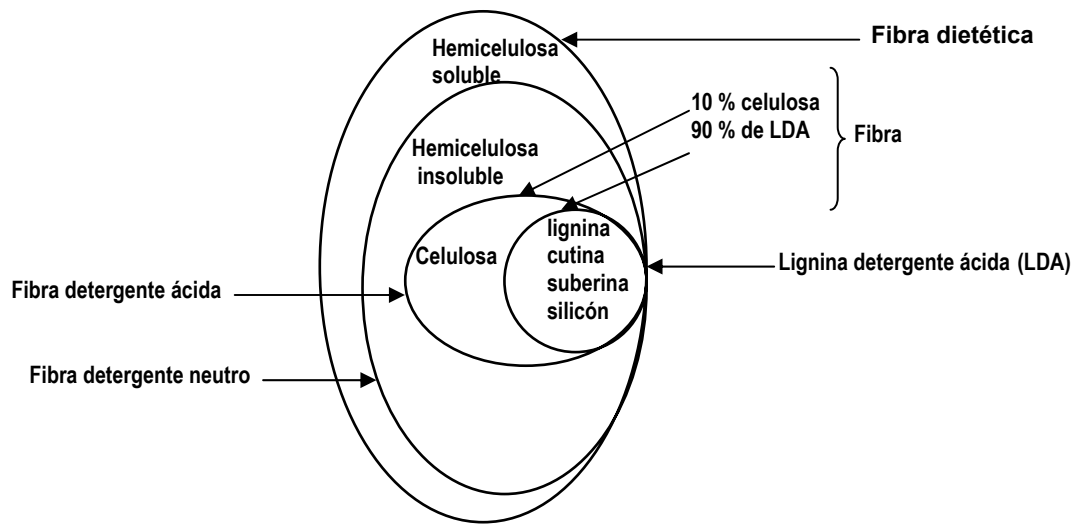


Figura 2. Propiedades químicas de los carbohidratos (AOAC, 1990)<sup>112</sup>.

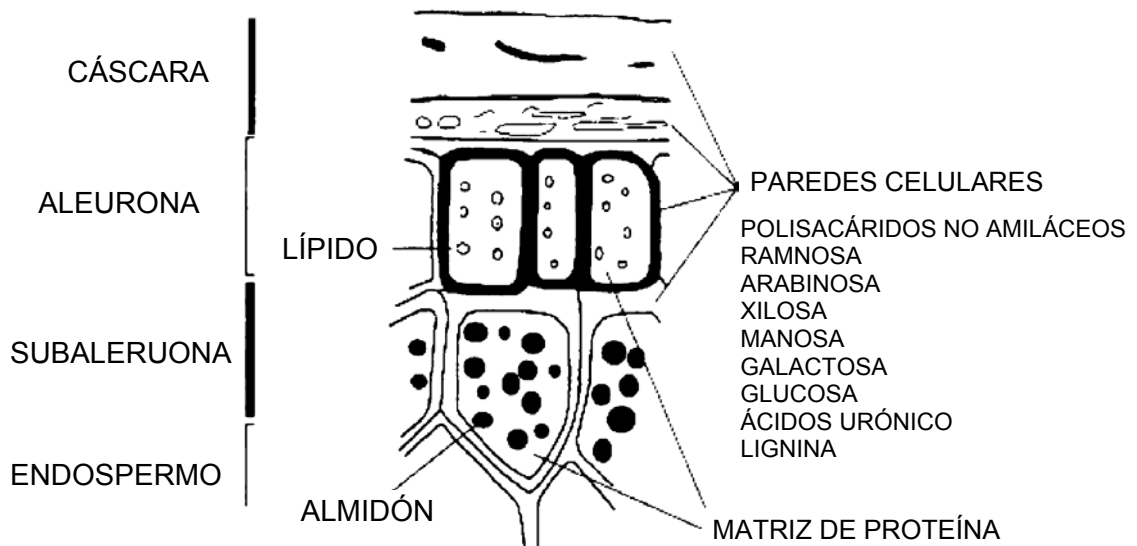


Figura 3. Ejemplo de los materiales de la pared celular de la avena<sup>108</sup>.

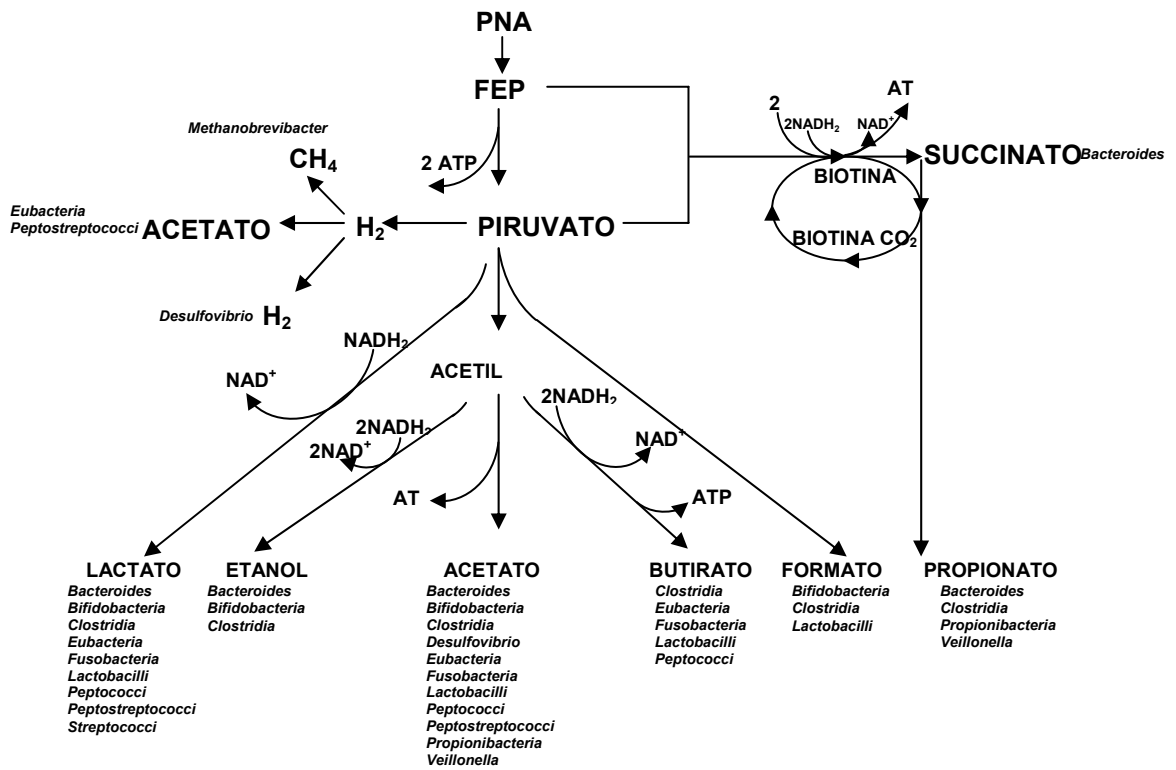


Figura 4. Principales rutas del metabolismo de carbohidratos y sus principales productos de fermentación en el intestino grueso del humano y en el rumen (modificado Macfarlane y Gibson, 1995<sup>126</sup>).

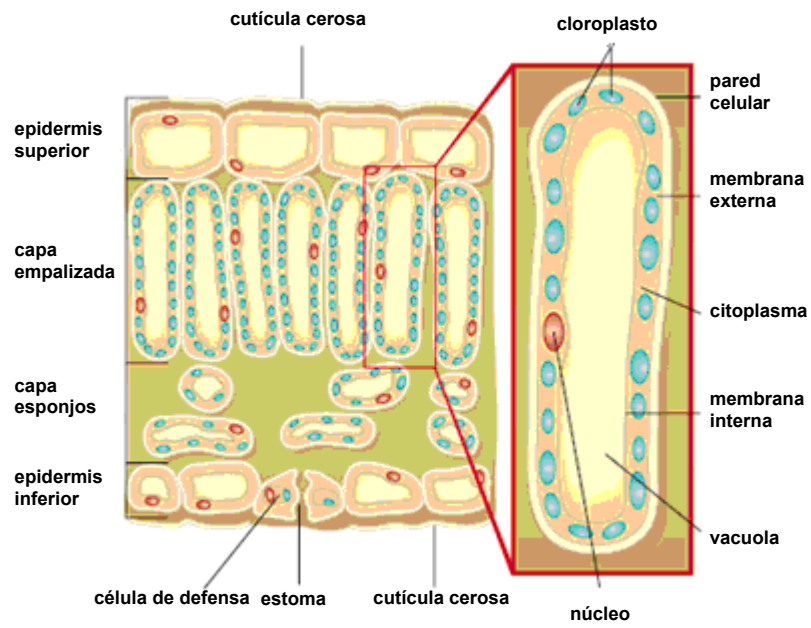
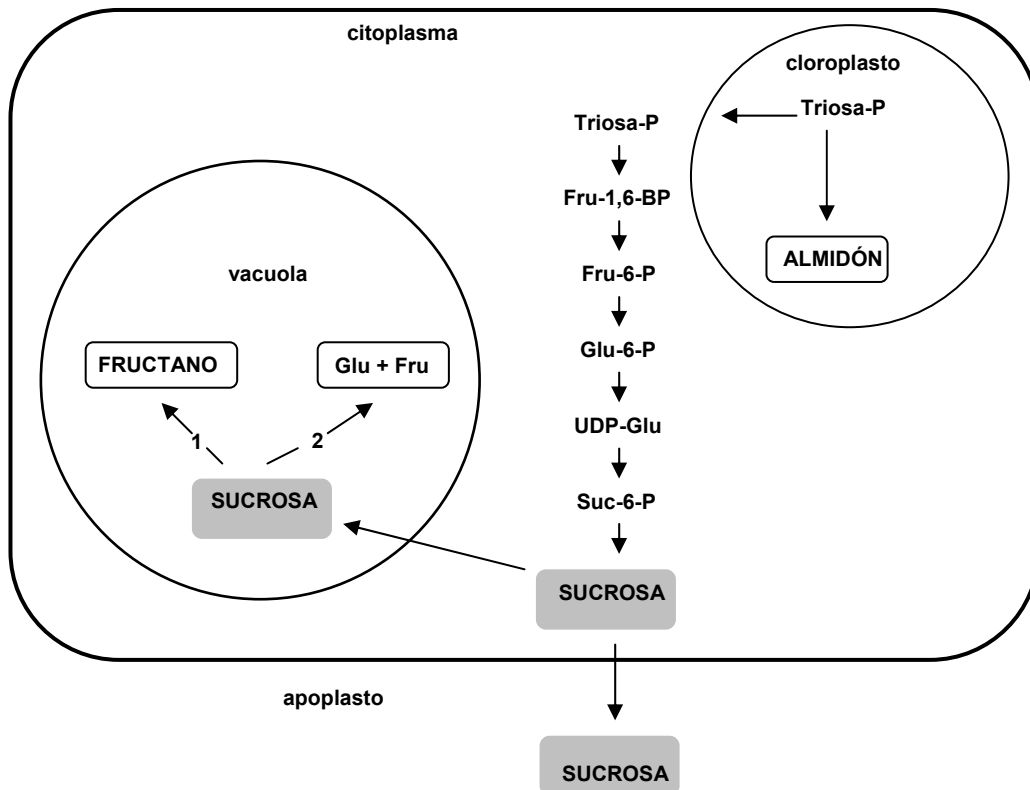
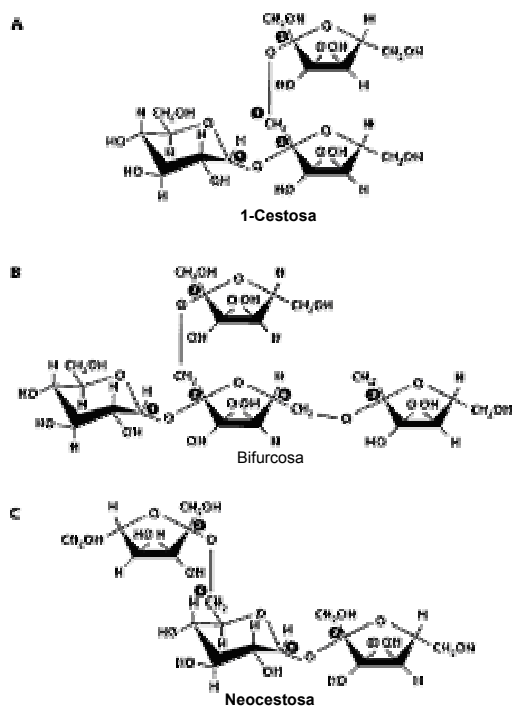


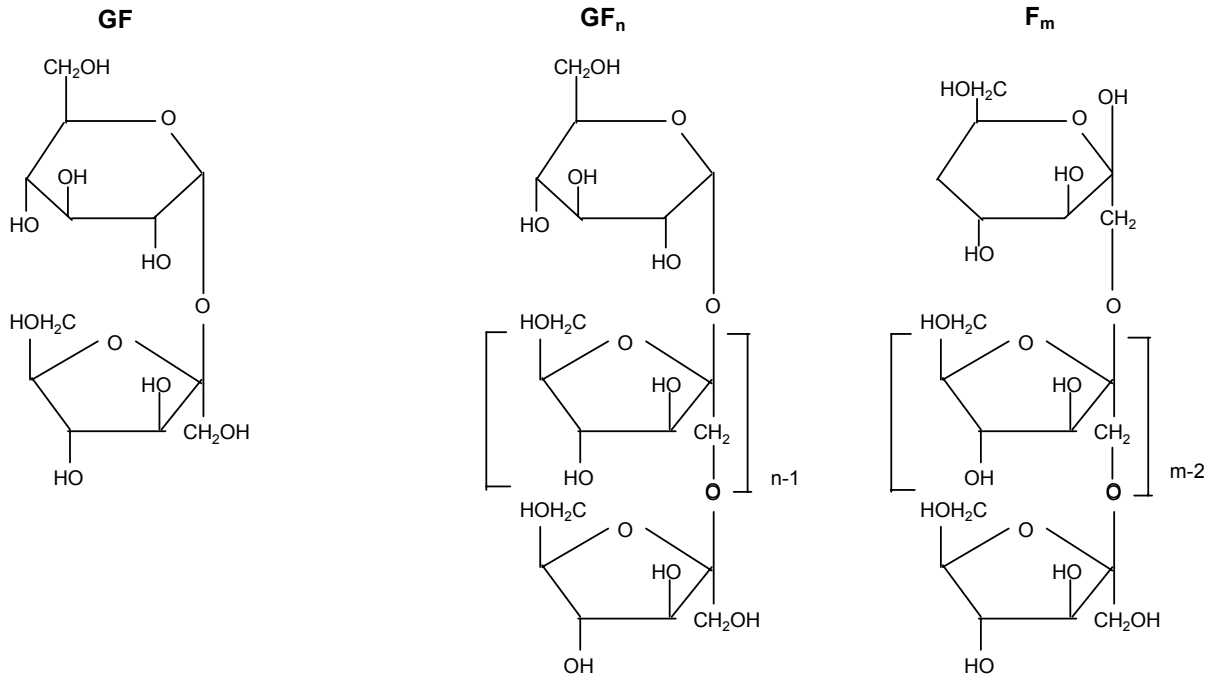
Figura 5. Sección de una planta, con una célula empalizada aumentada<sup>136</sup>.



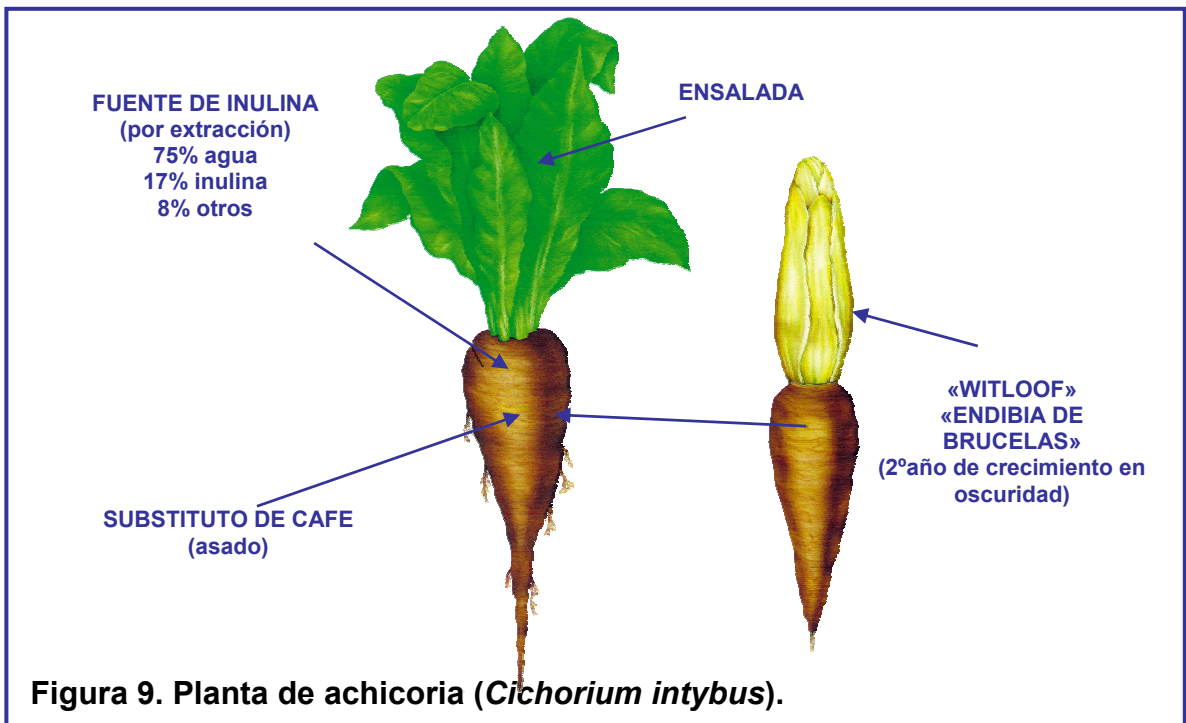
**Figura 6. Representación esquemática del metabolismo de carbohidratos en una célula vegetal. La alta actividad fotosintética se asocia a los altos índices de exportación de carbono del cloroplasto al citoplasma, dando como resultado un aumento en los intermediarios para la síntesis de sucrosa. La sucrosa sintetizada se distribuye en la vacuola (almacenaje) o en el apoplasto (exportación). En la vacuola, la sucrosa se puede convertir en fructano por fructosiltransferasas (1) o hidrolizar en glucosa y fructosa por la invertasa (2)<sup>137</sup>.**



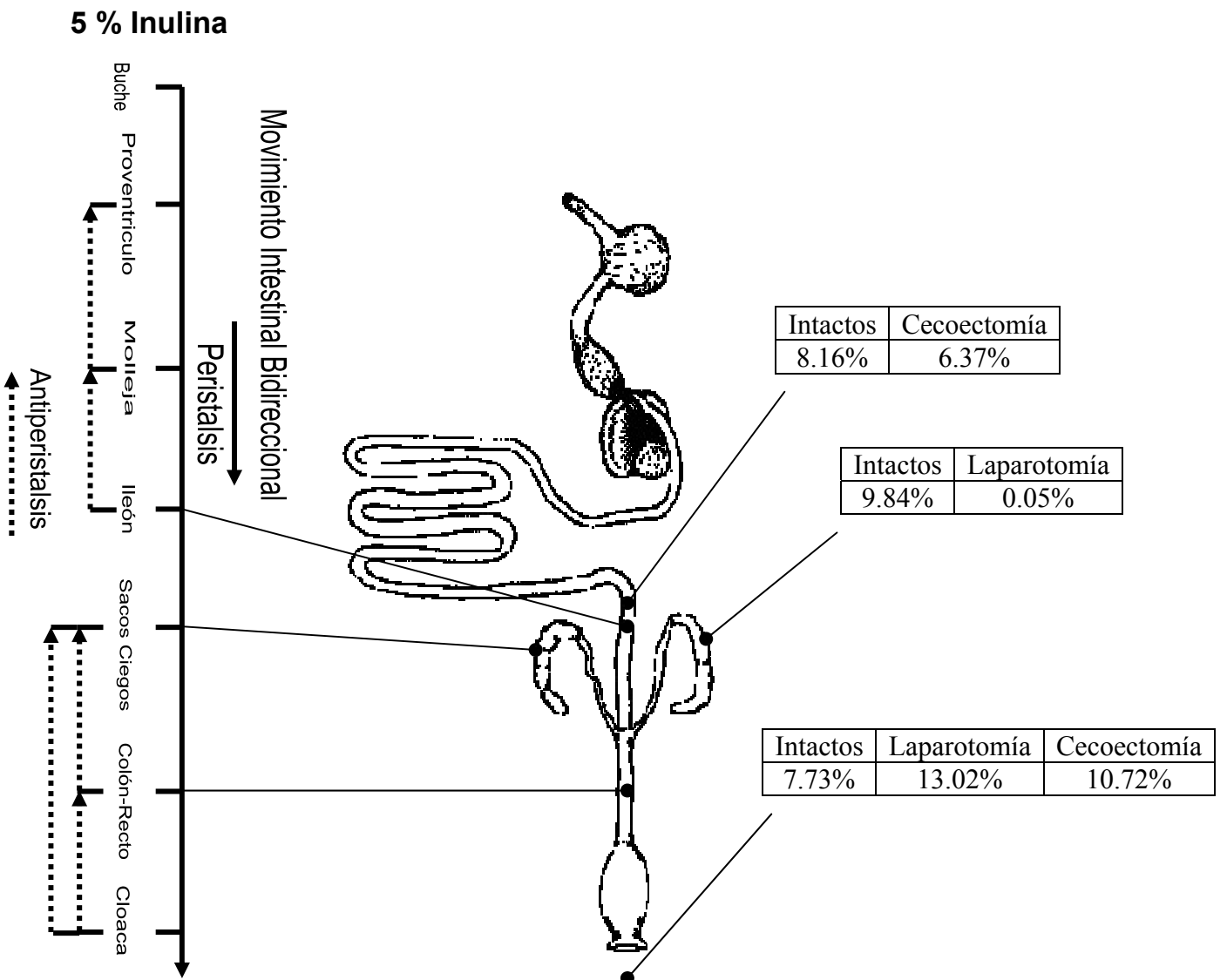
**Figura 7.** Algunos ejemplos de diversas moléculas de fructanos estructurales encontrados en las plantas. A, el trisacarido 1-cestosa consiste en una unidad de sucrosa con un enlace  $\beta$ -D-fructosil (2-1) y es la molécula más corta de la inulina. B, la bifurcosa del tetrasacarido es un ejemplo de un levano de tipo mixto y consiste en una unidad de sucrosa con un enlace  $\beta$ -D-fructosil (2-1) y (2-6). C, Neocestosa es la molécula más pequeña de las neoserias de la inulina, y en esta molécula una unidad del  $\beta$ -D-fructosil se liga al C6 del grupo químico de glucosa de la sucrosa. Los números cercados en negro representan los números de los átomos de carbono en las moléculas del azúcar<sup>137</sup>.



**Figura 8: Estructura química de sucrosa (GF) y FOS (GF<sub>n</sub> y F<sub>m</sub>). G = glucosil; F = fructosil; n o m indican el número de moléculas de fructosa en las moléculas. Cadenas cortas de FOS son conocidas como oligofruktosa (n = 4.8 en promedio, máximo = 9), y cadenas medianas como inulina (n = 12 en promedio, máximo = 60)<sup>153</sup>.**



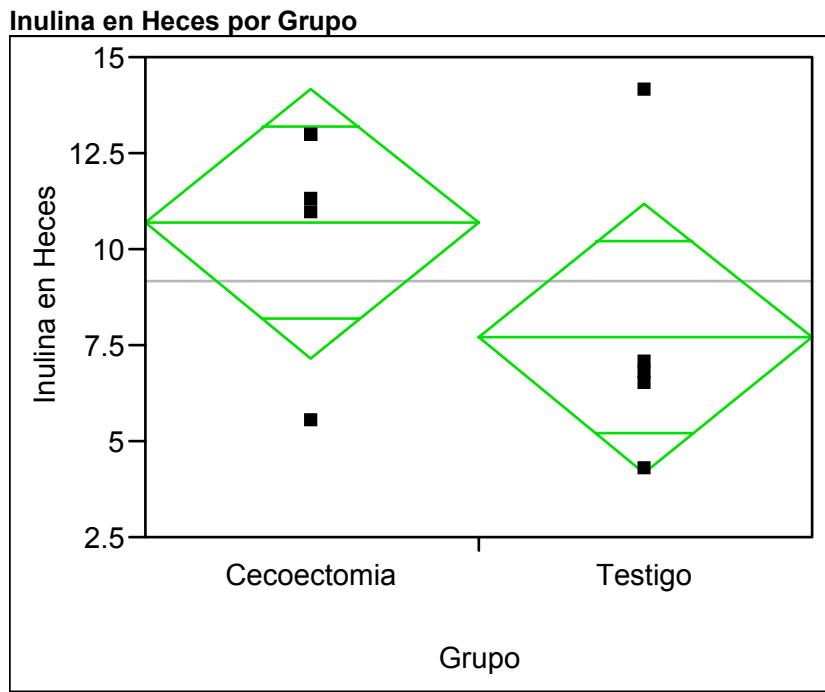
**Figura 9. Planta de achicoria (*Cichorium intybus*).**



**Figura 10. Movimientos intestinales y cuantificación porcentual de inulina a través de HPLC por sección intestinal.**



Figura 11.



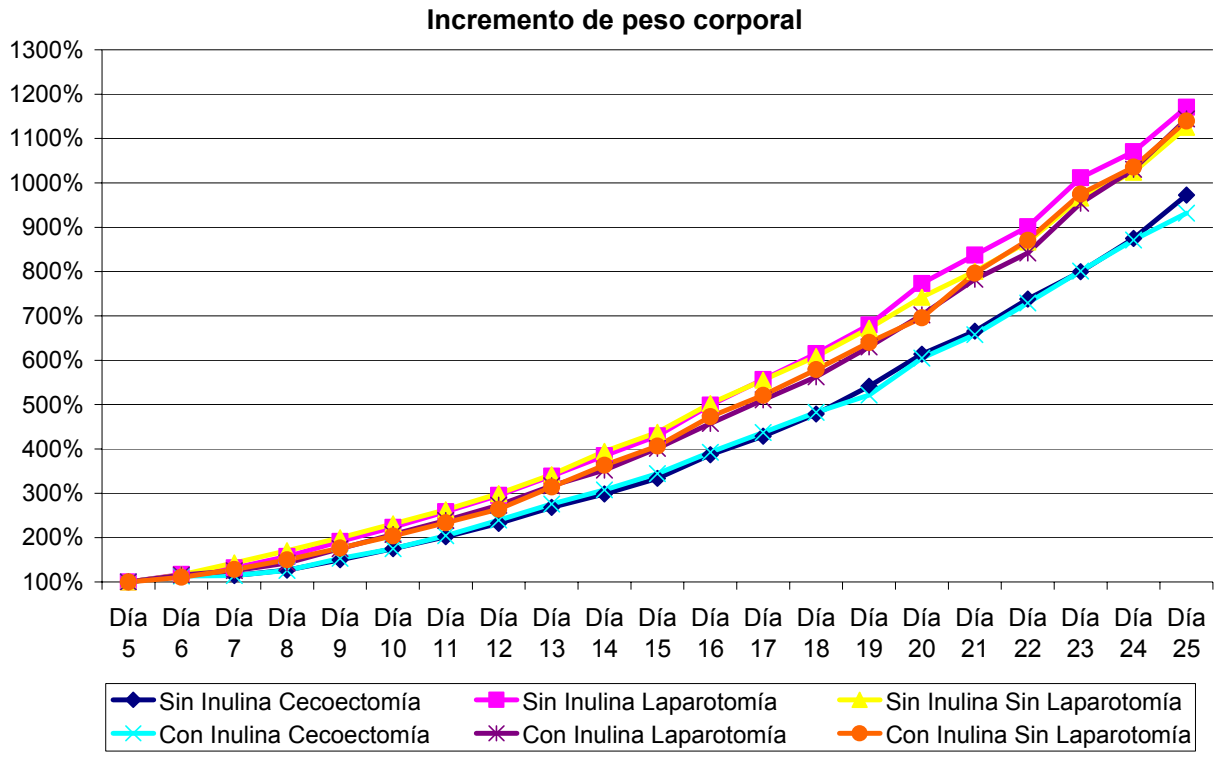
**Wilcoxon / Kruskal-Wallis Tests (Suma de los Rangos)**

Nivel	Cuenta	Suma	Media	(Media-Media 0)/Std0
Cecoectomia	5	32	6.40000	0.836
Testigo	5	23	4.60000	-0.836

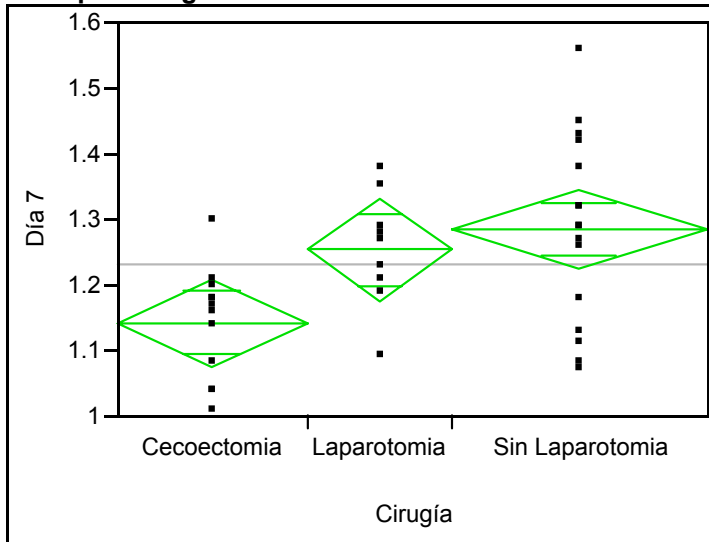
**Aproximación Xi cuadrada**

Xi Cuadrada	GL	Prob>Xi Cuadrada
0.8836	1	0.3472

Figura 12



**Figura 13. Grupos con inulina**  
**Día 7 por Cirugía**



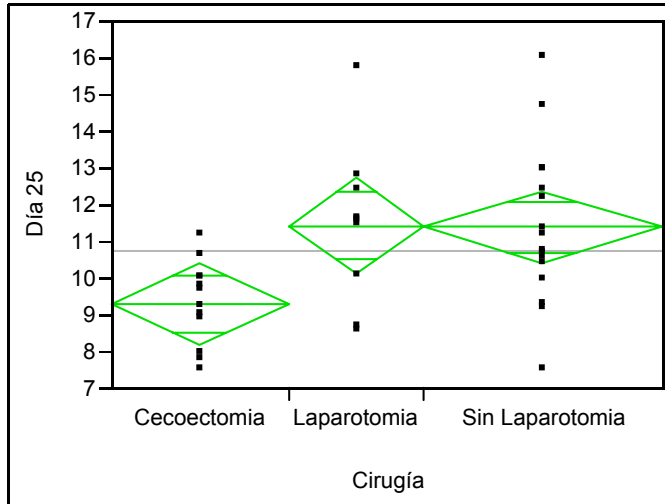
**Wilcoxon / Kruskal-Wallis (Suma de los Rangos)**

Nivel	Cuenta	Suma	Media	(Media-Media0)/Std0
Cecoectomía	12	136	11.3333	-2.971
Laparotomía	9	197.5	21.9444	0.921
Sin Laparotomía	16	369.5	23.0938	1.994

**Aproximación Xi cuadrada**

Xi Cuadrada	GL	Prob>Xi Cuadrada
8.9893	2	0.0112

**Figura 14. Grupos con inulina  
Día 25 por Cirugía**



**Wilcoxon / Kruskal-Wallis (Suma de los Rangos)**

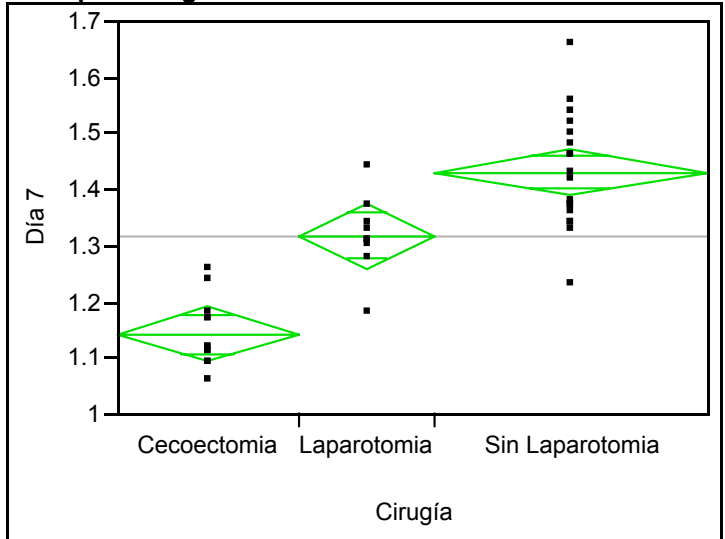
Nivel	Cuenta	Suma	Media	(Media-Media0)/Std0
Cecoectomía	12	133	11.0833	-3.066
Laparotomía	9	207.5	23.0556	1.274
Sin Laparotomía	16	362.5	22.6563	1.778

**Aproximación Xi cuadrada**

Xi Cuadrada	GL	Prob>Xi Cuadrada
9.5090	2	0.0086

Figura 15. Grupos sin inulina

Día 7 por Cirugía



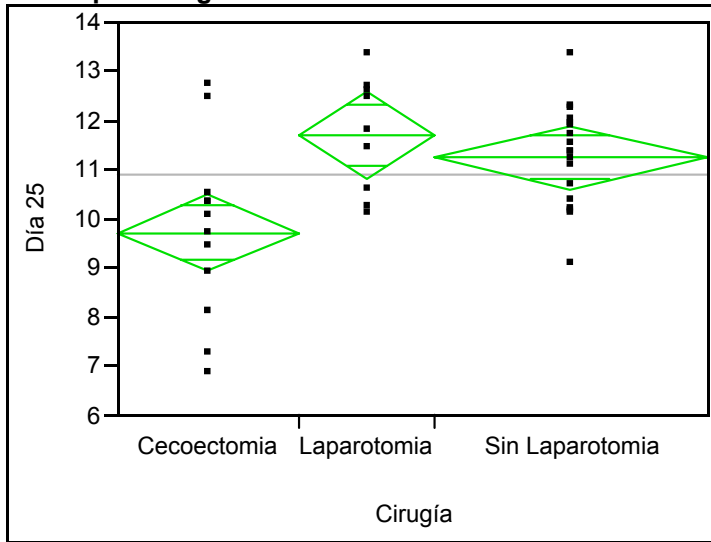
**Wilcoxon / Kruskal-Wallis (Suma de los Rangos)**

Nivel	Cuenta	Suma	Media	(Media-Media0)/Std0
Cecoectomía	12	82.5	6.8750	-4.781
Laparotomía	9	175	19.4444	-0.150
Sin Laparotomía	18	522.5	29.0278	4.568

**Aproximación Xi cuadrada**

Xi Cuadrada	GL	Prob>Xi Cuadrada
27.2517	2	<.0001

Figura 16. Grupos sin inulina  
 Día 25 por Cirugía



**Wilcoxon / Kruskal-Wallis (Suma de los Rangos)**

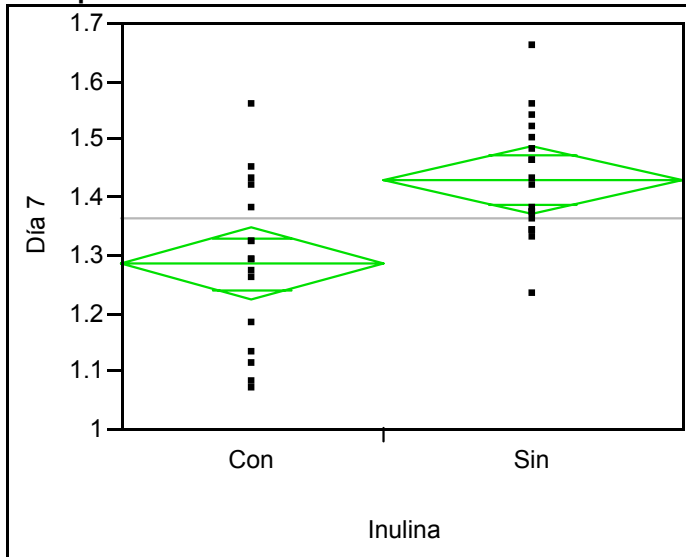
Nivel	Cuenta	Suma	Media
Cecoectomía	12	147	12.2500
Laparotomía	9	234.5	26.0556
Sin Laparotomía	18	398.5	22.1389

(Media-Media0)/Std0
-2.815
1.800
1.071

**Aproximación Xi cuadrada**

Xi Cuadrada	GL	Prob>Xi Cuadrada
8.7172	2	0.0128

Figura 17. Grupos sin laparotomía  
 Día 7 por Inulina



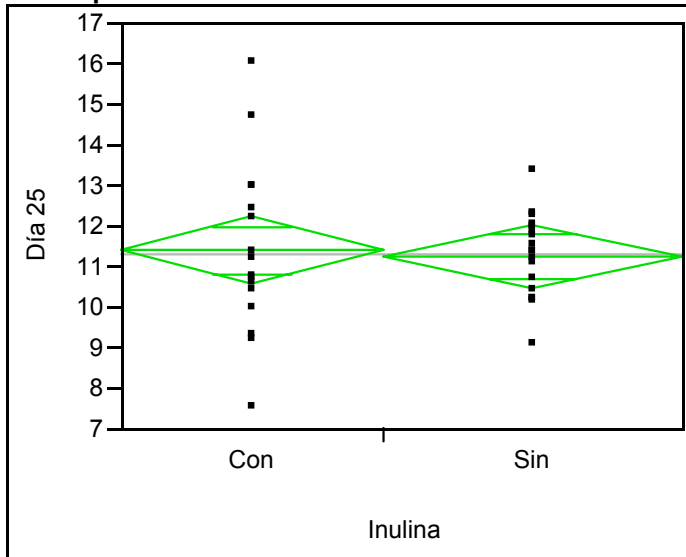
**Wilcoxon / Kruskal-Wallis (Suma de los Rangos)**

Nivel	Cuenta	Suma	Media	(Media-Media0)/Std0
Con	16	194	12.1250	-2.952
Sin	18	401	22.2778	2.952

**Aproximación Xi cuadrada**

Xi Cuadrada	GL	Prob>Xi Cuadrada
8.8169	1	0.0030

Figura 18. Grupos sin laparotomía  
 Día 25 por Inulina



**Wilcoxon / Kruskal-Wallis (Suma de los Rangos)**

Nivel	Cuenta	Suma	Media	(Media-Media0)/Std0
Con	16	280	17.5000	0.000
Sin	18	315	17.5000	0.000

**Aproximación Xi cuadrada**

Xi Cuadrada	GL	Prob>Xi Cuadrada
0.0000	1	1.0000



## CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de los carbohidratos que no son digeribles por las enzimas endógenas de los no rumiantes<sup>64,58</sup>.

Categoría	Residuos Monoméricos	Fuente
<b>Polisacáridos (Fibra Dietética)</b>		
<b>Almidón Resistente</b>		
Almidón físicamente inaccesible (RS1)	Glucosa	Granos y semillas parcialmente molidos
Gránulos de almidón resistentes	Glucosa	Papa cruda, plátano
Almidón de retrogradación	Glucosa	Productos de almidón con tratamiento térmico
<b>Polisacáridos no amiláceos (PNA)</b>	Glucosa	
Pared celular (PNA)	Glucosa	
Celulosa	Glucosa	la mayoría de los cereales y las legumbres
Mezcla de enlaces $\beta$ -glucanos	Glucosa	Cebada, avena, arroz
Arabinogilanos	Xilosa y arabinosa	Arroz, trigo, cebada
Arabinogalactanos	Galactosa, arabinosa	Co producto de cereales
Xiloglucanos	Glucosa y xilosa	Harinas de cereal
Ramnogalacturanos	Ácidos urónicos, ramnosa	Cascarilla de chícharo
Galactanos	Galactosa	Harina de frijol de soya, de pulpa de remolacha
<b>PNA que no son paredes celulares</b>		
Fructanos	Fructosa	Arroz
Mananos	Manosa	Pasta de coco, pasta de palma
Pectinas	Ácidos urónico, Ramnosa	Manzana, pulpa de remolacha
Galactomananos	Galactosa, manosa	Goma arábiga
<b>Oligosacáridos (Prebióticos)</b>		
$\alpha$ -Galacto-oligosacáridos	Galactosa, glucosa, fructosa	Harina soya, chícharo, harina de nabo
Fructo-oligosacáridos	Fructosa, glucosa	Cereales, aditivos alimenticios, alcachofa de Jerusalén, raíces de achicoria
Transgalacto-oligosacáridos	Galactosa, glucosa	Aditivos alimenticios, productos lácteos

**Cuadro 2. Fuentes de carbono y nitrógeno utilizados por las bacterias anaeróbicas de los sacos ciegos del pollo<sup>37</sup>.**

Bacteria	Fuentes de carbono utilizado				
	Glucosa	Lactosa	Lactato	Amoniaco	Ácido Úrico
<i>Coprococcus/Streptococcus/Peptostreptococcus</i>	+	+	-	+	+
<i>Bacteroides</i> spp.	+	+	-	+	+
<i>Fusobacterium</i> spp	+	-	-	+	+
<i>Megamonas</i> spp.	+	+	+	ND	-
<i>Bifidobacterium</i> spp.	+	+	-	ND	-
<i>Clostridium</i> spp.	+	+	-	+	+
<i>Eubacterium</i> spp.	+	-	+	+	+
<i>Gemmiger</i> spp.	+	-	+	+	-

Reacción positiva (+); Reacción negativa (-); ND, no determinado. A 50% o más de las cepas probadas dieron la reacción que se muestra.

**Cuadro 3. Concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y valores de pH en el contenido cecal aviar (Modificado de: Jamroz et al., 1998<sup>120</sup>)**

Especie	pH del contenido cecal	Concentración Total de AGCC
Pollo	5.65–7.8	107–185 mmol/kg

**Cuadro 4. Contenido de inulina y oligofruetosa (en % de materia húmeda) en plantas que son comúnmente utilizadas en la nutrición humana<sup>157</sup> (Coussement, 1995).**

<b>Fuente</b>	<b>Parte comestible</b>	<b>% contenido de sólidos secos</b>	<b>% contenido de inulina</b>	<b>% contenido de oligofruetosa</b>
Cebolla	Bulbo	6-12	2-6	2-6
Alcachofa de Jerusalén	Tubérculo	19-23	16-20	10-15
Achicoria	Raíz	20-25	15-20	5-10
Puerro	Bulbo	15-20	3-10	2-5
Ajo	Bulbo	40-45	9-16	3-6
Alcachofa	Hojas-corazón	14-16	3-10	<1
Plátano	Fruta	24-26	0.3-0.7	0.3-0.7
Arroz	Cereal	88-90	0.5-1	0.5-1
Cebada	Cereal	NA	0.5-1.5	0.5-1.5
Diente de león	Hojas	50-55	12-15	NA
Bardana	Raíz	21-25	3.5-4.0	NA
Camasia	Bulbo	31-50	12-22	NA
Murnong	Raíz	25-28	8-13	NA
Yacon	Raíz	13-31	3-19	3-19
Salsifí	Raíz	20-22	4-11	4-11
Trigo	Cereal	88-90	1-4	1-4

**Cuadro 5. Dieta basal para el experimento con inulina en pollos de engorda**

<b>INGREDIENTE</b>	<b>Iniciador 0 a 25 días</b>
	<b>Kg</b>
Maíz amarillo	497.002
Soya solv. 48%	373.513
Inulina	50.0
Aceite vegetal	40.197
Carbonato de calcio	15.329
Ortofosfato 1820	14.111
Sal	4.146
Minerales*	1.0
Vitaminas pollo*	2.5
Metionina 98	2.052
Cloruro de colina 60%	1.0
Antioxidante	0.15
<b>Total</b>	<b>1000</b>

**ANÁLISIS CALCULADO**

<b>NUTRIMENTO</b>		<b>INICIADOR</b>
Proteína Cruda	%	22.00
E. M aves Kcal/ kg	%	3000
Lisina	%	1.20
Metionina	%	0.50
Metionina + Cistina	%	0.90
Treonina	%	0.80
Calcio total	%	0.90
Fosforo disponible	%	0.40
Sodio	%	0.182

\* Premezcla de vitaminas y minerales: Vitamina A, 12 000 000.0 UI; Vitamina D3, 250 000.0 UI; Vitamina E, 15 000.0 UI; Vitamina K3 2.0g; Riboflavina, 4.0; Niacina 45.0g, D pantotenato de calcio, 13.0g; Vitamina B12, 20.0mg; cloruro de colina, 250.0g; B.T.H., 40.0; vehículo c.b.p., 2 500.0g; Selenio, 0.200g; Cobalto, 0.200g; Yodo, 0.300g; Cobre, 12.00g; Zinc, 50.0g; Hierro, 50.0g; Manganeso, 100.0 g; Excipiente c.b.p., 1

**Cuadro 6. Muestras analizadas para la determinación de inulina a través de HPLC, Laboratorio Orafti, Tienen, Bélgica. Resultados porcentuales.**

Cirugía	Muestra	Enviada	Analizada	* HPLC Promedio	* HPLC Limite Inf	* HPLC Limite Sup	DE
Laparotomía	Prececal	5	0	NA	NA	NA	NA
Cecoectomía	Prececal	4	3	6.37	5.76	6.93	0.59
Sin Laparotomía	Prececal	6	3	8.16	5.96	11.77	3.15
Laparotomía	Cecal	3	3	0.05	0.02	0.11	0.06
Sin Laparotomía	Cecal	7	3	9.84	0.09	29.26	16.82
Cecoectomía	Poscecal	5	5	10.72	5.55	12.95	3.04
Laparotomía	Poscecal	3	1	13.02			
Sin Laparotomía	Poscecal	5	5	7.73	4.29	14.12	3.73
	Total	38	23				

NA = No Analizado; DE= Desviación Estándar; \* % de inulina cuantificada

## REFERENCIAS

1. Józefiak D, Rutkowski A, Martin SA. Carbohydrate fermentation in the avian ceca: a review. *Anim Feed Sci Technol* 2004;113:1-15.
2. McLelland J. Anatomy of the avian cecum. *J Exp Zool* 1989;Suppl 3:2-9.
3. Clarke PL. The structure of the ileo-caeco-colic junction of domestic fowl (*Gallus gallus*). *Br Poult Sci* 1978;19:595-600.
4. Whittow CG: *Sturkie's Avian Physiology*. 5th Ed., 2000, Carolina: Academic Press.
5. Herpol C, van Grembergen G. La signification du pH dans le tube digestif de *Gallus domesticus*. *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 1967;7:33-38.
6. Sudo SZ, Duke GE. Kinetics of absorption of volatile fatty acids from the ceca of domestic turkeys. *Comp Biochem Physiol A*. 1980;67:231-237.
7. Shires A, Thompson JR, Turner BV, Kennedy PM, Goh YK. Rate of passage of corn-canola meal and corn-soybean meal diets through the gastrointestinal tract of broiler and White Leghorn chickens. *Poult Sci* 1987;66:289-298.
8. Savory CJ, Mitchel MA. Absorption of hexose and pentose sugars *in vivo* in perfused intestinal segments in the fowl. *Comp Biochem Physiol A* 1991;100:969-974.
9. Planas JM, Villá MC, Ferrer R, Moretó M. Hexose transport by chicken cecum during development. *Pfluegers Arch* 1986; 407:216-220.
10. Vinardell MP, Lopera MT. Jejunal and cecal 3-oxymethyl-D-glucose absorption in chicken using a perfusion system *in vivo*. *Comp Biochem Physiol A* 1987;86:625-627.
11. Obst BS, Diamond JM. Interspecific variation in sugar and amino acid transport by the avian cecum. *J Exp Zool* 1989;3 (Suppl.)117-126.
12. Moretó M, Amat C, Puchal A, Buddington RK, Planas JM. Transport of L-proline and  $\alpha$ -methyl-D-glucoside by chicken proximal cecum during development. *Am J Physiol* 1991;260:G457-G463.
13. Jorgensen H, Zhao XQ, Knudsen KE, Eggum BO. The influence of dietary fibre source and level on the development of the gastrointestinal tract\*

digestibility and energy metabolism in broiler chickens. *Br J Nutr* 1996;75:379–395.

14. Jamroz D, Jakobsen K, Bach Knudsen KE, Wilczkiewicz A, Orda J. Digestibility and energy value of the non-starch polysaccharides in young chickens, ducks and geese, fed diets containing high amounts of barley. *Comp Bioch Physiol: A* 2002;131:657–668.
15. McNab JM. The avian ceca: a review. *Wld's Poult Sci J* 1973;29, 251–263.
16. Son JH, Ragland D, Adeola O. Quantification of digesta flow into the caeca. *Br Poult Sci* 2002;43:322–324.
17. Coates ME, Ford JE, Harrison GF. Intestinal synthesis of vitamins of the B complex in chicks. *Br J Nutr* 1968;22:493–498.
18. Heard GS, Annison EF. Gastrointestinal absorption of vitamin B-6 in the chicken (*Gallus domesticus*). *J Nutr* 1986;116:107-120.
19. Tortuero F, Brenas A, Riperez J. The influence of intestinal (ceca) flora on serum and egg yolk cholesterol levels in laying hens. *Poult Sci* 1975;54:1935–1938.
20. Goldstein DL. Absorption by the cecum of wild birds: is there interspecific variation. *J. Exp. Zool.* 1989;Suppl. 3:103–110.
21. Braun EJ, Campbell CE. Uric acid decomposition in the lower gastrointestinal tract. *J Exp Zool* 1989; Suppl. 3:70-74.
22. Knarreborg A, Simon MA, Engberg RM, Jensen BB, Tannock GW. Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:5918–5924.
23. Engberg RM, Hedemann MS, Jensen BB. The influence of grinding and pelleting of feed on the microbial composition and activity in the digestive tract of broiler chickens. *Brit Poult Sci* 2002;44:569-579.
24. Netherwood T, Gilbert HJ, Parker DS, O'Donnell AG. Probiotics shown to change bacterial community structure in the avian gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:5134–5138.
25. Xu ZR, Hu CH, Xia MS, Zhan XA, Wang MQ. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. *Poult Sci* 2003; 82:1030–1036.

26. van der Wielen PW, Keuzenkamp DA, Lipman LJ, van Knapen F, Biesterveld S. Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial community in commercially raised broiler chickens during growth. *Microb Ecol.* 2002 Oct;44(3):286-93.
27. Zhu XY, Zhong T, Pandya Y, Joerger RD. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68:124–137.
28. Servin AL. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 2004;28(4):405-440.
29. Schiffrin EJ, Blum S. Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56(Suppl 3): S60 – S64.
30. Rahner R. Bakteriologische Mitteilungen ueber die Darmbakterien der Huehner. *Zentbl Bakteriol Parasitenkd* 1901; 80:239–244.
31. Shapiro SK, Sarles WB. Microorganisms in the intestinal tract of normal chickens. *J Bacteriol* 1949;58:531–544.
32. Barnes, EM, Mead GC, Barnum DA, Harry EG. The intestinal flora of the chicken in the period 2–6 weeks of age, with particular reference to the anaerobic bacteria. *Br Poult Sci* 1972;13:311–326.
33. Barnes, EM, Mead GC, Griffiths NM. The microbiology and sensory evaluation of pheasants hung at 5, 10, and 15 degrees C. *Br Poult Sci* 1973;14:229–240.
34. Barnes EM. The intestinal microflora of poultry and game birds during life and after storage. *J Appl Bacteriol* 1979;46: 407–419.
35. Mead GC, Adams BW. Some observations on the caecal microflora of the chick during the first two weeks of life. *Br Poult Sci* 1975;16:169–176.
36. Salanitro JP, Fairchild IG, Zgornicki YD. Isolation, culture characteristics, and identification of anaerobic bacteria from the chicken cecum. *Appl Microbiol* 1974;27:678–687.
37. Mead, GC. Bacteria in the gastrointestinal tract of birds, p. 216–242. In: Mackie RI, White BA, Isaacson RE. (Eds.), *Gastrointestinal Microbiology, Gastrointestinal Microbes and Host Interactions.* vol. 2. 1997. Chapman & Hall Microbiology Series, New York, N.Y.



38. Mead GC. Microbes of the avian cecum: types present and substrates utilized. *J Exp Zool* 1989; Suppl.;3:48–55.
39. Nurmi E, Rantala M. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature* 1973; 241:210–211.
40. Vispo C, Karasov WH. 1997. The interaction of avian gut microbes and their host: an elusive symbiosis. In: Mackie, R., White, B.A. (Eds.), *Gastrointestinal Microbiology, Gastrointestinal Ecosystems and Fermentations*. Chapman and Hall Microbiology Series. pp. 116–156.
41. Barrow, P. 1992. Probiotic for chickens. Pages 225–257 in *Probiotics, the Scientific Basis*. Fuller R, ed. Chapman and Hall, London.
42. Lev, M., and C. A. E. Briggs. The gut flora of the chicks. 1. The flora of newly hatched chicks. *J Appl Bacteriol* 1956;19:36–38.
43. van der Wielen, PW, Biesterveld S, Lipman LJA, van Knapen F. Inhibition of a glucose-limited sequencing fed-batch culture of *Salmonella enterica* Serovar *Enteritidis* by volatile fatty representative of the ceca of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:1979–1982.
44. Langendijk, PS, Schut F, Jansen GJ, Raangs GC, Kamphuis GR, Wilkinson MH, Welling GW. Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:3069–3075.
45. Lu J, Idris U, Harmon B, Hofacre C, Maurer JJ, Lee MD. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Appl Environ Microbiol* 2003;69(11):6816-24.
46. Barrow PA, Huggins MB, Lovell M A, Simpson JM. Observation on the pathogenicity of experimental *Salmonella typhimurium* infection in chickens. *Res Vet Sci* 1987; 42:194–199.
47. Doyle MP. Colonization of chicks by *Campylobacter jejuni*. In L. C. Blankenship (ed.). *Colonization control of human bacterial enteropathogens in poultry*. 1991. Academic Press, Inc.
48. Duchet-Suchaux M, Lechopier P, Marly J, Bernadet P, Delaunay R, Pardon P. Quantification of experimental *Salmonella enteritidis* carrier state in B13 leghorn chicks. *Avian Dis* 1995;39:796–803.
49. Milner KC, Schaffer MF. Bacteriological studies of experimental *Salmonella* infections in chicks. *J Infect Dis* 1952;90:81–96.

50. Amit-Romach E, Sklan D, Uni Z. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. *Poultry Science* 2004;83:1093–1098.
51. Petr J, Rada V. Bifidobacteria are obligate inhabitants of the crop of adult laying hens. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2001;48(3):227-33.
52. Guan LL, Hagen KE, Tannock GW, Korver DR, Fassenko GM, GE Allison. Detection and identification of *Lactobacillus* species in crops of broilers of different ages by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(11):6750–6757.
53. Montagne L, Pluske JR, Hampson DJ. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Anim Feed Sci Technol* 2003; 108 95–117.
54. Conway PL, 1994. Function and regulation of the gastrointestinal microbiota of the pig. In: Souffrant WB, Hagemester H. (Eds.), *Proceedings of the VI<sup>th</sup> International Symposium on Digestive Physiology in Pigs*. EAAP Publication no. 80, Dummerstorf, pp. 231–240.
55. Van Dijk JE, Mouwen JM, Koninkx JF. Review on histology and absorptive capacity of the gastro-intestinal epithelium. In: Jansman AJM, Huisman, J. (Eds.), *Nutrition and Gastrointestinal Physiology—Today and Tomorrow*. TNO, Wageningen, 1999, pp. 1–8.
56. Trowell H, Southgate DA, Wolever TM, Leeds AR, Gassull MA, Jenkins DJ. Letter: dietary fibre refined. *Lancet* 1976;1:967.
57. Englyst HN, Cummings JH. Digestion of the polysaccharides of some cereal foods in the human small intestine. *Am J Clin Nutr* 1985;44:42–50.
58. Englyst HN, Kingman SM, Cumming JH. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *Eur J Clin Nutr* 1992;46:33–50.
59. Englyst HN. Classification and measurements of plant polysaccharides. *Anim Feed Sci Technol* 1989;23:27–42.
60. Van Soest PJ, Wine RH. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. Determination of plant cell-wall constituents. *J Assoc Anal Chem* 1967;50:50–55.

61. Moore WEC, Moore LVH, Cato EP, Wilkins TD, Kornega ET. Effect of high-fiber and high-oil diets on the faecal flora of swine. *Appl Environ Microb* 1987;53: 638–644.
62. Pryde, SE, Richardson AJ, Stewart CS, Flint HJ, Molecular analysis of the microbial diversity present in the colonic wall, colonic lumen, and caecal lumen of a pig. *Appl Environ Microb* 1999;65: 5372–5377.
63. Leser TD, Amenuvor JZ, Jensen TK, Lindecrona RH, Boye M, Moller K. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl Environ Microb* 2002;68:673–690.
64. Bach Knudsen KE. Carbohydrates and lignin contents of plant materials used in animal feeding. *Anim Feed Sci Technol* 1997;67:319–338.
65. Argenzio RA, Southworth K. Analysis of starch and other main constituents of cereal grains. *Swed. J Agric Res* 1974;14, 135–139.
66. Von Engelhardt W, Rönnau K, Rechkemmer G, Sakata T. Absorption of short-chain fatty acids and their role in the hindgut of monogastric animals. *Anim Feed Sci Technol* 1989;23:43–53.
67. Sakata T, Inagaki A. 2001. Organic acid production in the large intestine: implication for epithelial cell proliferation and cell death. Piva A, Bach Knudsen KE, Lindberg JE. (Eds.), *The Gut Environment of Pigs*. Nottingham University Press, Nottingham, pp. 85–94.
68. Roediger, WEW. Utilisation of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. *Gastroenterology* 1982;83, 424–429.
69. Démigné C, Rémésy C. Stimulation of absorption of volatile fatty acids and mineral in the caecum of rats adapted to a very high fiber diet. *J Nutr* 1985;123:234–243.
70. Rérat A, Fizlewicz M, Giusi A, Vaugelade P. Influence of meal frequency on postprandial variations in the production and absorption of volatile fatty acids in the digestive tract of conscious pigs. *J Anim Sci* 1987;64:448–456.
71. Dierick NA, Vervaeke IJ, Demeyer DI, Decuypere JA. Approach to the energetic importance of fibre digestion in pigs. 1. Importance of fermentation in the overall energy supply. *Anim Feed Sci Technol* 1989;23,141–167.
72. Yen JT, Nienaber JA, Hill DA, Pond WG. Potential contribution of absorbed volatile fatty acids to whole-animal energy requirement in conscious swine. *J Anim Sci* 1991;69:2001–2012.

73. McBurney MI, Sauer WC. Fiber and large bowel energy absorption: validation of the integrated ileostomy-fermentation model using pigs. *J Nutr* 1993;123:721–727.
74. Nordgaard I, Mortensen PB. Digestive processes in the human colon. *Nutrition* 1995;11:37–45.
75. Sakata T. Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors. *Br J Nutr* 1987;58:95–103.
76. Roediger WEW, Moore A. Effect of short chain fatty acids on sodium absorption in isolated human colon perturbed through the vascular bed. *Digest Dis Sci* 1981;26, 100–106.
77. Hentges DJ. 1992. Gut flora and disease resistance. In: Fuller, R. (Ed.), *Probiotics: The Scientific Basis*. Chapman and Hall, London, pp. 87–110.
78. Prohaska L. Antibacterial mechanism of volatile fatty acids in the intestinal tract of pigs against *Escherichia coli*. *Zentralbl Veterinärmed Reihe B* 1986;33:166–173.
79. May T, Mackie RI, Fahey GC, Cremin JC, Garleb KA. Effect of fiber source on short-chain fatty acid production and on the growth and toxin production by *Clostridium difficile*. *Scand J Gastroenterol* 1994;29:916–922.
80. Prohaska L. Antibacterial effect of volatile fatty acids in enteric *E. coli* infections of rabbits. *Zentralbl Veterinärmed Reihe B* 1980;27:631–639.
81. Mathers JC. Digestion of non-starch polysaccharides by non-ruminant omnivores. *Proc Nutr Soc* 1991;50:161–172.
82. Bach Knudsen KE, Hansen I. Gastrointestinal implications in pigs of wheat and oat fractions. 1. Digestibility and bulking properties of polysaccharides and other major constituents. *Br J Nutr* 1991;65:217–232.
83. Macfarlane GT, Cummings, JH. 1991. The colonic flora, fermentation, and large bowel digestive function. In: Phillips, SF, Pemberton JH, Shorter RG. (Eds.), *The Large Intestine: Physiology, Pathophysiology and Disease*. Raven Press, New York, pp. 51–92.
84. Jensen BB. The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. *J. Anim. Feed Sci.* 1998;7:45–6.

85. Jensen BB. 2001. Possible ways of modifying type and amount of products from microbial fermentation in the gut. In: Piva A, Bach Knudsen KE, Lindberg JE. (Eds.), *Gut Environment of Pigs*. Nottingham University Press, Nottingham, pp. 181–200.
86. Houdijk JGM, Bosch MW, Tamminga S, Verstegen MWA, Berenpas EB, Knoop H. Apparent ileal and total-tract nutrient digestion by pigs as affected by dietary nondigestible oligosaccharides. *J Anim Sci* 1999;77:148–158.
87. Williams BA, Verstegen MWA, Tamminga S. Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nutr Res Rev* 2001;4:207–227.
88. Bach Knudsen KE, Jorgensen H. 2001. Intestinal degradation of dietary carbohydrates—from birth to maturity. In: Lindberg JE, Ogle B. (Eds.), *Digestive Physiology of Pigs*. CABI publishing, Wallingford, pp. 109–120.
89. Nyman M, Asp NG, Cumming J, Wiggins H. Fermentation of dietary fibre in the intestinal tract: comparison between man and rat. *Br J Nutr* 1986;55:487–496.
90. Wenk C. The role of dietary fibre in the digestive physiology of the pig. *Anim Feed Sci Technol*. 2001;90:21–33.
91. Fernandez JA, Jorgensen JN, Just A. Comparative digestibility experiments with growing pigs and adult sows. *Anim Prod* 1986;43:127–132.
92. Shi XS, Noblet J. Contribution of the hindgut to digestion of diets in growing pigs and adult sow: effect of diet composition. *Livest Prod Sci* 1993;38:225–235.
93. Stephen AM. Whole grains—impact of consuming whole grains on physiological effects of dietary fiber and starch. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1994;34:499–511.
94. Low, AG. 1985. Role of dietary fibre in pig diet. In: Haresign, W., Cole, D.J.A. (Eds.), *Recent Advances in Animal Nutrition*. Butterworths, London, pp. 87–112.
95. Nyachoti CM, De Lange CFM, MacBride BW, Schulze H. Significance of endogenous gut nitrogen losses in the nutrition of growing pigs: a review. *Can J Anim Sci* 1997;77, 149–163.

96. Gdala J. Composition properties and nutritive value of dietary fibre of legume seeds. A review. *J Anim Feed Sci* 1998;7:131–149.
97. Pluske JR, Kim JC, McDonald DE, Pethick DW, Hampson DJ. 2001. Non-starch polysaccharides in the diets of young weaned piglets. In: Varley MA, Wiseman J. (Eds.), *The Weaner Pig: Nutrition and Management*. CABI publishing, Wallingford, pp. 81–112.
98. Annison G. Commercial enzyme supplementation of wheat-based diets raises ileal glycanase activities and improves apparent metabolisable energy, starch and pentosan digestibilities in broiler chickens. *Anim Feed Sci Technol* 1990;38, 105–121.
99. Choct M, Annison G. Anti-nutritive activity of wheat pentosans in broiler diets. *Br Poult Sci*. 1990 Dec;31(4):811-21.
100. Nordgaard I, Mortensen PB. Digestive processes in the human colon. *Nutrition* 1995;11:37–45.
101. Mosenthin R, Hambrecht E, Sauer WC, 1999. Utilisation of different fibres in piglets feeds. In: Garnsworthy PC, Wiseman J. (Eds.), *Recent Advances in Animal Nutrition*. Nottingham University Press, Nottingham, pp. 227–256.
102. Eggum BO. The influence of dietary fibre on protein digestion and utilisation in monogastrics. *Arch Tierzucht* 1995;48:89–95.
103. Souffrant WB. Effect of dietary fibre on ileal digestibility and endogenous nitrogen losses in the pig. *Anim Feed Sci Technol* 2001;90, 93–102.
104. Blaak EE, Saris WHM. Health aspects of various digestible carbohydrates. *Nutr Res* 1995;15, 1547–1573.
105. Potty VH. Physico-chemical aspects, physiological functions, nutritional importance and technological significance of dietary fibres—a critical appraisal. *J Food Sci Technol* 1996;33:1–18.
106. Goodlad, RA. Dietary fibre and the risk of colorectal cancer. *Gut* 2001;48:587–589.
107. Meunier-Salaun MC. 1999. Fibre in diets of sows. In: Garnsworthy PC, Wiseman J. (Eds.), *Recent Advances in Animal Nutrition*. Nottingham University Press, Nottingham, pp. 257–273.

108. Bach Knudsen KE. The nutritional significance of “dietary fibre” analysis. *Anim Feed Sci Technol* 2001;90, 3–20.
109. Cummings JH, Macfarlane GT. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *J Parenter Enteral Nutr* 1997;21, 357–365.
110. Cook, SI, Sellin JH. Review article: short-chain fatty acids in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1998;12;499–507.
111. Prosky L. When is dietary fibre considered a functional food? *Biofactors* 2000;12:289–297.
112. AOAC, 1990. Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 15th ed. Arlington, VA.
113. Annison G, Choct M. Anti-nutritive activities of cereal non-starch polysaccharides in broiler diets and strategic minimizing their effect. *Wld’s Poult Sci J* 1991;73:1433–1440.
114. Bedford MR, Morgan, AJ. The use of enzymes in poultry diets. *Wld’s Poult Sci J* 1996;52:61–69.
115. Smith CHM, Annison G. Non-starch plant polysaccharides in broiler nutrition-towards a physiologically valid approach to their determination. *Wld’s Poult Sci J* 1996;52:203–221.
116. Ikeda K, Kusano K. In vitro inhibition of digestive enzymes by indigestible polysaccharides. *Cereal Chem* 1983;60:260–263.
117. Ikegami S, Tsuchihashi F, Harada H, Tsuchinashi N, Nishide E, Innami S. Effect of viscous indigestible polysaccharides on pancreatic-biliary secretion and digestive organs in rats. *J Nutr* 1990;120, 353– 360.
118. Pinchasov Y, Elmaliyah S. Broiler chicken responses to anorectic agents. Part 1. Dietary acetic and proponic acids and propionic acids and the digestive system. *Poult Sci* 1994;73:648–652.
119. Marounek M, Rada V, Benda V. Effect of ionophores and 2-bromoethane-sulphonic acid in hen caecal methanogenic cultures. *J Anim Feed Sci* 1996;5:425-431.
120. Jamroz D, Wiliczkiwicz A, Skorupińska J. Fermentation and apparent digestion of the structural carbohydrates in chicks\* ducks and geese fed triticale mixtures supplemented with enzymes. *J Anim Physiol Anim Nutr* 1998;79, 1–17 (in German).

121. Marounek M, Suchorska O, Savka O. Effect of substrate and feed antibiotics on in vitro production of volatile fatty acids and methane in cecal contents of chickens. *Anim Feed Sci Technol* 1999;80:223–230.
122. Carré B, Derouet L, Leclercq B. The digestibility of cell-wall polysaccharides from wheat (bran or whole grain), soybean meal, and white lupin meal in cockerels, muscovy ducks, and rats. *Poult Sci* 1990 ;69:623–633.
123. Langhout DJ, Schutte JB. Nutritional implicats of pectins in chickens in relation to estrification and origin of pectins. *Poult Sci* 1996;75:1236–1242.
124. Jamroz D, Wilicziewicz A, Orda J, Skorupińska J. Ileal and postileal fermentation of cereal carbohydrates in chicken and ducks *Wien. Tierarztl. Monatsschr.* 1994;81:80–84 (in German).
125. Tsukahara T, Ushida K. Effects of animal or plant protein diets on cecal fermentation in guinea pigs (*Cavia porcellus*), rats (*Rattus norvegicus*) and chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Comp Bioch Physiol: A* 2000;127:139–146.
126. Macfarlane GT, Gibson GR.1995. Microbiological aspects of the production of short chain fatty acids in the large bowel. In: Cummings, J.H., Rombeau, J.L., Sakata, T. (Eds.), *Physiological and Clinical Aspects of Short-Chain Fatty Acids*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 87–105.
127. Van der Wielen PW, Biesterveld S, Notermans S, Hofstra H, Urlings BAP, van Knapen F. Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:2536–2540.
128. Larbier M, Leclercq B. 1992. *Nutrition et alimentation des volailles*. INRA Paris. English Edition: *Nutrition and Feeding of Poultry*. Translated and Edited by J. Wiseman, Nottingham University Press, Nottingham.
129. Kirchgessner M, Eder K, Müller HL, Jamroz D. Zur energetischen bewertung von nichtstärke polisacchariden beim geflügel. *J Anim Physiol Anim Nutr* 1999;81, 8151–8155.
130. Morton ES. 1978. Avian arboreal folivores: why not? In: Montgomery, G.G. (Ed.), *The Ecology of Arboreal Folivores*. Smithsonian Institution, Washington, DC, pp. 123–130.



131. Gäbel G. 1995. Transport of short-chain fatty acids in the ruminant forestomach. In: Cummings JH, Rombeau JL, Sakata T. (Eds.), *Physiological and Clinical Aspects of Short-Chain Fatty Acids*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 133-147.
132. Russell JB. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. *J Appl Bacteriol.* 1992;73, 363–370.
133. McHan F, Shotts EB. Effect of short-chain fatty acids on the growth of *Salmonella typhimurium* in an in vitro system. *Avian Dis* 1993;37:396–398.
134. Hendry GAF, Wallace RK (1993). The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans. In M Suzuki, NJ Chatterton, eds, *Science and Technology of Fructans*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 119–139.
135. Pilon-Smits EAH, Ebskamp MJM, Paul MJ, Jeuken MJW, Weisbeek PJ, Smeekens SCM. Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol* 1995;107:125–130.
136. Food production and the environment. Chapter 7. Plant cells.1-26
137. Vijn I, Smeekens S. Fructan: more than a reserve carbohydrate?. *Plant Physiol* 1999;120;351–359.
138. Pollock CJ, Cairns AJ. Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1991;42:77–101.
139. Bonnett GD, Sims IM, John JAS, Simpson RJ. Purification and characterization of fructans with  $\beta$ -2,1- and  $\beta$ -2,6-glycosidic linkages suitable for enzyme studies. *New Phytol* 1994;127: 261–269.
140. Koops AJ, Jonker HH. Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* Colombia. II. Purification of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and reconstitution of fructan synthesis in vitro with purified sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and fructan:fructan 1-fructosyltransferase. *Plant Physiol* 1996;110: 1167–1175.
141. Carpita NC, Kanabus J, Housley TL. Linkage structure of fructans and fructan oligomers from *Triticum aestivum* and *Festuca arundinaceae* leaves. *J Plant Physiol* 1989;134:162–168.

142. Bonnett GD, Sims IM, Simpson RJ, Cairns AJ. Structural diversity of fructan in relation to the taxonomy of the Poaceae. *New Phytol* 1997;136:11–17.
143. Shiomi N. Properties of fructosyltransferases involved in the synthesis of fructan in liliaceous plants. *J Plant Physiol* 1989;134:151–155.
144. Livingstone DP III, Chatterton NJ, Harrison PA. Structure and quantity of fructan oligomers in oat (*Avena* spp.). *New Phytol* 1993;123:725–734.
145. Ernst M, Chatterton NJ, Harrison PA. Purification and characterization of a new fructan series from species of Asteraceae. *New Phytol* 1996;132: 63–66.
146. Wagner W, Keller F, Wiemken A. Fructan metabolism in cereals: induction in leaves and compartmentation in protoplasts and vacuoles. *Z Pflanzenphysiol* 1983;112: 359–372.
147. Vijn I, van Dijken A, Sprenger N, van Dun K, Weisbeek P, Wiemken A, Smeekens S. Fructan of the inulin neoseris is synthesized in transgenic chicory plants (*Cichorium intybus* L.) harbouring onion (*Allium cepa* L.) fructan:fructan 6Gfructosyltransferase. *Plant J* 1997;11: 387–398.
148. Pollock CJ. Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. *New Phytol* 1986;104:1–24.
149. Wiemken A, Sprenger N, Boller T (1995) Fructan: an extension of sucrose by sucrose. In HG Pontis, GL Salerno, EJ Echeverria, eds, *Sucrose Metabolism, Biochemistry, Physiology and Molecular Biology*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp 178–189.
150. Van Loo J, Coussement P, Leenheer LD, Hoebregs H, Smits G. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1995;35:525-552.
151. Phelps C. The physical properties of inulin solutions. *Biochem J* 1965;45:41-47.
152. De Bruyn A, Alvarez AP, Sandra P, De Leenheer L. Isolation and identification of  $\beta$ -D-fructofuranosyl-(2->1)- $\beta$ -D-fructofuranosyl-(2->1)-D-Fructose, a product of the enzymic hydrolysis of the inulin from *Cichorium intybus*. *Carbohydrate Res* 1992; 235: 303-8.

153. Gibson, G. R. & Roberfroid, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995;125:1401– 1412.
154. De Leenheer L. 1994. Production and use of inulin: industrial reality with a promising future, In *Carbohydrates as organic row materials III*, Workshop Wageningen, NL,28-29/11/1994.
155. Schöne A. Betrachtungen über Verwendungsmöglichkeit der Zichorie. *Centralblatt für die Zuckerindustrie*.1920;27:396-398.
156. Belval H. 1927. *Industrie de l'inuline et du lévulose*(book). Dix ans d'efforts scientifiques, industriels et coloniaux 1914-1924, Chimie et Industrie, Paris, pp 1068-1069.
157. Coussement P. 1995. Raftiline® and Raftilose®. Description, production, natural occurrence and history of inulin and oligofructose.. ORAFIT, Active Food Ingredients, Aandorenstraat 1, B - 3300 Tienen, Belgium, pp 1-17.
158. Külz E. Beitrage zur Path. Therap der Diabetes. *Jahrb Tierchem* 1874;4:448.
159. Rutherford PP, Whittle R. The carbohydrate composition of onions during long term cold storage. *J Hort Sci* 1982;57:349-356.
160. Suzuki M, Cutcliffe JA. Fructans in onion bulbs in relation to storage life. *Can J Plant Sci* 1989;69:1327-1333.
161. Bacon JSD. The trisaccharide fraction of some monocotyledons. *Biochem J*. 1959;73:507-514.
162. Darbyshire B, Henry RJ. Differences in fructan content and synthesis in allium species. *New Phytol* 1981;87:249-257.
163. Fiala V, Jolivet E. Variations quantitatives en composés azotés et glucidiques de racines d'asperges, mâles et femelles, au cours de leur première année de culture. *Agronomie* 1982;2 :735-740.
164. Okey R, Williams AW. On inulin in the globe artichoke. *J Am Chem Soc* 1920;42:1693-1696.
165. Van Hee L. Nieuws rond de teelt van groenten- B. *Industriegroenten- 5*. Waar staan we met de teelt van schorseneer. *Landbouwtijdschrift* 1982;3:2361-2364.

166. Nilsson U, Dahlquist A. Cereal fructosans: characterization and structure of wheat fructans. *Food Chem* 1986;22:95-106.
167. Sutalf LO, Levitt MD. Follow-up of a flatulent patient. *Dig Dis Sci* 1979;24:652-654.
168. Medcalf DG, Cheung PW. Composition and structure of glucofructans from durum wheat flour. *Cereal Chem* 1971;48:1-8.
169. Douglas JA, Poll JTK. A preliminary assessment of chicory as an energy crop. *New Zeal J Exp Agric* 1986;14:223-225.
170. Pazola Z, Cieslak J. Coffee substitute extracts especially in the roasting process. *FD Chem* 1979;4:41-52.
171. Van Den Hil J, Mesken M. Teelt en veredeling van aardperen. *Koolhydraten in Nederland* 1988;3:5-8.
172. Washington Gasohol Comm. (1981). Artichokes as food. *The American Artichoke*, Chapter 5.
173. Mc Gee D. (1993). Taking the wind out of the sunroot. *The Corious Cook*, Harper Collins Publishers, London.
174. Strauss (1911). *Therapie Der Gegenwart III*, pp. 337.
175. Lewis HB. The value of inulin as a foodstuff. *J Am Med Assoc* 1912;58:1176-1177.
176. Beringer A, Wenger R. Inulin in der Ernährung des Diabetikers. *Dtsch Zeitschr f Verdauungs u Stofwechselkrankh* 1955;15:268-272.
177. Birch GG, Soon EB. The composition and properties of diabetic jams. *Confect Prod* 1973;73-76.
178. Daho E. Improvements in and relating to the production of diatetic foods. 1930, UK Patent 350777.
179. Okey R. Sudies on the behavior of inulin in the animal body.- II. Inulin in the alimentary canal. *J Biol Chem* 1919; 39(1):149-162.
180. McCance RA, Lawrence RD. The carbohydrate content of foods- inulin and fructosans. *Medical Research Council, Special Report Series* 1929;135:58.

181. Wise EC, Heyl FW. Failure of a diabetic to utilize inulin. J Amer Pharm Ass 1931;20:26-29.
182. Heupke W, Blanckenburg K. Die Verdauung des Inulins Deut Arch Klin Med 1934;176:182-187.
183. Küppers-Sonnenberg GA. Inulin and Lävulose der Topinambur. Zucker 1952;5:30-33.
184. Roberfroid M. Dietary fiber, inulin, and oligofructose: a review comparing their physiological effects. Crit Rev Food Sci Nutr. 1993;33(2):103-48.
185. Baillarge E. (1942). "Le topinambour, ses usages, sa culture" (book): "La Terre -Encyclopédie Paysanne", Ed. Flammarion.
186. Shannon JA. The excretion of inulin by the dogfish (*Squalus acanthias*), J. Cellul. and Compar. Physiol. 1934;5 :301-310.
187. Shannon JA. The excretion of inulin by the dog. Am J Physiol 1935;112:405-413.
188. Shannon JA. The excretion of inulin and creatinine at low urine flows by the normal dog. Am J Physiol 1936;114:362-365.
189. Richards AN, Westfall BB, Bott PA. Renal excretion of inulin, creatinine and xylose in normal dogs", Proc Soc Exp Biol Med 1934;32:73-75.
190. Shannon JA, Smith HW. The excretion of inulin, xylose and urea by normal and phlorizinized man. J of Clin Investig 1935;14:393-401.
191. Preuss HG, Podlasek SJ, Henry JB. (1991), Evaluation of renal function and water electrolyte, and acid-base balance" (book:) Clinical Diagnosis and Management, Ed. J.B.Henry; Publ. W.B. Saunders, pp. 119-121.
192. Carabin IG, Flamm WG. Evaluation of Safety of Inulin and Oligofructose as Dietary Fiber. Reg Toxicol Pharma 30, 268–282 (1999)
193. Roberfroid MB y Delzenne N. Dietary fructans. Annual Review Nutrition 1998;18:117-143.
194. MoshFegh AJ, Friday JE, Goldman JP y Chug Ahuga JK. Presence of inulin and oligofructose in the diets of Americans. Journal of Nutrition 1999;129(suppl 7S):1407S-1411S.

195. Milner J, Roberfroid M. Nutritional and health benefits of inulin and oligofructose. *Journal of Nutrition* 1999;129, suppl 7S:1394S-1502S.
196. Roberfroid MB, Van Loo JA, Gibson ER. The bifidogeneic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *J Nutr* 1998;128:11-19.
197. Van Loo J, Cummings JH, Delzenne N, Englyst HN, Franck A, Hopkins MJ, Kok N, Macfarlane GT, Newton DF, Quigley ME, Roberfroid MR, Van Vliet T, Van den Heuvel EGH. Functional food properties of nondigestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *Brit J Nutr* 1999 81:121-132.
198. Homma N. Bifidobacteria as a resistance factor in human beings. *Bifidobacteria Microflora* 1988;7:35-43.
199. Yamazaki S, Kamimura H, Momose H, Kawashima T, Ueda K. Protective effect of bifidobacteria-monoassociation against lethal activity of *Escherichia coli*. *Bifidobacteria Microflora* 1982;1:55-64.
200. Araya\_Kojima T, Yaeshima T, Ishibashi N, Shimamura S, Hayasawa H. Inhibitory effects of *Bifidobacterium longum* BB536 on harmful intestinal bacteria. *Bifidobacteria Microflora* 1995;14:59-66.
201. Butel MJ, Roland N, Hibert A, Popot F, Favre A, Tessedo AC, Bensaada M, Rimbault A, Szylit O. Clostridia in experimental narcotizing enterocolitis in gnotobiotic quails and protective role of bifidobacteria. *J Med Microbiol* 1998; 47:391-399.
202. Gibson GR, Beatty ER, Wang X, Cummings JH. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology* 1995;108:975-982.
203. Kruse HP, Kleessen B, Blaut M. Effects of inulin on faecal bifidobacteria in human subjects. *Br J Nutr* 1999;82:375-382.
204. Alles MS, Hautvast JGA, Nagengast FM, Hartemink R, Van Laere KMJ y Jansen JBM. Fate of fructo-oligosaccharides in the human intestine. *British Journal of Nutrition* 1996;76:211-221.
205. McBain A y Macfarlane G. Investigations of bifidobacterial ecology and oligosaccharide metabolism in a three-stage compound continuous culture system. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1997;222, suppl 32-40.

206. Kim M, Shin HK. The water-soluble extract of chicory influences serum and liver lipid concentrations, cecal short-chain fatty acid concentrations and fecal lipid excretion in rats. *J Nutr* 1998;128:1731–1736.
207. Levrat MA, Rémésy C, Demigné C. High propionic acid fermentations and mineral accumulation in the cecum of rats adapted to different levels of inulin. *J Nutr* 1991;121:1730–1737.
208. Gråstena S. M., Pajarib AM, Liukkonenc KH, Karppinenc S, HM Mykkänenena. Fibers with different solubility characteristics alter similarly the metabolic activity of intestinal microbiota in rats fed cereal brans and inulin. *Nutrition Research* 2002; 22:1435–1444.
209. Drasar DS, Hill MJ. *Human Intestinal Flora*. Academic Press, London UK, 1974.
210. Drasar DS, Barrow PA. *Intestinal Microbiology*. Van Nostrand Reinhold Ltd. Wokingham, UK, 1985.
211. Sunvold GD. Dietary fiber for dogs and cats: An historical perspective. In : *Recent Advances in Canine and Feline Nutrition: 1996 Iams Nutrition Symposium Proceedings*. pp3-14. Carey DP, Norton SA, Bolser SM Eds., Orange Frazer Press, Wilmington, OH.
212. Varel VJ, Yen JT. Microbial perspective on fiber utilization by swine. *J Anim Sci* 1997;75:2715-2722.
213. Frandson RD, Spurgeon TL. Anatomy of the digestive system. In: *Anatomy and Physiology of Farm Animals*, 5<sup>th</sup> ed, 1992, pp. 304-332. Lea and Pebrger, Philadelphia, PA.
214. Allison MJ. Microbiology of the rumen and small and large intestines. In: *Duke's Physiology of Domestic Animals*. 10<sup>th</sup> ed. 1989, pp.340-350. Swenson, MJ Ed Cornell University Press Ithaca, NY.
215. Tomomatsu H. Health effects of oligosaccharides. *Food Technol* 1994;48:61-65.
216. Saito Y, Takano T, Rowland I. Effects of soybean oligosaccharides on the human gut microflora in in vitro culture. *Microbiol Ecol Health Dis* 1992;5:105-111.
217. Moxley RA, Duhamel GE. Comparative pathology of bacterial enteric diseases of swine. *Adv Exp Med Biol* 1999;473:83-101.

218. Pope MJ, Cherry TE. An evaluation of the presence of pathogens on broilers raised on poultry litter treatment-treated litter. *Poult Sci* 2000;79:1351-1355.
219. Craven SE, Stern NJ, Line E, Bailey JS, Cox NA, Fedorka-Cray P. Determination of the incidence of *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, and *Clostridium perfringens* in wild birds near broiler chicken houses by sampling intestinal droppings. *Avian Dis* 2000;44:715-720.
220. Willard MD, Simpson RP, Delles EK, Coben ND, Fossum TW, Kolp D, Reinhart G. Effects of dietary supplementation of fructo-oligosaccharides on small intestinal bacterial overgrowth in dogs. *Am J Vet Res* 1994;55:654-659.
221. Friedel D, Levine GM. Effect of short-chain fatty acids on colonic function and structure. *J Parenter Ent Nutr* 1992;16:1-4.
222. Aldoori WH. The protective role of dietary fiber in diverticular disease. In: *Dietary Fiber in Health and Disease*. 1997, pp 291-308. Kritchevsky D and Bonfield C, Plenum Press, New York.
223. Drackley JK, Beaulieu AD. Energetic substrates for intestinal cells. In: *Recent Advances in Canine and Feline Nutrition: 1998 Iams Nutrition Symposium Proceedings*. pp. 463-472. Reinhart GA, Carey DP, EDS, Orange Frazer Press, Wilmington, OH.
224. Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* 2001;81:1031-1064.
225. Flickinger EA, Van Loo J, Fahey GC Jr. Nutritional responses to the presence of inulin and oligofructose in the diets of domesticated animals: a review. *Crit Rev Food Sci Nut* 2003;43(1):19-60.
226. Chaplin SB. Effect of cecectomy on water and nutrient absorption of birds. *J Exp Zool Suppl* 1989;3:81-6.
227. Thornburn CC, Willcox JS. The ceca of the domestic fowl and digestion of the crude fibre complex, I. *Br Poult Sci* 1965;6 (1):23-31.
228. Thornburn CC, Willcox JS. The ceca of the domestic fowl and digestion of the crude fibre complex, II. *Br Poult Sci* 1965;6 (1):33-43.



229. Kessler JW, Nguyen TH, Thumas OP. The amino acid excretion values and intact and cecectomized negative control roosters used for determining metabolic plus endogenous urinary loss. *Poultry Sci* 1981;60:1576-1577.
230. Parsons CM. Influence of caeectomy and source of dietary fiber or starch on excretion of endogenous amino acids by laying hens. *Br J Nutr* 1984;51:541-548.
231. Parsons CM. Influence of caeectomy on digestibility of amino acids by roosters fed distillers' dried grains with solubles. *J Agric Sci Camb* 1985;104:469-472.
232. Parsons CM. Determination of digestible and available amino acids in meat meal using conventional and caeectomized cockerels or chick growth assays. *Br J Nutr* 1986;56:227-240.
233. Johns DC, Low CK, Sedcole JR, James KAC. Determination of amino acid digestibility using caeectomized and intact adult cockerels. *Br Poult Sci* 1986;27:451-461.
234. Green S, Bertrand SL, Duron MJC, R Maillard. Digestibilities of amino acids in maize, wheat and barley meals, determined with intact and caeectomized cockerels. *Br Poult Sci* 1987; 28:631-641.
235. Asociación Canadiense de Ciencias de Animales de Laboratorio (ACCAL). Capítulo IV – Instalaciones y ambiente para CCPA, Manual Vol 1 (2ª ed) 1998.  
[http://www.ccac.ca/english/gui\\_pol/guides/spanish/v1\\_93/chap/CHIV.HTM](http://www.ccac.ca/english/gui_pol/guides/spanish/v1_93/chap/CHIV.HTM)  
[http://www.ccac.ca/french/gui\\_pol/guides/spanish/v1\\_93/chap/CHX.HTM](http://www.ccac.ca/french/gui_pol/guides/spanish/v1_93/chap/CHX.HTM)
236. Laboratory Animals. Laboratory birds: refinements in husbandry and procedures. *Laboratory Animals* 2001;35 (Suppl. 1).
237. Quintana LJA. Avitecnia: manejo de las aves domésticas más comunes. 2ª ed. México, D.F. Trillas, 1999.
238. Calnek BW. Enfermedades de las aves. 2ª ed. México: Manual Moderno, 2000.
239. Carlin-Valderrabano SC. Evaluación de la técnica de cecoectomía con anestesia disociativa en terminos de sobrevivencia en pollitos de engorda de 6 días de edad. Tesis de maestría. 2004. Universidad Nacional Autonoma de México. D.F. México.

240. Perusquía JMT y Paasch ML. Necropsias en aves. México, D.F.: Trillas, 1985.
241. Aluja SA y Constantino CF. Técnicas de necropsia en animales domésticos. 2ª ed. México, D.F.: Manual Moderno, 2002.
242. NORMA Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
243. Hoebregs H. Fructans in foods and food products, ion-exchange chromatographic method: collaborative study. *J. Assoc Off Anal Chem Int* 1997;80:1029-1037.
244. Product: JMP. Release: 5.1.2: A BUSINESS UNIT OF SAS Copyright © 1989-2004 SAS Institute Inc. All rights reserved.
245. Payne WL, Kifer RR, Snyder DG, Combs GF. Studies on protein digestion in the chicken. 1. Investigation of apparent amino acid digestibility of fish meal protein using cecectomized, adult male chickens. *Poultry Sci* 1971;50:143-150.
246. Thompson DC, Boag DA. Role of the caeca in Japanese quail energetics. *Can J Zool* 1975;53:166-170.
247. McBee RH. Fermentation in the hindgut. Pages 185-250 in: *Microbial Ecology of the Gut*. Clark RTJ, Bauchap T, ed. Academic Press, New York, 1977.
248. Duke GE, Bird JE, Daniels KA, Bertroy RW. Food metabolizability and water balance in intact and cecectomized Great-horned Owls. *Compl Biochem Physiol A* 1981;68:237-240.
249. Duke GE, Eccleston E, Kirkwood S, Louis C, Bedbury H. Cellulose digestion by domestic turkeys fed low or high fiber diets *J Nutr* 1984;114:95-102.
250. Green S. Effect of dietary fiber and caeectomy on the excretion of endogenous amino acids from adult cockerels. *Br Poult Sci* 1988; 29:419-429.
251. Schlotthauer CF, Essex HE, Mann FC. Cecal occlusion in the prevention of backhead (Enterohepatitis) in turkeys. *J Am Vet Med Assoc* 1933;36(2):218-228.

252. Dziuk HE, Scheiber AR, Duke GE. Cecectomized turkeys- physiological characteristics and susceptibility to bluecomb. *Poultry Sci* 1970;49:244-247.
253. Hughes MR, Zentneo-Savin T, Kojwarg D. Effects of saline acclimation and cecal ligation on body water and water flux in male and female Pekin ducks. *Can J Zool* 1991;69:771-775.
254. Bach Knudsen KE, Hessov I. Recovery of inulin from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) in the small intestine of man. *Br J Nutr* 1995;74:101-13.
255. Ellegard L, Andersson H, Bosaeus I. Inulin and oligofructose do not influence the absorption of cholesterol, or the excretion of cholesterol, Ca, Mg, Zn, Fe, or bile acids but increases energy excretion in ileostomy subjects. *Eur J Clin Nutr.* 1997;51:1-5.
256. Molis C, Flourie B, Ouarne F, et al. Digestion, excretion, and energy value of fructooligosaccharides in healthy humans. *Am J Clin Nutr.* 1996; 64:324-8.
257. Persia. *Nuova Revista Clinica Therapeutica.* Jahresbuch Tierchemie 1905; XXV,822.
258. Neubauer. *München Medizine Wochenschrift.* 1905;1525.
259. Alles MS, Hautvast JG, Nagengast FM, Hartemink R, Van Laere KM, Jansen JB. Fate of fructo-oligosaccharides in the human intestine. *Br J Nutr.* 1996;76(2):211-21.
260. Branner GR, Böhmer BM, Erhardt W, Henke J, Roth-Maier DA. Investigation on the precaecal and faecal digestibility of lactulose and inulin and their influence on nutrient digestibility and microbial characteristics. *Arch Anim Nut* 58(5):353-366.
261. Xu ZR, Hu CH, Xia MS, Zhan XA, Wang MQ. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. *Poult Sci.* 2003 Jun;82(6):1030-6.
262. Rehman H, Rosenkranz C, Böhm J, Zentek J. Dietary inulin affects the morphology but not the sodium-dependent glucose and glutamine transport in the jejunum of broilers. *Poult Sci.* 2007 Jan;86(1):118-22.

263. Martinez-Bautista M. Efecto de la administración de inulina en el modelo de reflujo coliileal en perros. Tesis de maestría. 2007. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F. México.
264. Welters CF, Heineman E, Thunnissen FB, van den Bogaard AE, Soeters PB, Baeten CG. Effect of dietary inulin supplementation on inflammation of pouch mucosa in patients with an ileal pouch-anal anastomosis. *Dis Colon Rectum*. 2002 May;45(5):621-7.
265. Biggs P, Parsons CM, Fahey GC. The effects of several oligosaccharides on growth performance, nutrient digestibilities, and cecal microbial populations in young chicks. *Poult Sci*. 2007 Nov;86(11):2327-36.