



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach

Praca Doktorska

Mgr inż. Zuzanna Wiśniewska

Określenie wpływu emulgatora i karbohydratów oraz ich mieszaniny na fermentację mikrobiologiczną w układzie pokarmowym drobiu oraz stopień wykorzystania składników pokarmowych diety w zależności od dominujących węglowodanów strukturalnych

Dziedzina: Nauki rolnicze

Dyscyplina: Zootechnika i rybactwo

Praca została sporządzona
w Katedrze Żywienia Zwierząt

Pod kierunkiem Promotora dr hab. Sebastiana Kaczmarka, prof. UPP
oraz Promotora pomocniczego dr hab. Ewy Pruszyńskiej-Oszmałek

Poznań 2023

Wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu

Podstawą niniejszej dysertacji doktorskiej są wyniki badań własnych finansowanych ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu 2015/19/D/NZ9/03580, przedstawione w dwóch publikacjach:

1. **Zuzanna Wiśniewska**, Paweł Kołodziejcki, Ewa Pruszyńska, Paweł Konieczka, Misza Kinsner, Paweł Górka, Jadwiga Flaga, Kinga Kowalik, Marcin Hejdysz, Marta Kubiś, Łukasz S. Jarosz, Artur Ciszewski, Sebastian A. Kaczmarek. (2023) Effect of emulsifier and multicarbohydrase enzyme supplementation on performance and nutrient digestibility in broiler diets containing rapeseed meal. *Poultry Science*, 102:102268, <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102268>
2. **Zuzanna Wiśniewska**, Paweł Kołodziejcki, Ewa Pruszyńska-Oszmałek, Paweł Konieczka, Misza Kinsner, Paweł Górka, Jadwiga Flaga, Kinga Kowalik, Marcin Hejdysz, Marta Kubiś, Łukasz S. Jarosz, Artur Ciszewski, Sebastian Kaczmarek. (2023) Combination of emulsifier and xylanase in triticale-based broiler chickens diets. *Archives of Animal Nutrition*, <https://doi.org/10.1080/1745039X.2023.2202591>

Serdeczne podziękowania
dla Pana dr hab. Sebastiana Kaczmarka, prof. UPP
oraz dr hab. Marcina Hejdysza
za nieocenioną pomoc i cierpliwość.

Spis treści

Zastosowane skróty.....	6
1. Streszczenie	8
2. Abstract.....	10
3. Wstęp	12
4. Hipoteza badawcza	15
5. Cel badań	16
6. Materiały i metody.....	17
6.1. Charakterystyka zwierząt doświadczalnych i miejsca doświadczeń	17
6.2. Mieszanki doświadczalne.....	17
6.3. Układ i przebieg doświadczeń	20
6.4. Kolekcja i przygotowanie prób	20
6.5. Analizy chemiczne	22
6.6. Obliczenia i analiza statystyczna	27
6.6.1 Doświadczenie nr 1 - poekstrakcyjna śruta rzepakowa	28
6.6.2 Doświadczenie nr 2 -pszenżyto	28
7. Najważniejsze wyniki badań własnych	29
7.1. Doświadczenie nr 1 – poekstrakcyjna śruta rzepakowa.....	29
7.1.1. Chemiczny skład paszy	29
7.1.2. Parametry produkcyjne	30
7.1.3. Strawność	30
7.1.4. Morfologia kosmków jelitowych	30
7.1.5. Ekskrecja kwasu siałowego	31
7.1.6. Koncentracja KKT	31
7.2. Doświadczenie nr 2 - pszenżyto.....	31
7.2.1. Parametry produkcyjne	31
7.2.2. Strawność	31
7.2.3. Lepkość treści pokarmowej	31

7.2.4. Ekskrecja kwasu sjałowego	32
7.2.5. Aktywność enzymów bakteryjnych	32
7.2.6. Koncentracja KKT	32
7.2.7. Histomorfometria	32
7.2.8. Ekspresja genów	32
8. Dyskusja.....	33
8.1. Wpływ zastosowania emulgatora i karbohydraz oraz ich mieszaniny na stopień wykorzystania składników pokarmowych diety - parametry produkcyjne i strawność	33
8.1.1. Doświadczenie nr 1 – poekstrakcyjna śruta rzepakowa	33
8.1.2. Doświadczenie nr 2 - pszenżyto	37
8.2. Wpływ zastosowania emulgatora i karbohydraz oraz ich mieszaniny na fermentację mikrobiologiczną w układzie pokarmowym drobiu.....	37
8.2.1. Bakteryjna aktywność enzymatyczna w jelitach ślepych	37
8.2.2. Stężenie SCFA w jelitach cienkim i ślepych	38
8.3 Wpływ zastosowania emulgatora i karbohydraz oraz ich mieszaniny na zmiany w obrębie układu pokarmowego drobiu	39
8.3.1 Ekskrecja kwasu sjałowego	39
8.3.2. Histomorfometria kosmków jelita czczego i krętego	40
8.3.3. Ekspresja genów	41
8.3.4. Lepkość treści przewodu pokarmowego.....	41
9. Podsumowanie i wnioski	42
10. Bibliografia	44
11. Spis tabel.....	51

Zastosowane skróty

(w porządku alfabetycznym)

AME_N – pozorna energia metaboliczna skorygowana do zerowego bilansu azotu

APD – pozorna strawność jelitowa

ATTD – pozorna strawność całkowita

BWG – przyrost masy ciała

CD – głębokość krypt jelitowych

CON – grupa kontrolna

CP – białko ogólne

DM – sucha masa

EE – tłuszcz surowy

EMU – grupa kontrolna z dodatkiem emulgatora

ENZ - grupa kontrolna z dodatkiem enzymu

FA – kwasy tłuszczowe

FCR – współczynnik wykorzystania paszy

FI – pobranie paszy

GE – energia brutto

NDF – neutralne włókno detergentowe

NS – P > 0.05

NSP – polisacharydy nieskrobiowe

PŚRz – poekstakcyjna śruta rzepakowa

PR – pozorny rozkład

SCFA - krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe

SEM – standardowy błąd średniej

VH – wysokość kosmków jelitowych

VH/CD – stosunek wysokości kosmków jelitowych do krypt jelitowych

VSA - powierzchnia kosmków jelitowych

1. Streszczenie

Przedmiotem dysertacji doktorskiej było określenie wpływu zastosowania emulgatora i karbohydraz oraz ich mieszaniny na fermentację mikrobiologiczną w układzie pokarmowym drobiu oraz stopień wykorzystania składników pokarmowych diety w zależności od dominujących węglowodanów strukturalnych. W tym celu przeprowadzono 2 doświadczenia żywieniowe z odmiennymi źródłami węglowodanów strukturalnych: poekstrakcyjną śrutą rzepakową (PŚRz) w doświadczeniu nr 1 oraz pszenżytem w doświadczeniu nr 2.

Biorąc pod uwagę cały okres doświadczenia, w przypadku diet z PŚRz, masa ciała istotnie wzrosła po zastosowaniu enzymu, natomiast w dietach z pszenżytem zaobserwowano wpływ badanych dodatków na masę ciała jedynie w okresie starter. Niezależnie od zastosowanej diety, suplementacja dodatkami skutkowała obniżeniem wartości pozostałych parametrów produkcyjnych: pobrania paszy (FI) oraz współczynnika wykorzystania paszy (FCR). W doświadczeniu nr 1 korzystne wartości parametrów produkcyjnych prawdopodobnie były następstwem zwiększenia pozornej strawności jelitowej (APD) białka ogólnego (CP), pozornej strawności całkowitej (ATTD) tłuszczu surowego (EE) oraz pozornego rozkładu (PR) frakcji włókna neutralnie detergentowego (NDF). W doświadczeniu nr 2 zanotowano zwiększenie PR w obrębie suchej masy (DM), CF, NDF oraz retencji N jedynie w okresie 28 dnia życia.

W zależności od rodzaju diety (źródła węglowodanów strukturalnych), odpowiedź ze strony aktywności mikrobiologicznej w układzie pokarmowym drobiu różniła się. W doświadczeniu nr 1 w grupie z dwoma dodatkami zaobserwowano spadek koncentracji krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) w jelitach ślepych, natomiast w doświadczeniu nr 2 koncentracja SCFA w jelitach ślepych po jednoczesnym zastosowaniu dodatków wzrosła. W doświadczeniu nr 1 powierzchnia kosmków jelitowych zwiększyła się w grupach suplementowanych dodatkami w porównaniu do grupy kontrolnej (CON). Jednoczesna aplikacja emulgatora i enzymu skutkowała największym stosunkiem wysokości kosmków jelitowych do krypt jelitowych (VH/CD). W doświadczeniu nr 2 zaobserwowano podobny wynik dotyczący VH/CD w jelicie krętym, dodatkowo zaobserwowano zmiany w obrębie kosmków jelita czczego, gdzie grubość błony śluzowej blaszki mięśniowej wzrosła w grupach z dodatkiem enzymu. W doświadczeniu nr 2 wystąpiły zmiany w ekspresji genów na poziomie białek, gdzie zaobserwowano zmniejszenie ekspresji genów SGLT1, PEPT1 oraz FATP1 w jelicie krętym po zastosowaniu emulgatora.

W obu doświadczeniach, zaobserwowano addytywny wpływ obu dodatków na fermentację mikrobiologiczną w układzie pokarmowym drobiu oraz stopień wykorzystania składników pokarmowych diety w zależności od zastosowanych dominujących węglowodanów strukturalnych.

2. Abstract

The subject of the PhD dissertation was to determine the effect of the use of emulsifier and carbohydrases and their mixture on microbial fermentation in the digestive system of poultry and the degree of utilization of dietary nutrients depending on the dominant structural carbohydrates. For this purpose, two feeding experiments were carried out with different sources of structural carbohydrates: post-extraction rapeseed meal (PŚRz) in experiment no. 1 and triticale in experiment no. 2.

The type of structural carbohydrates affected body weight gain (BWG). Taking into account the entire period of the experiment, in the case of diets with PŚRz, body weight increased significantly after the use of the enzyme, while in diets with triticale the effect of additives on the above parameter was observed only in the starter period. Irrespective of the source of structural carbohydrates used, supplementation with additives resulted in a decrease in the value of other production parameters: feed intake (FI) and feed conversion ratio (FCR). In experiment no. 1, the favorable values of production parameters were probably the result of an increase in the apparent intestinal digestibility (APD) of crude protein (CP), the apparent total digestibility (ATTD) of crude fat (EE) and the apparent degradation (PR) of the neutral detergent fiber fraction (NDF). In experiment no. 2, an increase in PR in terms of dry matter (DM), CF, NDF and N retention was noted only during the 28th day of life.

Depending on the source of structural carbohydrates, the response of microbial activity in the poultry digestive system varied. In experiment no. 1, in the group with two additives used, a decrease in the concentration of short-chain fatty acids (SCFA) in the cecum was observed, while in experiment no. 2, the concentration of SCFA in the cecum increased after the concomitant use of the additives. In experiment no. 1, the surface of the intestinal villi increased in the groups supplemented with additives compared to the control group (CON). Simultaneous application of emulsifier and enzyme resulted in the highest ratio of intestinal villus height to intestinal crypts (VH/CD). In experiment no. 2, a similar result was observed for VH/CD in the ileum, in addition changes were observed in the jejunum villi, where the thickness of the muscularis mucosa increased in the enzyme-treated groups. In experiment no. 2, there were changes in gene expression at the protein level, where a decrease in the expression of SGLT1, PEPT1 and FATP1 genes was observed in the ileum after the use of the emulsifier. The additive effect of both additives on the microbial fermentation in the digestive system of poultry, as well as

degree of utilization of dietary nutrients depending on the dominant structural carbohydrates was observed.

3. Wstęp

Stale rosnące zapotrzebowanie w sektorze produkcji drobiu przy jednoczesnej potrzebie zachowania zasad zrównoważonego rozwoju stanowi aktualne wyzwanie światowej branży drobiarskiej. Biorąc pod uwagę ograniczone zasoby komponentów paszowych oraz emisji zanieczyszczeń do środowiska, słusznym rozwiązaniem jest zwiększanie potencjału genetycznego drobiu przy równoczesnym zwiększeniu wykorzystania przez zwierzęta składników pokarmowych, np. tłuszczu, będącego jednym z droższych komponentów paszowych stosowanych w mieszankach dla zwierząt monogastrycznych.

Rutynowo stosowanym zabiegiem w celu zwiększenia strawności tłuszczu w mieszankach dla drobiu jest aplikacja egzogennych emulgatorów. Słusność stosowania emulgatorów została potwierdzona w wielu badaniach (Alzawqari, 2011; Guerreiro i in., 2011; Kaczmarek i in., 2015; Ravindran i in., 2016) i wynika z rozwoju fizjologicznego ptaków. U nowo wyklutych kurcząt zaobserwowano niski poziom sekrecji związków posiadających właściwości emulgujące: soli kwasów żółciowych oraz enzymu lipazy, czego skutkiem jest ograniczona zdolność trawienia tłuszczu utrzymująca się aż do około 14 dnia życia zwierząt (Krogdahl, 1985; Noy i Sklan, 1995; Uni i in., 1999). W przewodzie pokarmowym kurcząt brojlerów reprezentującym środowisko wodne, trawienie i absorpcja tłuszczu jest możliwa dopiero po procesie micelizacji (Ravindran i in., 2016). Dodatek egzogenego emulgatora spełnia powyższe wymagane funkcje; obniża napięcie powierzchniowe płynów umożliwiając swobodne mieszanie się substancji z dwóch faz, umożliwia tworzenie miceli, zwiększa strawność tłuszczu i poprawia w rezultacie wydajność produkcyjną (Ravindran i in., 2016).

Do żywieniowych wyzwań należy również między innymi zwiększenie rozkładu nierozpuszczalnych, ciężkostrawnych związków; polisacharydów nieskrobiowych (NSP), zawartych w lokalnie dostępnych surowcach, np. poekstrakcyjnej śruty rzepakowej (PŚRz) będącej alternatywą dla poekstrakcyjnej śruty sojowej (PŚS), czy pszenżyta. Obecność NSP, będących substancjami antyżywieniowymi, wpływa niekorzystnie na strawność składników pokarmowych diety (Salih i in., 1991; Lazaro i in., 2003). Powszechnym zabiegiem stosowanym od kilku dekad jest suplementacja diet drobiowych enzymami, wykazującymi możliwość częściowego rozkładu NSP; karbohydrazami (Bedford, 2018). Karbohydrazy powodują rozkład złożonych, niestrawnych cząsteczek, np. arabinoksylianów, tworząc mniejsze i podatniejsze na trawienie cząstki. Wynikiem działania enzymu jest m. in. zmniejszenie lepkości treści

jelita krętego (Słominski, 2011) oraz obniżenie potencjału NSP do „kapsułkowania” pozostałych składników pokarmowych (Meng i in., 2005b; Rutkowski i in., 2012), w rezultacie skutkując poprawą wartości pokarmowej pasz i strawności składników pokarmowych (Bedford i Cowieson, 2012).

Badania przeprowadzone przez Kaczmarka i in. (2015) ujawniły nieznaną wcześniej zależność między jednoczesnym zastosowaniem emulgatora w dietach pszeniczno-kukurydziano-sojowych z dodatkiem ksylanazy, a zwiększoną degradacją frakcji włókna neutralno-detergentowego (NDF). Pierwotnie założono, iż poprawa degradacji NDF jest wynikiem pośrednim wynikającym z polepszenia dostępu enzymu do substratu, w związku z polepszoną strawnością tłuszczu, dzięki dodatku emulgatora. Jednakże, zarówno w badaniach *in vitro*, jak i na zwierzętach przeżuwających, zauważono bezpośredni wpływ emulgatorów na mikrobiom znajdujący się w przewodzie pokarmowym. Zaobserwowano zwiększenie wydzielania enzymów rozkładających polisacharydy nieskrobiowe (NSP) mieszczące się w obrębie frakcji NDF (Lee i in., 2004; Ahn i in., 2009). Praca Kubiś i in. (2020) częściowo tłumaczy mechanizm powyżej uzyskanych wyników, biorąc za przykład diety dla drobiu z dodatkiem pszenicy oraz łoju wołowego suplementowane ksylanazą i emulgatorem. W badaniu tym wykazano, iż jednoczesne stosowanie obu dodatków istotnie zmniejszyło lepkość treści pokarmowej. W rezultacie, zaobserwowano korzystne z punktu widzenia gospodarza przesunięcie fermentacji mikrobiologicznej z jelita cienkiego do jelit ślepych, gdzie zanotowano zwiększoną aktywność enzymów bakteryjnych.

Powyższe badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem zbóż o wysokiej zawartości rozpuszczalnych w wodzie NSP, wykazujących właściwości zwiększające lepkość treści pokarmowej (Knudsen, 2014). W związku z powyższym, spodziewano się otrzymania znaczącej odpowiedzi enzymatycznej. W niniejszym badaniu zastosowano podobny model eksperymentalny co w pracy Kubiś i in. (2020), jednakże z zastosowaniem odmiennego źródła węglowodanów strukturalnych: pszenżyta, wykazującego podobny profil NSP do pszenicy, oraz PŚRz, niewykazującej tendencji do zwiększania lepkości treści przewodu pokarmowego oraz podatnej na fermentację mikrobiologiczną w nieznacznym stopniu (Zduńczyk i in., 2015). Mimo tego, badania wykazują poprawę parametrów produkcyjnych oraz wykorzystania składników pokarmowych po dodatku enzymów w dietach z PŚRz (Meng i in., 2005b; Rutkowski i in., 2012).

Celem niniejszej pracy jest zbadanie wpływu jednoczesnego zastosowania dodatku emulgatora oraz enzymu na: aktywność mikrobiomu w przewodzie pokarmowym drobiu, parametry produkcyjne, strawność składników pokarmowych, oraz morfologię jelit, w zależności od zastosowanego źródła węglowodanów strukturalnych.

4. Hipoteza badawcza

Hipoteza badawcza zakłada addytywne działanie emulgatora i karbohydraz zastosowanych jednocześnie na korzystne zmiany fermentacyjne w obrębie układu pokarmowego kurcząt rzeźnych oraz poprawę wykorzystania składników pokarmowych i wydajność kurcząt brojlerów, niezależnie od rodzaju węglowodanów strukturalnych diety, oraz w stopniu wyższym niż emulgator lub enzym stosowane oddzielnie.

5. Cel badań

Celem dysertacji doktorskiej było zbadanie wpływu zastosowania suplementacji emulgatorem, enzymem, lub ich mieszaniną, na fermentację mikrobiologiczną w układzie pokarmowym drobiu (profil i aktywność mikrobiomu, koncentrację SCFA) oraz stopień wykorzystania składników pokarmowych diety (wydajność wzrostu, strawność składników pokarmowych) w zależności od wykorzystania odmiennych dominujących węglowodanów strukturalnych. Dodatkowo; analiza zmian zachodzących w obrębie układu pokarmowego kurcząt rzeźnych (histomorfometria jelit, ekspresja genów na poziomie białek) po zastosowaniu suplementacji wspomnianymi dodatkami w dietach opartych na PŚRz oraz pszenżycie.

6. Materiały i metody

6.1. Charakterystyka zwierząt doświadczalnych i miejsca doświadczeń

Jednodniowe, męskie osobniki kurcząt rzeźnych linii Ross 308 w liczbie 864 sztuk pozyskane z lokalnej wylęgarni (DanHatch Polska, Wolsztyn, Polska) zostały wykorzystane do przeprowadzenia dwóch eksperymentów żywieniowych. Eksperymenty żywieniowe oraz wszystkie związane z nimi procedury przeprowadzono w Zakładzie Doświadczalnym Żywienia Zwierząt w Gorzynie (Polska), jednostce badawczej Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, zgodnie z wytycznymi Lokalnej Komisji Etycznej ds. Eksperymentów na Zwierzętach w Poznaniu w zakresie badań na zwierzętach i opieki nad zwierzętami objętymi badaniami (Dyrektywa Unii Europejskiej (UE) 2010/63/UE w sprawie doświadczeń na zwierzętach). Ze względu na zachowanie standardów produkcyjnych i pobranie prób badawczych pośmiertnie lub bez negatywnego wpływu na dobrostan zwierząt (np. zbieranie odchodów), nie była wymagana indywidualna zgoda na przeprowadzenie doświadczeń.

6.2. Mieszanki doświadczalne

W obu doświadczeniach zastosowano trójfazowe żywienie podzielone na okresy starter (1 - 11 dzień), grower (12 - 25 dzień), finisz (26 - 42 dzień). Grupy żywieniowe podzielono na kontrolną (CON), kontrolną z dodatkiem emulgatora (EMU), kontrolną z dodatkiem enzymu (ENZ), kontrolną z dodatkiem emulgatora i enzymu (EMU + ENZ). Bazą dla diet w obu doświadczeniach była kukurydza z poekstrakcyjną śrutą sojową oraz olej sojowy i palmowy jako główne źródła tłuszczu.

W doświadczeniu nr 1 (Tabela 1) w celu wprowadzenia do diety węglowodanów strukturalnych niepodatnych na fermentację mikrobiologiczną, zastosowano dodatek PŚRz. Zastosowano dedykowany dla PŚRz koktajl enzymatyczny Superzyme OM (Canadian Bio-Systems Inc., Calgary, Kanada). W skład multikarbohidraty wchodziło: 2100 U celulazy, 300 U mannanazy, 37.5 U galaktanazy, 750 U ksylanazy, 450 U glukozylazy, 1875 U amylazy i 150 U proteazy na kg diety. W dietach dodatkowo zastosowano fitazę Quantum blue (500 jednostek fitazy (FTU)/kg, AB Vista Feed Ingredients, Marlborough, Wielka Brytania). Diety podawano w formie kruszonki (0 - 11 d) lub granulatu (12 - 42 d).

Tabela 1. Skład i zawartość składników pokarmowych diety kontrolnej (CON) w okresach starter, grower, finisz w doświadczeniu nr 1

Składnik, [%]	starter	grower	finisz
	1 – 11 d	12 – 25 d	26 – 42 d
Kukurydza	53.6	58.9	52.2
Poekstrakcyjna śruta sojowa	32.8	27.3	22.1
Poekstrakcyjna śruta rzepakowa	5.00	7.00	15.0
Olej sojowy	3.25	1.60	3.80
Olej palmowy	2.00	1.60	3.90
Fosforan jednowapniowy	0.68	0.56	0.49
Premiks ²	1.00	1.00	1.00
Kreda pastewna	0.38	0.31	0.16
DL - met	0.36	0.28	0.25
HCL - Lys	0.38	0.29	0.26
NaHCO ₃	0.25	0.26	0.26
NaCl	0.17	0.10	0.10
L - Thr	0.14	0.09	0.08
TiO ₂	-	0.30	0.30
L - trypt	-	0.17	-
Quantum Blue	0.01	0.01	0.01
Analizowana zawartość składników pokarmowych			
Białko surowe [%]	22.2	21.1	20.5
Energia brutto [kcal/kg] (MJ/kg)	-	-	4 562 (19.1)
Ekstrakt eterowy [%]	8.63	6.71	10.2
TiO ₂ [%]	-	-	0.32

¹Diety EMU, ENZ i EMU + ENZ uzupełniono emulgatorem (0.015 g/kg dla diety starter, 0.0173 g/kg dla diety grower i 0.0188 g/kg dla diety finisz), enzymem (0.12 g/kg we wszystkich dietach), lub zastosowano oba dodatki jednocześnie

²Dostarcza na kg diety: witaminę A, 11250 j.m.; witamina D, 2500 j.m.; witamina E, 80 mg; witamina K, 2.50 mg; witamina B12, 0.02 mg; kwas foliowy, 1.17 mg; cholina, 379 mg; D - kwas pantotenowy, 12.5 mg; ryboflawina, 7.0 µm; niacyna, 41.67 mg; tiamina, 2.17 mg; D - biotyna, 0.18 mg; pirydoksyna, 4.0 mg; etoksychina, 0.09 mg; Mn, 73 mg jako tlenek manganu; Zn, 55 mg jako tlenek cynku; Fe, 45 mg jako siarczan żelaza; Cu, 20 mg jako siarczan miedzi; I, 0.62 mg jako jodek wapnia; Se, 0.3 mg jako selen potasowy; salinomycyna, 60 mg.

W doświadczeniu nr 2 (Tabela 2) zastosowano dodatek pszenżyta, jako źródło węglowodanów strukturalnych podatnych na fermentację mikrobiologiczną w przewodzie pokarmowym, oraz dedykowany w powyższym przypadku enzym Econase HCP 4000 (ABVista, Marlborough, Wielka Brytania) zawierający 1.4-β-ksylanazę, w ilości 4 g na 1 tonę paszy. Diety podawano w formie sypkiej.

Tabela 2. Skład i zawartość składników pokarmowych diety kontrolnej (CON) w okresach starter, grower, finisz w doświadczeniu nr 2

Składnik, [%]	Starter	Grower	Finisz
	1 – 11 d	12 – 25 d	26 – 42 d
Kukurydza	43.4	27.4	25.4
Poekstrakcyjna śruta sojowa	37.9	28.0	29.6
Pszenżyto	10.0	35.0	35.0
Olej sojowy	3.40	2.80	3.45
Olej palmowy	2.00	2.89	3.51
Fosforan jednowapniowy	0.66	0.56	0.50
Premiks ²	1.00	1.00	1.00
Kreda pastewna	0.41	0.36	0.27
DL – met	0.36	0.34	0.32
L - Lys – HCL	0.29	0.33	0.23
NaHCO ₃	0.25	0.24	0.25
NaCl	0.20	0.10	0.10
L – Thr	0.12	0.16	0.12
L - Trp	-	0.20	-
TiO ₂	-	0.30	0.30
Fitaza ³	0.01	0.01	0.01

Analizowana zawartość składników pokarmowych w dietach finisz

	CON	EMU	ENZ	EMU+ENZ
Sucha masa [%]	89.2	90.6	90.1	89.7
Białko ogólne [%]	19.37	19.07	19.09	19.21
Energia brutto [MJ/kg]	18.93	18.87	18.75	18.92
Ekstrakt eterowy [%]	10.52	10.62	10.49	10.76
NDF [%]	10.04	11.00	11.01	10.75
TiO ₂ [%]	0.29	0.31	0.30	0.31

¹Diety EMU, ENZ i EMU+ENZ uzupełniono emulgatorem (starter 0.015 g/kg diety, grower 0.0114 g/kg i finisz; 0.014 g/kg), enzymem (starter 0.04 g/kg diety, grower i finisz 0.00004 g/kg diety) lub obydwoma jednocześnie. Aktywność enzymu w grupie ENZ kształtowała się następująco: 21 900 BXU/kg (starter), 15 900 BXU/kg (grower), 17 900 BXU/kg (finisz); w grupie EMU+ENZ: 19 200 BXU/kg (starter), 19 100 BXU/kg (grower), 18 800 BXU/kg (grower)

²Dostarcza na kg diety: witaminę A, 11250 j.m.; witamina D, 2500 j.m.; witamina E, 80 mg; witamina K, 2.50 mg; witamina B12, 0.02mg; kwas foliowy, 1.17 mg; cholina, 379 mg; D - kwas pantotenowy, 12.5 mg; ryboflawina, 7.0 µm; niacyna, 41.67 mg; tiamina, 2.17 mg; D - biotyna, 0.18 mg; pirydoksyna, 4.0 mg; etoksychina, 0.09 mg; Mn, 73 mg jako tlenek manganawy; Zn, 55 mg jako tlenek cynku; Fe, 45 mg jako siarczan żelaza; Cu, 20 mg jako siarczan miedzi; I, 0.62 mg jako jodek wapnia; Se, 0.3 mg jako selen potasowy; salinomycyna, 60 mg

³Quantum Blue, AB-Vista UK, 1000 FTU/kg diety

W obu doświadczeniach zastosowano emulgator GRP (rycynooleinian glikolu glicerylowo-polietylenowego, E484, Bredol 683, AkzoNobel SC AB, Stenungsund, Szwecja) poprzez częściowe zastąpienie kukurydzy. Równowagę hydrofilowo-lipofilową dla Bredolu 683 określono na poziomie 9.5. Do przygotowania diet wykorzystano mieszalnik horyzontalny (Zuptor 300 MPW, Zuptor sp. zoo., Gostyń, Polska) z

ustawieniem pasma mieszającego na 27.4 obr/min przez 4 min. Kukurydza została zmielona w młynie dyskowym Skiold (SK2500, Skiold A/S, Sæby, Dania). Minerale, witaminy, aminokwasy, enzymy, emulgator oraz tłuszcze zostały dodane bezpośrednio do miksera. W celu zapewnienia homogenności, przed dodaniem do paszy zmieszano niewielką ilość emulgatora z olejami, w przypadku enzymu; z paszą podstawową jako premiks. W dietach okresu finiszera jako marker żywieniowy dodano dwutlenek tytanu (TiO₂) w ilości 3.0 g/kg, aby obliczyć strawność jelitową oraz wydalanie całkowitego i wolnego kwasu sjałowego. Izoenergetyczne i izobiałkowe diety zadawane były *ad libitum*, podobnie jak dostęp do wody. Diety spełniały lub przekraczały zalecenia żywieniowe Aviagen dla kurcząt brojlerów (AVIAGEN, 2014).

6.3. Układ i przebieg doświadczeń

W doświadczeniu nr 1 i 2 wykorzystano kolejno 384 oraz 480 sztuk brojlerów, podzielonych na 4 klasy wagowe (różnica między każdą klasą wynosiła 0.5 grama) oraz losowo przydzielonych do 4 grup żywieniowych. W doświadczeniu nr 1 zastosowano 12 powtórzeń w każdej grupie eksperymentalnej, w doświadczeniu nr 2 zastosowano 15 powtórzeń: w obu eksperymentach do każdego powtórzenia wybrano po 8 osobników (po 2 ptaki z każdej klasy wagowej).

Zwierzęta były utrzymywane w kojcach ściółkowych o wymiarach 1.2 x 0.8 m na ściółce trocinowej. W pierwszym tygodniu eksperymentu ptaki były doświetlane przez 24 h, następnie otrzymywały 16 h światła i 8 h ciemności. Temperatura pomieszczenia w pierwszym tygodniu doświadczenia wynosiła 32 °C, stopniowo malejąc do 23 °C pod koniec trzeciego tygodnia doświadczenia.

6.4. Kolekcja i przygotowanie prób

W celu określenia parametrów produkcyjnych w obu doświadczeniach monitorowano średnie pobranie paszy (FI) oraz przyrost masy ciała (BWG) po zakończeniu każdego okresu żywieniowego (starter, grower, finisz), wykorzystując kojec jako jednostkę eksperymentalną. Przed pomiarem masy ciała ptaki były głodzone przez 4 h. Zgodnie z badaniami (Verkamp, 1986; Kim i in., 2007) resztki niestrawionego pokarmu mogą wpłynąć na odczyt wyników, a 4 h to minimalny czas głodówki odpowiedni do pomiarów rzeczywistej masy ciała w związku z czasem wydalania treści zalegającej w jelitach. Bazując na FI i BWG obliczono współczynnik wykorzystania paszy (FCR). Śmiertelność w obu doświadczeniach była niska i niezwiązana ze skarmianiem mieszanek doświadczalnych, nie przekraczała 4 % (dane nieopublikowane).

Podczas okresu finisz, w 28 oraz 35 dniu trwania eksperymentu, w celu pobrania prób kałomoczu zainstalowano tace zbiorcze w kojcach ściółkowych (12 powtórzeń na grupę/kolekcję w doświadczeniu nr 1, 15 powtórzeń na grupę/kolekcję w doświadczeniu nr 2; w każdym powtórzeniu po 8 ptaków w obu doświadczeniach). Ptaki zostały przeniesione z kojcy, następnie ruszty podłogowe zostały umieszczone nad tacami zbiorczymi. Po 2 dniach, wolne od zanieczyszczeń (paszy, piór, ściółki) próby kałomoczu zostały zebrane w ciągu doby trzykrotnie, następnie zostały zamrożone, zliofilizowane oraz zmielone w celu przeprowadzenia dalszych analiz.

W obu doświadczeniach pod koniec okresu finisz (35 dzień) poddano eutanazji 100 osobników (25 z każdej grupy). Zastosowano ogłuszanie elektryczne jako zalecaną metodę eutanazji dla zwierząt eksperymentalnych (dyrektywa Uni Europejskiej (EU) 2010/63/EU dla eksperymentów na zwierzętach).

W celu określenia strawności składników pokarmowych w obu doświadczeniach pobrano treść jelita krętego (n = 10) poprzez delikatne wyciśnięcie. W doświadczeniu nr 2 treść z jelita krętego posłużyła również do określenia lepkości treści przewodu pokarmowego oraz koncentracji krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Treść z jelit ślepych posłużyła w obu doświadczeniach do określenia koncentracji krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, dodatkowo do sprawdzenia aktywności enzymów bakteryjnych w doświadczeniu nr 2. Próby po pobraniu zostały zamrożone w ciekłym azocie, następnie przechowane w - 80 °C do czasu przeprowadzenia dalszych analiz.

W obu doświadczeniach pobrano 2 cm fragmenty środkowego jelita czczego oraz środkowego jelita krętego w celu pomiarów histomorfometrycznych.

W doświadczeniu nr 2 dodatkowo pobrano fragmenty jelita krętego oraz jelit ślepych w celu analizy populacji bakterii metodą RT-PCR (n = 10). W celu analizy ekspresji genów 5 cm fragmenty jelita krętego oraz jelit ślepych zostały natychmiastowo umieszczone na schłodzonym szkle, rozcięte i kilkakrotnie wypłukane schłodzonym roztworem soli fizjologicznej. Małe fragmenty tkanek ($\approx 0.5 \times 0.5$ cm) zostały pobrane przy użyciu sterylnych szczypiec i natychmiastowo zamrożone w ciekłym azocie.

6.5. Analizy chemiczne

Pasza, zliofilizowane treści jelit oraz kałomocz, zostały zmielone w młynku laboratoryjnym na sicie o średnicy 1 mm. Próbkę paszy zostały przeanalizowane pod kątem zawartości suchej masy (zgodnie z metodą 2001.12), białka ogólnego (metoda 976.05), tłuszczu określonego jako ekstrakt eterowy (metoda 920.39) przy użyciu aparatury Soxtec System HT 1043 Extraction Unit (Foss Tecator, Dania) oraz frakcji włókna NDF oznaczonego z użyciem termostabilnej amylazy i wyrażonego łącznie z pozostałym popiołem (metoda 973.18) zgodnie z wytycznymi AOAC (2005). Energia brutto (GE) pasz została oznaczona dzięki adiabatycznej bombie kalorymetrycznej (KL 12Mn, Precyzja-Bit PPHU, Bydgoszcz, Polska) standaryzowanej kwasem benzoesowym. W doświadczeniu nr 1 przy pomocy chromatografii gazowej przeprowadzono dodatkowo analizę koncentracji KKT w oleju sojowym i palmowym, wykorzystując w tym celu metodę opisaną przez Szczechowiak i in., (2016).

Również próby kałomoczu (GE, NDF, N) oraz treści jelit (białko ogólne, ekstrakt eterowy) zostały przeanalizowane powyższymi metodami w celu określenia pozornej strawności całkowitej w przewodzie pokarmowym (ATTD) oraz pozornej strawności jelitowej (APD). W przypadku doświadczenia 1 dodatkowo analizie poddano poziom Ca w treści jelita cienkiego (metoda 927.02) oraz skrobi (metoda 996.11, bazując na zestawie do oznaczania całkowitej zawartości skrobi Megazyme).

Poziom TiO_2 w paszy, treści pokarmowej oraz kałomoczu został określony zgodnie z metodą opisaną przez Short i in., (1996) z procedurą przygotowania prób proponowaną przez Myers i in., (2004).

Badania histomorfometryczne wykorzystaniem odcinków jelita czczego oraz krętego zostały przeprowadzone zgodnie z metodą opisaną przez Konieczka i in., (2018). Przygotowane próbki zostały odwodnione oraz zatopione w parafinie. Przekroje poprzeczne przygotowanych preparatów pocięto na mikrotomie w plastry o grubości 4.5 μm , następnie skrawki były barwione hematoksyliną i eozyną. W celu dalszej analizy wykonano zdjęcia prób wykorzystując w tym celu mikroskop świetlny (Olympus BX51 microscope; Olympus Corp., Tokyo, Japonia) z oprogramowaniem CellD Imaging (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Niemcy). Zmierzono następujące parametry histomorfometryczne: wysokość kosmków (VH) – mierzona od wierzchołka kosmka do połączenia kosmka z kryptą; głębokość krypt (CD) – mierzona od ujścia krypty do podstawy; grubość błony śluzowej błazki mięśniowej; szerokość kosmków – na

przekroju środkowym kosmka; powierzchnie kosmków (VSA). Dodatkowo obliczono współczynnik wysokości kosmka do głębokości krypty (VH/CD).

Zawartość całkowitego i wolnego kwasu sjałowego w kałomoczu została oznaczona procedurą opisaną przez Jourdian i in., (1971). Izolację surowych mucyn z kałomoczu przeprowadzono metodą opisaną przez Lien i in., (1996); ok. 0.6 g zliofilizowanego kałomoczu połączono w temperaturze 4 °C z 5 mL chlorku sodu (0.15 mol/L) zawierającego 0.2 M/L azydku sodu. Próby po homogenizacji poddano wirowaniu przy 12000 g przez 30 min. Supernatant przeniesiono do nowych probówek oraz ponownie poddano wirowaniu (12000 g przez 30 min) w celu usunięcia nierozpuszczalnego materiału. Następnie, supernatant przeniesiono do zważonych wcześniej probówek oraz schłodzono w lodzie. Do supernatantu dodano lodowatego etanolu 60 % oraz ponownie schłodzono w lodzie, następnie pozostawiono przez noc w temperaturze 20 °C w celu wytrącenia. Kolejnym etapem było odwirowanie prób (1400 g przez 10 min) oraz rozpuszczenie surowych mucyn w 2 mL destylowanej wody. Następnie, do 0.5 mL preparatu surowych mucyn dodano 0.1 mL 0.04 M roztworu kwasu nadjodowego. Roztwór został wymieszany oraz umieszczony w lodzie na 20 min. Następnie dodano 1.25 mL odczynnika rezorcyłowego, ponownie wymieszano, umieszczono w lodzie na 5 min, ogrzano w 100 °C przez 15 min, schłodzono, dodano 1.25 mL alkoholu tert-butyłowego, mocno wstrząśnięto aż do otrzymania roztworu jednofazowego. W celu ustabilizowania barwy, próbówki zostały umieszczone w łaźni wodnej o temperaturze 37 °C na 3 min, następnie zostały schłodzone do temperatury pokojowej. Absorbancje roztworów odczytano przy długości fali 630 nm stosując spektrofotometr Media (Marcel Lamidey S.A., Châtillon, Francja). Zawartość całkowitego i wolnego kwasu sjałowego w kałomoczu została wyrażona w $\mu\text{mol/g TiO}_2$.

Koncentracja KKT w jelitach (doświadczenie nr 1 – jelita ślepe, doświadczenie nr 2 – jelito kręte i ślepe) została określona za pomocą chromatografii gazowej metodą opisaną przez Konieczka i in. (2019). Chromatograf gazowy HP 5890 Series II (Hewlett Packard, Waldbronn, Niemcy) z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym, kolumną kapilarną ze stopionej krzemionki Supelco Nukol (wewnętrzna średnica 30 m x 0.25 mm, powłoka 0.25 mm), oraz hel jako gaz nośny zostały wykorzystane do separacji. Koncentrację poszczególnych KKT przeprowadzono za pomocą wzorca wewnętrznego – kwasu izokapronowego.

Dodatkowo w doświadczeniu nr 2 analizie poddano lepkość treści pokarmowej, aktywność enzymów bakteryjnych w jelicie ślepym, populację bakterii oraz ekspresję genów w jelitach krętym i ślepych.

W celu określenia lepkości treści pokarmowej pobrano ok. 2 g świeżej treści z jelita krętego i natychmiast umieszczono w mikrowirówce poddając wirowaniu przy $12700 \times g$ przez 5 min. Odsączony pipetą supernatant przechowywano na lodzie do czasu przeprowadzenia analizy lepkości. Lepkość treści jelitowej zmierzono za pomocą lepkościomierza ($mPas \cdot s = cP = 1 \times 100 \text{ dyn s cm}^{-2}$) Brookfield Digital DV-II+ cone/plate (Brookfield Engineering Laboratories Inc., Stoughton, MA, USA) przy prędkości 42.5 s^{-1} w $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

Glikolityczna aktywność enzymów bakteryjnych została przeprowadzona na treści jelit ślepych przy pomocy metody spektrofotometrycznej opisanej przez Konieczka i Smulikowska (2017). Aktywność mierzono pod względem szybkości uwalniania p-(o-)nitrofenolu z nitrofenyloglukozydów. Dla każdego enzymu bakteryjnego zastosowano odmienne podłoże: dla β -glukuronidazy, p-nitrofenylo- β -D-glukuronid; dla α -glukozydazy p-nitrofenylo- α -D-glukopiranozyd; dla β -glukozydazy p-nitrofenylo- β -D-glukopiranozyd; dla α -galaktozydazy, p-nitrofenylo- α -D-galaktopiranozyd, dla β -galaktozydazy, p-nitrofenylo- β -D-galaktopiranozyd (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Treść pokarmową w ilości 0.5 g rozcieńczono buforem fosforanowym (0.1 M, pH 7.0) w stosunku 1:10 (wag./obj.). Po homogenizacji, roztwór dwukrotnie sonikowano przez 30 s, następnie poddano wirowaniu ($10\ 000 \times g$, 15 min). Supernatant w ilości 0.12 ml zmieszano z 0.18 ml roztworu substratu (5 mM), inkubowano przez 10 min (37°C), następnie dodając 1.5 ml zimnego 0.25 M roztworu węgla sodu. Absorbancję optyczną stężenia p-(o-)nitrofenolu mierzono przy 400 nm (p-nitrofenol) lub 420 nm (o-nitrofenol). Próby treści pokarmowej analizowano trzykrotnie (w oddzielnych seriach). Aktywność enzymu została wyrażona w mikromolach produktu utworzonego na minutę (U) na gram próbki.

W celu określenia populacji bakterii w jelitach krętym i ślepych, wykorzystano metodę PCR. Amplifikację genu rRNA 16S dla całkowitej populacji bakterii oraz poszczególnych grup przeprowadzono z wykorzystaniem specyficznych starterów, które przedstawiono w Tabeli 3. Otrzymane produkty PCR poddano elektroforezie na 2% żelu agarozowym. Ilościowego oznaczenia produktów PCR dokonano za pomocą oprogramowania ImageJ 1.47v h (National Institute of Mental Health, Bethesda, MD,

USA). Ilościowe zmiany każdej grupy bakterii wyrażono jako stosunek do całkowitej liczby bakterii w próbce. Próbkę analizowano w dwóch powtórzeniach.

Tabela 3. Sekwencje starterów użytych do amplifikacji bakteryjnego genu 16S rRNA.

Rodzaj	Startery	Sekwencja 5'-3'	Długość produktu PCR (pary zasad)
Uniwersalny	Reverse	CGTGCCAGCCGCGGTAATACG	611
	Forward	GGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACAT	
<i>Lactobacillus spp.</i>	Forward	CATCCAGTGCAAACCTAAGAG	286
	Reverse	GATCCGCTTGCCTTCGCA	
<i>Escherichia coli</i>	Forward	GGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTC	585
	Reverse	TTCCCGAAGGCACATTCT	
<i>Clostridium spp.</i>	Forward	AAAGGAAGATTAATACCGCATAA	722
	Reverse	ATCTTGCGACCGTACTCCCC	
<i>Bifidobacterium spp.</i>	Forward	CGGGTGCTICCCACTTTCATG	1417
	Reverse	GATTCTGGCTCAGGATGAACG	

Ekspresja genów (SGLT1, PEPT1, FATP1, GLUT2) została określona dzięki metodzie PCR w czasie rzeczywistym (ang. Real-Time PCR). Do izolacji całkowitego RNA użyto zestawu ReliaPrep™ RNA Tissues Miniprep System (Promega, Madison, WI), zgodnie z zaleceniami producenta. Uzyskane RNA rozpuszczono w wolnej od nukleaz wodzie (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a następnie poddano oznaczeniu ilościowemu i jakościowemu przy wykorzystaniu spektrofotometru Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Integralność RNA sprawdzano poprzez elektroforezę na żelu agarozowym. cDNA wygenerowano przy wykorzystaniu komercyjnego zestawu High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta. Badania dotyczące ekspresji wybranych genów przeprowadzono z wykorzystaniem urządzenia the StepOnePlus Real-Time PCR System (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA) z wykorzystaniem barwnika SYBR Green. Każda pojedyncza reakcja zawierała 5 µL odczynnika PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), 900 nmol każdego ze starterów (forward lub reverse), 1 µL próbki cDNA oraz wody wolnej od nukleaz, którą dopełniano próbkę do objętości 10 µL Górka i in., (2018). Algorytm NormFinder został wykorzystany do wybrania najbardziej optymalnych genów referencyjnych (Andersen i in., 2004) w celu normalizacji ekspresji genów badanych: GAPDH, RPL13, RPL4 i PPIC.

6.6. Obliczenia i analiza statystyczna

Wartości APD oraz pozornej energii metabolicznej skorygowanej do zerowego bilansu azotu (AME_N) dla diet zostały obliczone w stosunku do wskaźnika TiO_2 w paszy, treści pokarmowej oraz kałomoczu. Strawność składników pokarmowych została obliczona według poniższego równania:

$$\text{Strawność} = \left\{ 1 - \left[\frac{TiO_2 \text{ w paszy}}{TiO_2 \text{ w treści pokarmowej}} \times \left(\frac{\text{składnik}_{\text{w treści pokarmowej}}}{\text{składnik}_{\text{w paszy}}} \right) \right] \right\},$$

gdzie zawartość TiO_2 oraz składników pokarmowych jest wyrażona w g/kg.

Wartość AME_N dla diet została obliczona według poniższego równania:

$$\begin{aligned}
AME_N \left[\frac{\text{MJ}}{\text{kg}} \right] &= GE_{\text{kałomoczu}} - \left[GE_{\text{kałomoczu}} \times \left(\frac{\text{TiO}_2 \text{ w paszy}}{\text{TiO}_2 \text{ w kałomoczu}} \right) \right] \\
&- 0.0344 \times \left\{ N_{\text{paszy}} - \left[N_{\text{kałomoczu}} \times \left(\frac{\text{TiO}_2 \text{ w paszy}}{\text{TiO}_2 \text{ w kałomoczu}} \right) \right] \right\},
\end{aligned}$$

gdzie GE odpowiada energii brutto [MJ/kg], N azotowi, TiO₂ markerowi żywieniowemu. Pozorna energia metaboliczna (AME) została skorygowana do zerowego bilansu azotu przyjmując wartość energetyczną azotu równą 34.4 MJ/kg, jak opisano w pracy Hill i Anderson (1958).

6.6.1 Doświadczenie nr 1 - poekstrakcyjna śruta rzepakowa

Badania przeprowadzono w układzie całkowicie losowym. Każdy kojec stanowił jednostkę eksperymentalną dla wyników parametrów produkcyjnych oraz ATTD, AME_N, APD dla wybranych osobników, analizy morfometrycznej kosmków jelitowych, wydalania kwasu sjałowego. Poziom istotności ustalono na $P \leq 0.05$. Dane zostały poddane obliczeniom z wykorzystaniem jednokierunkowej analizy wariancji z wykorzystaniem środowiska R (R Development Core Team, 2014) oraz pakietu Agrícola (de Mendiburu, 2014) wykorzystując następujący model:

$$Y_i = \mu + \alpha_i + \varepsilon_i,$$

gdzie Y_i odpowiada zmierzonej wartości zależnej, μ jest średnią ogólną, α_i jest efektem dodatku oraz ε_i jest losowym błędem.

6.6.2 Doświadczenie nr 2 -pszenżyto

Kojce reprezentowały jednostkę doświadczalną dla FI i FCR, dla pozostałych parametrów (BWG, strawność, względna ekspresja genów itp.) ptak był jednostką doświadczalną. Poziom istotności ustalono na $P \leq 0.05$. Wszystkie dane zostały poddane modelowi mieszanemu procedury NLMN w środowisku R (R Development Core Team, 2014) z wykorzystaniem pakietu Agrícola (de Mendiburu, 2014). Model posiadał efekty główne ENZ i EMU oraz powiązane interakcje jako efekty stałe. Do rozdzielania średnich dla efektów głównych i efektów interakcji wykorzystano niezależny t-test i metodę Duncana.

7. Najważniejsze wyniki badań własnych

7.1. Doświadczenie nr 1 – poekstrakcyjna śruta rzepakowa

7.1.1. Chemiczny skład paszy

Kompozycja kwasów tłuszczowych (KT) w olejach wykorzystanych w doświadczeniach znajduje się w Tabeli 4. Określony profil KT w paszy ukazał różnice pomiędzy olejem sojowym, a palmowym. Nasycone kwasy tłuszczowe (SFA) stanowiły prawie 50 % oleju palmowego, przy dominującym udziale kwasu palmitynowego (42 %) oraz stearynowego (4.78 %). Olej sojowy składał się głównie z wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) przy dominującym udziale kwasu linolenowego (51.7 %). W oleju sojowym SFA nie przekraczały 16.5 %.

Tabela 4. Kompozycja kwasów tłuszczowych (% ogólnych kwasów tłuszczowych) w olejach wykorzystanych w doświadczeniach

Kwasy tłuszczowe, %	Olej sojowy	Olej palmowy
Nasycone kwasy tłuszczowe		
C12:0 Kwas laurynowy	0.07	0.16
C14:0 Kwas mirystynowy	0.08	1.01
C16:0 Kwas palmitynowy	10.0	42.9
C18:0 Kwas stearynowy	5.50	4.78
Jednonienasycone kwasy tłuszczowe		
C18:1cis9 Kwas oleinowy	21.8	39.8
C18:1c11 Kwas wakcenyowy	1.30	0.72
C20:1t Kwas eikozenowy	0.47	0.39
Wielonienasycone kwasy tłuszczowe		
C18:2c9c12 Kwas linolowy	51.7	9.30
C18:3c9c12 c15 α - Kwas linolenowy	7.53	0.22
C18:3n6 γ – linolenowy	0.19	0.15
C20:3n6 Homo - γ – linolenowy	0.58	0.10
C20:5n3 kwas ikozapentaenowy	0.23	0.12

SFA ¹	16.1	49.1
UFA ²	83.9	50.9
MUFA ³	23.1	40.9
PUFA ⁴	60.4	9.95

¹Nasycone kwasy tłuszczowe, ²Nienasycone kwasy tłuszczowe, ³Jednonienasycone kwasy tłuszczowe, ⁴Wielonienasycone kwasy tłuszczowe

7.1.2. Parametry produkcyjne

Podczas całego okresu trwania doświadczenia najniższe pobranie paszy (FI) zaobserwowano w grupie EMU + ENZ ($P \leq 0.05$). W tej samej grupie zaobserwowano również zwiększony przyrost masy ciała (BWG) w stosunku do grup bez dodatku enzymu ($P \leq 0.05$). Wszystkie grupy z dodatkami posiadały niższy współczynnik wykorzystania paszy (FCR) od CON, przy czym grupa EMU + ENZ charakteryzowała się najniższą wartością FCR ($P \leq 0.05$). Śmiertelność ptaków wyniosła ok. 4 % (15 sztuk) i nie była powiązana z czynnikami żywieniowymi.

7.1.3. Strawność

Nie zanotowano różnic w AME_N pomiędzy grupami doświadczalnymi. Grupa EMU + ENZ miała najwyższą wartość APD CP oraz skrobi ($P \leq 0.05$), podobnie jak degradacji NDF. Interesującym wynikiem jest wyższa statystycznie degradacja NDF w grupie CON w porównaniu do grup EMU i ENZ. Grupy z dodatkiem emulgatora posiadały wyższe APD EE, najwyższą wartość została zaobserwowana w grupie EMU ($P \leq 0.05$). W przypadku APD Ca jedynie grupa EMU + ENZ różniła się od grupy CON ($P \leq 0.05$); podobny trend zaobserwowano dla ATTD EE w 24 dniu. Nie zanotowano różnic dla ATTD EE w 35 dniu.

7.1.4. Morfologia kosmków jelitowych

Suplementacja dodatkami zwiększyła powierzchnię kosmków jelita czczego ($P \leq 0.05$), jednak różnica nie była widoczna między grupą EMU a CON. W grupie EMU + ENZ zaobserwowano tendencję do zwiększonej VH, zmniejszonej VW w stosunku do CON, oraz najwyższy współczynnik VH/CD ($P < 0.1$). Nie zaobserwowano różnic między grupami w przypadku CD, czy grubości błony śluzowej blaszki mięśniowej w jelicie czczym. Podobnie, nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy wyżej wymienionymi parametrami w przypadku kosmków jelitowych jelita krętego.

7.1.5. Ekskrecja kwasu sjałowego

Nie zanotowano różnic między grupami w ogólnej i wolnej ilości kwasu sjałowego w 28 dniu trwania eksperymentu. W 42 dniu grupa EMU + ENZ wykazała najmniejszą ekskrecję kwasu sjałowego zarówno ogólnego, jak i wolnego ($P \leq 0.05$), jednakże bez statystycznie istotnej różnicy w porównaniu do grupy ENZ.

7.1.6. Koncentracja KKT

W przypadku grupy EMU + ENZ zaobserwowano obniżenie koncentracji kwasu octowego oraz ogólnej zawartości KKT w jelitach ślepych w porównaniu do grupy CON. Nie zanotowano różnic między grupami w przypadku koncentracji kwasu propionowego, masłowego, izomasłowego, walerianowego i izowalerianowego.

7.2. Doświadczenie nr 2 - pszenżyto

7.2.1. Parametry produkcyjne

Istotne statystycznie różnice między FI oraz BWG zaobserwowano jedynie w okresie starter, gdzie oba parametry wykazywały korzystniejsze wartości w grupach suplementowanych ($P \leq 0.05$). Od 1 do 11 dnia trwania doświadczenia, grupy suplementowane przedstawiały wyższe wartości BWG w porównaniu do grupy CON. W przypadku FI w okresie starter, jedynie grupy suplementowane enzymem różniły się istotnie ($P \leq 0.05$) od grupy CON, przedstawiając zmniejszone FI. Polepszenie parametru FCR zanotowano we wszystkich suplementowanych grupach.

7.2.2. Strawność

Osobniki z grup z dodatkiem emulgatora prezentowały największą wartość AME_N ($P \leq 0.01$), podobnie jak w przypadku rozkładu DM ($P \leq 0.05$). Rozkład NDF był największy w grupie EMU + ENZ ($P \leq 0.05$), jednak nie różnił się od grupy EMU. Powyższe parametry strawności wskazały istotne statystycznie różnice pomiędzy grupą CON, a grupami suplementowanymi.

7.2.3. Lepkość treści pokarmowej

Lepkość treści pokarmowej w jelicie krętym była najniższa w grupach z dodatkiem enzymu, prezentując wartość ok. 20 % niższą niż w przypadku grupy CON ($P \leq 0.05$). Grupie EMU nie zanotowano różnic w stosunku do grupy CON.

7.2.4. Ekskrecja kwasu siałowego

Zaobserwowano zmniejszenie całkowitego wydalanego kwasu siałowego w 28 dniu po zastosowaniu enzymu ($P \leq 0.05$). Nie zanotowano istotnych statystycznie różnic w ekskrecji wolnego kwasu siałowego między grupami w 28 dniu trwania doświadczenia.

7.2.5. Aktywność enzymów bakteryjnych

Aktywność α -galaktozydazy, α -glukozydazy oraz β -glukozydazy była wyższa w grupie CON w porównaniu z grupami suplementowanymi ($P \leq 0.05$) co skutkowało interakcją pomiędzy emulsyfikatorem a enzymem.

7.2.6. Koncentracja KKT

W jelicie krętym zaobserwowano różnice między grupami w koncentracji kwasu walerianowego (C5). Zastosowanie enzymu zwiększyło ($P < 0.05$) stężenie kwasu walerianowego w treści pokarmowej ($P \leq 0.05$). Zmiany nie wpłynęły na różnice w ogólnej koncentracji KKT między grupami.

W jelitach ślepych koncentracja kwasu octowego była większa w grupach suplementowanych niż w grupie CON ($P \leq 0.05$). Powyższy wynik znalazł odzwierciedlenie w ogólnej koncentracji KKT. Zanotowano również różnice ($P \leq 0.05$) w koncentracji kwasu masłowego; najniższy poziom wykazała grupa CON, zastosowanie ksylanazy i emulgatora zwiększyło stężenie kwasu masłowego ($P \leq 0.05$).

7.2.7. Histomorfometria

Morfometria błony śluzowej jelita krętego wykazała wyższy stosunek VH/CD w grupie EMU + ENZ w porównaniu do grupy EMU, jednakże nie różniła się od grupy ENZ czy CON ($P \leq 0.05$). Grubość błony śluzowej blaszki mięśniowej w jelicie czczym zwiększyła się po zastosowaniu enzymu ($P \leq 0.05$).

7.2.8. Ekspresja genów

Najniższą ekspresję genów SGLT1, PEPT1 i FATP1 na poziomie mRNA w jelicie krętym zaobserwowano w grupie EMU ($P \leq 0.05$).

Po zastosowaniu ksylanazy nastąpiło zmniejszenie ekspresji GLUT2 w jelicie ślepych w porównaniu z innymi grupami, co skutkowało interakcją między ksylanazą a emulgatorem ($P \leq 0.05$).

8. Dyskusja

8.1. Wpływ zastosowania emulgatora i karbohydraz oraz ich mieszaniny na stopień wykorzystania składników pokarmowych diety - parametry produkcyjne i strawność

8.1.1. Doświadczenie nr 1 – poekstrakcyjna śruta rzepakowa

Podczas pierwszego tygodnia życia kurcząt brojlerów sekrecja endogennej lipazy oraz soli żółciowych jest nieznaczna (Sklan, 2001), co negatywnie wpływa na strawność tłuszczu w tym okresie. W związku z powyższym, propozycja suplementacji diet dodatkami paszowymi jest uzasadniona. Niniejsze badanie potwierdza wcześniejsze doniesienia o poprawie parametrów produkcyjnych jak FI oraz FCR w grupach doświadczalnych po zastosowaniu dodatków (Aftab, 2009; de Vries i in., 2014; Kaczmarek i in., 2014). Autorzy powyższych prac spekulują, iż poprawa w FI, występująca po zastosowaniu enzymu i/lub emulgatora jest związana z poprawą wykorzystania paszy. Wyniki strawnościowe niniejszego badania częściowo potwierdzają powyższą hipotezę. W grupach z dodatkiem emulgatora zauważono wyraźną poprawę w strawności tłuszczu (APD, $P \leq 0.05$; ATTD w 24 dniu, $P \leq 0.05$). Przypuszczalnie, do zapewnienia zapotrzebowania kalorycznego brojlery potrzebowały mniej paszy, stąd zmniejszone FI (Mathlouthi i in., 2002). Dodatkowo, polepszona strawność tłuszczu umożliwiła fizyczny dostęp enzymów trawiennych przewodu pokarmowego do pozostałych składników pokarmowych, co zwiększyło ich rozkład i absorpcję (Danicke i in., 1999). Poprawa FI widoczna po zastosowaniu dodatków (nawet w okresie starter), jest niespójna z wynikami poprzednich badań (Cowieson i in., 2010; Alzawqari, 2011; Guerreiro i in., 2011; de Vries i in., 2014; Ahmadi, 2016). Możliwym wytłumaczeniem tej rozbieżności może być zastosowanie różnych rodzajów emulgatorów (Abbas i in., 2016), np. wysuszoną żółć wołową lub emulgator zawierający kazeinę z mleka. Zważając na fakt zastosowania w niniejszym doświadczeniu diet, w których poziom tłuszczu przekraczał 5 % oraz zawierał tłuszcze nasycone (olej palmowy), spodziewano się mniej korzystnego FCR w grupie CON w porównaniu do pozostałych grup. We wcześniejszych badaniach (Zaefarian i in., 2015) wykazano, że dodatek tłuszczów nasyconych (łój wołowy) do diety powoduje zmniejszenie wydajności brojlerów na skutek pogorszenia wykorzystania tłuszczu (w stosunku do dodatku tłuszczów nienasyconych; oleju sojowego). W niniejszym badaniu, grupa EMU + ENZ prezentowała najkorzystniejszy FCR, jako następstwo najniższego FI przy najwyższym BWG. Jak wspomniano wcześniej, w związku z niedojrzałością układu pokarmowego,

zdolność trawienia i wchłaniania składników pokarmowych u świeżo wyklutych ptaków jest osłabiona (Ravindran i Abdollahi, 2021). Z tego względu, w warunkach żywienia dietami zawierającymi słabo strawne źródło tłuszczu (olej palmowy), po dodatku emulgatora w okresie starter (1 – 11 dnia), zauważono istotne polepszenie FCR, co również było widoczne w zwiększonym BWG. Po zakończeniu newralgicznego okresu po wykluciu, do ok. 2 tygodnia życia brojlerów, następuje rozwinięcie układu pokarmowego (Ravindran i Abdollahi, 2021). Poprawny rozwój i dojrzewanie układu pokarmowego odzwierciedlone zostało w braku różnic między BWG czy FCR podczas okresu grower (12 – 25 dzień). Wyniki zwiększonego BWG w grupach z dodatkiem enzymu są sprzeczne z wcześniejszymi badaniami, gdzie zastosowano oba dodatki oddzielnie (Aftab, 2009; de Vries i in., 2014).

Powyższe wyniki jasno wskazują pozytywne współdziałanie obu dodatków na wykorzystanie składników pokarmowych, co dodatkowo znalazło potwierdzenie w największej APD CP i skrobi, oraz degradacji NDF. Podobne wyniki otrzymano w przypadku zwiększonego ATTD oraz APD EE w porównaniu do grupy CON. Jednakże, największe APD EE zaobserwowano w grupie EMU, co pokrywa się z wynikami pracy Guerreiro i in., (2011). Powyższy wynik może sugerować obniżenie pozytywnego działania emulgatora na strawność tłuszczu przez dodatek enzymu. Z jednej strony, po zastosowaniu karbohidrazy, niektóre z produktów rozkładu NSP PŚRz mogą mieć negatywny wpływ na strawność tłuszczu. Komórki ściany polisacharydów PŚRz są mocno powiązane wiązaniami estrowymi lub mostkami wodorowymi. Nawet po rozkładzie enzymatycznym, wciąż mogą pozostać niestrawne związki, np. ksyloglukan lub celuloza, lub pozostałości po polisacharydach pektynowych: ramnozyl, arabinozyl, uronyl (Pustjens i in., 2013; 2014). Z drugiej strony, badania Jia i in., (2012) sugerują, iż odpowiedź enzymatyczna po zastosowaniu multikarbohidraz może się różnić w zależności od profilu NSP, wskazując wysoką zawartość oligosacharydów i polisacharydów pektynowych jako przyczynę zwiększonej wartości AME_N dla brojlerów. Jednakże, w obecnym badaniu wartości AME_N nie różniły się między grupami, podobnie jak ATTD EE w dniu 35. Dodatkowo, między ATTD a APD EE zanotowano nieznaczną różnicę, co sugeruje jelito czcze oraz górny odcinek jelita krętego jako główne miejsca trawienia i wchłaniania tłuszczu u drobiu (Tancharoenrat i Ravindran, 2014). Dobrze znanym jest fakt nieznacznego wchłaniania tłuszczu w dolnych segmentach układu pokarmowego u zwierząt monogastrycznych. Zjawisko to może częściowo tłumaczyć brak różnic w ATTD EE pod koniec trwania eksperymentu (35 dzień). W przypadku

ATTD EE w dniu 28 pojawiły się różnice w grupach z dodatkiem emulgatora. Przypuszczalnie, emulgator poprzez usprawnienie procesu wykorzystania tłuszczu, zmniejszył fizyczne pokrycie składników pokarmowych tłuszczem, co w konsekwencji poskutkowało zwiększonym wystawieniem ich na działanie enzymów trawiennych i egzogennych (Danicke i in., 1999). Za powyższym twierdzeniem przemawiają również wyniki najwyższej ATTD EE w dniu 28 w grupie z jednoczesną suplementacją emulgatora i enzymu, które były jednak niższe niż w przypadku dnia 35. Przypuszczalnie, pogorszona strawność tłuszczu w początkowym okresie życia brojlerów może być związana ze wspomnianą wcześniej niedostatecznie rozwiniętą syntezą soli żółciowych w pierwszych dniach życia (Krogdahl, 1985).

Najwyższe APD CP i skrobi w grupie EMU + ENZ wskazuje na współdziałanie ze sobą obu dodatków, podczas gdy zastosowanie jedynie enzymu nie spowodowało różnic w stosunku do CON, co jest zgodne z wcześniejszymi badaniami (Kocher i in., (2000); de Vries i in., (2014). NSP PŚRz wykazują efekt „kapsułkowania”; mogą wbudowywać w struktury ścian komórkowych białka lub inne składniki pokarmowe. Efekt ten uniemożliwia endogennym enzymom na dotarcie do substratu, skutkując upośledzeniem procesu trawienia i powodując straty w składnikach pokarmowych (Raza i in., 2019). W przypadku jednoczesnej suplementacji dwoma dodatkami zaobserwowano zniwelowanie tego niekorzystnego efektu.

We wcześniejszych badaniach (Francesch i Geraert, 2009), po zastosowaniu koktajlu enzymatycznego, zaobserwowano również zwiększoną retencję Ca co objawiało się lepszą mineralizacją kośćca. Uważa się iż znaczny dodatek tłuszczów nasyconych w dietach dla brojlerów zmniejszy dostępność minerałów oraz obniży retencję Ca na skutek formowania się nierozpuszczalnych mydeł w treści przewodu pokarmowego (Selle i in., 2009; Tancharoenrat i Ravidran, 2014). W obecnym doświadczeniu nr 1, APD Ca była najwyższa w grupie EMU + ENZ, jednak różnice nie były istotne w porównaniu z grupą EMU. Można założyć, iż usprawnienie wykorzystania tłuszczu poprzez dodanie emulgatora zapobiegło formowaniu się mydeł. Rozważając jednoczesne zastosowanie emulgatora i enzymu, ich sposób działania jest najpewniej podobny jak w APD CP i skrobi; wydajniejszy rozkład tłuszczu dzięki emulgatorowi, zapewnił zwiększenie dostępności składników pokarmowych do endo- i egzogennych enzymów oraz usprawnił tworzenie miceli. Następstwem było zwiększenie podatności składników pokarmowych na trawienie i absorpcje (Cho i in., 2012).

W niniejszym badaniu przeprowadzono analizę degradacji NDF w całym przewodzie pokarmowym. Analiza NDF obejmuje jedynie nierozpuszczalne frakcje ściany komórkowej, takie jak celuloza, hemiceluloza, oraz lignina, włączając w to nierozpuszczalne polisacharydy nieskrobiowe (NSP). Analiza nie zawiera natomiast frakcji rozpuszczalnych w wodzie, co skutkuje niedoszacowaniem rzeczywistej zawartości NSP (Van Soest i in., 1991). Jednakże, do rozpuszczalnych komponentów NSP zaliczają się w większości pektyna i β -glukany, które nie stanowią głównych składników NSP obecnego w niniejszym badaniu. Rozpuszczalne w wodzie NSP kukurydzy, SBM oraz CM stanowią jedynie nieznaczną część ogólnej zawartości NSP, ok. 10 % (Meng i in., 2005b). W związku z powyższym, degradacja NDF nadal może być brana pod uwagę jako reprezentująca zawartość NSP. Dodatkowym działaniem enzymów rozkładających NSP, prócz zmniejszania lepkości treści pokarmowej, jest rozpuszczanie macierzy ściany komórkowej, w którą mogą być wbudowane składniki pokarmowe. W ten sposób możliwe jest ograniczenie zdolności NSP do tzw. „kapsułkowania” owych składników (Słominski, 2011). Składniki pokarmowe uwolnione ze struktury ścian komórkowych dzięki enzymowi są bardziej podatne na działanie wszystkich enzymów trawiennych (Choct, 2006; Francesch i Geraert, 2009) oraz w przypadku niniejszego badania, emulgatora. Z drugiej strony, jak wcześniej wspomniano, dodatek emulgatora na skutek polepszenia strawności tłuszczu zapewnił fizyczny dostęp enzymu do substratu (Danicke i in., 1999). Podobne wnioski wysunęli Meng i Słominski (2005) w badaniu *in vitro*, gdzie w dietach sojowo-kukurydzianych zauważyli zwiększenie degradacji NSP po podaniu multikarbohydryzy (każdy enzym dodany w ilości 0.01 g/g substratu). Dodatkowo, emulgator mógł wykazać pozytywny wpływ na właściwości enzymu. Wykazano, iż środki powierzchniowo czynne (NIS) mogą wykazywać zdolność do zmian w strukturze substratu poprzez powodowanie jego pęcznienia i pęknięcia (Kim i in., 2006), co może prowadzić do zwiększenia zdolności zatrzymywania wody i enzymu (Goto i in., 2003), oraz zwiększa podatność substratu na atak enzymatyczny (Kamande i in., 2000; Kim i in., 2006; Ahn i in., 2009). Udowodniono również zdolność NIS do stabilizacji enzymów oraz zmniejszenia ich denaturacji podczas hydrolizowania celulozy. Poprzez zmianę struktury celulozy, NIS zwiększają jej podatność i dostępność na rozkład; dodatkowo, wydłużają działanie enzymu (Kim i in., 2006; Ahn i in., 2009). Możliwa pozytywna interakcja między surfaktantem jakim jest emulgator, a enzymem, nie jest całkowicie oczywista, ponieważ w większości przypadków surfaktanty mogą powodować zmiany konformacyjne białek powodując zmniejszenie aktywności

enzymatycznej (Holmberg, 2018). Jednakże, działanie surfaktantów niejonowych (do których należą emulgatory) są uważane za łagodne w interakcji z enzymami, ponieważ nie wykazują zdolności do przyciągania elektrostatycznego (Holmberg, 2018).

8.1.2. Doświadczenie nr 2 - pszenżyto

Zastosowana ksylanaza w pierwszych tygodniach życia kurcząt brojlerów zwiększyła BWG i jednocześnie obniżyła FI. Powyższe parametry przyczyniają się do zmniejszenia FCR, co dodatkowo prowadzi do zwiększonego pozornego rozkładu CF, NDF, DM i N z wartością AME_N w pierwszych 28 dniach. Zastosowanie emulgatora zwiększyło BWG w okresie starter oraz całkowity FCR. Biorąc pod uwagę, że endogenne wydzielanie enzymu lipazy jest ograniczone u nowo wyklutych ptaków (Uni, et al., 1999), wraz z brakiem zdolności trawienia w większym stopniu złożonych struktur NSP (Słominski, 2011) przez drób, spodziewano się polepszenia parametrów produkcyjnych po suplementacji emulgatorem i ksylanazą w dietach kurcząt brojlerów opartych na pszenżycie lub oleju palmowym. Wcześniejsze badania nie wykazały jednak wpływu na wydajność po dodaniu jedynie emulgatora (Roy i in., 2010) lub ksylanazy (Mendes i in., 2013) u brojlerów w okresie starter. Zmniejszony całkowity FCR po dodaniu ksylanazy lub emulgatora nie pokrywał się z wynikami APD CP, EE i skrobi w 35 dniu, gdzie zauważono brak efektu. Brak różnic pomiędzy grupami pod względem parametrów strawności może być związany z już ustabilizowanym mikrobiomem u starszych ptaków, co znajduje odzwierciedlenie w większej tolerancji na wysoką lepkość zapewnianą przez NSP pszenżyta (Szczurek i in., 2020).

8.2. Wpływ zastosowania emulgatora i karbohydraz oraz ich mieszaniny na fermentację mikrobiologiczną w układzie pokarmowym drobiu

8.2.1. Bakteryjna aktywność enzymatyczna w jelitach ślepych

8.2.1.1. Doświadczenie nr 2 – pszenżyto

Rozpad złożonej struktury NSP mający miejsce po zastosowaniu ksylanazy niweluje jego „lepkie właściwości”, dzięki czemu treść pokarmowa może przepływać płynniej (Raza i in., 2019). Zwiększony pasaż treści pokarmowej zapewnia mniej czasu na aktywność mikrobiologiczną, dodatkowo częściowo rozłożony NSP ogranicza substrat do fermentacji mikrobiologicznej. Obserwacje te zostały potwierdzone w niniejszym badaniu; we wszystkich grupach suplementowanych aktywność bakteryjna enzymu α -glukozydazy w jelicie ślepym istotnie spadła. Mniejsza aktywność drobnoustrojowej α - i β -glukozydazy wskazuje na zmniejszoną obecność β -glukanów i

celulozy jako substratów fermentacji. Odkrycia te potwierdzają badania Hubener i in. (2002), którzy wykazali niższą aktywność 1.3-1.4- β -glukanazy w jelicie ślepych po dodaniu ksylanazy do diety pszenno-żytniej u kurcząt brojlerów. Może to wskazywać na pośredni wpływ emulgatora na mikroflorę jelitową kurcząt brojlerów, co wcześniej sugerowali Kubiś i in. (2020). Przypuszczalnie, biorąc pod uwagę wpływ zastosowania enzymu i emulgatora oddzielnie na aktywność enzymów drobnoustrojów, głównym czynnikiem zmniejszenia tej aktywności jest zwiększenie przepływu treści pokarmowej zapewniane przez: 1. emulgator wspomagający tworzenie miceli i zwiększenie wykorzystania nasyconego, spowalniającego pasażu przewodu pokarmowego, tłuszczu oleju palmowego; 2. ksylanaza zmniejszająca lepkość treści pokarmowej, a także rozkładając NSP pszenżyta, ograniczająca obecność substratu do fermentacji mikrobiologicznej.

8.2.2. Stężenie SCFA w jelitach cienkim i ślepych

8.2.2.1. Doświadczenie nr 1 – poekstrakcyjna śruta rzepakowa

Pomimo zaobserwowanej zwiększonej degradacji NDF w grupie EMU + ENZ, w treści przewodu pokarmowego nadal pozostają jego niestrawione części. Zgodnie z Pustjens i in. (2013; 2014), frakcje NDF niezdolne do dalszego rozkładu (pomimo zastosowania enzymu) to składowe NSP: ksyloglukan, celuloza, pozostałości pektyny. Pozostałości te mogą tworzyć substrat dla fermentacji mikrobiologicznej. W przypadku kurcząt brojlerów fermentacja mikrobiologiczna ma miejsce głównie w jelitach ślepych, gdzie pełni udział w regulacji rozwoju nabłonka jelitowego (Van der Wielen i in., 2000). Jednym ze wskaźników ukazujących intensywność fermentacji mikrobiologicznej jest koncentracja KKT w jelitach. W niniejszym badaniu, jednoczesne zastosowanie emulgatora i enzymu spowodowało spadek koncentracji kwasu octowego, co może być postrzegane jako negatywna zmiana. Wysoki poziom fermentacji i obecność KKT w jelitach ślepych brojlerów, zwłaszcza kwasu octowego, obniża pH środowiska zapewniając warunki uniemożliwiające namnażaniu się patogennych bakterii (Van der Wielen i in., 2000). Jednakże, nie zauważono zmian w kolonizacji bakteryjnej w niniejszym badaniu. W opozycji do większości NSP obecnych w zbożach, NSP PŚRz nie powinny przyczynić się do wzrostu lepkości treści pokarmowej w jelicie krętym (Słominski, 2011; Zduńczyk i in., 2015b; Raza i in., 2019). W związku z tym, niestrawione składniki pokarmowe przesuną się do dystalnych części układu pokarmowego. Prawdopodobnie, enzym dodany do mieszanek zdegradował NSP PŚRz do frakcji, które nie były preferowanym substratem dla fermentacji mikrobiologicznej w

jelitach ślepych (Słominski i Campbell, 1990). Dodatek emulgatora do enzymu sugeruje wzmocnienie powyższego procesu, wraz z degradacją NSP. Możliwym wytłumaczeniem jest wysoka zawartość nierozpuszczalnych polisacharydów i lignin w PŚRz, które nie są w znaczącym stopniu podatne na fermentacje mikrobiologiczną w dolnych partiach układu pokarmowego (Bach Knudsen, 1997). Dodatkowo, związki polifenolowe w PŚRz mogą wykazywać działanie inhibujące proliferację mikrobiomu (Amarowicz i in., 2001; Negi i Jayaprakasha, 2001), co również może tłumaczyć obniżoną fermentację.

8.2.2.2. Doświadczenie nr 2 – pszenżyto

Zarówno ksylanaza, jak i emulgator zwiększyły stężenie octanu, maślanu i całkowitego SCFA w jelicie ślepych, co wskazuje na fermentację probiotycznych oligosacharydów (Baker i in., 2021). Kwasy octanowy i masłowy mogą pozytywnie wpływać na środowisko jelitowe poprzez obniżanie pH jelita ślepego, a tym samym zapobieganie rozwojowi szkodliwych bakterii (Van der Wielen, 2000). Jednak w obecnym badaniu populacje bakterii jelita ślepego, zarówno korzystne, jak i patogenne, pozostały niezmienione.

8.3 Wpływ zastosowania emulgatora i karbohidraz oraz ich mieszaniny na zmiany w obrębie układu pokarmowego drobiu

8.3.1 Ekskrecja kwasu sjałowego

8.3.1.1. Doświadczenie nr 1 – poekstrakcyjna śruta rzepakowa

Nabłonek przewodu pokarmowego brojlerów pokrywają mucyny będące substratem dla części bakterii jelitowych. Produktem powstającym podczas rozkładu mucyn przez enzymy bakteryjne jest kwas sjałowy. Kwas sjałowy jako pozostałość po rozkładzie mucyn pojawia się w kałomoczu, z tego względu może stanowić podstawę do oszacowania ogólnej produkcji mucyn oraz stanowić wskaźnik endogennych strat (Cowieson i in., 2004). Ze względu na zdolność NSP rzepaku do wbudowywania w swoje struktury białek lub innych składników pokarmowych, uniemożliwia ich dostęp do endogennych enzymów przewodu pokarmowego, co może powodować upośledzenie trawienia i związane z tym straty (Raza i in., 2019). Jednoczesne zastosowanie obu dodatków w niniejszym badaniu zniwelowało powyższy negatywny efekt. Najniższy poziom ekskrecji kwasu sjałowego widoczny w grupie EMU + ENZ wraz z najkorzystniejszymi wynikami strawnościowymi w tej grupie zdają się potwierdzać powyższe założenie.

8.3.2. Histomorfometria kosmków jelita czczego i krętego

8.3.2.1. Doświadczenie nr 1 – poekstrakcyjna śruta rzepakowa

Zwiększona w doświadczeniu nr 1 strawność składników pokarmowych na skutek jednoczesnego zastosowania emulgatora i enzymu może być związana z intensywniejszym rozwojem kosmków jelitowych. W niniejszym badaniu rozwój kosmków był większy w grupach suplementowanych, co jest zgodne z wcześniejszymi wynikami badań Alzawqari i in. (2011), w których zaobserwowano korzystniejszą morfologię kosmków po zastosowaniu w dietach emulgatora (wysuszona żółć wołowa; 0.25 % i 0.50 % w mieszankach). Przyspieszenie pasażu treści pokarmowej umożliwia efektywniejsze rozproszenie w środowisku jelita endogennych soli żółciowych. Obecność soli żółciowych zapewnia odpowiednie warunki do rozwoju kosmków jelitowych poprzez ograniczenie absorpcji endotoksyn (Sheen-Chen i in., 2002), wykazując nawet zdolność do fizycznej odnowy uszkodzonej śluzówki (Kamiya i in., 2004). Wcześniejsze badania wykazały również, iż zastosowanie emulsyfikatora (lecytyny) doprowadziło do zwiększenia depozycji kolagenu w kosmkach jelitowych (Wendel, 2000; Mandalari i in., 2009; Brautigam i in., 2017). Poprzez włączenie się w struktury komórek nabłonka jelitowego zwiększył ich wytrzymałość i wysokość, co przyczyniło się do polepszonej absorpcji składników pokarmowych. W badaniach Gopinger i in. (2014), polepszone warunki panujące w śluzówce jelitowej zwiększyły powierzchnię chłonną kosmków, skutkując zwiększoną absorpcją składników pokarmowych. Podobny skutek zanotowano w niniejszym badaniu, gdzie, jak wspomniano wcześniej, po jednoczesnym zastosowaniu obu dodatków zanotowano najwyższe APD CF i skrobi.

8.3.2.2. Doświadczenie nr 2 – pszenżyto

Zmienione środowisko jelitowe spowodowane zwiększonym stężeniem SCFA (octanów i maślanów) może skutkować wzmożonym rozwojem nabłonka (Van der Wielen, 2000). Pomimo powyższego, powierzchnia chłonna kosmków pozostała nienaruszona po zastosowaniu dodatków, co jest zgodne z badaniem Iji i in. (2001). Istotna zmiana dotyczyła jedynie grubości błony śluzowej jelita czczego, która była większa u kurcząt brojlerów w grupie ENZ. Grubsza błona śluzowa jelit może być spowodowana metabolizmem izowalerianianu przez enterocyty (Śliżewska i in., 2020), zatem większe stężenie kwasu izowalerianianowego skutkuje wzmożoną proliferacją komórek. Ponadto kwas izowalerianowy jest kwasem gnilnym, jego zwiększone stężenie jest uważane za wskaźnik nieprawidłowości w fermentacji i namnażaniu patogenów

(Śliżewska i in., 2020). Jednak w obecnym badaniu nie potwierdziły tego różnice w populacji bakterii, z wyjątkiem zmian w populacji E. Coli po dodaniu ENZ.

8.3.3. Ekspresja genów

8.3.3.1. Doświadczenie nr 2 – pszenżyto

FATP1 jest białkiem transportującym kwasy tłuszczowe zaangażowanym w transbłonowy transport kwasów tłuszczowych, dlatego jego ekspresję obserwuje się w jelicie cienkim, gdzie przebiega proces wchłaniania lipidów (Wang i in., 2021). Biorąc pod uwagę obniżoną ekspresję FATP1 w jelicie krętym ($P \leq 0.05$) w grupach z dodatkiem emulgatora, można przypuszczać, że ze względu na ułatwione trawienie, większa ilość tłuszczów została wchłonięta w jelicie czczym, które jest głównym obszarem wchłaniania lipidów (Lema et al., 2020), zwłaszcza nienasyconych (Hurwitz et al., 1973). Ponadto, wchłanianie tłuszczów nasyconych jest intensywniejsze w jelicie krętym (Hurwitz i in., 1973). Tym samym, w grupach bez suplementacji emulgatorem, a co za tym idzie, z większą zawartością tłuszczów nasyconych w świetle jelita, ekspresja FATP1 w jelicie krętym była większa. Można spekulować, że podobny mechanizm miał miejsce w przypadku ekspresji PEPT1 i SGLT1. Za tym proponowanym wyjaśnieniem dodatkowo przemawia parametr AME_N w dniu 28, gdzie grupy z emulgatorem miały najwyższe wartości.

8.3.4. Lepkość treści przewodu pokarmowego

8.3.4.1. Doświadczenie nr 2 - pszenżyto

Oczekuje się, że włączenie dodatku zbóż do diety kurcząt brojlerów zwiększy lepkość treści pokarmowej ze względu na wysoką zawartość NSP (Baker i in., 2021), co pociąga za sobą szereg niepożądanych konsekwencji: wydłużenie czasu pasażu treści pokarmowej (Almirall i in., 1995); dostarczanie substratów (niestrawionych składników pokarmowych) umożliwiających niekorzystną fermentację mikrobiologiczną w górnych odcinkach przewodu pokarmowego kurcząt brojlerów (GIT) (Choct i in., 1999); „kapsułkowanie” składników pokarmowych (Prohaszka, 1986), straty w składnikach pokarmowych i energii (Raza i in., 2019). Grupy doświadczalne z dodatkiem ksylanazy wykazały zmniejszoną lepkość treści pokarmowej, co było spodziewanych efektem na podstawie ustaleń Słomińskiego (2011).

9. Podsumowanie i wnioski

Jednoczesne zastosowanie emulgatora i karbohydraz wykazuje addytywny wpływ na fermentację mikrobiologiczną w układzie pokarmowym drobiu oraz stopień wykorzystania składników pokarmowych diety. W zależności od dominujących surowców paszowych odpowiedź na suplementację jest odmienna, jednak za każdym razem przedstawia pozytywny efekt. Rodzaj odpowiedzi ze strony układu pokarmowego drobiu jest ściśle związany z efektem jaki wywiera na niego obecność specyficznych dla danego źródła węglowodanów NSP. Specyficzny antyżywniowy efekt wynika z odmiennego profilu NSP, zależnego od rodzaju zastosowanych w dietach węglowodanów. W przypadku NSP PŚRz głównym problemem jest ograniczenie dostępności składników pokarmowych przez ściany komórkowe roślin (zjawisko „kapsułkowania”), a w przypadku pszenżyta – zwiększanie lepkości treści przewodu pokarmowego przez rozpuszczalne NSP zawarte także w ścianach komórkowych. Negatywne następstwa obecności odmiennych NSP w diecie kurcząt brojlerów są podobne: pogorszenie dostępności, strawności i wchłaniania składników pokarmowych. Zastosowanie dedykowanych dla specyficznych NSP enzymów skutkuje złagodzeniem niepożądanych efektów.

W przypadku diet z PŚRz równoczesny dodatek emulgatora i karbohydraz ma korzystniejszy wpływ na degradację NDF niż ich osobne stosowanie, co może wynikać ze zwiększenia dostępności enzymu do substratu po poprawie trawienia tłuszczów. Równoczesna suplementacja emulgatora i multikarbohidrazy zapewniła korzystne warunki do rozwoju błony śluzowej, co przekładało się na lepsze wchłanianie składników pokarmowych. Zwiększona strawność składników pokarmowych zmniejszyła straty endogenne, a tym samym poprawiła przyrosty masy ciała i wykorzystanie paszy.

W przypadku diet opartych o pszenżyto, dodatek emulgatora i ksylanazy poprawił strawność składników pokarmowych w pierwszych 4 tygodniach życia kurcząt brojlerów. Jednoczesne stosowanie dodatków wpłynęło również na aktywność mikrobiomu jelitowego. Zaobserwowany niższy FCR prawdopodobnie wynikał z lepszej strawności tłuszczu oraz zmniejszeniu lepkości treści pokarmowej. Oba efekty skutkowały obniżeniem aktywności drobnoustrojów oraz korzystnym przesunięciem fermentacji mikrobiologicznej do dystalnych części jelit (jelit ślepych).

Wyniki uzyskane w niniejszych doświadczeniach sugerują następujące wnioski:

- zastosowanie jednocześnie emulgatora oraz karbohydrazy może być strategią żywieniową umożliwiającą, w zależności od rodzaju diety (użytych surowców paszowych), modulowanie procesów trawienia oraz aktywności mikrobiomu ptaków rzeźnych
- wydaje się że w przypadku znaczącego dodatku tłuszczu do diety, efektywność jego trawienia oraz wchłaniania ma kluczowe znaczenie dla prawidłowości funkcjonowania układu pokarmowego oraz mikroorganizmów go zasiedlających
- skuteczna degradacja węglowodanów strukturalnych diety, w układzie pokarmowym drobiu, może zależeć nie tylko od obecności odpowiednich enzymów (karbohydraz) ale także od dostępności substratu dla tych enzymów oraz od aktywności samego mikrobiomu układu pokarmowego.
- obydwie dodatki są skutecznymi narzędziami żywieniowymi które umożliwiają lepsze wykorzystanie różnego rodzaju diet przez brojlery. Dzięki emulgatorom oraz karbohydrazom możemy poprawić ekonomie produkcji brojlerów kurzych oraz ograniczyć negatywny wpływ tej produkcji na środowisko naturalnego.

10. Bibliografia

- Abbas, M., M. Arif, M. Saeed, M. Reyad - Ul - ferdous, M. Hassan, M. Arain, A. Rehman. 2016. Emulsifier effect on fat utilization in broiler chicken. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 11:158–167.
- Aftab, U. 2009. Utilization of alternative protein meals with or without multiple-enzyme supplementation in broilers fed low-energy diets. *J. Appl. Poult. Res.* 18:292–296.
- Ahmadi, M. 2016. The Effect of Different Levels of Rapeseed Meal with and without Enzyme on the Performance and the Serum Level of Triiodothyronine (T3), Thyroxine (T4) and Thyroid Stimulating Hormone (TSH) in Broiler Chickens. *Iran. J. Appl. Anim. Sci.* 6:203–209.
- Ahn, G., J. Kim, E. Park, Y. Oh, G. Lee, J. Lee, C. Kim, K. Park. 2009. Effects of non - ionic surfactant supplementation on ruminal fermentation, nutrient digestibility and performance of beef steers fed high - roughage diets. *Asian - australas. J. Anim. Sci.* 22:993–1004.
- Almirall, M., M. Francesch, A. M. Perez-Vendrell, J. Brufan, E. Estevez-Garcia. 1995. The differences in intestinal viscosity produced by barley and β -glucanase after digesta enzyme activities and ileum nutrient digestibility more in broiler chicks than in cocks. *J. Nutr.* 125:947–955.
- Alzawqari, M., H. N. Moghaddama, H. Kermanshahi, A. R. Rajib. 2011. The effect of desiccated ox bile supplementation on performance, fat digestibility, gut morphology and blood chemistry of broiler chickens fed tallow diets. *J. Appl. Anim. Res.* 39:169–174.
- AOAC. 2005. Agricultural chemicals; contaminants; drugs. Official Methods of Analysis Vol. 1. AOAC, International, Gaithersburg Maryland.
- Amarowicz, R., J. Fornal, M. Karama, and F. Shahidi. 2001. Antioxidant activity of extracts of phenolic compounds from rapeseed oil cakes. *J. Food Lipids* 8:65–74.
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., Ørntoft, T. F. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research*, 64(15): 5245-5250.
- Atteh, J. O., S. Leeson. 1984. Effects of Dietary Saturated or Unsaturated Fatty Acids and Calcium Levels on Performance and Mineral Metabolism of Broiler Chicks. *Poult. Sci.* 6:2252–2260.
- AVIAGEN. 2014. Ross Broiler Nutrition Supplement. Accessed 11.12.2017, <http://en.aviagen.com/>
- Bach Knudsen, K. E. 1997. Carbohydrate and lignin content of plant materials used in animal feeding. *Anim. Feed Sci. Technol.* 67:319–338.
- Baker, J. T., M. E. Duarte, D. M. Holanda, S. W. Kim. 2021. Friend or Foe? Impacts of Dietary Xylans, Xylooligosaccharides, and Xylanases on Intestinal Health and Growth Performance of Monogastric Animals. *Animals* 11:609.
- Bedford, M. R. 2018. The evolution and application of enzymes in the animal feed industry: the role of data interpretation. *Br. Poult. Sci.* 59, 486–493.

- Bedford, M. R., A. J. Cowieson. 2012. Exogenous enzymes and their effects on intestinal microbiology. *Anim. Feed Sci. Technol.* 173, 76–85.
- Brautigam, D. L., R. Li, E. Kubicka, S. D. Turner, J. S. Garcia, M. L. Weintraut, E. A. Wong. 2017. Lysolecithin as feed additive enhances collagen expression and villus length in the jejunum of broiler chickens. *Poult. Sci.* 96:2889–2898.
- Cho, J. H., P. Y. Zhao, I. H. Kim. 2012. Effects of emulsifier and multienzyme in different energy density diet on growth performance, blood profiles, and relative organ weight in broiler chickens. *J. Agric. Sci.*, 4:161–168.
- Choct, M., R. J. Hughes, M. R. Bedford. 1999. Effects of a xylanase on individual bird variation, starch digestion throughout the intestine, and ileum and caecal volatile fatty acid production in chickens fed wheat. *Br. Poult. Sci.* 40:419–422.
- Choct, M. 2006. Enzymes for the feed industry: Past, present and future. *Worlds Poult. Sci. J.* 62:5–16.
- Cowieson, A. J., T. Acamovic, M. R. Bedford. 2004. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 45:101–108.
- Cowieson, A. J., M. R. Bedford, V. Ravindran. 2010. Interactions between xylanase and glucanase in maize - soy - based diets for broilers. *Br. Poult. Sci.* 51:246–257.
- Danicke, S., W. Vahjen, O. Simon, H. Jeroch. 1999. Effects of dietary fat type and xylanase supplementation to rye-based broiler diets on selected bacterial groups adhering to the intestinal epithelium on transit time of feed, and on nutrient digestibility. *Poult. Sci.*, 78:1292–1299.
- de Mendiburu, F. 2014. *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*, Version: 1.2 - 1. Accessed May 25 2017. <http://cran.r-project.org/>
- de Vries, S., A. M. Pustjens, M. A. Kabel, R. P. Kwakkel, W. J. J. Gerrits. 2014. Effects of processing technologies and pectolytic enzymes on degradability of nonstarch polysaccharides from rapeseed meal in broilers. *Poult. Sci.* 93:589–598.
- Francesch, M., P. A. Geraert. 2009. Enzyme complex containing carbohydrases and phytase improves growth performance and bone mineralization of broilers fed reduced nutrient corn - soybean - based diets. *Poult. Sci.* 88:1915–1924.
- Gopinger, E., E. G. Xavier, M. C. Elias, A. A. S. Catalan, M. L. S. Castro, A. P. Nunes, V. F. B. Roll. 2014. The effect of different dietary levels of canola meal on growth performance, nutrient digestibility, and gut morphology of broiler chickens. *Poult. Sci.* 93:1130–1136.
- Goto, M., H. D. Bae, S. S. Lee, M. S. Yahaya, S. Karita, K. Wanjae, K. J. Cheng. 2003. Effects of surfactant Tween 80 on forage degradability and microbial growth on the in vitro rumen mixed and pure cultures. *Asian - Australas. J. Anim. Sci.* 16:672–676.
- Górka, P., B. Śliwiński, J. Flaga, J. Wiczorek, M. M. Godlewski, E. Wierzchos, R. Zabielski, Z. M. Kowalski. 2017. Effect of butyrate infusion into the rumen on butyrate flow to the duodenum, selected gene expression in the duodenum epithelium, and nutrient digestion in sheep. *Journal of Animal Science*, 95:2144–2155.

- Górka, P., B. Śliwiński, J. Flaga, J. Olszewski, P. Nawrocka, K. Sobkowiak, R. Miltko, M. M Godlewski, R. Zabielski, Z. M Kowalski. 2018. Effect of exogenous butyrate on the gastrointestinal tract of sheep. II. Hydrolytic activity in the rumen and structure and function of the small intestine. *Journal of Animal Science*, 96:5325–5335.
- Guerreiro, N. A. C., A. C. Pezzato, J. R. Sartori, C. Mori, V. C. Cruz, V. B. Fascina, D. F. Pinheiro, L. A. Madeira, J. C. Gonçalves. 2011. Emulsifier in Broiler Diets Containing Different Fat Sources. *Braz. J. Poult. Sci.*, 13:119–125.
- Hill, F. W., D. L. Anderson. 1958. Comparison of metabolizable energy and productive energy determinations with growing chicks. *J. Nutr.* 64:587–603.
- Holmberg, K. 2018. Interactions between surfactants and hydrolytic enzymes. *Colloids Surf. B* 168:169–177.
- Hubener, K., W. Vahjen, O. Simon. 2002. Bacterial responses to different dietary cereal types and xylanase supplementation in the intestine of broiler chicken. *Arch Tierernahr.*, 56:167-187.
- Hurwitz, S., A. Bar, M. Katz, D. Sklan, P. Budowski. 1973. Absorption and secretion of fatty acids and bile acids in the intestine of the laying fowl. *J. Nutr.*, 103:543–547.
- Iji, P. A., R. J. Hughes, M. Choct, D. R. Tivey. 2001. Intestinal structure and function of broiler chickens on wheat-based diets supplemented with a microbial enzyme. *Asian-australas. J. Anim. Sci.*, 14:54–60.
- Jia, W., D. Mikulski, A. Rogiewicz, Z. Zduńczyk, J. Jankowski, B. A. Slominski. 2012. Low-Fiber Canola. Part 2. Nutritive Value of the Meal. *J. Agric. Food Chem.* 60:12231–12237.
- Jourdian, G. W., L. Dean, S. Roseman. 1971. The sialic acids: XI. A periodate - resorcinol method for the quantitative estimation of free sialic acids and their glycosides. *J. Biol. Chem.* 246:430–435.
- Kaczmarek, S. A., A. Rogiewicz, M. Mogielnicka, A. Rutkowski, R. O. Jones, B. A. Slominski. 2014. The effect of protease, amylase, and nonstarch polysaccharide - degrading enzyme supplementation on nutrient utilization and growth performance of broiler chickens fed corn - soybean meal - based diets. *Poult. Sci.* 93:1745–1753.
- Kaczmarek, S. A., M. Bochenek, A. C. Samuelsson, A. Rutkowski. 2015. Effects of glyceryl polyethylene glycol ricinoleate on nutrient utilisation and performance of broiler chickens. *Arch. Anim. Nutr.* 69:285–296.
- Kamande, G. M., J. Baah, K. J. Cheng, T. A. McAllister, J. A. Shelford. 2000. Effects of Tween 60 and Tween 80 on protease activity, thiol group reactivity, protein absorption and cellulose degradation by rumen microbial enzymes. *J. Dairy Sci.* 83:536–542.
- Kamiya, S., M. Nagino, H. Kanazawa, S. Komatsu, T. Mayumi, and K. Takagi. 2004. The value of bile replacement during external biliary drainage: an analysis of intestinal permeability, integrity and microflora. *Ann. Surg.* 239:510–517.
- Kim, W. J., Y. Gamo, Y. M. Sani, Y. Wusiman, S. Ogawa, S. Karita, i M. Goto. 2006. Effect of Tween 80 on hydrolytic activity and substrate accessibility of

- carbohydrolase I (CBH I) from *Trichoderma viride*. *Asian - Australas. J. Anim. Sci.* 19:684–689.
- Kim, D. H., Y. M. Yoo, S. H. Kim, B. G. Jang, B. Y. Park, S. H. Cho, P. N. Seong, K. H. Hah, J. M. Lee, Y. K. Kim, and I. H. Hwang. 2007. Effect of the length of feed withdrawal on weight loss, yield and meat color of broiler. *Asian - Australas. J. Anim. Sci.* 20:106–111.
- Knudsen, K. E. B. 2014. Fiber and nonstarch polysaccharide content and variation in common crops used in broiler diets. *Poult. Sci.* 93:2380–2393.
- Kocher, A., M. Choct, M. D. Porter, J. Broz. 2000. The Effects of Enzyme Addition to Broiler Diets Containing High Concentrations of Canola or Sunflower Meal. *Poult. Sci.* 79:1767–1774.
- Kołodziejski, P. A., E. Pruszyńska-Oszmałek, M. Sassek, P. Kaczmarek, D. Szczepankiewicz, M. Billert, P. Maćkowiak, M. Z. Strowski, K. W. Nowak. 2017. Changes in obestatin gene and GPR39 receptor expression in peripheral tissues of rat models of obesity, type 1 and type 2 diabetes. *Journal of Diabetes*, 9:353–361.
- Konieczka, P., S. Smulikowska. 2017. Viscosity negatively affects the nutritional value of blue lupin seeds for broilers. *Animal*, 12:1144–1153.
- Konieczka, P., M. Barszcz, M. Choct, S. Smulikowska. 2018. The interactive effect of dietary n - 6: n - 3 fatty acid ratio and vitamin E level on tissue lipid peroxidation, DNA damage in intestinal epithelial cells, and gut morphology in chickens of different ages. *Poult. Sci.* 97:149–158.
- Konieczka, P., J. Czerwiński, J. Jankowiak, K. Ząbek, S. Smulikowska. 2019. Effects of partial replacement of soybean meal with rapeseed meal, narrow - leaved lupin, DDGS and probiotic supplementation on performance and gut microbiota activity and diversity in broilers. *Ann. Anim. Sci.* 19:1–17.
- Krogdahl, A. 1985. Digestion and absorption of lipid in poultry. *J. Nutr.* 115:675–685.
- Kubiś, M., P. Kołodziejski, E. Pruszyńska - Oszmałek, M. Sassek, P. Konieczka, P. Górka, J. Flaga, D. Katarzyńska - Banasik, M. Hejdysz, Z. Wiśniewska, S. A. Kaczmarek. 2020. Emulsifier and Xylanase Can Modulate the Gut Microbiota Activity of Broiler Chickens. *Anim.* 10:2197.
- Lazaro, R., M. Garcia, P. Medel, G. G. Mateos. 2003. Influence of Enzymes on Performance and Digestive Parameters of Broilers Fed Rye - Based Diets. *Poult. Sci.* 82:132–140.
- Lee, S. S., H. S. Kim, Y. H. Moon, N. J. Choi, J. K. Ha. 2004. The effects of a non - ionic surfactant on the fermentation characteristics, microbial growth, enzyme activity and digestibility in the rumen of cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115:37–50.
- Lema, I., J. R. Araújo, N. Rolhion, S. Demignot. 2020. Jejunum: The understudied meeting place of dietary lipids and the microbiota. *Biochimie*, 178:124–136.
- Lien, K. A., M. I. McBurney, B. I. Beyde, A. B. Thomson, W. C. Sauer. 1996. Ileal recovery of nutrients and mucin in humans fed total enteral formulas supplemented with soy fiber. *Am. J. Clin. Nutr.* 63:584–595.
- Mandalari G., K. Adel-Patient, V. Barkholt, C. Baro, L. Bennett, M. Bublin, S. Gaier, G. Graser, G. S. Ladics, D. Mierzejewska, E. Vassilopoulou, Y. M. Vissers, L.

- Zuidmeer, N. M. Rigby, L. J. Salt, M. Defernez, F. Mulholli, A. R. Mackie, M. S. Wickham, E. N. Mills. 2009. In vitro digestibility of beta-casein and beta-lactoglobulin under simulated human gastric and duodenal conditions: a multi-laboratory evaluation. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 55:372-381.
- Mathlouthi, N., J. P. Lallès, P. Lepercq, C. Juste, M. Larbier. 2002. Xylanase and β -glucanase Supplementation Improve Conjugated Bile Acid Fraction in Intestinal Contents and Increase Villus Size of Small Intestine Wall in Broiler Chickens Fed a Rye-Based Diet. *J. Anim. Sci.* 80:2773–2779.
- Mendes, A. R., T. Ribeiro, B. A. Correia, P. Bule, B. Maças, L. Falcão, J. P. B. Freire, L. M. A. Ferreira, C. M. G. A. Fontes, M. M. Lordelo. 2013. Low doses of exogenous xylanase improve the nutritive value of triticale-based diets for broilers. *J. Appl. Poult. Res.*, 22:92–99.
- Meng, X., B. A. Slominski. 2005. Nutritive value of corn, soybean meal, canola meal, and peas for broiler chickens as affected by a multicarbohydrase preparation of cell wall degrading enzymes. *Poult. Sci.* 84:1242–1251.
- Meng, X., B. A. Slominski, C. M. Nyachoti, L. D. Campbell, W. Guenter. 2005b. Degradation of cell wall polysaccharides by combinations of carbohydrase enzymes and their effect on nutrient utilization and broiler chicken performance. *Poult. Sci.* 84:37–47.
- Myers, W. D., P. A. Ludden, V. Nayigihugu, B. W. Hess. 2004. Technical Note: A procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. *J. Anim. Sci.* 82:179–183.
- Negi, P. S., and G. K. Jayaprakasha. 2001. Antibacterial activity of grapefruit (*Citrus paradisi*) peel extract. *Eur. Food Res. Technol.* 213:484–487.
- Noy, Y., Sklan, D., 1995. Digestion and absorption in the young chick. *Poult. Sci.* 74, 366–373.
- Prohaszka, L. 1986. Antibacterial mechanism of volatile fatty acids in the intestinal tract of pigs against *Escherichia coli*. *Zoonoses Public Hlth.*, 33:166-73.
- Pruszyńska-Oszmałek, E., P. A. Kołodziejcki, K. Stadnicka, M. Sassek, D. Chalupka, D., B. Kuston, L. Nogowski, P. Maćkowiak, G. Maiorano, J. Jankowski, M. Bednarczyk. 2015. In ovo injection of prebiotics and synbiotics affects the digestive potency of the pancreas in growing chickens. *Poultry science*, 94:1909-1916.
- Pustjens, A. M., H. A. Schols, M. A. Kabel, and H. Gruppen. 2013. Characterisation of cell wall polysaccharides from rapeseed (*Brassica napus*) meal. *Carbohydr. Polym.* 98:1650–1656.
- Pustjens, A. M., S. de Vries, H. A. Schols, H. Gruppen, W. J. J. Gerrits, and M. A. Kabel. 2014. Understanding carbohydrate structures fermented or resistant to fermentation in broilers fed rapeseed (*Brassica napus*) meal to evaluate the effect of acid treatment and enzyme addition. *Poult. Sci.* 93:926–934.
- R Development Core Team. 2014. R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- Ravindran, V. and M. R. Abdollahi. 2021. Nutrition and digestive physiology of the broiler chick: state of the art and outlook. *Animals*, 11:2795.






- Ravindran, V., P. Tanchaoenrat, F. Zaefarian, G. Ravindran. 2016. Fats in poultry nutrition: Digestive physiology and factors influencing their utilisation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 213:1–21.
- Raza, A., S. Bashir, R. Tabassum. 2019. An update on carbohydrases: Growth performance and intestinal health of poultry. *Heliyon* 5:e01437.
- Roy, A., S. Haldar, S. Mondal, T. K. Ghosh. 2010. Effects of Supplemental Exogenous Emulsifier on Performance, Nutrient Metabolism, and Serum Lipid Profile in Broiler Chickens. *Veterinary Medicine International*, Article ID 262604.
- Rutkowski, A., S. Kaczmarek, A. Szczyrkowska, D. Józefiak. 2012. The effect of particle size of full-fat rapeseed and of multi-carbohydrase enzyme supplementation on nutrient digestibility and performance in broilers. *J. Anim. Feed Sci.* 21:324–333.
- Salih, M. E., H. L. Classen, G. L. Campbell. 1991. Response of chickens fed on hullless barley to dietary beta - glucanase at different ages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 33:139–149.
- Selle, P. H., A. J. Cowieson, and V. Ravindran. 2009. Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and pigs. *Livest. Sci.* 124:126–141.
- Sheen-Chen, S. M., H. S. Chen, H. T. Ho, W. J. Chen, C. C. Sheen, and H. L. Eng. 2002. Effect of bile acid replacement on endotoxin-induced tumor necrosis factor- α production in obstructive jaundice. *World J. Surg.* 26:448–450.
- Short, F. J., P. Gorton, J. Wiseman, K. N. Boorman. 1996. Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. *Anim. Feed Sci. Technol.* 59:215–221.
- Sklan, D. 2001. Development of digestive tract of poultry. *Worlds Poult. Sci. J.* 57:415–428.
- Slominski, B. A., L. D. Campbell. 1990. Non-starch Polysaccharides of Canola Meal: Quantification, Digestibility in Poultry and Potential Benefit of Dietary Enzyme Supplementation. *J. Sci. Food Agric.* 53:175–184.
- Slominski, B. A. 2011. Review: Recent advances in research on enzymes for poultry diets. *Poult. Sci.* 90:2013–2023.
- Szczechowiak, J., M. Szumacher-Strabel, M. El-Sherbiny, M. Bryszak, A. Stochmal, A. Cieślak. 2016. Effect of dietary supplementation with *Saponaria officinalis* root on rumen and milk fatty acid proportion in dairy cattle. *Anim. Sci. Pap.* 34:221–231.
- Szczurek, W., B. Szymczyk, A. Arczewska-Włosek, S. Świątkiewicz. 2020. Apparent and standardised ileum digestibility of amino acids in wheat, triticale and barley for broiler chickens at two different ages. *Br Poult Sci.*, 61:63–69.
- Śliżewska, K., P. Markowiak-Kopeć, A. Zbikowski, P. Szeleszczuk. 2020. The effect of synbiotic preparations on the intestinal microbiota and her metabolism in broiler chickens. *Sci Rep.*, 10:4281.

- Tancharoenrat, P., V. Ravindran. 2014. Influence of tallow and calcium concentrations on the performance and energy and nutrient utilization in broiler starters. *Poult. Sci.* 93:1453–1462.
- Uni, Z., Y. Noy, D. Sklan. 1999. Posthatch development of small intestinal function in the poult. *Poult. Sci.* 78:215–222.
- Van der Wielen, P. W. J. J., S. Biesterveld, S. Notermans, H. Hofstra, B. A. P. Urlings, F. van Knapen. 2000. Role of Volatile Fatty Acids in Development of the Cecal Microflora in Broiler Chickens during Growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2536–2540.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-97.
- Verkamp, C. H. 1986. Fasting and yield of broilers. *Poult. Sci.* 65:1299–1304.
- Wang, Y., Y. Wang, X. Lin, Z. Gou, Q. Fan, S. Jiang. 2021. Effects of *Clostridium butyricum*, Sodium Butyrate, and Butyric Acid Glycerides on the Reproductive Performance, Egg Quality, Intestinal Health, and Offspring Performance of Yellow-Feathered Breeder Hens. *Front Microbiol.*, 12:657542.
- Wendel, A. 2000. Lecithin. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*.
- Zaefarian, F., L. F. Romero, V. Ravindran. 2015. Influence of high dose of phytase and an emulsifier on performance, apparent metabolisable energy and nitrogen retention in broilers fed on diets containing soy oil or tallow. *Br. Poult. Sci.* 56:590–597.
- Zduńczyk, Z., J. Jankowski, S. Kaczmarek, J. Juśkiewicz. 2015. Determinants and effects of postileal fermentation in broilers and turkeys (Part 1): Gut microbiota composition and its modulation by feed additives. *Worlds Poult. Sci. J.* 71:37–48.
- Zduńczyk, Z., J. Jankowski, S. Kaczmarek, J. Juśkiewicz. 2015b. Determinants and effects of postileal fermentation in broilers and turkeys (Part 2): cereal fibre and SBM substitutes. *Worlds Poult. Sci. J.* 71:49–58.

11. Spis tabel

Tabela 1. Skład i zawartość składników pokarmowych diety kontrolnej (CON) w okresach starter, grower, finisz w doświadczeniu nr 1	18
Tabela 2. Skład i zawartość składników pokarmowych diety kontrolnej (CON) w okresach starter, grower, finisz w doświadczeniu nr 2	19
Tabela 3. Sekwencje starterów użytych do amplifikacji bakteryjnego genu 16S rRNA.	26
Tabela 4. Kompozycja kwasów tłuszczowych (% ogólnych kwasów tłuszczowych) w olejach wykorzystanych w doświadczeniach.....	29

Effect of emulsifier and multicarbohydase enzyme supplementation on performance and nutrient digestibility in broiler diets containing rapeseed meal

Zuzanna Wiśniewska ^{*}, Paweł Kołodziejcki,[†] Ewa Pruszyńska,[†] Paweł Konieczka [‡], Misza Kinsner [‡],
Paweł Górka,[§] Jadwiga Flaga,[§] Kinga Kowalik ^{||}, Marcin Hejdysz,[#] Marta Kubiś,^{*} Łukasz S. Jarosz,[¶]
Artur Ciszewski,[¶] and Sebastian A. Kaczmarek ^{*-1}

^{*}Department of Animal Nutrition, Poznan University of Life Sciences, 60-637 Poznan, Poland; [†]Department of Animal Physiology, Biochemistry and Biostructure, Poznan University of Life Sciences, 60-637 Poznan, Poland;

[‡]The Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition, Polish Academy of Sciences, 05-110 Jablonna, Poland; [§]Department of Animal Nutrition and Biotechnology, and Fisheries, University of Agriculture in Krakow, 30-059 Krakow, Poland; [#]Department of Animal Breeding and Animal Product Quality Assessment, University of Life Sciences, 62-002 Zlotniki, Poland; ^{||}Department of Animal Physiology and Endocrinology, University of Agriculture in Krakow, 30-059 Krakow, Poland; and [¶]Department of Epizootiology and Clinic of Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Lublin 20-612, Poland

ABSTRACT The aim of this study was to determine the effect of emulsifier and multicarbohydase enzyme supplementation on performance, nutrient utilization, and apparent metabolizable energy—nitrogen (AME_N) value of broiler diets containing rapeseed meal (RSM) as well as their influence on the gut morphological structures, excretion of total and free sialic acid, and cecum concentration of short-chain fatty acids (SCFAs) in broiler chickens. A total of 384 male broiler chicks were assigned to four dietary treatments. The diet of the control treatment (CON) consisted of soybean, maize, and RSM (5% in starter, 7% in grower, 15% in finisher) with soybean and palm oils. The diets used for the experimental treatments were the control diet supplemented with an emulsifier (EMU), enzyme (ENZ), or both (EMU + ENZ). The duodenum (n = 10/treatment) and ileum (n = 10/treatment) digesta samples were assessed to determine nutrient digestibility: crude protein (CP), ether extract (EE), starch, Ca. Throughout the experimental period, EMU + ENZ treatment indicated the lowest total average feed intake and feed

conversion ratio, with the highest average weight gain among the studied treatments ($P < 0.05$). The EMU + ENZ treatment also resulted in higher ($P < 0.05$): apparent prececal digestibility (APD) of CP, total tract neutral detergent fibre (NDF) degradation, apparent total tract digestibility (ATTD) of EE, villus height to crypt depth ratio ($P < 0.1$). The highest APD of EE was noted in the EMU treatment ($P < 0.05$). No significant differences were found in the AME_N values of the diets. A greater jejunum villi surface area was found in groups supplemented by enzyme compared to CON ($P < 0.05$). The EMU + ENZ treatment presented lower sialic acid excretion in the ileum and concentration of cecum SCFAs compared to the CON treatment ($P < 0.05$). The obtained results indicate that simultaneous usage of additives had beneficial effect on production parameters, nutrient digestibility, NDF degradation, as well as gut mucosa morphology. Based on the SCFAs concentration results, separate or simultaneous addition of emulsifier or/and enzyme did not provoke excessive fermentation activity of cecal bacteria.

Key words: broiler performance, carbohydrases, emulsifier, rapeseed meal, non-starch polysaccharide

2023 Poultry Science 102:102268

<https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102268>

INTRODUCTION

The global intensification of poultry production with limited resources of feed materials, together with increasing environmental pollution, has led to the urgent need to develop strategies for sustainable production. One of the reasonable solutions to overcome this challenge is to improve the utilization of genetic potential, proper estimation and fulfilment of animals' nutritional requirements. Some nutritional aspects that may be

© 2022 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of Poultry Science Association Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Received July 24, 2022.

Accepted October 14, 2022.

¹Corresponding author: sebastian.kaczmarek@up.poznan.pl

considered are increasing the utilization of feed components, such as fat, and enhancing the decomposition of poorly digestible nonsoluble structures such as non-starch polysaccharides (NSP).

The gastrointestinal tract (GIT) of a broiler chicken represents a water environment where fatty acids (FA) are absorbed in the form of micelle (Ravindran et al., 2016). Monoglycerides and short-chain FA presented mainly in unsaturated oil fats, such as soybean oil (Sauvant et al., 2004), are passively absorbed from the intestinal lumen (Pond et al., 2005). However, saturated FA included, for instance, in palm oil, are poorly digested and absorbed by birds (Scott et al., 1982) and require solubilization first (Davenport, 1980). Chemical substances such as bile acid salts exhibit emulsifying properties that enable micelle formation, as well as further decomposition of FA by lipase (Ravindran et al., 2016). However, fully developed secretion of both bile acid salts and lipase does not occur until around 14 d of a broiler's life (Krogdahl, 1985; Uni, et al. 1999). Therefore, emulsifier substances can be added to broiler diets to enhance fat digestibility in early age and improve birds' performance during the whole rearing period (Kaczmarek et al., 2015; Ravindran et al., 2016). Additionally, the common practice from the economical point of view is to blend saturated and unsaturated fats due to the natural emulsifying properties of unsaturated FA (Freeman, 1969; Wiseman and Lessire, 1987).

Literature data indicate that the digestibility of nutrients is negatively influenced by the presence of NSP in the diet (Salih et al., 1991; Lazaro et al., 2003). In diets containing rapeseed meal (RSM), NSP-degrading enzymes improve carbohydrate digestibility and eliminate potential nutrient-encapsulating effect of NSP. This has been proven by Meng et al. (2005b) and Rutkowski et al. (2012), who observed improvement in nutrient digestibility and birds' performance due to the presence of NSP-degrading enzymes in RSM-based diets. Interestingly, a previous study on broiler chickens by Kaczmarek et al. (2015) revealed that neutral detergent fibre (NDF) degradation in the wheat-corn and soybean meal (SBM) diet was increased after combined supplementation with emulsifier and carbohydrase. Initially, improvement in NDF degradation was considered as an indirect result of improving substrate-to-enzyme ratio after improvement in fat digestion by emulsifier. However, *in vitro* studies, as well as studies on ruminant animals, indicated that emulsifiers have a direct effect on the GIT microbiome (Ahn et al., 2009). It was established that non-ionic surfactant (NIS) enhance the secretion of bacterial enzymes responsible for the carbohydrates degradation (Lee et al., 2004), which are one of the NDF components. Kubis et al. (2020) analyzed the addition of xylanase and emulsifier to wheat-based diets with tallow, and their results partially explained those obtained by Kaczmarek (2015); in experimental diets supplemented simultaneously with both additives, a decrease in digesta viscosity was observed, which presumably resulted in a favorable shift of fermentation from the ileum to the cecum, where the activity of

bacterial enzymes is greater. As the abovementioned studies involved the use of viscous grain, the response of the NSP enzyme was as expected. In the present study, a similar experimental model was used as in the work of Kubis et al. (2020). Nevertheless, the carbohydrate source used was RSM, which is considered as a nonviscous component, with negligible susceptibility to microbial fermentation in the lower GIT (Zdunczyk et al., 2015a). However, NSP of RSM still possesses properties which negatively influence accessibility and digestibility of nutrients; a possibility to encapsulating nutrients causing their losses (Raza et al., 2019). Therefore, response after enzyme may vary compared to the viscous grains, however, still may presents positive effect on nutrients availability (Francesch and Gersert, 2009).

The study aimed to analyze the influence of carbohydrase, emulsifier, or a combination of both on performance, nutrient utilization, and apparent metabolizable energy—nitrogen (AME_N) value of maize-soybean-RSM-based broiler diets, and their influence of gut morphological structures, and short-chain fatty acids (SCFAs) concentration in chickens. Additionally, ileum excretion of total and free sialic acid, a product of mucin bacterial breakdown will be analyzed, as it is consider as a good indicator of endogenous losses (Cowieson et al., 2004).

We hypothesized that the combined use of emulsifier and carbohydrase would improve nutrient utilization as well as broiler chickens' performance to a greater extent than the individual use of enzyme or emulsifier.

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out in the Experimental Station of Poznan University of Life Sciences in Gorzyn, Poland. All the experimental procedures were performed in accordance with the guidelines of the Local Ethical Committee for Experiments on Animals in Poznan regarding animal experimentation and animal care under study (European Union [EU] Directive 2010/63/EU for animal experiments). Approval for conducting the experiment was not required as the production methods and sample collection (excreta) had no negative impact on the birds' welfare and is not considered as experimental procedure carried out on each animal.

Experimental Design

A total of 384 Ross 308 male broiler chicks (1-day-old) were obtained from a local hatchery (DanHatch Poland, Wolsztyn, Poland). The birds were divided into 4 weight classes (each class differed by 0.5 grams) and randomly assigned to 4 dietary treatments (12 replications, 8 individuals; 2 birds from each weight class). All birds were reared in 1.2 × 0.8 m floor pens on wood-shaving litter. In the first week of the experiment, the birds were exposed to light for 24 h, and subsequently to 18 h of light and 6 h of darkness. The temperature in the pens was maintained at 32°C in the first week of the

experiment and then gradually reduced up to 23°C at the end of the third week. Fresh water and crumbled or pelleted feed were provided ad libitum.

Diets

The dietary treatments were divided into 3 phases; 1 to 11 d: starter, 12 to 25 d: grower, 26 to 42 d: finisher. Dietary treatments consisted of: the control (CON) diet (Table 1) based on maize, SBM, and RSM at 5%, 7%, and 15% (starter, grower, and finisher, respectively), and the control diet supplemented with emulsifier (EMU), enzyme (ENZ), or both (EMU + ENZ). The soybean and palm oils were the main fat sources of the diets, and were determined for FA content (Table 2). Quantum blue phytase (1,000 phytase units/kg; AB Vista Feed Ingredients, Marlborough, UK) was included in all diets. The emulsifier was made of glyceryl polyethylene glycol ricinoleate (E484, Bredol 683; AkzoNobel SC AB, Stenungsund, Sweden) and added to the EMU and ENZ + EMU treatment diets instead of maize at 0.015 g/kg of starter diet, 0.0173 g/kg of grower diet, and 0.0188 g/kg of finisher diet. Replacement of maize by emulsifier was justified by the greatest amount of this component in a formulated diet; levels of replacement were negligible and not consider as factor which may disrupt balance of a diet. The hydrophilic-to-lipophilic balance value of Bredol 683 was 9.5. The enzyme used at 0.12 g/kg in all diets was Superzyme OM (Canadian

Table 1. Composition and nutrient contents of the control (CON)¹ diet: starter, grower, finisher (as feed basis).

Ingredients, %	Starter 1–11 d	Grower 12–25 d	Finisher 26–42 d
Maize	53.6	58.9	52.2
Soybean meal	32.8	27.3	22.1
Rapeseed meal	5.00	7.00	15.0
Soybean oil	3.25	1.60	3.80
Palm oil	2.00	1.60	3.90
Monocalcium phosphate	0.68	0.56	0.49
Premix ²	1.00	1.00	1.00
Limestone	0.38	0.31	0.16
DL-met	0.36	0.28	0.25
HCL-Lys	0.38	0.29	0.26
NaHCO ₃	0.25	0.26	0.26
NaCl	0.17	0.10	0.10
L-Thr	0.14	0.09	0.08
TiO ₂	-	0.30	0.30
L-trp	-	0.17	-
Quantum Blue	0.01	0.01	0.01
Analyzed nutrient content in % or otherwise noted			
Crude protein [%]	22.2	21.1	20.5
Gross energy [kcal/kg] (MJ/kg)	-	-	4,562 (19.1)
Ether extract [%]	8.63	6.71	10.2
TiO ₂ [%]	-	-	0.32

¹EMU, ENZ and EMU + ENZ diets were supplemented with emulsifier (0.015 g/kg of starter diet, 0.0173 g/kg of grower diet, and 0.0188 g/kg of finisher diets), enzyme (0.12 g/kg in all diets), or both simultaneously.

²Provides per kg diet: vitamin A, 11250 IU; vitamin D, 2500 IU; vitamin E, 80 mg; vitamin K, 250 mg; vitamin B12, 0.02 mg; folic acid, 1.17 mg; choline, 379 mg; D-pantothenic acid, 125 mg; riboflavin, 7.0 mg; niacin, 41.67 mg; thiamin, 2.17 mg; D-biotin, 0.18 mg; pyridoxine, 4.0 mg; ethoxyquin, 0.09 mg; Mn, 73 mg as manganese oxide; Zn, 55 mg as zinc oxide; Fe, 45 mg as iron sulfate; Cu, 20 mg as copper sulfate; I, 0.62 mg as calcium iodide; Se, 0.3 mg as selenium potassium; salinomycin, 60 mg.

Table 2. Fatty acids composition (% of total fatty acids) of oils used in experimental diets.

Fatty acids, %	Soybean oil	Palm oil
Saturated fatty acids		
C12:0 Myristic acid	0.07	0.16
C14:0 Myristic acid	0.08	1.01
C16:0 Palmitic acid	10.0	42.9
C18:0 Stearic acid	5.50	4.78
Monounsaturated fatty acids		
C18:1c18:1 Oleic acid	21.8	39.8
C18:1c11:1 Vaccenic acid	1.30	0.72
C20:1t Eicosenoic acid	0.47	0.39
Polyunsaturated fatty acids		
C18:2c9c12:2 Linoleic acid	51.7	9.30
C18:3c9c12:3 α-Linolenic acid	7.53	0.22
C18:3n6 γ-Linolenic	0.19	0.15
C20:3n6 Homo-γ-Linolenic	0.58	0.10
C20:5n3 Icosapentaenoic acid	0.23	0.12
SFA ¹	16.1	49.1
UFA ²	83.9	50.9
MUFA ³	23.1	40.9
PUFA ⁴	60.4	9.95

¹Saturated fatty acids.

²Unsaturated fatty acids.

³Monounsaturated fatty acids.

⁴Polyunsaturated fatty acids.

Bio-Systems Inc., Calgary, Canada) which is a multicarbohydrase with 2100 U cellulase, 300 U mannanase, 37.5 U galactanase, 750 U xylanase, 450 U glucanase, 1875 U amylase, and 150 U protease per kg of diet. All formulated diets met or exceeded the Aviagen nutrient recommendations for broiler chickens (AVIAGEN, 2014). All diets were crumbled (0–11 d) or pelleted

(12–42 d) and were isoenergetic and isonitrogenous.

A horizontal mixer (Zuptor 300 MPW; Zuptor sp. zoo., Gostyń, Poland) was used to prepare diets. The mixing band was set at 27.4 rpm for 4 min for mixing. Maize was ground by a Skiold disk mill (SK2500; Skiold A/S, Søby, Denmark). Minerals, vitamins, amino acids, enzymes, emulsifier, and fats were added directly to the mixer during mixing. The homogeneity of emulsifier and enzyme was assured by mixing a small amount of the emulsifier with oils, and the enzyme with basic feed as a premix before being added to the final feed. The finisher phase diets were supplemented with an internal marker, titanium dioxide (TiO₂), at 3.0 g/kg, to determine prececal digestibility as well as total and free sialic acid excretion.

Sample Collection

To determine growth performance, the average feed intake (AFI) and average gain (AG) were monitored (with pen as an experimental unit) after each nutrition phase (starter, grower, finisher), and the feed conversion ratio (FCR) was calculated. The birds were fasted for 4 h before weighing, as this is the minimum time proper to live weight measures due to the excretion of intestinal wastes without affecting the yielding (Veerkamp, 1986; Kim et al., 2007).

During the finisher phase (28–36 d), collection trays were installed in floor pens to obtain excreta samples (12

replications per treatment/per collection; one replication represented eight birds). The individuals were removed from pens and next, wire floor trays were placed above the collection tray. Contaminant-free excreta samples were collected after approximately 3 h. The samples were frozen, freeze-dried, and ground for further analyses.

A total of 100 individuals (25 from each treatment) were euthanized by electric stunning following the recommendations for euthanasia of experimental animals. The duodenum ($n = 10$ / treatment) and ileum ($n = 10$ / treatment) digesta samples were collected by gentle squeezing from randomly selected birds from each pen. The samples were frozen in liquid nitrogen to determine nutrient digestibility, and segments (2 cm) of the middle duodenum and middle ileum were used for histomorphometric measurements. All samples (except used for histomorphometric measurements) were stored at -80°C for further analyses.

Chemical Analyses

Feed, digesta, and excreta samples were ground in a laboratory mill with a 1-mm sieve and were analyzed for dry matter (DM; method 2001.12), crude protein (CP; method 976.05), fat as ether extract (EE; method 920.39), and Ca (method 927.02) according to the guidelines of the AOAC International (AOAC, 2005). The gross energy (GE) of feed was determined using an adiabatic bomb calorimeter (KL-12Mn; Precyzja-Bit PPHU, Bydgoszcz, Poland) standardized with benzoic acid. The feed samples were analyzed for acid detergent fibre (expressed inclusive of residual ash) and NDF (assayed with a heat-stable amylase and expressed inclusive of residual ash) using the official methods 942.05 and 973.18, respectively (AOAC, 2005). Fat content was determined using a Soxtec System HT 1043 Extraction Unit (Foss Tecator, Denmark).

Analysis of the excreta samples (for GE, NDF, and N) and ileum digesta samples (for CP, Ca, starch, and EE) were carried out using the abovementioned methods. The FA concentrations in soybean oil and palm oil were determined by gas chromatography as described by Szczechowiak et al. (2016).

The levels of TiO_2 marker in the finisher diet and excreta were determined as described by Short et al. (1996) in samples prepared as proposed by Myers et al. (2004). The AOAC colorimetric method 996.11 (AOAC, 2005) based on a Megazyme total starch determination kit was performed to determine starch content in ileum digesta samples.

Histomorphometric measurements of ileum and jejunum were made as described by Konieczka et al. (2018). Briefly, fixed tissue samples were dehydrated and embedded in paraffin wax. Transverse sections of prepared samples were cut on a microtome with a thickness of $4.5\ \mu\text{m}$, and the sections were stained with hematoxylin and eosin. For further analyses, images of samples were taken using a light microscope (Olympus BX51

microscope; Olympus Corp., Tokyo, Japan) with CellD Imaging Software (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany). The following parameters were measured in the sections: villus height (VH)—from the tip of the villus to the villus–crypt junction; crypt depth (CD)—from the crypt mouth to base; lamina muscularis mucosae thickness; villus width—at the midline of the villus; and villus surface area. The VH/CD ratio was calculated.

The content of total and free sialic acids in excreta was determined using the procedure of Jourdan et al. (1971). The isolation of crude mucin from excreta was performed as described by Lien et al. (1996). Briefly, approximately 0.6 g freeze-dried excreta at 4°C was combined with 5 mL sodium chloride (0.15 mol/L) containing 0.2 M/L sodium azide. The homogenized samples were centrifuged at 12,000 g for 30 min. The supernatant was moved to second test tube and reused in second centrifugation (12,000 g for 30 min) prepared due to the proper removal of insoluble material. Then, the supernatant was pipetted into a preweighed test tube and cooled in an ice bath. Ice-cold ethanol (60%) was added to the supernatant, and the samples were cooled in an ice bath. Then, the samples were precipitated overnight at 20°C . After centrifugation at 1,400 g for 10 min, crude mucin was solubilized in 2 mL distilled water. Next, 0.1 mL of 0.04 M periodic acid solution was added to 0.5 mL of crude mucin preparation. The solution was mixed and placed in an ice bath for 20 min. Afterward 1.25 mL of resorcinol reagent was added to the solution. The solution was mixed, placed in an ice bath for 5 min, heated for 15 min (100°C), cooled, and filled with tert-butyl alcohol (1.25 mL). A single-phase solution was generated by vigorous mixing. Then, the tubes were placed in a water bath for 3 min (37°C) to stabilize the color, and cooled to the room temperature. The absorbance of the solution was read at 630 nm using a Media Spectrophotometer (Marcel Lamidy S.A., Châtillon, France). Total and free sialic acid in excreta was expressed in $\mu\text{mol/g}$ of TiO_2 .

The SCFA concentration in the cecum digesta was determined by gas chromatography following the method of Konieczka et al. (2019). An HP 5890 Series II gas chromatograph (Hewlett Packard, Waldbronn, Germany) with a flame-ionization detector, a Supelco Nukol fused silica capillary column (30 m \times 0.25 mm internal diameter, film 0.25 mm), and helium as the carrier gas was used for separation. The concentrations of individual SCFAs were determined using an internal standard (isocaproic acid).

Calculations and Statistical Analyses

The values of APD and AME_N of the diets were calculated in relation to the TiO_2 ratio of the nutrient content of the feed, digesta, or excreta. The nutrient digestibility was calculated using the following equation:

$$\text{Digestibility} = \left\{ 1 - \left[\frac{(\text{TiO}_{2\text{diet}}/\text{TiO}_{2\text{digesta}})}{(\text{component}_{\text{digesta}}/\text{component}_{\text{diet}})} \right] \right\}$$

where the content of TiO_2 and that of the dietary components are given as grams per kilogram.

The AME_N of diets was calculated using the following equation:

$$AME_N [MJ/kg] = GE_{corrected} - [GE_{corrected} \times (TiO_{2diet}/TiO_{2corrected}) - 0.0344 \times \{N_{diet} - [N_{corrected} \times (TiO_{2diet}/TiO_{2corrected})]\},$$

where GE represents the gross energy [MJ/kg], N represents nitrogen, and TiO_2 represents the dietary marker. AME was corrected to a zero-nitrogen balance with 34.4 MJ/kg N retained as described by Hill and Anderson (1958).

The experiment was conducted as a completely randomized design. Each pen represented one experimental unit for performance results and apparent total tract digestibility (ATTD) and AME_N , and individual birds for APD, duodenum and ileum morphometry, and sialic acid excretion. The significance level was set at $P < 0.05$. All data were calculated using the analysis of variance of the general linear model procedure under the R environment (R Development Core Team, 2014) with the Agricola package (de Mendiburu, 2014) using the following model:

$$Y_i = \mu + \alpha_i + \varepsilon_i$$

where Y_i is the measured dependent variable, μ is the overall mean, α_i is the effect of additive, and ε_i is the random error.

RESULTS

Chemical Composition and Performance

The FA composition of the oils used in the diets is presented in Table 2. The determined FA profile of the feed showed the differences between soybean oil and palm oil. In palm oil, SFAs constituted almost 50%, while in soybean oil their content did not exceed 16.5%. The predominant SFAs in palm oil were palmitic acid (42%) and stearic acid (4.78%). Soybean oil mainly consisted of polyunsaturated FA (60%), and the dominant unsaturated FA was linoleic acid (517 g/kg).

The mortality in the experiment was not found to be related to dietary treatments used, and averaged approximately 4% (15 birds). Throughout the experimental period, the lowest AFI was observed in the

EMU + ENZ treatment ($P < 0.05$). AG significantly differed only in the starter and finisher phases of nutrition, with the greatest values observed in ENZ and EMU + ENZ treatments. No significant differences in AG were noted among the treatments during the experiment; however, the experimental treatments showed numerically greater AG values than the CON treatment. The CON treatment showed the highest FCR, while the lowest value was recorded in the EMU + ENZ treatment. The detailed results of the analysis of AFI, AG, and FCR among the dietary treatment treatments are presented in Table 3.

Digestibility

The values of AME_N of the diets and APD of CP, EE, Ca, and starch are presented in Table 4. No differences in the AME_N values were found among the treatments. The EMU + ENZ treatment resulted in the highest APD of CP and starch ($P < 0.05$) as well as the highest total tract NDF degradation. Interestingly, the total tract NDF degradation of the CON treatment was significantly higher than that of the EMU and ENZ treatments. The lowest ($P < 0.05$) APD of EE was found in the CON and ENZ treatments, whereas the highest value was recorded in the EMU treatment. Considering the APD of Ca, only the EMU + ENZ treatment showed a statistically higher value compared to the CON treatment ($P < 0.05$); however, the value did not differ from the EMU treatment. A similar trend was observed for the ATTD of EE at 24 d. No differences among treatments were found for the ATTD of EE at 42 d.

Gut Morphology

Supplementation with additives increased the jejunum VSA ($P < 0.05$); however, the EMU treatment did not show any difference compared to the CON treatment. A difference ($P < 0.1$) in the VW and VH of jejunum was observed only in the EMU + ENZ treatment compared to the CON treatment (greater VH and lower VW). The highest VH/CD ratio was noted in the EMU + ENZ treatment ($P < 0.1$). No differences were observed in jejunum CD and lamina muscularis mucosae thickness among the treatments. Similarly, no statistically significant differences or trends were found for the abovementioned parameters of ileum mucosa structures

Table 3. Performance of broiler chickens fed: control diet (CON), control diet supplemented with emulsifier (EMU), control diet supplemented with enzyme (ENZ), control diet supplemented with emulsifier, and enzyme (EMU+ENZ).

day	AFI (g/bird)				AG (g/bird)				FCR ¹ (kg/kg)			
	1-11	12-25	26-42	1-42	1-11	12-25	26-42	1-42	1-11	12-25	26-42	1-42
CON	244 ^a	1,409 ^a	2,458 ^a	4,110 ^a	212 ^b	973	1,493 ^b	2,678 ^b	1.15 ^a	1.45	1.82 ^a	1.60 ^a
EMU	224 ^{ab}	1,387 ^{ab}	2,391 ^{ab}	4,002 ^{bc}	218 ^a	990	1,603 ^b	2,711 ^b	1.03 ^b	1.41	1.74 ^b	1.54 ^b
ENZ	233 ^{ab}	1,388 ^{ab}	2,433 ^{ab}	4,054 ^{bc}	220 ^a	987	1,660 ^b	2,766 ^{ab}	1.06 ^{ab}	1.41	1.70 ^b	1.52 ^b
EMU + ENZ	218 ^b	1,371 ^b	2,365 ^b	3,954 ^c	223 ^a	981	1,694 ^b	2,798 ^a	0.97 ^b	1.40	1.60 ^c	1.46 ^c
SEM	3.71	5.66	13.1	17.5	1.18	5.38	10.0	11.6	0.019	0.009	0.015	0.010
P-value	0.041	0.026	0.041	0.006	< 0.001	0.65	< 0.001	< 0.001	0.002	0.055	< 0.001	< 0.001

^{a-c}Means in a column not sharing a common letter are significantly different ($P \leq 0.05$).

¹Feed conversion ratio.

Table 4. Apparent metabolizable energy corrected to N equilibrium (AME_N), apparent pre-cecal digestibility (APD) of crude protein (CP), ether extract (EE) on 28th day, Ca, starch, EE apparent total tract digestibility (ATTD) on 35th day and neutral detergent fibre (NDF) total tract degradation in broiler chickens fed control diet (CON), control diet supplemented with emulsifier (EMU), control diet supplemented with enzyme (ENZ), control diet supplemented with emulsifier and enzyme (EMU+ENZ).

Treatment	AME _N , kcal/kg (MJ/kg)		APD at 35th day				ATTD of EE		Total tract NDF degradation
	at 28 d	at 35 d	CP	EE	Ca	Starch	28 d	35 d	
CON	2,985 (12.5)	2,913 (12.2)	71.8 ^b	85.1 ^c	15.3 ^b	93.3 ^b	80.3 ^b	90.7	40.7 ^b
EMU	2,866 (12.0)	2,913 (12.2)	68.3 ^c	90.7 ^a	22.2 ^{bc}	94.7 ^b	82.6 ^{bc}	92.2	34.9 ^c
ENZ	3,009 (12.6)	2,890 (12.1)	70.7 ^{bc}	84.9 ^c	13.6 ^b	94.8 ^b	81.7 ^b	93.6	35.1 ^c
EMU + ENZ	3,105 (13.0)	2,842 (11.9)	79.7 ^a	87.2 ^b	29.1 ^a	97.5 ^a	84.8 ^a	91.3	49.2 ^a
SEM	0.163	0.151	0.9	0.4	1.734	0.463	0.5	0.9	1.2
P-value	0.126	0.879	< 0.001	< 0.001	0.002	0.006	0.003	0.661	< 0.001

^{a-c}Means in a column not sharing a common letter are significantly different ($P \leq 0.05$).

(data not shown). The detailed results of the analysis of jejunum morphology among the dietary treatment treatments are presented in Table 5.

Sialic Acid Excretion

The studied treatments showed no differences in total and free sialic acid excretion on d 24. At 42 d, both total and free sialic acid excretion were the lowest in the EMU + ENZ treatment ($P < 0.05$); however, no differences compared to the ENZ treatment were observed. The detailed results of the analysis of sialic acid excretion among the dietary treatment treatments are presented in Table 6.

Cecum SCFA Concentration

Only the EMU + ENZ treatment showed a lower concentration of acetic acid and total SCFAs concentration in the cecum compared to the CON treatment. The EMU treatment and the ENZ treatment did not differ in acetate concentration compared to the CON and EMU + ENZ treatments. No differences were observed in the concentrations of propionic, butyric, isobutyric, valeric, and isovaleric acids among the treatments. The detailed results of the analysis of SCFAs concentration among the dietary treatment treatments are presented in Table 7.

Table 5. Villus height (VH), crypt depth (CD), villus width (VW), lamina muscularis mucosae thickness (MT), villus surface area (VSA) of duodenum and ileum mucosa in broiler chickens fed control diet (CON), control diet supplemented with emulsifier (EMU), control diet supplemented with enzyme (ENZ), control diet supplemented with emulsifier and enzyme (EMU+ENZ).

Treatment	VH	CD	VW (μm)	MT	VSA (mm^2)	VH/CD
CON	1,169 ⁿ	178	150 ⁿ	169	0.566 ^b	6.62 ⁿ
EMU	1,320 ^{an}	196	160 ^{an}	148	0.687 ^{ab}	6.81 ⁿ
ENZ	1,349 ^{an}	203	160 ^{an}	150	0.704 ^a	6.67 ⁿ
EMU + ENZ	1,453 ^a	177	173 ^a	135	0.812 ^a	8.46 ^a
SEM	40.2	4.88	3.17	4.92	0.026	0.287
P-value	0.086	0.15	0.078	0.104	0.007	0.059

^{a-c}Means in a column not sharing a common letter are significantly different ($P \leq 0.05$).

^{a-c}Means in a column not sharing a common letter tend to differ ($P \leq 0.1$).

DISCUSSION

During the first week of a broiler's life, the secretion of lipase and bile salts is negligible (Sklan, 2001), which affects fat digestion. Thus, it has been proposed that broiler diets can be supplemented with additives to improve birds' performance. In this study, birds fed with experimental diets containing additives showed differences in AFI and FCR, which is in agreement with the results of previous studies (Aftab, 2009; de Vries et al., 2014; Kaczmarek et al., 2014). The authors of these studies speculated that improvement in FI and consequently in FCR after the addition of enzyme and/or emulsifier was related to better feed utilization. The digestibility results obtained in the present study partially support this hypothesis. After the addition of emulsifier, fat digestibility was found to be improved in the experimental treatments (APD, $P < 0.05$; ATTD on d 24, $P < 0.05$). Presumably, less feed was needed to fulfill the caloric requirements of broilers (Mathlouthi et al., 2002), which as a result lowered AFI. Additionally, improved fat digestibility enable physical access of other nutrients to the digestive enzymes, make them more prone to degradation and absorption (Danicke et al., 1999). Enhanced AFI observed after the use of additives (even in the starter phase) is inconsistent with the results of several previous studies (Cowieson et al., 2010; Alzawqari, 2011; Guerreiro et al., 2011; de Vries et al., 2014; Ahmadi, 2016). The contradictory results in these studies may also be related to the use of different types of emulsifiers (Abbas et al., 2016), for instance; desiccated ox bile or emulsifier consisted of milk derived casein. Considering that suboptimal diets were used in the present study, in which the fat levels for broilers exceeded above 5% and included saturated fats (palm oil), deterioration in FCR was expected in the CON treatment. Previously, Zaefarian et al. (2015) showed that, compared to unsaturated fats, the addition of saturated fats caused a reduction in broilers efficiency (tallow vs. soybean oil), as a result of deterioration in fat utilization. In the present study, the EMU + ENZ treatment presented the most preferable FCR in association with the lowest AFI and the highest AG during the whole period of experiment. As was mentioned, capacity to absorb and digest is impoverished in newly hatched chicks due to the immature GIT (Ravindran and

Table 6. Excretion of sialic acid ($\mu\text{mol/g}$ of TiO_2) in ileum of digesta in broiler chickens fed control diet (CON), control diet supplemented with emulsifier (EMU), control diet supplemented with enzyme (ENZ), control diet supplemented with emulsifier and enzyme (EMU+ENZ).

Treatments	28 d		42 d	
	Total SA/1 g TiO_2	Free SA/1 g TiO_2	Total SA/1 g TiO_2	Free SA/1 g TiO_2
CON	514	550	678 ^a	688 ^a
EMU	570	561	705 ^a	709 ^a
ENZ	546	537	607 ^{ab}	604 ^{ab}
EMU + ENZ	422	449	516 ^b	515 ^b
SEM	0.622	0.822	25.0	24.9
P-value	0.104	0.303	0.026	0.017

^{a-c}Means in a column not sharing a common letter are significantly different ($P \leq 0.05$).

Abdollahi, 2021). Thus, in condition of a diet consisting poorly digested saturated fat oil addition (palm oil), after emulsifier supplementation in the starter phase (1–11 d), significant enhancement among FCR occurred, which also was reflected among increased AG. After neonatal after-hatching period, approximately till second week of broiler's life, GIT become well-developed (Ravindran and Abdollahi, 2021). Maturation of broiler's GIT was reflected by no changes among AG or FCR during grower phase (12–25 d). Results of improved AG in the groups with enzyme are in contradictory with the previous studies where additives were supplemented separately (Aftab, 2009; de Vries et al., 2014; Kaczmarek et al., 2014).

This finding clearly indicates the positive mutual effect of both additives on nutrient utilization which was additionally reflected by the greatest APD of CP and starch, and total tract NDF degradation. Similarly, the ATTD of EE and APD of EE were greater in the experimental treatments compared to the CON treatment. However, the highest APD of EE was observed in the EMU treatment, which is in agreement with the results of Guerreiro et al. (2011). This indicates that enzyme addition may be contributed to lowering the positive influence of emulsifier on fat digestibility. On the one hand, after carbohydrase addition, some of the NSP

decomposition products of RSM may negatively influence fat digestion. Cell wall polysaccharides of RSM is strongly bounded by ester bonds or hydrogen bridges and even after degradation may consist of residues unable to further degradation, for instance xyloglucan and cellulose, or residues originating from pectic polysaccharides; rhamnosyl, arabinosyl, uronyl (Pustjens et al., 2013; 2014). On the other hand, Jia et al. (2012) suggested that the response to the addition of multicarbohydrase may vary due to the NSP profile, indicated high content of oligosaccharides and pectic polysaccharides increased AME_N value for broilers. However, the AME_N value in the current study did not differ among the treatments nor did the ATTD of EE on d 35. Additionally, a slight difference observed between the ATTD and APD of EE suggested that the jejunum and the upper ileum are the major sites of fat digestion and absorption in poultry species (Tanchaonrat et al., 2014). It is well accepted that fat absorption is negligible in the lower segments of the GIT in monogastric animals. This partially explains the lack of differences in ATTD of EE at the end of the experiment (d 35). However, differences in ATTD of EE on d 28 occurred in groups supplemented by emulsifier. Presumably, emulsifier by improving fat digestibility, diminished physical covering of nutrients by fat and consequently ensured their enhanced exposure to the digestive and exogenous enzymes (Danicke et al., 1999). This conclusion is also supported by the highest numerical ATTD of EE value on 28 d in the group with both additives. The ATTD of EE on d 28 was lower than that on d 35. It can be speculated that due to the underdeveloped synthesis of bile salts after hatching (Krogdahl, 1985), the EE digestibility is compromised in the early days of a bird's life.

The highest APD of CP and starch indicates the simultaneous action of both additives, while enzyme addition alone did not cause any differences, which agrees with the results of Kocher et al. (2000) and de Vries et al. (2014). Nutrient absorption is precisely related to intestinal villi development. In this study, the villus development was found to be enhanced after the use of additives, which is in agreement with the results of Alzawqari et al. (2011) who observed favorable villus morphology after emulsifier addition to the diet (desiccated ox bile; 0.25% and 0.50% of the diet). The addition

Table 7. Total short-chain fatty acid (SCFA) concentration in ileum digesta in broiler chickens fed control diet (CON), control diet supplemented with emulsifier (EMU), control diet supplemented with enzyme (ENZ), control diet supplemented with emulsifier and enzyme (EMU+ENZ).

Treatment	C2 ¹	C3 ²	C4 ³	C4 ⁴	C5 ⁵	C5 ⁶	Total
CON	38.8 ^a	3.55	0.55	9.21	0.64	0.70	52.8 ^a
EMU	37.5 ^{ab}	3.61	0.51	9.48	0.60	0.72	52.4 ^a
ENZ	35.6 ^{ab}	3.86	0.52	7.26	0.65	0.58	48.5 ^{ab}
EMU + ENZ	33.4 ^b	3.01	0.53	7.81	0.59	0.68	46.0 ^b
SEM	0.750	0.159	0.023	0.529	0.050	0.022	1.08
P-value	0.013	0.341	0.829	0.422	0.840	0.311	0.035

^{a-c}Means in a column not sharing a common letter are significantly different ($P \leq 0.05$).

¹Acetic acid.

²Propionic acid.

³Isobutyric acid.

⁴Butyric acid.

⁵Isovaleric acid.

⁶Valeric acid.

of emulsifier and enzyme may improve the condition of the mucosa due to the enhanced flow in digesta, enabling better dispersal of endogenous bile acids. Bile acids are known for ensuring proper conditions for villus development, for instance; limit endotoxin absorption (Sheen-Chen et al., 2002), or even have the possibility to physical renewal of the damaged mucosa (Kamiya et al., 2004). On the other hand, previous studies revealed that the use of emulsifier (lysolecithin) led to increased deposition of collagen in the villi resulted in increased strength and height of villus and enhanced nutrient absorption due to its incorporation itself into epithelial cells (Wendel, 2000; Mandalari et al., 2009; Brautigam et al., 2017). Improved intestinal mucosa condition increases the villus surface, resulting in better nutrient absorption (Gopinger et al., 2014), which is reflected by the highest APD of CP and starch in the EMU + ENZ treatment.

Inclusion of a higher amount of saturated fats in broiler diets is expected to decrease the availability of minerals, diminishing Ca digestibility due to the formation of insoluble soaps in the gut lumen (Selle et al., 2009; Tancharoenrat and Ravidran, 2014). In this study, the APD of Ca was the highest in the EMU + ENZ treatment; however, the difference was not statistically significant in comparison to the EMU treatment. It can be assumed that emulsifier usage prevents soap formation by enhancing fat retention. Considering the combined use of emulsifier and enzyme, the mode of action is probably similar to that related to the APD of CP: efficient fat decomposition after emulsifier usage enhanced the exposure of nutrients to endogenous and exogenous enzymes and improved micelle formation, making the nutrients more prone to digestion and absorption (Cho et al., 2012). The lowest level of sialic acid in the EMU + ENZ treatment additionally confirmed this hypothesis. In broilers, the epithelium of the GIT is covered in mucins which act as a substrate for intestinal bacteria. Upon breakdown by bacterial enzymes, mucins are converted into sialic acid, which appears as residues in excreta and thus can be used to assess approximate total mucin production and also as an indicator of endogenous losses (Cowieson et al., 2004). Rapeseed NSP has an encapsulating effect ability; it may incorporate starch, protein and other nutrients into its cell wall. This negative effect unable endogenous enzymes to reach substrates, thus, impeding digestion and causing nutrient losses (Raza et al., 2019). However, the combined use of both additives in this study mitigated this effect. Francesch and Geraert (2009) also observed increased Ca retention, which was manifested as higher bone mineralization and Ca percentage of DM after multienzyme addition in their study.

In the present study, the total tract NDF degradation was determined in all the treatments. Generally, analyses of NDF include only the content of nonsoluble fractions of cell wall, such as cellulose, hemicellulose, and lignin, including insoluble NSP, and do not include water-soluble components, which results in the underestimation of the actual total content of NSP (Van Soest

et al., 1991). However, soluble NSP components mostly include pectin and β -glucans, which were not considered as the main NSP components in the present study. Meng et al. (2005b) reported that the water-soluble NSP of corn, SBM, and canola meal constitutes only a minority of the total NSP (around 10%). Thus, the total tract NDF degradation may still be considered to represent the NSP content similar to the actual values. In addition to decreasing viscosity, enzymes decomposing NSP dissolving the cell wall matrix of NSP, where nutrients may be incorporated, thus, limit the NSP nutrient-encapsulating ability (Slominski, 2011). Nutrients released from cell walls by the enzyme are more accessible to all digestive enzymes (Choct, 2006; Francesch and Geraert, 2009), as well as to emulsifier in the case of the present study. On the other side, as mentioned above, emulsifier addition probably ensure physical access of NSP enzyme to the substrate due to the enhanced fat digestibility (Danicke et al., 1999). In line with this study, Meng and Slominski (2005) in their in vitro study noticed an improvement in NSP degradation in soybean-maize diets after supplementation with multicarbohydrase (each enzyme added at 0.01 g/g of substrate). Moreover, emulsifier usage presumably has a positive influence on enzyme properties. It has been shown that NIS alter substrate structures by swelling and cracking them (Kim et al., 2006), which leads to enhanced water- and enzyme-holding capacities (Goto et al., 2003) and increased vulnerability to enzymatic attack (Kamande et al., 2000; Kim et al., 2006; Ahn et al., 2009). Additionally, NIS have the ability to stabilize enzymes and reduce enzyme denaturation during the hydrolysis of cellulose by alter its' ultrastructure and make it more prone and accessible to degradation, additionally leading to prolonged enzyme activity (Kim et al., 2006; Ahn et al., 2009). This positive interaction between surfactant and enzyme is not obvious as in general surfactants may cause conformational changes of the protein causing in decreased enzymatic activity (Holmberg, 2018). However, nonionic surfactants (as emulsifier) are consider more gentle in interaction with enzyme as they have no ability to electrostatic attraction (Holmberg, 2018).

Although NDF degradation was enhanced in the EMU + ENZ treatment, some of its' undigested components may still be observed. Based on study of Pustjens et al., (2013; 2014) probable components of NDF unable to further degradation were NSP compounds: xyloglucan, cellulose, or pectic residues. These residues may be considered as a microbiome breakdown substrate. Microbial fermentation mostly occurs in the cecum, where the microorganisms take part in the regulation of intestinal epithelial development (Van der Wielen et al., 2000). In the present study, the addition of enzyme and emulsifier caused a reduction in SCFA (acetic acid) concentration, which, due to the SCFA properties may be consider as negative change. Following Van der Wielen et al. (2000), higher fermentation and presence of SCFA in broiler's caeca, especially acetic acid, ensure lower pH providing conditions inhibiting

pathogenic bacteria development. However, in the current study bacterial colonization was not altered (data not shown). Rather non-viscous component, such as RSM (Slominski, 2011; Raza et al., 2019) will not evoke an increase in viscosity in the ileum compared to most of the NSP in grains (Zdunczyk et al., 2015b); thus, undigested nutrients will pass to the lower part of the GIT. The enzyme added to the diets may have degraded the NSP of RSM to a substrate fraction that is not preferred by cecum microbiota for fermentation (Slominski and Campbell, 1990), and emulsifier seems to enhance this degradation process. This may be connected with a high content of insoluble polysaccharides and lignin in RSM, known as rather unsusceptible to microbial fermentation in the lower GIT (Bach Knudsen, 1997). Additionally, polyphenolic compounds presented in RSM can act as growth-reducing agents, thus, may diminished gastrointestinal microbiota proliferation (Amarowicz et al., 2001; Negi and Jayaprakasha, 2001).

Thus, the obtained results indicate the mutual effect of emulsifier and enzyme on production parameters and nutrient digestibility in birds fed diets with RSM, as well as on the jejunum morphology, total and free sialic acid excretion, and total cecum SCFA concentration. Overall, both additives did not provoke excessive, compare to the unsupplemented diets, fermentation in the ceca, did not increase production of putrefactive SCFAs as did not increase internal losses of the nutrients by the host. It seems that simultaneous addition of emulsifier and carbohydrases has more beneficial effect on the degradation of NDF than their usage alone, which may be a result of enhancement in substrate accessibility after improved fat digestion.

In conclusion, simultaneously supplemented emulsifier and multicarbohydrase provided favorable conditions for mucosa development, resulting in better nutrient absorption. Enhanced nutrient digestibility diminished endogenous losses, thus improved performance parameters. Studies on diets containing different type of structural carbohydrates and fats are necessary to understand the mode of action of dietary supplementation of enzyme and/or emulsifier. Also, differentiation in time of emulsifier supplementation may be needed to assess dependence of broilers age and effective emulsifier usage. In addition, more detailed analyses explaining changes in structural NSP and their impact on GIT are needed.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was conducted in the framework of research project 2015/19/D/NZ9/03580 financed by National Science Centre, Kraków, Poland.

DISCLOSURES

The authors declare that they have no competing interests. The authors certify that they have no affiliation with or financial involvement in any organization or

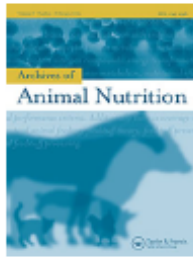
entity with a direct financial interest in the subject matter or materials discussed in the manuscript.

REFERENCES

- Abbas, M., M. Arif, M. Saeed, M. Reyad - Ul - ferdous, M. Hassan, M. Arain, and A. Rehman. 2016. Emulsifier effect on fat utilization in broiler chicken. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 11:158-167.
- Aftab, U. 2009. Utilization of alternative protein meals with or without multiple-enzyme supplementation in broilers fed low-energy diets. *J. Appl. Poult. Res.* 18:292-296.
- Ahmadi, M. 2016. The effect of different levels of rapeseed meal with and without enzyme on the performance and the serum level of triiodothyronine (T3), Thyroxine (T4) and thyroid stimulating hormone (TSH) in broiler chickens. *Iran. J. Appl. Anim. Sci.* 6:203-209.
- Alm, G., J. Kim, E. Park, Y. Oh, G. Lee, J. Lee, C. Kim, and K. Park. 2009. Effects of non-ionic surfactant supplementation on ruminal fermentation, nutrient digestibility and performance of beef steers fed high - roughage diets. *Asian - Australas. J. Anim. Sci.* 22:993-1004.
- Alzawqari, M., H. N. Moghaddama, H. Kermanshahi, and A. R. Rajib. 2011. The effect of desiccated ox bile supplementation on performance, fat digestibility, gut morphology and blood chemistry of broiler chickens fed tallow diets. *J. Appl. Anim. Res.* 39:169-174.
- Amarowicz, R., J. Fornal, M. Karamać, and F. Shahidi. 2001. Antioxidant activity of extracts of phenolic compounds from rapeseed oil cakes. *J. Food Lipids* 8:65-74.
- AOAC. 2005. Agricultural chemicals; contaminants; drugs. *Official Methods of Analysis Vol. 1.* AOAC, International, Gaithersburg MD.
- AVIAGEN. 2014. Ross broiler nutrition supplement. Accessed Nov. 2017. <http://en.aviagen.com/>.
- Bach Knudsen, K. E. 1997. Carbohydrate and lignin content of plant materials used in animal feeding. *Anim. Feed Sci. Technol.* 67:319-338.
- Brautigan, D. L., R. Li, E. Kubicka, S. D. Turner, J. S. Garcia, M. L. Weintraub, and E. A. Wong. 2017. Lysolecithin as feed additive enhances collagen expression and villus length in the jejunum of broiler chickens. *Poult. Sci.* 96:2889-2898.
- Cho, J. H., P. Y. Zhao, and I. H. Kim. 2012. Effects of emulsifier and multienzyme in different energy density diet on growth performance, blood profiles, and relative organ weight in broiler chickens. *J. Agric. Sci.* 4:161-168.
- Choct, M. 2006. Enzymes for the feed industry: past, present and future. *Worlds Poult. Sci. J.* 62:5-16.
- Cowieson, A. J., T. Acamovic, and M. R. Bedford. 2004. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 45:101-108.
- Cowieson, A. J., M. R. Bedford, and V. Ravindran. 2010. Interactions between xylanase and glucanase in maize - soy - based diets for broilers. *Br. Poult. Sci.* 51:246-257.
- Danicke, S., W. Vahjen, O. Simon, and H. Jeroch. 1999. Effects of dietary fat type and xylanase supplementation to rye-based broiler diets on selected bacterial groups adhering to the intestinal epithelium on transit time of feed, and on nutrient digestibility. *Poult. Sci.* 78:1292-1299.
- Davenport, H. W. 1980. *Physiology of the Digestive Tract.* Year Book Medical Publishers Inc, London, UK.
- de Mendiburu, F. 2014. *Agricolae: statistical procedures for agricultural research*, version: 1.2 - 1. Accessed May, 2017. <http://cran.r-project.org/>.
- de Vries, S., A. M. Pustjens, M. A. Kabel, R. P. Kwakkel, and W. J. J. Gerrits. 2014. Effects of processing technologies and pectolytic enzymes on degradability of nonstarch polysaccharides from rapeseed meal in broilers. *Poult. Sci.* 93:589-598.
- Francesch, M., and P. A. Genart. 2009. Enzyme complex containing carbohydrases and phytase improves growth performance and bone mineralization of broilers fed reduced nutrient corn - soybean - based diets. *Poult. Sci.* 88:1915-1924.
- Freeman, C. P. 1969. Low pH reduces micellar solubilization-reason for poor fat digestion in rats fed lactic acid. *Br. J. Nut.* 23:249.
- Gopinger, E., E. G. Xavier, M. C. Elias, A. A. S. Catalan, M. L. S. Castro, A. P. Nunes, and V. F. B. Roll. 2014. The effect of different dietary levels of canola meal on growth performance,

- nutrient digestibility, and gut morphology of broiler chickens. *Poult. Sci.* 93:1130-1136.
- Goto, M., H. D. Bae, S. S. Lee, M. S. Yahaya, S. Karita, K. Wanjae, and K. J. Cheng. 2003. Effects of surfactant Tween 80 on forage degradability and microbial growth on the *in vitro* rumen mixed and pure cultures. *Asian - Australas. J. Anim. Sci.* 16:672-676.
- Guerreiro, N. A. C., A. C. Pezzato, J. R. Sartori, C. Mori, V. C. Cruz, V. B. Fascina, D. F. Pinheiro, L. A. Madeira, and J. C. Goncalves. 2011. Emulsifier in broiler diets containing different fat sources. *Brax. J. Poult. Sci.* 13:119-125.
- Hill, F. W., and D. L. Anderson. 1958. Comparison of metabolizable energy and productive energy determinations with growing chicks. *J. Nutr.* 64:587-603.
- Holmberg, K. 2018. Interactions between surfactants and hydrolytic enzymes. *Colloids Surf. B* 168:169-177.
- Jia, W., D. Mikulski, A. Rogiewicz, Z. Zduńczyk, J. Jankowski, and B. A. Slominski. 2012. Low-fiber canola. Part 2. nutritive value of the meal. *J. Agric. Food Chem.* 60:12231-12237.
- Jourdan, G. W., L. Dean, and S. Roseman. 1971. The sialic acids: XI. A periodate - resorcinol method for the quantitative estimation of free sialic acids and their glycosides. *J. Biol. Chem.* 246:430-435.
- Kaczmarek, S. A., A. Rogiewicz, M. Mogielnicka, A. Rutkowski, R. O. Jones, and B. A. Slominski. 2014. The effect of protease, amylase, and nonstarch polysaccharide - degrading enzyme supplementation on nutrient utilization and growth performance of broiler chickens fed corn - soybean meal - based diets. *Poult. Sci.* 93:1745-1753.
- Kaczmarek, S. A., M. Bochenek, A. C. Samuelson, and A. Rutkowski. 2015. Effects of glyceryl polyethylene glycol ricinoleate on nutrient utilization and performance of broiler chickens. *Arch. Anim. Nutr.* 69:285-296.
- Kamande, G. M., J. Baah, K. J. Cheng, T. A. McAllister, and J. A. Shelford. 2000. Effects of Tween 60 and Tween 80 on protease activity, thiol group reactivity, protein absorption and cellulose degradation by rumen microbial enzymes. *J. Dairy Sci.* 83:536-542.
- Kamiya, S., M. Nagino, H. Kanazawa, S. Komatsu, T. Yamumi, and K. Takagi. 2004. The value of bile replacement during external biliary drainage: an analysis of intestinal permeability, integrity and microflora. *Ann. Surg.* 239:510-517.
- Kim, W. J., Y. Gamo, Y. M. Sani, Y. Wusiman, S. Ogawa, S. Karita, and M. Goto. 2006. Effect of Tween 80 on hydrolytic activity and substrate accessibility of carbohydrase I (CBH I) from *Trichoderma viride*. *Asian - Australas. J. Anim. Sci.* 19:684-689.
- Kim, D. H., Y. M. Yoo, S. H. Kim, B. G. Jang, B. Y. Park, S. H. Cho, P. N. Seong, K. H. Hah, J. M. Lee, Y. K. Kim, and I. H. Hwang. 2007. Effect of the length of feed withdrawal on weight loss, yield and meat color of broiler. *Asian - Australas. J. Anim. Sci.* 20:106-111.
- Krogdahl, A. 1985. Digestion and absorption of lipid in poultry. *J. Nutr.* 115:675-685.
- Kocher, A., M. Choct, M. D. Porter, and J. Brox. 2000. The effects of enzyme addition to broiler diets containing high concentrations of canola or sunflower meal. *Poult. Sci.* 79:1767-1774.
- Konieczka, P., M. Banzasz, M. Choct, and S. Smulikowska. 2018. The interactive effect of dietary n - 6: n - 3 fatty acid ratio and vitamin E level on tissue lipid peroxidation, DNA damage in intestinal epithelial cells, and gut morphology in chickens of different ages. *Poult. Sci.* 97:149-158.
- Konieczka, P., J. Czerwinski, J. Jankowiak, K. Zabek, and S. Smulikowska. 2019. Effects of partial replacement of soybean meal with rapeseed meal, narrow - leaved lupin, DDGS and probiotic supplementation on performance and gut microbiota activity and diversity in broilers. *Ann. Anim. Sci.* 19:1-17.
- Kubis, M., P. Kolodziejki, E. Pruszyńska - Osmałek, M. Sassek, P. Konieczka, P. Gorka, J. Flaga, D. Katarzyńska - Banasik, M. Hejduysz, Z. Wisniewska, and S. A. Kaczmarek. 2020. Emulsifier and xylanase can modulate the gut microbiota activity of broiler chickens. *Anim* 10:2197.
- Lazaro, R., M. Garcia, P. Medel, and G. G. Mateos. 2003. Influence of enzymes on performance and digestive parameters of broilers fed rye - based diets. *Poult. Sci.* 82:132-140.
- Lee, S. S., H. S. Kim, Y. H. Moon, N. J. Choi, and J. K. Ha. 2004. The effects of a non - ionic surfactant on the fermentation characteristics, microbial growth, enzyme activity and digestibility in the rumen of cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115:37-50.
- Lien, K. A., M. I. McBurney, B. I. Beyde, A. B. Thomson, and W. C. Sauer. 1996. Ileal recovery of nutrients and mucin in humans fed total enteral formulas supplemented with soy fiber. *Am. J. Clin. Nutr.* 63:584-595.
- Mandalari, G., K. Adel-Patient, V. Barikolt, C. Baro, L. Bennett, M. Bublin, S. Gaier, G. Graser, G. S. Ladics, D. Mierzejewska, E. Vassilopoulou, Y. M. Vissens, L. Zuidmeer, N. M. Rigby, L. J. Salt, M. Defernex, F. Mulholland, A. R. Mackie, M. S. Wickham, and E. N. Mills. 2009. *In vitro* digestibility of beta-casein and beta-lactoglobulin under simulated human gastric and duodenal conditions: a multi-laboratory evaluation. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 55:372-381.
- Mathlouthi, N., J. P. Lalles, P. Loperaq, C. Juste, and M. Larbier. 2002. Xylanase and β -glucanase supplementation improve conjugated bile acid fraction in intestinal contents and increase villus size of small intestine wall in broiler chickens fed a rye-based diet. *J. Anim. Sci.* 80:2773-2779.
- Meng, X., and B. A. Slominski. 2005. Nutritive value of corn, soybean meal, canola meal, and peas for broiler chickens as affected by a multicarbohydrase preparation of cell wall degrading enzymes. *Poult. Sci.* 84:1242-1251.
- Meng, X., B. A. Slominski, C. M. Nyachoti, L. D. Campbell, and W. Guenter. 2005b. Degradation of cell wall polysaccharides by combinations of carbohydrase enzymes and their effect on nutrient utilization and broiler chicken performance. *Poult. Sci.* 84:37-47.
- Myers, W. D., P. A. Ludden, V. Nayigihugu, and B. W. Hess. 2004. Technical note: a procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. *J. Anim. Sci.* 82:179-183.
- Negi, P. S., and G. K. Jayaprakash. 2001. Antibacterial activity of grapefruit (*Citrus paradisi*) peel extract. *Eur. Food Res. Technol.* 213:484-487.
- Pond, W. G., D. C. Church, K. R. Pond, and P. A. Schoknecht. 2005. *Basic Animal Nutrition and Feeding*. 5th ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.
- Pustjens, A. M., H. A. Schols, M. A. Kabel, and H. Gruppen. 2013. Characterisation of cell wall polysaccharides from rapeseed (*Brassica napus*) meal. *Carbohydr. Polym.* 98:1650-1656.
- Pustjens, A. M., S. de Vries, H. A. Schols, H. Gruppen, W. J. J. Gerrits, and M. A. Kabel. 2014. Understanding carbohydrate structures fermented or resistant to fermentation in broilers fed rapeseed (*Brassica napus*) meal to evaluate the effect of acid treatment and enzyme addition. *Poult. Sci.* 93:926-934.
- Ravindran, V., P. Tancharoerat, F. Zaefarian, and G. Ravindran. 2016. Fats in poultry nutrition: digestive physiology and factors influencing their utilisation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 213:1-21.
- Ravindran, V., and M. R. Abdollahi. 2021. Nutrition and digestive physiology of the broiler chick: state of the art and outlook. *Animals* 11:2795.
- Raza, A., S. Bashir, and R. Tabassum. 2019. An update on carbohydrases: growth performance and intestinal health of poultry. *Heliyon* 5:e01437.
- Rutkowski, A., S. Kaczmarek, A. Szczyrkowska, and D. Jozefiak. 2012. The effect of particle size of full-fat rapeseed and of multi-carbohydrase enzyme supplementation on nutrient digestibility and performance in broilers. *J. Anim. Feed Sci.* 21:324-333.
- Salih, M. E., H. L. Claassen, and G. L. Campbell. 1991. Response of chickens fed on hullless barley to dietary beta - glucanase at different ages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 33:139-149.
- Sauvant, D., J. M. Perez, and G. Tran. 2004. Pages 296-297 in *Tables of Composition and Nutritional Value of Feed Materials*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.
- Scott, M. L., M. C. Nesheim, and R. J. Young. 1982. *Nutrition of the Chicken*. 3rd ed. W.F. Humphrey Press Inc, NY.
- Selle, P. H., A. J. Cowieson, and V. Ravindran. 2009. Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and pigs. *Livest. Sci.* 124:126-141.
- Sheen-Chen, S. M., H. S. Chen, H. T. Ho, W. J. Chen, C. C. Sheen, and H. L. Eng. 2002. Effect of bile acid replacement on endotoxin-induced tumor necrosis factor-alpha production in obstructive jaundice. *World J. Surg.* 26:448-450.
- Short, F. J., P. Gorton, J. Wiseman, and K. N. Boorman. 1996. Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. *Anim. Feed Sci. Technol.* 59:215-221.
- Sidan, D. 2001. Development of digestive tract of poultry. *Worlds Poult. Sci. J.* 57:415-428.

- Slominski, B. A., and L. D. Campbell. 1990. Non-starch polysaccharides of canola meal: quantification, digestibility in poultry and potential benefit of dietary enzyme supplementation. *J. Sci. Food Agric.* 53:175–184.
- Slominski, B. A. 2011. Review: recent advances in research on enzymes for poultry diets. *Poult. Sci.* 90:2013–2023.
- Szzechowiak, J., M. Skumacher-Strabel, M. El-Sherbiny, M. Bryszak, A. Stochmal, and A. Cieslak. 2016. Effect of dietary supplementation with *Saponaria officinalis* root on rumen and milk fatty acid proportion in dairy cattle. *Anim. Sci. Pap.* 34:221–231.
- Tancharoenrat, P., and V. Ravindran. 2014. Influence of tallow and calcium concentrations on the performance and energy and nutrient utilization in broiler starters. *Poult. Sci.* 93:1453–1462.
- Uni, Z., Y. Noy, and D. Sklan. 1999. Posthatch development of small intestinal function in the poult. *Poult. Sci.* 78:215–222.
- Van der Wielen, P. W. J. J., S. Biesterveld, S. Notermans, H. Hofstra, B. A. P. Urlings, and F. van Knapen. 2000. Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2536–2540.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583–3597.
- Verkamp, C. H. 1986. Fasting and yield of broilers. *Poult. Sci.* 65:1299–1304.
- Wendel, A. 2000. Lecithin. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 14th. John Wiley & Sons, Inc, New York.
- Wiseman, J., and M. Lesire. 1987. Interactions between fats of differing chemical content: apparent metabolisable energy values and apparent fat availability. *Br. Poult. Sci.* 28:663–676.
- Zafarian, F., L. F. Romero, and V. Ravindran. 2015. Influence of high dose of phytase and an emulsifier on performance, apparent metabolisable energy and nitrogen retention in broilers fed on diets containing soy oil or tallow. *Br. Poult. Sci.* 56:590–597.
- Zdunczyk, Z., J. Jankowski, S. Kaczmarek, and J. Juszkiewicz. 2015a. Determinants and effects of postleal fermentation in broilers and turkeys (Part 1): gut microbiota composition and its modulation by feed additives. *Worlds Poult. Sci. J.* 71:37–48.
- Zdunczyk, Z., J. Jankowski, S. Kaczmarek, and J. Juszkiewicz. 2015b. Determinants and effects of postleal fermentation in broilers and turkeys (Part 2): cereal fibre and SBM substitutes. *Worlds Poult. Sci. J.* 71:49–58.
- R Development Core Team. 2014. R: a language and environment for statistical computing. Accessed Feb. 2020. <http://www.Rproject.org/>.



Combination of emulsifier and xylanase in triticale-based broiler chickens diets

Zuzanna Wiśniewska, Paweł Kołodziejcki, Ewa Pruszyńska-Oszmałek, Paweł Konieczka, Misza Kinsner, Paweł Górka, Jadwiga Flaga, Kinga Kowalik, Marcin Hejdysz, Marta Kubiś, Łukasz S. Jarosz, Artur Ciszewski & Sebastian Kaczmarek

To cite this article: Zuzanna Wiśniewska, Paweł Kołodziejcki, Ewa Pruszyńska-Oszmałek, Paweł Konieczka, Misza Kinsner, Paweł Górka, Jadwiga Flaga, Kinga Kowalik, Marcin Hejdysz, Marta Kubiś, Łukasz S. Jarosz, Artur Ciszewski & Sebastian Kaczmarek (2023): Combination of emulsifier and xylanase in triticale-based broiler chickens diets, *Archives of Animal Nutrition*, DOI: [10.1080/1745039X.2023.2202591](https://doi.org/10.1080/1745039X.2023.2202591)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/1745039X.2023.2202591>



Published online: 24 May 2023.



Submit your article to this journal [↗](#)
















View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Combination of emulsifier and xylanase in triticale-based broiler chickens diets

Zuzanna Wiśniewska ^a, Paweł Kołodziejcki ^b, Ewa Pruszyńska-Oszmałek ^b,
Paweł Konieczka ^c, Misza Kinsner ^c, Paweł Górka ^d, Jadwiga Flaga ^d,
Kinga Kowalik ^e, Marcin Hejdysz ^f, Marta Kubiś ^g, Łukasz S. Jarosz ^g,
Artur Ciszewski ^g and Sebastian Kaczmarek ^a

^aDepartment of Animal Nutrition, Poznan University of Life Sciences, Poznan, Poland; ^bDepartment of Animal Physiology, Biochemistry and Biostructure, Poznan University of Life Sciences, Poznan, Poland; ^cThe Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition, PAS, Jablonna, Poland; ^dDepartment of Animal Nutrition and Dietetics, University of Agriculture in Krakow, Krakow, Poland; ^eDepartment of Animal Physiology and Endocrinology, University of Agriculture in Krakow, Krakow, Poland; ^fDepartment of Animal Breeding and Animal Product Quality Assessment, University of Life Sciences, Złotniki, Poland; ^gDepartment of Epizootiology and Clinic of Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Lublin, Poland

ABSTRACT

The current study aimed to investigate the effect of supplementing an emulsifier, xylanase or a combination of both on the growth performance, digestibility of nutrients, microflora activity and intestinal morphology in broiler chickens fed triticale-based diets. A total of 480 one-day-old male Ross 308 broiler chicks were randomly assigned to four dietary treatments: control (CON), control with an added emulsifier (EMU), control with added xylanase (ENZ) and control with emulsifier and xylanase (EMU+ENZ). Xylanase supplemented groups had diminished feed intake (FI) and enhanced body weight gain (BWG) only within the starter period ($p \leq 0.05$), while the feed conversion ratio (FCR) in the ENZ and ENZ+EMU groups was lower than CON during the whole experiment period. There was significant ENZ and EMU interaction in apparent metabolisable energy corrected to N equilibrium (AME_N) as well as NDF and DM retention. The viscosity of ileum digesta was the lowest in groups with enzyme addition. Interactions show that caecal galactosidase- α activity was higher in the CON group compared to EMU supplementation, but similar to ENZ and EMU+ENZ ($p < 0.05$). Activity of glucosidase- α was higher in the CON group related to inclusion of EMU or ENZ alone ($p < 0.05$) but did not differ from the combined supplementation of EMU+ENZ, whereas the glucosidase- β activity was higher in the CON group compared to all supplemented diets ($p < 0.05$). Caecal C2 concentration was greater in the CON group than supplemented diets ($p < 0.05$). The expression of FATP1, PEPT1 and SGLT1 in the ileum was downregulated after emulsifier addition ($p \leq 0.05$). The addition of emulsifier and xylanase indicates a mutual effect on broiler chickens' performance and nutrient digestibility in triticale diets with palm oil during the first nutritional period. Additionally, concomitantly additives usage influenced intestinal microbiome activity, as well.


ARTICLE HISTORY

Received 22 November 2022
Accepted 8 April 2023

KEYWORDS

Xylanase; emulsifier; broiler chicken microbiome; viscosity; Intestinal SCFA

CONTACT Sebastian Kaczmarek  sebastian.kaczmarek@up.poznan.pl

 Results of bacterial populations from caeca contents measured on the 35th day, morphometry of ileum mucosa at 35 d, as well as gene expression on the mRNA level in the ileum (GLUT2, CD36) and caeca (GLUT2, SGLT1, PEPT1, CD36), are presented in the supplemental data.

© 2023 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

1. Introduction

The use of emulsifiers in broiler chicken diets is common due to the increase in fat digestibility (Ravindran et al. 2016). Studies confirm that the bird's ability to digest fat is underdeveloped after hatching and reaches full efficiency around the second week of life (Uni et al. 1999). The mode of action of exogenous emulsifiers is connected with reducing the surface tension of liquids, allowing free mixing of naturally immiscible substances, thereby increasing fat digestibility and influencing production performance (Ravindran et al. 2016). Lee et al. (2004) found that surfactants might increase *in vitro* and *in situ* rumen fermentation; the authors observed a higher ruminal microbial population and hydrolytic enzyme activities in rumen fluids after emulsifier addition. In research by Kaczmarek et al. (2015), emulsifier supplementation in xylanase supplemented diet increases fat digestibility, as well as other nutrients including neutral detergent fibre (NDF), possibly in relation to enhanced accessibility of microbes to fibre and greater microbial activity in the distal parts of the broiler chickens' gastrointestinal tract (GIT). In addition, (Kubis et al. 2020) reported that xylanase and emulsifier had cumulative effect on gastrointestinal tract microbiota activity.

Exogenous carbohydrases, for instance, xylanase, break down complex, indigestible arabinoxylans molecules into smaller and more prone to digestion particles, thus resulting in reduced viscosity of the ileal content, releasing nutrients and, finally, raising the nutritional value of the feed (Słominski 2011). Triticale applied in diets within the current study is considered a rich source of the soluble fraction of fibre, for example, water-extractable arabinoxylans known for displaying viscous properties (Rakha et al. 2011). Decomposition of complex non-starch polysaccharide (NSP) structures by enzyme provides products which may influence microbiome population and activity, by altering substrate for microbial fermentation or providing a probiotic effect (Kiarie et al. 2013).

The current study aimed to investigate the effect of supplementing an emulsifier, xylanase or a combination of both on the growth performance, digestibility of nutrients, microflora activity and intestinal morphology in broiler chickens fed triticale-based diets. We hypothesise that mutual addition of both additives will alter microbiome activity to a greater extent when compared to individual usage.

2. Materials and methods

All animal procedures were conducted in accordance with the guidelines of the Polish Council of Animal Care regarding animal experimentation and animal care under study (European Union [EU] Directive 2010/63/EU for animal experiments). All activities performed on animals during the experiment were in accordance with normal production conditions and sample collection (excreta) had no negative impact on the birds' welfare and is not considered an experimental procedure carried out on each animal.

2.1. Bird management

A total of 480 one-day-old male Ross 308 broiler chicks were obtained from a local hatchery (DanHatch Poland, Wolsztyn, Poland). Fifteen replicate pens of eight birds each were randomly assigned to four dietary treatments. Birds were individually

weighed and sorted into four weight classes (each class differed by 0.5 grams). Groups of eight birds, two from each weight class, were randomly assigned to pens such that the average initial body weight (BW) of birds was similar across pens (~40.2 g). Fresh water and feed in pelleted form were provided *ad libitum* throughout the experiment.

2.2. Experimental design and diets

Dietary treatments consisted of control (CON), control with an added emulsifier (EMU), control with added xylanase (ENZ), and control with an emulsifier and xylanase (EMU+ENZ). Experimental diets (Table 1) were divided into three phases: starter (1–11 d), grower (12–25 d), finisher (26–42 d) and based on maize, soybean meal and triticale and soybean oil and palm oil as a main fat source. The amount of palm oil ranged from 2.0% in the starter, 2.89% in the grower to about 3.51% in the finisher diets. Nutrients met or exceeded Aviagen's recommendations for broiler chickens (AVIAGEN 2014). All diets were prepared in a horizontal mixer (Zuptor 300 MPW, Zuptor sp. zoo., Gostyń,

Table 1. Composition and nutrient contents of the control (CON)¹ diet: starter, grower, finisher (as feed basis).

Ingredients [%]	Starter 1–11 d	Grower 12–25 d	Finisher 26–42 d	
Maize	43.4	27.4	25.4	
Soybean meal	37.9	28.0	29.6	
Triticale	10.0	35.0	35.0	
Soybean oil	3.40	2.80	3.45	
Palm oil	2.00	2.89	3.51	
Monocalcium phosphate	0.66	0.56	0.50	
Premix ²	1.00	1.00	1.00	
Limestone	0.41	0.36	0.27	
DL – met	0.36	0.34	0.32	
L – Lys - HCL	0.29	0.33	0.23	
NaHCO ₃	0.25	0.24	0.25	
NaCl	0.20	0.10	0.10	
L – Thr	0.12	0.16	0.12	
L – Trp	-	0.20	-	
TiO ₂	-	0.30	0.30	
Phytase ³	0.01	0.01	0.01	
Analysed nutrient content in % or otherwise noted:				
	Finisher diets			
	CON	EMU	ENZ	EMU+ENZ
Dry matter [%]	89.2	90.6	90.1	89.7
Crude protein [%]	19.37	19.07	19.09	19.21
Gross energy [MJ/kg]	18.93	18.87	18.75	18.92
Ether extract [%]	10.52	10.62	10.49	10.76
NDF [%]	10.04	11.00	11.01	10.75
TiO ₂ [%]	0.29	0.31	0.30	0.31

¹EMU, ENZ and EMU+ENZ diets were supplemented with emulsifier B (starter 0.15%, grower 0.114% and finisher; 0.14%), enzyme (starter 0.4%, grower and finisher 0.0004%), or both simultaneously. The activity of an enzyme in the ENZ group was as follows: 21 900 BXU/kg (starter), 15 900 BXU/kg (grower), 17 900 BXU/kg (finisher); in the EMU+ENZ group: 19 200 BXU/kg (starter), 19 100 BXU/kg (grower), 18 800 BXU/kg (finisher).

²Provides per kg diet: vitamin A, 11250 IU; vitamin D, 2500 IU; vitamin E, 80 mg; vitamin K, 2.50 mg; vitamin B12, 0.02 mg; folic acid, 1.17 mg; choline, 379 mg; D - pantothenic acid, 12.5 mg; riboflavin, 7.0 mg; niacin, 41.67 mg; thiamin, 2.17 mg; D - biotin, 0.18 mg; pyridoxine, 4.0 mg; ethoxyquin, 0.09 mg; Mn, 73 mg as manganous oxide; Zn, 55 mg as zinc oxide; Fe, 45 mg as iron sulfate; Cu, 20 mg as copper sulfate; I, 0.62 mg as calcium iodide; Se, 0.3 mg as selenium potassium; salinomycin, 60 mg.

³Quantum Blue, AB-Vista UK, 1000 FTU/kg of diet.

Poland). Mixing time was set at 4 min and the mixing band setting was 27.4 rev/min. All ingredients, except minerals, vitamins, amino acids, enzyme, emulsifier and fat, were ground using a Skiold disk mill (SK2500, Skiold A/S, Sæby, Denmark). The rest of the ingredients were added directly to the mixer. In order to obtain homogeneity of the added enzyme, a suitable amount of the product was mixed with a small amount of the basic feed as a premix, which was then added to the feed to get a final concentration. For the same reason, the emulsifier was first mixed with the oils. Titanium dioxide added to finisher diets at 3.0 g/kg served as an internal marker used to determine the apparent pre-caecal digestibility. All diets were pelleted in a Scorpion pellet press (BMG Pelleting Experts, Gdańsk, Poland) equipped with a 22 kW engine and a 4-mm-thick ring die with 3-mm-diameter holes; pelleting conditions were monitored and maintained at a constant ampere draw of the load metre for the mill motor to the consistency of pelleting conditions, with a production rate around 100 kg/h. The pelleting temperature was ~80°C and the conditioning time was 40 s.

The xylanase used in supplemented diets was Econase HCP 4000 (AB Vista, Marlborough, UK) containing 1,4- β -xylanase (modified strain of *Trichoderma reesei*, thermostable up to 95°C; bond specificity: beta 1–4, endo-xylanase). The inclusion rate was 4 g per 1 ton of feed. One gram of product contained 1,4- β -xylanase (4,000,000 BXU [xylanase units determined on birch xylan substrate at 50°C and pH 5.3]/g), endo- β -glucanase (~500,000 BU/g) and endocellulase (80,000 ECU/g). The activity of an enzyme in the ENZ group was as follows: 21 900 BXU/kg (starter), 15 900 BXU/kg (grower), 17 900 BXU/kg (finisher); in the EMU+ENZ group: 19 200 BXU/kg (starter), 19 100 BXU/kg (grower) and 18 800 BXU/kg (finisher). The GRP emulsifier (glyceryl polyethylene glycol ricinoleate), (E484, Bredol 683, AkzoNobel SC AB, Stenungsund, Sweden) was added at a concentration of 0.15% in the starter diet, 0.173% in grower and 0.188% in finisher diets by partial substitution of maize.

2.3. Sample collection

Body weight gain (BWG) and feed intake (FI) were determined by pen after each phase (starter, grower, finisher). Before weighing, the birds fasted for 4 h. This time is proper to live weight measures to avoid affecting the yielding due to the excretion of intestinal wastes (Kim et al. 2007). The BWG and FI were used to calculate the feed conversion ratio (FCR), corrected to the weight of dead and culled birds. Total mortality (including culled birds) in the experiment was low and averaged approximately 4% (data not shown), with causes unrelated to the dietary treatments.

On days 28th and 35th, collection trays were placed in the floor pens to allow excreta collection (15 replications per treatment per collection, one replication represented eight birds). For this purpose, birds were briefly removed from pens and wire floor trays were placed above the collection tray. After 2 d, excreta samples, free from contamination (feed, feathers, litter), were collected for 24 h (three times per day) and subsequently frozen, freeze-dried and finely ground for further analyses.

On day 35th 25 chickens from each group were sacrificed by electric stunning, according to the recommendations for euthanasia of experimental animals (European Union (EU) Directive 2010/63/EU for animal experiments). The intestinal content was taken for analyses by gently squeezing: the ileum (digestibility of nutrients ($n = 10$),

viscosity and fatty acids concentration ($n = 8$) and caeca ($n = 8$) (bacterial enzyme activity, fatty acids concentration). Segments of 2 cm of the middle jejunum and middle ileum were collected for histomorphometric measurements. Sections of the intestine: ileum and caeca were collected to further Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) analyses ($n = 10$). For gene expression analysis, intestine sections (≈ 5 cm length) were immediately placed on ice-cold glass, cut open and repeatedly rinsed with ice-cold saline. Small pieces of intestine tissue ($\approx 0.5 \times 0.5$ cm) were collected using sterile forceps and scissors and immediately snap-frozen in liquid nitrogen.

2.4. Chemical analyses

Diets were analysed for dry matter (DM), crude protein (CP), fat as ether extract (EE) and NDF, with heat-stable amylase and expressed inclusive of residual ash using methods 2001.12, 976.05, 920.39 and 973.18, respectively, according to (AOAC 2005). The gross energy of the diets was determined using an adiabatic bomb calorimeter (KL 12Mn, Precyzja-Bit PPHU, Bydgoszcz, Poland) standardised with benzoic acid. The excreta samples (for NDF and N) and ileum digesta samples (for crude protein (CP) and ether extract (EE) analysis) were analysed using the above-mentioned methods.

The TiO_2 in feed, digesta and excreta samples was determined according to (Short et al. 1996). Ileum digesta viscosity was determined based on approximately 2 g (wet weight) of the fresh digesta. After collection, ileum digesta were immediately placed in a microcentrifuge tube and centrifuged at $12,700 \times g$ for 5 min analysis. The supernatant was withdrawn and stored on ice until viscosity ($\text{mPas}\cdot\text{s} = \text{cP} = 1 \times 100 \text{ dyne s cm}^{-2}$) was determined using a Brookfield Digital DV-II+ cone/plate viscometer (Brookfield Engineering Laboratories Inc., Stoughton, MA, USA) at a shear rate of 42.5 s^{-1} at 40°C .

The total and free sialic acids at 28 d were prepared following the procedure by (Jourdian et al. 1971). The crude mucin extracted from excreta was isolated as described by Lien et al. (1996). The absorbance was read using a Media Spectrophotometer (Marcel Lamidey S.A., Châtillon, France) at 630 nm. Total and free sialic acid in excreta was expressed in $\mu\text{mol/g TiO}_2$.

The glycolytic activities of bacterial enzymes were determined in the caeca digesta. The following enzymes were taken under investigation: α -glucosidase, β -glucosidase, α -galactosidase, β -galactosidase and β -glucuronidase. The spectrophotometric method was used, as described by (Konieczka and Smulikowska 2017).

The short-chain fatty acid (SCFA) concentration in the ileum and caeca digesta was determined following Konieczka et al. (2019) using gas chromatography. The following SCFA were taken under investigation: acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid and valeric acid.

To determine the total bacteria population, PCR Amplification of the Bacterial 16S rRNA gene was prepared using the universal primer set as described in (Kubis et al. 2020). Sequences of primers used for the amplification of bacterial 16S rRNA gene are presented in Table 2. To separate obtained PCR products, electrophoresis on 2% agarose gel was used. Quantification of PCR products was obtained with ImageJ 1.47 v software for densitometry measurements (National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA). For each bacteria group, density of bands was expressed in relation to the density of the total bacteria primers product. Samples were analysed in duplicate.

Table 2. Sequences of primers used for amplification of bacterial 16S rRNA gene.

Bacterial Group	Primers	Sequence 5'-3'	Base Pair
Universal	Forward	CGTGCCAGCCGCGTAATACG	611
	Reverse	GGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACAT	
<i>Lactobacillus</i> spp.	Forward	CATCCAGTGCAACCTAAGAG	286
	Reverse	GATCCGCTTGCCTTCGCA	
<i>Escherichia coli</i>	Forward	GGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTC	585
	Reverse	TTCCCGAAGGCACATTCT	
<i>Clostridium</i> spp.	Forward	AAAGGAAGATTAATACCGCATAA	722
	Reverse	ATCTTGCACCGTACTCCCC	
<i>Bifidobacterium</i> spp.	Forward	CGGGTGCTICCCACTTTCATG	1417
	Reverse	GATTCTGGCTCAGGATGAACG	

Determination of jejunal and ileum histomorphometric parameters was obtained following the methodology previously described by (Konieczka et al. 2018). Histomorphometric parameters taken under investigation were: villus height, crypt depth, villus width, lamina muscularis mucosae thickness, villus surface area and villus height/crypt depth (VH/CD) ratio.

2.5. Gene expression

Total RNA from tissue samples was isolated using ReliaPrep™ RNA Tissues Miniprep System (Promega, Madison, WI), according to the manufacturer's instruction. Subsequently, RNA was dissolved in the nuclease-free water (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), verified for quality and integrity, and subjected to reverse transcription reaction, as previously described (Gorka et al. 2017). Obtained cDNA was analysed for mRNA expression of selected genes with real-time PCR as previously described by (Gorka et al. 2018). Four reference genes were considered to normalise target gene expression (GAPDH, RPL13, RPLA and PPIC) and NormFinder was used to determine the most optimal reference gene or genes (Andersen et al. 2004).

2.6. Calculations and statistical analyses

Apparent pre-caecal digestibility (APD) and apparent metabolisable energy corrected to N equilibrium (AME_N) values of the diets were calculated relative to the ratio of TiO_2 to the content of the nutrient in question in the feed, digesta or excreta. The digestibility of various dietary components (using the starch calculation as an example) and AME_N content of experimental diets was calculated according to the following equations:

$$\text{Digestibility} = \left\{ 1 - \left[\left(\frac{TiO_{2\text{diet}}}{TiO_{2\text{digesta}}} \right) \times \left(\frac{\text{Starch}_{\text{digesta}}}{\text{Starch}_{\text{diet}}} \right) \right] \right\},$$

where the contents of TiO_2 and starch in diets and digesta are given as grams per kilogram.

$$AME_N \left[\frac{MJ}{kg \text{ of DM}} \right] = GE_{\text{excreta}} - \left[GE_{\text{excreta}} \times \left(\frac{TiO_{2\text{diet}}}{TiO_{2\text{excreta}}} \right) \right] - 0.0344 \times \left\{ N_{\text{diet}} - \left[N_{\text{excreta}} \times \left(\frac{TiO_{2\text{diet}}}{TiO_{2\text{excreta}}} \right) \right] \right\},$$

where gross energy (GE) represents the gross energy [MJ/kg], N represents nitrogen and TiO_2 is the dietary marker. Apparent metabolisable energy (AME) was corrected to a zero-nitrogen balance using 34.4 MJ/kg N retained according to (Hill and Anderson 1958).

Each pen was the experimental unit for FI and FCR. For other parameters (BW, digestibility, relative gene expression, etc.) bird was an experimental unit. The $p < 0.05$ was considered significant. All data were subjected to mixed model of the NLIN procedure of the R environment (R Development Core Team 2014) and using the Agrícola package (De Mendiburu 2014). The model had main effects of ENZ and EMU and associated interactions as fixed effects. Independent t-test and Duncan methods were used to separate means for the main and interaction effects.

3. Results

3.1. Performance

There was no interaction between ENZ and EMU birds' performance. FI and BWG differed significantly only within the starter period (Table 3). From 1 to 11 d, supplemented diets resulted in greater BWG (approximately 4.5%) compared to the CON; regarding FI during this period, only xylanase-supplemented treatments differed significantly from the CON group, as FI decreased by approximately 6%. A reduction in FCR was xylanase-supplemented diets compared to CON.

3.2. Digestibility

The results obtained for AME_N , apparent retention of crude fat (CF), dry matter (DM), N and NDF on the 28th day are presented in Table 4. AME_N was lower in the CON group in relation to other treatments ($p < 0.01$) and combining EMU+ENZ increased AME_N compared to ENZ supplementation only but was not different to using EMU alone. The same interaction was observed for apparent DM retention ($p < 0.05$), whereas for NDF, EMU+ENZ was similar to using either ENZ or EMU alone, and all supplemented groups had higher NDF retention than the CON group ($p < 0.05$).

Results of APD of CP, EE and starch on the 35th day had no significant differences, regardless of the group (Table 5).

3.3. Sialic acid excretion and ileum digesta viscosity

Use of the enzyme decreased total sialic acid excretion ($p < 0.05$), (Table 6).

The viscosity of ileum digesta was the lowest in groups with enzyme addition (Table 6) and diminished by approximately 20% compared to the CON ($p \leq 0.05$). The EMU group did not differ from the CON group.

3.4. Bacterial enzyme activity

Interactions show that caecal galactosidase- α activity was higher in the CON group compared to EMU supplementation, but similar to ENZ and EMU+ENZ ($p < 0.05$).

Table 3. Performance (FI – feed intake [g/bird], BWG – body weight gain [g/bird], FCR – feed conversion ratio [kg/kg]) of broiler chickens fed a control diet (CON), control diet supplemented with an emulsifier (EMU), control diet supplemented with an enzyme (ENZ), control diet supplemented with emulsifier and enzyme (EMU+ENZ).

	1–11 d			12–25 d			26–42 d			1–42 d		
	BWG	FI	FCR	BWG	FI	FCR	BWG	FI	FCR	BWG	FI	FCR
Main effects:												
without ENZ	219	226	1.03	905	1325	1.47	1309	2269	1.73	2433	3820	1.57
without EMU	218	221	1.02	905	1323	1.47	1309	2269	1.74	2431	3813	1.57
with ENZ	223	214	0.96	915	1312	1.44	1350	2254	1.69	2489	3781	1.53
with EMU	224	219	0.98	916	1314	1.44	1351	2254	1.69	2491	3787	1.53
Interaction effects												
CON	214	229	1.07	905	1333	1.48	1294	2275	1.76	2414	3838	1.59
EMU	225	222	1.00	906	1317	1.46	1324	2262	1.71	2453	3802	1.55
ENZ	221	214	0.97	904	1313	1.45	1324	2262	1.71	2449	3789	1.55
EMU+ENZ	226	215	0.96	926	1312	1.42	1377	2246	1.66	2529	3773	1.50
SEM ¹	1.19	2.20	0.012	6.72	6.98	0.009	19.0	10.8	0.015	23.1	16.2	0.01
p-value												
Emulsifier	0.004	0.497	0.056	0.409	0.549	0.113	0.281	0.516	0.085	0.203	0.431	0.02
Enzyme	0.025	0.010	0.001	0.478	0.363	0.110	0.285	0.517	0.089	0.23	0.243	0.013
Interaction	0.284	0.306	0.155	0.430	0.604	0.690	0.766	0.933	0.995	0.666	0.752	0.926

^{a-c}Means in a column not sharing a common letter are significantly different ($p \leq 0.05$).

¹ Pooled standard error of the mean.

Table 4. Apparent metabolisable energy corrected to N equilibrium (AME_N), dry matter (DM), nitrogen (N), ether extract (EE) and neutral detergent fibre (NDF) retention at 28 d in broiler chickens fed a control diet (CON), control diet supplemented with an emulsifier (EMU), control diet supplemented with an enzyme (ENZ), control diet supplemented with emulsifier and enzyme (EMU+ENZ).

	AME _N [MJ/kg of DM]	Apparent Retention:			
		DM	N	EE	NDF
Main effects:					
without ENZ	13.9	71.2	62.1	89.6	39.9
without EMU	13.6	69.3	60.4	88.9	38.2
with ENZ	14.0	72.3	63.7	92.8	47.3
with EMU	14.4	74.3	65.5	93.5	49.0
Interaction effects:					
CON	13.4 ^c	68.0 ^c	58.7	85.8	32.4 ^c
EMU	14.5 ^a	74.4 ^a	65.5	93.3	47.3 ^{ab}
ENZ	13.7 ^b	70.5 ^b	62.0	91.9	43.9 ^b
EMU+ENZ	14.3 ^a	74.1 ^a	65.4	93.6	50.7 ^a
SEM ¹	0.081	0.495	0.654	1.18	1.46
<i>p</i> -value					
Emulsifier	0.2587	0.0472	0.1094	0.1542	<0.001
Enzyme	<0.001	<0.001	<0.001	0.0476	<0.001
Interaction	0.0056	0.0114	0.0937	0.1987	0.0476

^{a-c}Means in a column not sharing a common letter are significantly different ($p \leq 0.05$).

¹Pooled standard error of the mean.

Table 5. Apparent pre-caecal digestibility (APD) of crude protein (CP), ether extract (EE) and starch at 35 d in broiler chickens fed a control diet (CON), control diet supplemented with an emulsifier (EMU), control diet supplemented with an enzyme (ENZ), control diet supplemented with emulsifier and enzyme (EMU+ENZ).

	Apparent pre-caecal digestibility[%]:		
	Crude protein	Ether extract	Starch
Main effects:			
without ENZ	79.5	93.5	95.2
without EMU	79.7	95.0	96.1
with ENZ	80.3	95.5	95.9
with EMU	80.2	94.0	95.0
Interaction effects:			
CON	78.9	93.4	95.8
EMU	80.2	93.6	94.7
ENZ	80.4	96.7	96.5
EMU+ENZ	80.2	94.4	95.4
SEM ¹	0.409	0.784	0.514
<i>p</i> -value			
Emulsifier	0.5465	0.5308	0.3134
Enzyme	0.3581	0.2185	0.5263
Interaction	0.3831	0.4393	0.9908

^{a-c}Means in a column not sharing a common letter are significantly different ($p \leq 0.05$).

¹Pooled standard error of the mean.

Activity of glucosidase- α was higher in the CON group related to inclusion of EMU or ENZ alone ($p < 0.05$) but did not differ from the combined supplementation of EMU +ENZ, whereas the glucosidase- β activity was higher in the CON group compared to all supplemented diets ($p < 0.05$) (Table 7).

Table 6. Excretion of sialic acid at 28 d and viscosity of ileum digesta at 35 d in broiler chickens fed a control diet (CON), control diet supplemented with an emulsifier (EMU), control diet supplemented with an enzyme (ENZ), control diet supplemented with emulsifier and enzyme (EMU+ENZ).

	Sialic Acid ($\mu\text{mol/g TiO}_2$):		Viscosity [cP]
	Total	Free	
Main effects:			
Without ENZ	575	522	5.50
Without EMU	527	482	4.92
With ENZ	480	434	4.39
With EMU	528	474	4.97
Interaction effects:			
CON	534	507	5.51
EMU	615	537	5.49
ENZ	520	457	4.33
EMU+ENZ	440	411	4.44
SEM ¹	0.012	0.044	0.12
<i>p</i> -value			
Emulsifier	0.7054	0.3056	0.7490
Enzyme	0.0127	0.0786	<0.001
Interaction	0.1271	0.7464	0.6502

¹Pooled standard error of the mean.

Table 7. The activity of the bacterial enzyme [U/g]¹ in caeca digesta at 35 d in broiler chickens fed a control diet (CON), control diet supplemented with an emulsifier (EMU), control diet supplemented with an enzyme (ENZ), control diet supplemented with emulsifier and enzyme (EMU+ENZ).

	Galactosidase		Glucosidase		β -Glucuronidase
	α -	β -	α -	β -	
Main effects:					
Without ENZ	1.62	2.52	0.995	0.818	1.525
Without EMU	1.65	2.50	0.960	0.777	1.535
With ENZ	1.63	2.17	0.885	0.614	1.460
With EMU	1.60	2.19	0.920	0.655	1.450
Interaction effects:					
CON	1.69 ^a	2.79	1.08 ^a	0.948 ^a	1.63
EMU	1.55 ^b	2.25	0.91 ^b	0.688 ^b	1.42
ENZ	1.61 ^b	2.21	0.84 ^b	0.605 ^b	1.44
EMU+ENZ	1.65 ^b	2.13	0.93 ^b	0.622 ^b	1.48
SEM ²	0.021	0.143	0.03	0.036	0.034
<i>p</i> -value					
Emulsifier	0.1954	0.2775	0.5449	0.0335	0.2216
Enzyme	0.9451	0.2270	0.0451	0.0008	0.3316
Interaction	0.0201	0.4249	0.0205	0.0171	0.0559

^{a-c}Means in a column not sharing a common letter are significantly different ($p \leq 0.05$).

²Pooled standard error of the mean.

3.5. SCFA concentration

The SCFA concentration in the ileum is presented in Table 8. There was no difference in SCFA concentration in ileum digesta except C5. Use of enzyme increased ($p < 0.05$) valeric acid concentration in digesta.

In the caeca, there was significant xylanase and emulsifier interaction for acetic acid concentration. The concentration of acetic acid was higher within supplemented groups (approximately 46.5%) when compared to the CON group, which is reflected in similar results considering total SCFA concentration (Table 8). Differences ($p \leq 0.05$) were also

detected for butyric acid and total SCFA concentration, use of xylanase and emulsifier increased butyric acid concentration ($p < 0.05$).

3.6. Histological morphometry

The morphometry of jejunal and ileal mucosa is presented in Table 9. Combined supplementation of EMU+ENZ led to a higher VH/CD ratio when compared to EMU alone but did not differ from ENZ or CON groups ($p < 0.05$). The thickness of *lamina muscularis mucosae* in the jejunum was greater in the enzyme supplemented treatments ($p < 0.05$).

3.7. Gene expression

Gene expressions on the mRNA level in ileum and caeca are presented in Table 10. There was significant emulsifier effect on SGLT1, PEPT1 and FATP1 expression in the ileum – used emulsifier decreased mRNA expressions. Use of xylanase and emulsifier significantly decreased GLUT2 expression in caeca in comparison with other treatments, resulting interaction between xylanase and emulsifier ($p < 0.05$).

4. Discussion

Used xylanase during the first weeks of the broiler chicken's life increased BWG and simultaneously reduced FI. The above parameters contribute to the diminished FCR, which additionally led to increased apparent retention of CF, NDF, DM and N with AME_N value in the first 28 d, as well. Used emulsifier, increased BWG during starter period and total FCR. Considering that endogenous lipase enzyme secretion is limited in newly hatched birds (Uni et al. 1999), added to the inability to digest to a greater extent complex structures of NSP (Slominski 2011), the incremental effects of emulsifier and xylanase supplementation may be expected in broiler chickens diets based on triticale or palm oil. However, studies found no effect on performance after emulsifier (Roy et al. 2010), or xylanase (Mendes et al. 2013) addition in starter broiler chickens. Reduced total FCR after xylanase or emulsifier addition, did not coincide with the results of APD of CP, EE and starch on the 35th day, where a lack of effect was noticed. The lack of differences among groups for digestibility parameters may be related to an already stabilised microbiome in older birds, which is reflected in greater tolerance for high viscosity provided by triticale's NSP (Szczyrek et al. 2020).

The inclusion of cereals addition in broiler chickens' diets is expected to increase digesta viscosity due to their high NSP content (Baker et al. 2021), which results in a series of undesirable consequences: prolonged digesta passage time (Almirall et al. 1995); provision of substrates (undigested nutrients) for unfavourable microbial fermentation in the upper parts of broiler chickens' gastrointestinal tract (GIT) (Choct et al. 1999); encapsulation of nutrients (Prohaszka 1986), resulting in impoverished enzymatic digestion by the host; nutrients and energy losses (Raza et al. 2019). Experimental groups with the addition of xylanase presented diminished viscosity of digesta, as was expected based on the findings of (Slominski 2011). Breakdown of the complex structure of NSP mitigates its' viscous properties, thus, digesta can flow more fluently (Raza et al. 2019). Enhanced digesta passage

Table 8. Short-chain fatty acid (SCFA) concentration in ileum and caeca [$\mu\text{mol/g}$] digesta at 35 d in broiler chickens fed a control diet (CON), control diet supplemented with an emulsifier (EMU), control diet supplemented with an enzyme (ENZ), control diet supplemented with emulsifier and enzyme (EMU+ENZ).

	Ileum					Caeca					Total	
	C2	C3	C4	C5	Total	C2	C3	C4	C5	Total		
Main effects:												
Without ENZ	5.81	0.31	0.16	0.12	6.76	33.7	1.74	0.51	0.43	9.87	0.79	47.0
Without EMU	5.74	0.29	0.16	0.14	6.62	32.5	1.67	0.49	0.44	9.26	0.79	45.1
With ENZ	5.58	0.28	0.16	0.16	6.47	39.1	1.62	0.45	0.40	13.6	0.83	56.0
With EMU	5.65	0.30	0.16	0.15	6.61	40.3	1.69	0.47	0.39	14.2	0.83	57.9
	5.81	0.31	0.16	0.12	6.76	33.7	1.74	0.51	0.43	9.87	0.79	47.0
Interaction effects:												
CON	5.52	0.29	0.15	0.12	6.47	27.0 ^a	1.74	0.52	0.44	7.08	0.79	37.55
EMU	6.10	0.33	0.16	0.13	7.04	40.4 ^b	1.74	0.49	0.42	12.66	0.79	56.48
ENZ	5.95	0.29	0.16	0.15	6.76	37.9 ^b	1.61	0.47	0.44	11.44	0.79	52.65
EMU+ENZ	5.21	0.26	0.15	0.17	6.18	40.3 ^b	1.64	0.44	0.36	15.68	0.87	59.30
SEM ¹	0.200	0.011	0.005	0.008	0.231	1.54	0.065	0.021	0.024	0.767	0.025	2.28
P-value												
Enzyme	0.8319	0.7945	0.9972	0.7421	0.9920	0.0035	0.9169	0.5758	0.344	0.0001	0.405	0.001
Interaction	0.5720	0.1795	0.9961	0.5452	0.5900	0.0371	0.3992	0.2468	0.517	0.0026	0.234	0.018
Interaction	0.1109	0.1012	0.0520	0.1106	0.2250	0.0347	0.9324	0.9763	0.584	0.5553	0.955	0.098

^{a-b}Means in a column not sharing a common letter are significantly different ($p \leq 0.05$).

C2 - acetic acid.

C3 - propionic acid; C4 - isobutyric acid.

C4 - butyric acid.

C5 - isovaleric acid.

¹Pooled standard error of the mean.

Table 9. Morphometry of jejunum and ileum mucosa at 35 d in broiler chickens fed a control diet (CON), control diet supplemented with an emulsifier (EMU), control diet supplemented with an enzyme (ENZ), control diet supplemented with emulsifier and enzyme (EMU+ENZ).

	Jejunum						Ileum						
	in (µm)			[ratio]			in (µm)			[ratio]			
	Villus Height	Crypt Depth	Villus Width	Lamina muscularis mucosae thickness	Villus surface area	VH/CD ¹	Villus Height	Crypt Depth	Villus Width	Lamina muscularis mucosae thickness	Villus surface area	VH/CD ¹	
Main effects													
Without ENZ	1450	233	190	173	0.895	6.27	1001	218	195	191	0.640	4.67	
Without EMU	1496	244	185	184	0.906	6.16	963	213	191	201	0.605	4.56	
With ENZ	1492	254	172	200	0.834	5.99	979	211	189	207	0.600	4.74	
With EMU	1445	242	177	190	0.824	6.09	1017	216	193	196	0.635	4.85	
Interaction effects													
CON	1503	234	198	178	0.973	6.45	1011	207	192	192	0.637	4.92 ^{ab}	
EMU	1396	231	181	168	0.817	6.08	990	228	197	189	0.643	4.42 ^b	
ENZ	1489	254	172	189	0.838	5.87	914	219	189	210	0.573	4.19 ^{ab}	
EMU+ENZ	1494	253	172	211	0.83	6.1	1044	203	189	203	0.626	5.28 ^a	
SEM ²	30.9	5.53	4.6	5	0.032	0.163	29.9	5.45	4.02	4.26	0.016	0.163	
P-value													
Emulsifier	0.4273	0.857	0.3458	0.4925	0.2078	0.8360	0.3695	0.8130	0.7552	0.5667	0.3536	0.3387	
Enzyme	0.5045	0.0628	0.0594	0.0042	0.3471	0.4120	0.7242	0.5609	0.5334	0.0711	0.2070	0.8224	
Interaction	0.3782	0.9216	0.3545	0.0717	0.2535	0.3699	0.2197	0.0964	0.7305	0.7754	0.4469	0.0134	

^{a-b}Means in a column not sharing a common letter are significantly different ($p \leq 0.05$).

¹Villus height to crypt depth ratio.

²Pooled standard error of the mean.

Table 10. Gene expression on the mRNA level in ileum and caeca at 35 d of broiler chickens fed a control diet (CON), control diet supplemented with an emulsifier (EMU), control diet supplemented with an enzyme (ENZ), control diet supplemented with emulsifier.

	Ileum					Caeca				
	SGLT1	PEPT1	FATP1	GLUT2	CD36	SGLT1	PEPT1	FATP1	GLUT2	CD36
Main effects:										
Without ENZ	2.685	8.305	1.505	2.125	0.794	0.135	0.035	1.14	0.165	0.415
Without EMU	2.95	9.95	1.745	1.09	0.8445	0.15	0.035	1.295	0.135	0.445
With ENZ	2.17	7.795	1.44	0.46	0.684	0.115	0.025	1.055	0.09	0.42
With EMU	1.905	6.15	1.2	1.495	0.6335	0.1	0.025	0.9	0.12	0.39
Interaction effects:										
CON	3.17	10.2	1.64	1.97	0.983	0.16	0.04	1.26	0.19	0.41
EMU	2.20	6.41	1.37	2.28	0.605	0.11	0.03	1.02	0.14	0.42
ENZ	2.73	9.7	1.85	0.21	0.706	0.14	0.03	1.3	0.08	0.48
EMU+ENZ	1.61	5.89	1.03	0.71	0.662	0.09	0.02	0.78	0.1	0.36
SEM ¹	0.239	0.678	0.109	0.513	0.092	0.013	0.005	0.092	0.034	0.046
<i>p</i> -value										
Emulsifier	0.0368	0.0146	0.0124	0.1512	0.6993	0.7222	0.6667	0.6214	0.0621	0.9832
Enzyme	0.4088	0.7711	0.7408	0.7801	0.2569	0.0523	0.4460	0.1166	0.0018	0.7262
Interaction	0.8950	0.9733	0.1892	0.8619	0.4292	0.6068	0.6679	0.5909	0.0239	0.7826

¹Relative expression of the investigated genes was presented as ΔCT , where $\Delta CT = \text{threshold cycle (CT) for target gene} - \text{CT for reference}$. Therefore, a higher ΔCT value represented lower mRNA expression and vice versa.

²Means in a column not sharing a common letter are significantly different ($p \leq 0.05$).

³Pooled standard error of the mean.

Table 11. Genera- and species-level bacterial populations from caecal contents at 35 d in broiler chickens fed control (CON), control supplemented with an emulsifier (EMU), control supplemented with an enzyme (ENZ), and control diet supplemented with emulsifier and enzyme (EMU+ENZ).

	Total bacteria:					
	[log 10]		<i>Bifidobacteria</i> ¹	<i>Lactobacillus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Clostridia</i>
Main effects:						
without ENZ	4.04	10 903	0.084	0.613	0.031	0.563
without EMU	4.04	10 909	0.086	0.614	0.067	0.621
with ENZ	4.05	11 252	0.027	0.589	0.090	0.655
with EMU	4.05	11 245	0.025	0.588	0.054	0.598
Interaction effects:						
CON	4.03	10 747	0.146	0.66	0.037	0.577
EMU	4.04	11 058	0.021	0.566	0.025	0.549
ENZ	4.04	11 071	0.025	0.567	0.096	0.664
EMU+ENZ	4.06	11 432	0.028	0.61	0.083	0.646
SEM ¹	0.006541	165	0.022	0.021	0.016	0.025
<i>p</i> -value						
Emulsifier	0.6215	0.6327	0.1705	0.3288	0.8468	0.6558
Enzyme	0.2840	0.2602	0.1977	0.8946	0.0427	0.0755
Interaction	0.9911	0.9715	0.1463	0.2294	0.7636	0.9758

¹Number of bacteria expressed as a ratio to total bacteria.

²Pooled standard error of the mean.

provides less time for microbial activity, additionally, broken-down NSP restricts substrate for microbial fermentation. These observations were confirmed in the present study; in all supplemented groups, bacterial activity of microbial α -glucosidase enzyme in the caeca significantly decreased. The lower activity of microbial α - and β -glucosidase indicates diminished presence of β -glucans and cellulose regarding as fermentation substrates. These findings corroborate the study of Hubener et al. (2002), which indicated lower

1,3-1,4- β -glucanase activity in caeca after xylanase addition to a wheat/rye diet for broiler chickens. This may indicate an indirect impact of emulsifiers on the gut microbiota of broiler chickens, which was previously suggested by (Kubis et al. 2020). Presumably, considering the effect of the application of enzyme and emulsifier on microbial enzyme activity separately, the main factor of this activity reduction is enhanced digesta flow provided by: 1. emulsifier supporting micelle creation and utilisation of saturated, slowing down digesta passage, palm oil fat; 2. xylanase decreasing digesta viscosity, as well as, by decomposing triticale NSP, decrease the substrate for microbial fermentation.

Both xylanase and emulsifier enhanced acetate, butyrate, and total SCFA concentration in the caeca, indicating fermentation of probiotic oligosaccharides (Baker et al. 2021). Acetate and butyrate acids may positively affect the intestinal environment by decreasing the caeca pH, thus, preventing detrimental bacteria development (Van der Wielen et al. 2000). However, in the current study, caecal bacteria populations, both beneficial and pathogenic, remained unaltered among dietary treatments (supplemental data).

An altered intestinal environment due to the greater SCFA (acetate and butyrate) concentration may result in enhanced epithelial development (Van der Wielen et al. 2000). Despite the above mentioned, the absorptive surface of the villus remained unaffected after additives usage (Table 9, supplemental data), which is in agreement with the study of (Iji et al. 2001). The significant change concerned only lamina muscularis mucosae thickness of jejunum, which revealed greater in the ENZ-supplemented broiler chickens. A thicker intestinal mucosa may be provided by the metabolisation of isovalerate by enterocytes (Slizewska et al. 2020), thus, greater isovaleric acid concentration results in enhanced proliferation of cells. Moreover, isovaleric acid is a putrid acid, its increased concentration is considered an indicator of abnormalities in fermentation and multiplication of pathogens (Slizewska et al. 2020). However, in the current study, this was not confirmed by differences in the bacteria population, except changes in *E. Coli* population after ENZ addition.

The FATP1 is a fatty acid transport protein-1 involved in fatty acid transmembrane transport, thus, its expression is observed in the small intestine due to lipids absorption (Wang et al. 2021). Considering decreased FATP1 expression in the ileum ($p \leq 0.05$) in groups with emulsifier addition, it may be presumed due to the facilitated fat digestion that a greater amount of fats was absorbed in the jejunum, which is the main absorptive area for fats (Lema et al. 2020), especially unsaturated ones (Hurwitz et al. 1973). Moreover, the absorption of saturated fats is greater in the ileum (Hurwitz et al. 1973). Thereby, in groups with no emulsifier supplementation and, consequently, with higher saturated fat in the lumen, FATP1 ileum expression was greater. It could be speculated that similar mechanism took place in case of PEPT1 and SGLT1 expression (Table 11). This proposed explanation is additionally supported by AME_N on the 28th day, where groups with emulsifier possessed the highest values.

5. Conclusion

The addition of emulsifier and xylanase indicates a mutual effect on performance and nutrient digestibility in triticale diets with palm oil during the first 4 weeks of broiler chickens' life. Additionally, concomitantly additives usage influenced intestinal microbiome activity, as well. Presumably, altered performance (especially feed conversion

ratio) occurred due to the streamlining of chyme passage time through the broiler chickens' gastrointestinal tract, provided simultaneously by 1. diminished viscosity by an enzyme; 2. augmentation of saturated fat digestibility by an emulsifier. Thereby, mixed effects may have resulted in overall deterioration in microbial activity among the intestine, moreover, shifting microbial fermentation to the distal part of the intestine (caeca). Additional studies are needed to fully understand the mode of action of both additives on broiler chickens' GIT.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

This study was carried out in the framework of the research project [2015/19/D/NZ9/03580] financed by the National Science Centre Poland.

ORCID

Zuzanna Wiśniewska  <http://orcid.org/0000-0002-7519-6445>
Paweł Kołodziejcki  <http://orcid.org/0000-0003-0715-0223>
Ewa Pruszyńska-Oszmałek  <http://orcid.org/0000-0002-7182-6905>
Paweł Konieczka  <http://orcid.org/0000-0002-2054-5636>
Misza Kinsner  <http://orcid.org/0000-0002-5539-281X>
Paweł Górka  <http://orcid.org/0000-0002-4278-0493>
Jadwiga Flaga  <http://orcid.org/0000-0002-5078-3694>
Kinga Kowalik  <http://orcid.org/0000-0001-6921-5569>
Marcin Hejdysz  <http://orcid.org/0000-0003-1772-7997>
Marta Kubiś  <http://orcid.org/0000-0003-2732-2344>
Łukasz S. Jarosz  <http://orcid.org/0000-0002-4914-1758>
Artur Ciszewski  <http://orcid.org/0000-0002-8100-7284>
Sebastian Kaczmarek  <http://orcid.org/0000-0003-3638-4192>

References

- Almirall M, Francesch M, Perez-Vendrell AM, Brufan J, Estevez-Garcia E. 1995. The differences in intestinal viscosity produced by barley and beta-glucanase alter digesta enzyme activities and ileal nutrient digestibilities more in broiler chicks than in cocks. *J Nutr.* 125:947–955.
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 64:5245–5250.
- AOAC. 2005. Agricultural chemicals; contaminants; drugs. In: Horwitz W, editor. *Official methods of analysis*. Vol. 1. Gaithersburg (MD): AOAC, International.
- AVIAGEN. 2014. Ross broiler nutrition supplement. [accessed 2017 Nov 12]. <http://en.aviagen.com/>.
- Baker JT, Duarte ME, Holanda DM, Kim SW. 2021. Friend or foe? Impacts of dietary xylans, xylooligosaccharides, and xylanases on intestinal health and growth performance of monogastric animals. *Animals.* 11:609.

- Choct M, Hughes RJ, Bedford MR. 1999. Effects of a xylanase on individual bird variation, starch digestion throughout the intestine, and ileum and caecal volatile fatty acid production in chickens fed wheat. *Br Poult Sci.* 40:419–422.
- De Mendiburu F. 2014. *Agricolae: statistical procedures for agricultural research*, version: 1.2 - 1. [accessed 2017 May 25]. <http://cran.r-project.org/>.
- Gorka P, Sliwinski B, Flaga J, Olszewski J, Nawrocka P, Sobkowiak K, Miltko R, Godlewski MM, Zabielski R, Kowalski ZM. 2018. Effect of exogenous butyrate on the gastrointestinal tract of sheep. II. Hydrolytic activity in the rumen and structure and function of the small intestine. *J Anim Sci.* 96:5325–5335.
- Gorka P, Sliwinski B, Flaga J, Wiczorek J, Godlewski MM, Wierzchos E, Zabielski R, Kowalski ZM. 2017. Effect of butyrate infusion into the rumen on butyrate flow to the duodenum, selected gene expression in the duodenum epithelium, and nutrient digestion in sheep. *J Anim Sci.* 95:2144–2155.
- Hill FW, Anderson DL. 1958. Comparison of metabolizable energy and productive energy determinations with growing chicks. *J Nutr.* 64:587–603.
- Hubener K, Vahjen W, Simon O. 2002. Bacterial responses to different dietary cereal types and xylanase supplementation in the intestine of broiler chicken. *Archiv für Tierernaehrung.* 56:167–187.
- Hurwitz S, Bar A, Katz M, Sklan D, Budowski P. 1973. Absorption and secretion of fatty acids and bile acids in the intestine of the laying fowl. *J Nutr.* 103:543–547.
- Iji PA, Hughes RJ, Choct M, Tivey DR. 2001. Intestinal structure and function of broiler chickens on wheat-based diets supplemented with a microbial enzyme. *Asian-Australas J Anim Sci.* 14:54–60.
- Jourdan GW, Dean L, Roseman S. 1971. The sialic acids: XI. A periodate-resorcinol method for the quantitative estimation of free sialic acids and their glycosides. *J Biol Chem.* 246:430–435.
- Kaczmarek SA, Bochenek M, Samuelsson AC, Rutkowski A. 2015. Effects of glyceryl polyethylene glycol ricinoleate on nutrient utilisation and performance of broiler chickens. *Arch Anim Nutr.* 69:285–296.
- Kiarie E, Romero LF, Nyachoti CM. 2013. The role of added feed enzymes in promoting gut health in swine and poultry. *Nutr Res Rev.* 26:71–88.
- Kim DH, Yoo YM, Kim SH, Jang BG, Park BY, Cho SH, Seong PN, Hah KH, Lee JM, Kim YK, et al. 2007. Effect of the length of feed withdrawal on weight loss, yield and meat color of broiler. *Asian-Australas J Anim Sci.* 20:106–111.
- Konieczka P, Barszcz M, Choct M, Smulikowska S. 2018. The interactive effect of dietary n-6: n-3 fatty acid ratio and vitamin E level on tissue lipid peroxidation, DNA damage in intestinal epithelial cells, and gut morphology in chickens of different ages. *Poult Sci.* 97:149–158.
- Konieczka P, Czerwinski J, Jankowiak J, Zabek K, Smulikowska S. 2019. Effects of partial replacement of soybean meal with rapeseed meal, narrow-leaved lupin, DDGS and probiotic supplementation on performance and gut microbiota activity and diversity in broilers. *Ann Anim Sci.* 19:1–17.
- Konieczka P, Smulikowska S. 2017. Viscosity negatively affects the nutritional value of blue lupin seeds for broilers. *Animal.* 12:1144–1153.
- Kubis M, Kolodziejewski P, Pruszyńska - Oszmalek E, Sassek M, Konieczka P, Gorka P, Flaga J, Katarzyńska - Banasik D, Hejdysz M, Wisniewska Z, et al. 2020. Emulsifier and xylanase can modulate the gut microbiota activity of broiler chickens. *Anim.* 10:2197.
- Lee SS, Kim HS, Moon YH, Choi NJ, Ha JK. 2004. The effects of a non - ionic surfactant on the fermentation characteristics, microbial growth, enzyme activity and digestibility in the rumen of cows. *Anim Feed Sci Technol.* 115:37–50.
- Lema I, Araújo JR, Rolhion N, Demignot S. 2020. Jejunum: the understudied meeting place of dietary lipids and the microbiota. *Biochimie.* 178:124–136.
- Lien K, McBurney M, Beyde B, Thomson A, Sauer W. 1996. Ileal recovery of nutrients and mucin in humans fed total enteral formulas supplemented with soy fiber. *Am J Clin Nutr.* 63:584–595.

- Mendes AR, Ribeiro T, Correia BA, Bule P, Maças B, Falcão L, Freire JPB, Ferreira LMA, Fontes CMGA, Lordelo MM. 2013. Low doses of exogenous xylanase improve the nutritive value of triticale-based diets for broilers. *J Appl Poult Res.* 22:92–99.
- Prohaszka L. 1986. Antibacterial mechanism of volatile fatty acids in the intestinal tract of pigs against *Escherichia coli*. *Zoonoses Public Hlth.* 33:166–173.
- Rakha A, Aman P, Andersson R. 2011. Dietary fiber in triticale grain: variation in content, composition, and molecular weight distribution of extractable components. *J Cereal Sci.* 54:324–331.
- Ravindran V, Tancharoenrat P, Zaefarian F, Ravindran G. 2016. Fats in poultry nutrition: digestive physiology and factors influencing their utilisation. *Anim Feed Sci Technol.* 213:1–21.
- Raza A, Bashir S, Tabassum R. 2019. An update on carbohydrases: growth performance and intestinal health of poultry. *Heliyon.* 5:e01437.
- R Development Core Team. 2014. R foundation for statistical computing, R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria.
- Roy A, Halder S, Mondal S, Ghosh TK. 2010. Effects of supplemental exogenous emulsifier on performance, nutrient metabolism, and serum lipid profile in broiler chickens. *Vet Med Int.* Article ID 262604.
- Short FJ, Gorton P, Wiseman J, Boorman KN. 1996. Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. *Anim Feed Sci Technol.* 59:215–221.
- Slizewska K, Markowiak-Kopec P, Zbikowski A, Szeleszczuk P. 2020. The effect of synbiotic preparations on the intestinal microbiota and her metabolism in broiler chickens. *Sci Rep.* 10:4281.
- Slominski BA. 2011. Review: recent advances in research on enzymes for poultry diets. *Poult Sci.* 90:2013–2023.
- Szczurek W, Szymczyk B, Arczewska-Włosek A, Świątkiewicz S. 2020. Apparent and standardised ileum digestibility of amino acids in wheat, triticale and barley for broiler chickens at two different ages. *Br Poult Sci.* 61:63–69.
- Uni Z, Noy Y, Sklan D. 1999. Posthatch development of small intestinal function in the poult. *Poult Sci.* 78:215–222.
- Van der Wielen PWJJ, Biesterveld S, Notermans S, Hofstra H, Urlings BAP, van Knapen F. 2000. Role of volatile fatty acids in development of the caeca microflora in broiler chickens during growth. *Appl Environ Microbiol.* 66:2536–2540.
- Wang Y, Wang Y, Lin X, Gou Z, Fan Q, Jiang S. 2021. Effects of *Clostridium butyricum*, sodium butyrate, and butyric acid glycerides on the reproductive performance, egg quality, intestinal health, and offspring performance of yellow-feathered breeder hens. *Front Microbiol.* 12:657542.

Mgr inż. Zuzanna Wiśniewska

Katedra Żywienia Zwierząt

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacjach stanowiących podstawę mojej rozprawy doktorskiej był następujący:

1. **Zuzanna Wiśniewska**, Paweł Kołodziejcki, Ewa Pruszyńska, Paweł Konieczka, Misza Kinsner, Paweł Górka, Jadwiga Flaga, Kinga Kowalik, Marcin Hejdysz, Marta Kubiś, Łukasz S. Jarosz, Artur Ciszewski, Sebastian A. Kaczmarek. (2023) Effect of emulsifier and multicarbohydrase enzyme supplementation on performance and nutrient digestibility in broiler diets containing rapeseed meal. *Poultry Science*, 102:102268, <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102268>

Realizacja eksperymentu (udział przy uboju i pobór treści i tkanek jelita cienkiego), analiza wyników, obliczenia statystyczne, napisanie maszynopisu pracy i odpowiedź na recenzje. Swój udział w publikacji oceniam na 60%.

2. **Zuzanna Wiśniewska**, Paweł Kołodziejcki, Ewa Pruszyńska-Oszmałek, Paweł Konieczka, Misza Kinsner, Paweł Górka, Jadwiga Flaga, Kinga Kowalik, Marcin Hejdysz, Marta Kubiś, Łukasz S. Jarosz, Artur Ciszewski, Sebastian Kaczmarek. (2023) Combination of emulsifier and xylanase in triticale-based broiler chickens diets. *Archives of Animal Nutrition*, <https://doi.org/10.1080/1745039X.2023.2202591>

Realizacja eksperymentu (udział przy uboju i pobór treści i tkanek jelita cienkiego), analiza wyników, napisanie maszynopisu pracy i odpowiedź na recenzje. Swój udział w publikacji oceniam na 60%.

.....

Dr. hab. Sebastian Kaczmarek, prof. UPP

Katedra Żywienia Zwierząt

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacjach stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej mgr inż. Zuzanny Wiśniewskiej był następujący:

1. Zuzanna Wiśniewska, Paweł Kołodziejski, Ewa Pruszyńska, Paweł Konieczka, Misza Kinsner, Paweł Górka, Jadwiga Flaga, Kinga Kowalik, Marcin Hejdysz, Marta Kubiś, Łukasz S. Jarosz, Artur Ciszewski, Sebastian A. Kaczmarek. (2023) Effect of emulsifier and multicarbohydrase enzyme supplementation on performance and nutrient digestibility in broiler diets containing rapeseed meal. Poultry Science, 102:102268, <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102268>

Opracowanie koncepcji badań, realizacja eksperymentu (zbilansowanie mieszanek doświadczalnych), pomoc w interpretacji wyników i opracowaniu redakcyjnym pracy. Swój udział w publikacji oceniam na 25%.

2. Zuzanna Wiśniewska, Paweł Kołodziejski, Ewa Pruszyńska-Oszmałek, Paweł Konieczka, Misza Kinsner, Paweł Górka, Jadwiga Flaga, Kinga Kowalik, Marcin Hejdysz, Marta Kubiś, Łukasz S. Jarosz, Artur Ciszewski, Sebastian Kaczmarek. (2023) Combination of emulsifier and xylanase in triticale-based broiler chickens diets. Archives of Animal Nutrition, <https://doi.org/10.1080/1745039X.2023.2202591>

Opracowanie koncepcji badań, realizacja eksperymentu (zbilansowanie mieszanek doświadczalnych), pomoc w interpretacji wyników, obliczeniach statystycznych i opracowaniu redakcyjnym pracy. Swój udział w publikacji oceniam na 25%.

.....

Dr inż. Marcin Hejdysz
Katedra Żywienia Zwierząt
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacjach stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej mgr inż. Zuzanny Wiśniewskiej był następujący:

1. Zuzanna Wiśniewska, Paweł Kołodziejcki, Ewa Pruszyńska, Paweł Konieczka, Misza Kinsner, Paweł Górka, Jadwiga Flaga, Kinga Kowalik, Marcin Hejdysz, Marta Kubiś, Łukasz S. Jarosz, Artur Ciszewski, Sebastian A. Kaczmarek. (2023) Effect of emulsifier and multicarbohydrase enzyme supplementation on performance and nutrient digestibility in broiler diets containing rapeseed meal. Poultry Science, 102:102268, <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102268>

Pomoc w opracowaniu redakcyjnym pracy. Swój udział w publikacji oceniam na 5%.

2. Zuzanna Wiśniewska, Paweł Kołodziejcki, Ewa Pruszyńska-Oszmałek, Paweł Konieczka, Misza Kinsner, Paweł Górka, Jadwiga Flaga, Kinga Kowalik, Marcin Hejdysz, Marta Kubiś, Łukasz S. Jarosz, Artur Ciszewski, Sebastian Kaczmarek. (2023) Combination of emulsifier and xylanase in triticale-based broiler chickens diets. Archives of Animal Nutrition, <https://doi.org/10.1080/1745039X.2023.2202591>

Pomoc w opracowaniu redakcyjnym pracy. Swój udział w publikacji oceniam na 5%.

.....

dr hab. Ewa Pruszyńska-Oszmałek

Katedra Fizjologii, Biochemii i Biostruktury Zwierząt

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacjach stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej mgr inż. Zuzanny Wiśniewskiej był następujący:

1. Zuzanna Wiśniewska, Paweł Kołodziejcki, Ewa Pruszyńska, Paweł Konieczka, Misza Kinsner, Paweł Górka, Jadwiga Flaga, Kinga Kowalik, Marcin Hejdysz, Marta Kubiś, Łukasz S. Jarosz, Artur Ciszewski, Sebastian A. Kaczmarek. (2023) Effect of emulsifier and multicarbohydrase enzyme supplementation on performance and nutrient digestibility in broiler diets containing rapeseed meal. Poultry Science, 102:102268, <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102268>

Przeprowadzenie analizy ekspresji genów (SGLT1, PEPT1, FATP1, GLUT2) w jelicie krętym oraz jelitach ślepych. Swój udział w publikacji oceniam na 5%.

2. Zuzanna Wiśniewska, Paweł Kołodziejcki, Ewa Pruszyńska-Oszmałek, Paweł Konieczka, Misza Kinsner, Paweł Górka, Jadwiga Flaga, Kinga Kowalik, Marcin Hejdysz, Marta Kubiś, Łukasz S. Jarosz, Artur Ciszewski, Sebastian Kaczmarek. (2023) Combination of emulsifier and xylanase in triticale-based broiler chickens diets. Archives of Animal Nutrition, <https://doi.org/10.1080/1745039X.2023.2202591>

Przeprowadzenie analizy ekspresji genów (SGLT1, PEPT1, FATP1, GLUT2) w jelicie krętym oraz jelitach ślepych. Swój udział w publikacji oceniam na 5%.



dr hab. Paweł A. Kołodziejski

Katedra Fizjologii, Biochemii i Biostruktury Zwierząt

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacjach stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej mgr inż. Zuzanny Wiśniewskiej był następujący:

1. Zuzanna Wiśniewska, Paweł Kołodziejski, Ewa Pruszyńska, Paweł Konieczka, Misza Kinsner, Paweł Górka, Jadwiga Flaga, Kinga Kowalik, Marcin Hejdysz, Marta Kubiś, Łukasz S. Jarosz, Artur Ciszewski, Sebastian A. Kaczmarek. (2023) Effect of emulsifier and multicarbohydrase enzyme supplementation on performance and nutrient digestibility in broiler diets containing rapeseed meal. Poultry Science, 102:102268, <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102268>

Przeprowadzenie analizy ekspresji genów (SGLT1, PEPT1, FATP1, GLUT2) w jelicie krętym oraz jelitach ślepych. Swój udział w publikacji oceniam na 5%.

2. Zuzanna Wiśniewska, Paweł Kołodziejski, Ewa Pruszyńska-Oszmalek, Paweł Konieczka, Misza Kinsner, Paweł Górka, Jadwiga Flaga, Kinga Kowalik, Marcin Hejdysz, Marta Kubiś, Łukasz S. Jarosz, Artur Ciszewski, Sebastian Kaczmarek. (2023) Combination of emulsifier and xylanase in triticale-based broiler chickens diets. Archives of Animal Nutrition, <https://doi.org/10.1080/1745039X.2023.2202591>

Przeprowadzenie analizy ekspresji genów (SGLT1, PEPT1, FATP1, GLUT2) w jelicie krętym oraz jelitach ślepych. Swój udział w publikacji oceniam na 5%.

Paweł Kołodziejski