

Reducción de antibióticos: estrategias para mantener la salud intestinal mitigando impacto en los costos de las dietas

Introducción

Los antibióticos promotores de crecimiento (AGP) han sido utilizados en la industria porcícola por sus efectos en la ganancia de peso y conversión alimenticia y su retiro impacta negativamente los parámetros productivos (Heyes et al., 2001; Holt et al., 2011). Entretanto algunos datos indican que la utilización de antimicrobianos en producción animal resulta en un aumento de la resistencia bacteriana contra estos antibióticos con posibles riesgos para la población humana (Mesa et al. 2006; Sáens et al., 2004;)

Muchos aditivos han sido desarrollados con el objetivo de mitigar los efectos negativos de la retirada de los AGP. Búsquedas en el PubMed con las palabras “swine” seguida respectivamente por una de las palabras “ácido orgánico”, “probiótico”, “prebiótico”, “aceites esenciales” y “enzimas” muestran que la mayor parte de las investigaciones han sido hechas con enzimas y ácidos orgánicos (1112 y 1051 resultados respectivamente). Considerando que las publicaciones son en general hechas con datos que indican diferencia entre los tratamientos, el número de investigaciones con ácidos orgánicos y enzimas alimenticias indican que estos dos aditivos han demostrado buena efectividad en aplicaciones para cerdos. Esta revisión estará enfocada en la utilización de ácidos orgánicos en las dietas de cerdos. Además, se realizará una revisión del uso de enzimas en nutrición de cerdos con foco en digestibilidad de nutrientes y efecto en la población bacteriana intestinal.

ÁCIDOS ORGÁNICOS

Los ácidos orgánicos son ampliamente utilizados en dietas para cerdos. Esta revisión considerará aspectos de desarrollo productivo, digestibilidad de nutrientes y efecto en las bacterias del intestino de cerdos alimentados con dietas suplementadas con ácidos orgánicos.

Digestibilidad de nutrientes

Existe evidencia que indica que la suplementación de ácidos en las dietas puede mejorar la digestibilidad de nutrientes. Buhler et al. (2006) suplementó 1% de ácido benzoico en dietas a base de trigo-cebada-triticale-arveja-soya y observó que la digestibilidad del nitrógeno fue 3.7% mayor debido a la suplementación de ácido benzoico. La suplementación de 3% de ácido láctico en dietas a base de maíz-soya mejoró la digestibilidad ileal de los aminoácidos lisina, metionina, treonina, isoleucina, arginina, valina, alanina y ácido glutámico (Kemmet et al., 1999a). También se observó que 3% de ácido láctico suplementado en dieta de maíz soya mejoró la digestibilidad total aparente de cenizas, Ca, P y Mg en 8, 20 y 22% respectivamente (Kemmet et al., 1999b). Omogbenigun et al. (2003) observó que la suplementación de una combinación de ácidos orgánicos (cítrico, málico, fosfórico, sórbico, tartárico y láctico) en dietas suplementadas con fitasa, resultó en 5% de mejora de la hidrólisis del fitato. El incremento de la digestibilidad de nutrientes con el uso de ácidos orgánicos está probablemente relacionado con un mayor tiempo de retención gástrica de la digesta (Hunt and Knox, 1969; Blum et al., 1976) y cambios en la morfología intestinal (Owusu-Asieu et al., 2003; Diao et al., 2014).

La actividad de pepsina en el estómago es influenciada por el pH (Taylor 1959). Con base en esto se puede asumir que los ácidos orgánicos reducen el pH estomacal y mejorar la actividad de la pepsina. Entretanto la suplementación dietética de ácidos orgánicos no cambia el pH gástrico (Risley et al., 1992; Kluge et al., 2006). El motivo para una mejor digestibilidad de nutrientes en dietas suplementadas con acidificantes debe estar relacionada con el mayor tiempo de retención gástrica. Hay evidencia que el alimento queda por más tiempo en el estómago en dietas suplementadas con acidificantes (Hunt and Knox, 1969, Blum et al. 1976, Mazanilla et al. 2004). Otro posible motivo está relacionado a cambios en la morfología intestinal por la suplementación de acidificantes (Owusu-Asieu et al., 2003; Diao et al., 2014) y esto será discutido posteriormente.

Capacidad Buffer

La capacidad buffer de los alimentos indica la cantidad de HCl que es necesario para reducir el pH del estómago después de la ingestión de alimento. Levic et al. (2005)

estudió la capacidad Buffer (cantidad de 1.0 M de HCl para reducir el pH de alimento para un pH de 5) de diferentes ingredientes de dietas de cerdos. Este estudio indicó que la capacidad buffer de maíz, torta de soya, fosfato dicálcico y caliza es 3, 21, 250 y 1.690 mEq/100g (Levic et al., 2005). Bockor et al. (2007) observó que la capacidad buffer de maíz, torta de soya y fosfato bicálcico es 3, 30 y 120 mEq/100g de muestra respectivamente. Con esto queda claro que dietas con mayor cantidad de soya y minerales tienen mayor capacidad buffer y demandan más H^+ para reducir el pH del estómago. Los acidificantes pueden también afectar la capacidad buffer de las dietas. Fue observado que el ácido fumárico suplementado a 3% puede disminuir la capacidad buffer (cantidad de 0.1 N de HCl para reducir el pH de 10 g de dieta para pH 4) de dietas de cerdos de 24 para 0 mEq/100g (Blank et al 1999). Así mismo, cambios en la formulación de la dieta alteran la capacidad buffer con efectos en la digestibilidad de nutrientes (Blank et al., 1999; Mroz et al., 2000). Mroz et al. (2000) reemplazó caliza por benzoato de Ca para reducir la capacidad buffer de la dieta de 632 para 578 mEq/kg de alimento y observó 1,5% de mejoría en la digestibilidad ileal aparente de materia orgánica por la reducción. Además, la digestibilidad total aparente de materia orgánica, energía bruta y nitrógeno mejora en 0,6; 0,8; y 1% respectivamente. Este mismo estudio observó una mejoría en la digestibilidad de P con la suplementación de los ácidos fórmico, fumárico y butírico. El efecto de los ácidos orgánicos en la digestibilidad de nutrientes parece ser más evidente en dietas con baja capacidad buffer (Blank et al., 1999). Fue observado que un 2% de ácido fumárico puede mejorar la digestibilidad de energía bruta, proteína y aminoácidos en dietas con menor capacidad buffer. Pero poco efecto en la digestibilidad de nutrientes fue observado en dietas de alta capacidad buffer (Blank et al., 1999).

Microbiota intestinal

Acidificantes de alimentos pueden afectar la microbiota intestinal, entretanto esto no parece estar relacionado con la reducción de pH de la digesta por la suplementación de los ácidos orgánicos. Risley et al. (1992) estudió la suplementación de 1,5% de ácido fumárico o ácido cítrico en dietas post destete. El pH medido en el alimento fue de 6,4 para la dieta control, 4.7 para la dieta suplementada con 1,5% de ácido fumárico y 4,9 para la dieta suplementada con 1,5% de ácido cítrico. A pesar del bajo pH del

alimento por la suplementación de los ácidos no se observó diferencias en el pH de digesta de estómago, yeyuno, ciego y colon. Kluge et al. (2006) midió el pH de digesta en el estómago, duodeno, yeyuno y íleon de cerdos alimentados con 0, 0,5 y 1% de ácido benzoico. Se observó que la suplementación de ácido benzoico no cambia el pH de la digesta. Entretanto se observó una reducción del total de bacterias aeróbicas y anaeróbicas en el estómago y una reducción de bacterias anaeróbicas en el íleon. La actividad antimicrobiana de los ácidos ocurre por su capacidad de penetrar en la membrana citoplasmática cuando están no disociados, reduciendo el pH intracelular, afectando el transporte de protones en la membrana (Ray, 1992). Knarrenborg et al. (2002) evaluó el efecto *in vitro* del ácido propiónico, fórmico, butírico, láctico, fumárico y benzoico en el cambio de población de coliformes y bacterias ácido lácticas en la digesta de lechones. Se observó que en la ausencia de los ácidos orgánicos hubo crecimiento de las bacterias en el contenido proximal del intestino anterior. Ácido benzoico tuvo un efecto bactericida en coliformes y bacterias ácido-lácticas. Ácido fumárico suprimió las bacterias ácido-lácticas. Los otros ácidos no afectaron las bacterias ácido-lácticas y llevaron a una modesta reducción de coliformes. La eficiencia de los ácidos orgánicos en causar una menor viabilidad de coliformes fue ácido benzoico > ácido fumárico > ácido láctico > ácido butírico > ácido fórmico > ácido propiónico. Eklund (1985) evaluó el efecto inhibitorio *in vitro* de ácido benzoico, ácido propiónico, en *E. coli*, *Staph. aureus*, *C. albicans*, *B. subtilis* y *B. cereus*. Se observó que el ácido benzoico fue más efectivo en la inhibición de microorganismos que el ácido propiónico. Cambios *in vivo* en la microbiota por la suplementación de acidificantes fue descrito en la literatura suportando datos *in vitro*. Torrallardona et al. (2007) observó que lechones alimentados con dieta suplementadas con 0,5% de ácido benzoico tienen una mayor biodiversidad de microbiota ileal (está Ok). Guggenbuhl et al. (2007) suplementó 0,5% de ácido benzoico en dietas de lechones. Fue observado la suplementación de ácido benzoico redujo el contenido intestinal de coliformes, *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, *Enterococcus spp*, y *Staphylococcus spp* en 89, 81, 92, 89, 97 % respectivamente, mientras *Lactobacillus spp* solamente decreció en 2%. En el mismo estudio la ganancia diaria de peso de lechones recibiendo 0,5% de ácido benzoico mejoro en 13% y la conversión alimenticia bajó en 6%. Risley et al. (1992)

estudió la suplementación de 1,5% de ácido fumárico o ácido cítrico en dietas post destete. Este estudio indicó que la suplementación de ácido fumárico o ácido cítrico para dietas no cambia la población de *E. coli*, clostridia, y *Lactobacilli* de la digesta en el estómago, yeyuno, ciego y colon posterior. La falta de efecto de ácido fumárico y ácido cítrico en poblaciones bacterianas *in vivo* debe estar relacionada con las diferentes capacidades de los ácidos inhibir el crecimiento de microorganismos (Knarrenborg et al., 2002). Esto puede también estar relacionado con la diferente capacidad de las especies de microorganismos de crecer en condiciones ácidas (Ray 1992).

Los procesos de manufactura industrial de acidificantes para dietas también pueden cambiar su efecto en la microbiota intestinal. Hay evidencias que el encapsulamiento permite que los ácidos orgánicos lleguen a regiones distales del tracto digestivo (Mallo et al., 2012). Piva et al. (2007) observó que una matriz de protección de ácido sórbico permite que 15% del ácido sórbico detectado en el estómago llegue al colon. La suplementación de ácido sórbico con una matriz protectora para dietas de lechones reduce la cantidad de coliformes en la parte posterior del yeyuno de los lechones, mientras no diferencias entre ácido sórbico sin la matriz protectora y la dieta control fue observada (Piva et al., 2007).

La suplementación de dietas con acidificantes fue también comparada con otros aditivos. Walsh et al. (2007) comparó la suplementación de 55 ppm de carbadox o 0,4% de un blend de ácidos (fumárico, láctico, cítrico, propiónico y benzoico). Fue concluido que acidificantes pueden recuperar 12% de la respuesta de carbadox en ganancia de peso. Enterando no se observaron cambios en el pH y cantidad *E. coli* en las excretas fecales. Owusu-Asiedu et al. (2003) medió la capacidad de yema de huevo en polvo con anticuerpos (0,5% de la dieta), ZnO (0,4% de la dieta), ácido fumárico (2% en la dieta) y carbadox (55 ppm) en el control de diarrea post destete causada por *E. coli* enterotoxigénica. Fue observado que la yema de huevo en polvo, ZnO, ácido fumárico y carbadox controlaron la diarrea y redujeron la mortalidad de los lechones desafiados con la *E. coli* enterotoxigénica. Con esto los ácidos orgánicos pueden potencialmente ser suplementados para lechones con el objetivo de mitigar las diarreas post destete.

Morfología intestinal

La suplementación de ácidos orgánicos también puede cambiar la morfología intestinal. Diao et al. (2014) suplementó dietas de lechones con 5 gramos de ácido benzoico por kilogramo. La suplementación de ácido benzoico aumentó la relación altura de vellosidad:profundidad de cripta del duodeno, yeyuno e íleo. Además, se redujo el conteo de *E. coli* en las muestras de digesta. Resultados similares fueron reportados por Owusu-Asieku et al. (2003) que suplementó dietas de sitio 2 con 0 o 2% de ácido fumárico y desafió los lechones con *E. coli* enterotoxigénica. Fue observado que los lechones que recibieron ácido fumárico en la dieta tuvieron menor incidencia de diarrea y tasa de mortalidad. También fue observado que lechones que recibieron ácido fumárico en la dieta tuvieron una mayor relación de vellosidad: profundidad de la cripta indicando un menor daño *E. coli* enterotoxigénica. Por lo tanto los ácidos orgánicos pueden promover la salud intestinal para una apropiada digestión y absorción de nutrientes.

Desempeño Zootécnico

Eisemann y van Heugten (2007) observaron que lechones alimentados con dietas suplementadas con ácido fórmico y/o formiato de amonio presentan una tendencia a tener mejor eficiencia alimenticia comparado a lechones que no reciben ácido amonio y/o formiato. De manera similar, dietas suplementadas con 0.5% de ácido benzoico se obtuvo una mejora en la ganancia de peso en un 13% y la eficiencia alimenticia en 6% (Guggenbuhl et al., 2007; Torrallardona et al., 2007). Manzanilla et al. (2004) estudió el efecto de ácido fórmico en el crecimiento y desarrollo de lechones. Fue observado que la suplementación de 0,5% de ácido fórmico mejoró la eficiencia alimenticia de los lechones en 3% con mayor cantidad de digesta en el estómago después que los cerdos consumían las dietas. Esto indica un mayor tiempo de retención gástrica en consecuencia de la suplementación con el ácido (Hunt and Knox, 1969; Blum et al., 1976). El efecto de los acidificantes en el mejor crecimiento puede estar relacionado con la mejor digestibilidad (Guggenbuhl et al., 2007) o cambios en la microbiota intestinal (Torrallardona et al., 2007) como discutido anteriormente.

Existen datos en los cuales la suplementación de ácido fosfórico (0,1 o 0,2% de la dieta) o mezclas de ácidos compuestos de cítrico y fumárico (1 y 2% de la dieta)

lograron efectos positivos en el crecimiento de los cerdos (Che et al., 2012). La diferente magnitud de la respuesta para los diferentes estudios puede estar relacionada con las diferencias entre los ácidos (Knarrenborg et al., 2002), capacidad buffer de las dietas (Blank et al., 1999), procesos de producción (Mallo et al., 2012) o ácidos inorgánicos con baja capacidad de acción en las bacterias (Ray, 1992).

ENZIMAS

La revisión de literatura va a estar enfocada en los principales ingredientes utilizados en dietas de cerdos (maíz y soja) y los efectos de algunas enzimas que pueden ser suplementadas en este tipo de dieta para lograr mejoras productivas.

Ingredientes y sustratos

Maíz (IFN 4-02-861, AAFCO, 1992) es una importante fuente de energía en las dietas, contiene 3.395 kcal/kg de energía metabolizable y 62,6% de almidón (NRC, 2012). Considerando los componentes no digeridos por cerdos, el maíz contiene 9,7% de polisacáridos no amiláceos (NSP) (Knudsen, 1997) y 0,21% de fósforo fítico (NRC, 2012). Los arabinoxilanos son los principales NSP totalizando 4,3% de la composición del maíz (Ward et al., 2008). Torta de soja (IFN 5-04-612, AAFCO, 1992) tiene 47,7% de proteína cruda (CP) y la digestibilidad ileal aparente (AID) de CP es 82% (NRC, 2012). Portando la torta de soja es una importante fuente de proteína en dietas de cerdos. Además, soja contiene 21,7% de NSP (Knudsen, 1997) y 0,38% de fósforo fítico (NRC, 2012). Torta de soja también contiene 3,8% de rafinosa y 7,3% de estaquiosa (NRC, 2012) que son considerados como compuestos que inducen la flatulencia (Liener et al., 1994). La proteína de soja es compuesta de cerca de 40 % de glicinina y cerca de 30% β conglucínicas (Brandom and Friedman 2002; Sun et al. 2007; Zhao et al. 2008)

Las enzimas nutricionales para degradar los compuestos que los cerdos no producen enzimas para digerir han sido estudiadas (Pettey et al., 2002; Kim et al., 2003; Kim et al. 2006; Ji et al., 2008; Li et al., 2010; Wang et al., 2011a; Wang et al., 2011b; Jo et al., 2012, Almeida and Stein, 2012) con el objetivo de mejorar la absorción de nutrientes en el tracto digestivo.

Xylanasa

La enzima endo-1,4- β -xilanasa (xylanase) carga lo identificador de la comisión de enzima 3.2.1.8 y cataliza la hidrólisis interna de las uniones (1 \rightarrow 4)- β -D-xilosídicas en los xilanos (International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 1992). Xylanases son clasificadas con base en su dominio catalítico, estructura y mecanismo molecular (Collins et al., 2005). Las xilanasas utilizadas por la industria pertenecen a las familias glicosídicas 10 y 11, ambas contienen glutamato en su sitio catalítico (Paloheimo et al., 2011). La familia 11 trabaja exclusivamente en los sustratos D-xylose y la familia 10 puede ser activa en otros sustratos como la celulosa (Collins et al., 2005). La mayoría de las xilanasas son activas entre pH 4-6 y hay xilanasas termo estables disponibles para aplicación en dietas (Paloheimo et al., 2011).

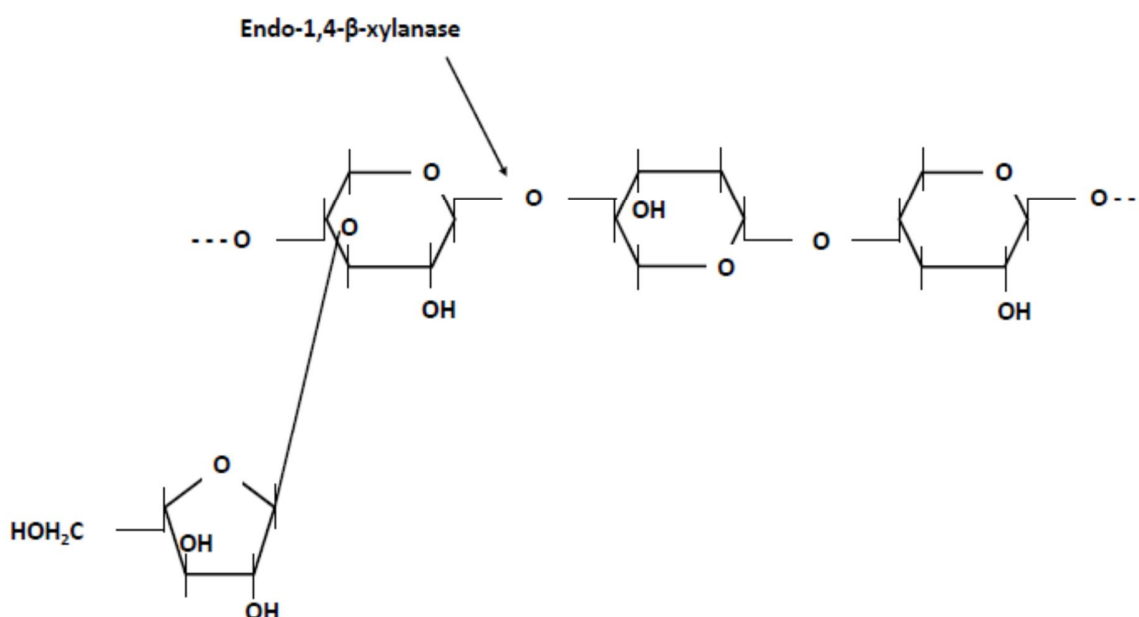


Figura 1. Estructura del xilano y sitios para endo-1,4- β -xilanase (adaptado from Subramaniyan and Prema, 2002).

Los cerdos no producen enzimas para degradar los arabinoxilanos, el modo de acción propuesto para las xilanasas está relacionado con la degradación de los arabinoxilanos de la pared celular permitiendo que las enzimas endógenas digieran los nutrientes que están dentro de la pared celular (Tervila-Wilo et al., 1996; Masey O'Neil

et al., 2014). Choct and Annison (1992) reportaron que los arabinoxilanos aumentan la viscosidad de la digesta y la suplementación de xilanasa disminuye el efecto de los arabinoxilanos en la viscosidad. El beneficio de la suplementación de xilanasa está relacionado con la degradación de NDF. Passos and Kim (2014) observaron que la suplementación de 0 para 1,400 LXU/kg aumentó la digestibilidad ileal de NDF de dietas a base de maíz-soya ofrecida para cerdos en etapa de crecimiento. Zanotto et al. (2010) reportaron que la combinación de xilanasa y amilasa mejora la energía digestible y la energía metabolizable del maíz en 2,8% y 2,9% respectivamente. La suplementación de xylanasa también mejoró la digestibilidad de una dieta a base de trigo (Woyengo et al., 2008; Moehn et al., 2007, Nortey et al., 2007), aportando evidencias que señalan que la xilanasa puede mejorar la digestibilidad de ingredientes degradando los arabinoxilanos de la pared celular.

Proteasa

Proteasa es el término general para las enzimas que degradan proteínas. La mayoría de las proteasas están clasificadas como serina proteasas pues el aminoácido serina está en su sitio catalítico (Hedstrom, 2006). Las serinas proteasas catalizan la hidrólisis de ligaciones peptídicas y tienen la nomenclatura de enzimas 3.4.21. (International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 1992). La efectiva suplementación de proteasas en dietas depende de la resistencia a bajos pH y la habilidad de degradar la torta de soya que es el ingrediente proteico más utilizado en las dietas de cerdos (Glitsø et al., 2012). Pedersen et al. (2012) estudiaron diferentes proteasas comerciales y observaron que ellas son activas entre pH 5.5 y 7.0. La primera proteasa en nutrición de cerdos fue reportada por Cunningham y Brisson (1957) donde se realizó una predigestión de ingredientes con enzimas, pero mejoras en el desempeño productivo no fueron observadas. Estudios recientes reportaron la suplementación de proteasa en dietas maíz soya mejorando la digestibilidad ileal aparente de nitrógenos en los lechones (Guggenbuhl et al. 2012), cerdos de crecimiento (Wang et al. 2011b) y finalización (Mc Alpine, 2012b).

Enzimas y funcionalidad gastrointestinal

Estudios hechos con enzimas indican que además de la mejora en la absorción intestinal de nutrientes ocurren cambios en la microbiota intestinal. Durmic et al. (2001)

evaluó la suplementación de un compuesto enzimático con actividades de xylanasa, glucanasa y amilasa en dietas a base de trigo y observó una reducción del número de bacterias anaeróbicas facultativas y un mayor número de no esporulogénicas. La misma reducción en las bacterias anaeróbicas facultativas fue observada en dietas a base de sorgo. En esta evaluación animales fueron inoculados con *B. hyodysenteriae* (inoculación diaria de una solución conteniendo de 10^8 células viables/ml durante 2 días) y se observó que cerdos recibiendo dietas con trigo tuvieron una mayor morbilidad (67%) comparado a animales recibiendo dietas de trigo con enzimas (50%) o trigo (33%). Willamil et al. (2012) también observó que la suplementación de 0,1% de un compuesto enzimático (22.000 U/g of endo- β -1,4-xylanasa y 2000 U/g de endo- β -1,3(4)-glucanasa) en dietas a base de trigo, cebada y centeno aumentó la altura de la vellosidad (423 vs 389 μ m) que es importante para una adecuada absorción de nutrientes.

La glicinina y β conglucínicas de la proteína de soya pueden causar daño a la mucosa intestinal (Qiao et al. 2003; Sun et al. 2007, 2008; Yoo et al. 2009). Hay evidencias que indican que la proteasa hidroliza la glicinina y la conglucínina de la soya y mejora el crecimiento de los lechones (Wang et al., 2011a). La suplementación de proteasa en dietas a base de maíz soya aumentó la altura de la vellosidad, la profundidad de la cripta y la relación altura de vellosidad: profundidad de cripta de cerdos en sitio 2 (Wang et al., 2011) Además la proteasa permite una reducción del conteo de *E.Coli* en el ciego y en el colon con aumento de la población de *Lactobacillus* en el ciego y colon. Por lo tanto, la suplementación de proteasa puede mejorar la digestibilidad de nutrientes y el crecimiento de los animales (Wang et al. 2011 b, Guggenbuhl et al. 2012) y también modificar la población de bacterias y la morfología intestinal (Wang et al., 2011a).

CONCLUSIÓN

Los ácidos orgánicos suplementados en dietas tienen el potencial de mejorar la ganancia de peso y la conversión alimenticia por mecanismos relacionados con cambios en la microbiota intestinal, morfología histológica y absorción de nutrientes.

Las respuestas pueden cambiar dependiendo de la capacidad buffer de los ingredientes de la dieta y el tipo de ácidos suplementados en la dieta. Considerando los ácidos disponibles para suplementación animal, el ácido benzoico tiene un efecto más pronunciado en la inhibición de crecimiento bacterianos comparado con otros ácidos disponibles para alimentación animal. Las Carbohidrasas y proteasas suplementadas en las dietas para cerdos, además del efecto en la mejor absorción de nutrientes inducen cambios en la población de bacterias y favorecen una mejor morfología intestinal.

LITERATURA

- AAFCO. 1992. Official Publication. Assoc. Am. Feed Control Off, Oxford, IN.
- Almeida, F. N., and H. H. Stein. 2012. Effects of graded levels of microbial phytase on the standardized total tract digestibility of phosphorus in corn and corn coproducts fed to pigs. *J. Anim. Sci.* 90:1262-1269.
- Blank, R., R. Mosenthin, W. C. Sauer, and S. Huang. 1999. Effect of fumaric acid and dietary buffering capacity on ileal and fecal amino acid digestibilities in early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 77:2974-2984.
- Blum, A. L., J. Hegglin, G. J. Krejs, F. Largiadar, H. Sauberli, and P. Schmid. 1976. Gastric emptying of organic acids in the dog. *J. Physiol.* 261:285-299.
- Buhler, K., C. Wenk, J. Broz, S. Gebert. 2006. Influence of benzoic acid and dietary protein level on performance, nitrogen metabolism and urinary pH in growing-finishing pigs. *Arch Anim Nutr.* 60:382-389.
- Bockor, L., F. Dahlke, A. Maiorka, O. S. Castro, E. G. Oliveira, E. L. Krabbe, and M. B. Warpechowski. 2007. Comparison of buffering capacity measures on feedstuffs and diets for piglets. *Arch. Vet. Sci.* 12:71-76.
- Brandom, D. L. and M. Friedman. 2002. Immunoassays of soy proteins. *J. Agric. Food Chem.* 50:6635-6642.
- Che, T. M., O. Adeola, M. J. Azain, S. D. Carter, G. L. Cromwell, G. M. Hill, D. C. Mahan, P. S. Miller, and J. E. Pettigrew. 2012. Effect of dietary acids on growth performance of nursery pigs: a cooperative study. *J. Anim. Sci.* 90:4408-4413.

- Collins, T., C. Gerday, and G. Feller. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:3-23.
- Choct, M., and G. Annison. 1992. Anti-nutritive effect of wheat pentosans in broiler chickens: roles of viscosity and gut microflora. *Brit. Poult. Sci.* 33:821-834.
- Cunningham, H. M., and G. J. Brisson. 1957. The effect of proteolytic enzymes on the utilization of animal and plant proteins by newborn pigs and the response to predigested protein. *J Anim. Sci.* 16:568-572.
- Diao,H., P. Zheng, B. Yu, J. He, X. B. Mao, J. Yu, and D.W.Chen. 2014. Effects of dietary supplementation with benzoic acid on intestinal morphological structure and microflora in weaned piglets. *Livest. Sci.* 167: 249-256.
- Durmic, Z., D.W. Pethick, B.P. Mullan¹, H. Schulze^{2,3}, J.M. Accioly and D.J. Hampson. 2000 Extrusion of wheat or sorghum and/or addition of exogenous enzymes to pig diets influences the large intestinal microbiota but does not prevent development of swine dysentery following experimental challenge. *J. Appl. Microbiol.* 89:678-686
- Eisemann, J. H., and E. van Heugten. 2007. Response of pigs to dietary inclusion of formic acid and ammonium formate. *J. Anim. Sci.* 85:1530-1539.
- Eklund, T. 1985. Inhibition of microbial growth at different pH levels by benzoic and propionic acids and esters of p-hydroxybenzoic acid. *Int. J. Food Microbiol.* 2:59-167.
- Glitsø, V., K. Pontoppidan, I. Knap, and N. Ward. 2012. Development of a Feed Protease. *Industrial Biotechnology.* 8:172-175. doi: 10.1089/ind.2012.1531.
- Guggenbuhl, P., A. Séon, A. Piñón Quintana, C. Simões Nunes. 2007. Effects of dietary supplementation with benzoic acid (VevoVital®) on the zootechnical performance, the gastrointestinal microflora and the ileal digestibility of the young pig. *Livest. Sci.* 108:218-221.
- Guggenbuhl, P., Y. Waché, and J. W. Wilson. 2012. Effects of dietary supplementation with a protease on the apparent ileal digestibility of the weaned piglet. *J. Anim. Sci.* 90:152-154.
- Hayes, D. J., H. H. Jensen, L. Backstrom, J. Fabiosa. 2001. Economic impact of a ban on the use of over the counter antibiotics in U.S. swine rations. *International Food and Agribusiness Management Review.* 4: 81-97.

- Hedstrom, L. 2002. Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chem. Rev.* 102: 4501-4523.
- Holt, J. P., E. van Heugten, A. K. Graves, M. T. See, W. E. M Morrow. 2011. Growth performance and antibiotic tolerance patterns of nursery and finishing pigs fed growth-promoting levels of antibiotics. *Livest. Sci.* 136:184-191.
- Hunt, J. N., and M. T. Knox. 1969. The slowing gastric emptying by nine acids. *J. Physiol.* 201:161-179.
- International Union of Biochemistry and Molecular Biology. 1992. Enzyme nomenclature: recommendations of the nomenclature committee of International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes. Acad. Press, New York, NY.
- Jo, J. K., S. L. Ingale, J. S. Kim, Y. W. Kim, K. H. Kim, J. D. Lohakare, J. H. Lee, and B. J. Chae. 2012. Effects of exogenous enzyme supplementation to corn- and soybean meal-based or complex diets on growth performance, nutrient digestibility, and blood metabolites in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 90:3041-3048.
- Kemme, P. A., A. W. Jongbloed, Z. Mroz, J. Kogut, A. C. Beynen. 1999a. Digestibility of nutrients in growing–finishing pigs is affected by *Aspergillus niger* phytase, phytate and lactic acid levels. 1. Apparent ileal digestibility of amino acids. *Livest. Prod. Sci.* 58:107-117.
- Kemme, P. A., A. W. Jongbloed, Z. Mroz, J. Kogut, A. C. Beynen. 1999b. Digestibility of nutrients in growing-finishing pigs is affected by *Aspergillus niger* phytase, phytate and lactic acid levels 2. Apparent total tract digestibility of phosphorus, calcium and magnesium and ileal degradation of phytic acid. *Livest. Prod. Sci.* 58:119-127.
- Kluge, H., J. Broz, and K. Eder. 2006. Effect of benzoic acid on growth performance, nutrient digestibility, nitrogen balance, gastrointestinal microflora and parameters of microbial metabolism in piglets. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 90:316-324.
- Knarreborg, A., N. Miquel, T. Granli, B.B. Jensen. 2002. Establishment and application of an in vitro methodology to study the effects of organic acids on coliform and lactic acid bacteria in the proximal part of the gastrointestinal tract of piglets. *Anim. Feed Sci. Tech.* 99:131-140.

- Knudsen, K. E. B. 1997. Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. *Anim. Feed Sci. Tech.* 67:319-338.
- Levic, J., O. Prodanovic, and S. Sredanovic. 2005. Understanding the buffering capacity in feedstuffs. *Biotech. Anim. Husbandry.* 21:309-313.
- Li, Y., Z. Fang, J. Dai, G. Partridge, Y. Ru, and J. Peng. 2010. Corn extrusion and enzyme addition improves digestibility of corn/soy based diets by pigs: in vitro and in vivo studies. *Anim. Feed Sci. Tech.* 158:146-154.
- Liener, I. E. 1994. Implications of antinutritional components in soybean foods. *Crit. Rev. Food Sci.* 34:31-67.
- Mallo, J. J., A. Balfagón, M. I. Gracia, P. Honrubia and M. Puyalto. 2012. Evaluation of different protections of butyric acid aiming for release in the last part of the gastrointestinal tract of piglets. *J. Anim. Sci.* 90:227-229.
- Masey-O'Neill, H. V., J. A. Smith, and M. R. Bedford. 2014. Multicarbohydrase enzymes for non-ruminants. *Asian Austral. J. Anim. Sci.* 27:290-301.
- Mc Alpine, P. O., C. J. O'Shea, P. F. Varley, and J. V. O'Doherty. 2012b. The effect of protease and xylanase enzymes on growth performance and nutrient digestibility in finisher pigs. *J. Anim. Sci.* 90:375-377.
- Mesa, R. J., V. Blanc, A. R. Blanch, P. Cortés, J. J. Gonzáles, S. Lavilla, E. Miro, M. Muniesa, M. Saco, M. T. Tórtola, B. Mirelis, P. Coll, M. Llagostera, G. Prats, F. Navarro. 2006. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J. Antimicrob Chemother.* 58: 211-215.
- Moehm, S., J. K. A. Atakora, J. Sands, and R. O. Ball. 2007. Effect of phytase-xylanase supplementation to wheat-based diets on energy metabolism in growing-finishing pigs fed ad libitum. *Livest. Sci.* 109:271-274.
- Mroz, Z., A. W. Jongbloed, K. H. Partanen, K. Vreman, P. A. Kemme, and J. Kogut. 2000. The effects of calcium benzoate in diets with or without organic acids on dietary buffering capacity, apparent digestibility, retention of nutrients, and manure characteristics in swine. *J. Anim. Sci.* 78:2622-2632.
- Nortey, T. N., J. F. Patience, P. H. Simmins, N. L. Trottier, and R. T. Zijlstra. 2007. Effects of individual or combined xylanase and phytase supplementation on energy,

- amino acid, and phosphorus digestibility and growth performance of grower pigs fed wheat-based diets containing wheat millrun. *J. Anim. Sci.* 85:1432-1443.
- NRC. 2012. Nutrient requirements of swine. 11th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Omogbenigun, F. O., C. M. Nyachoti, and B. A. Slominski. 2003. The effect of supplementing microbial phytase and organic acids to a corn-soybean based diet fed to early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 81:1806-1813.
- Owusu-Asiedu, A., C. M. Nyachoti, and R. R. Marquardt. 2003. Response of early-weaned pigs to an enterotoxigenic *Escherichia coli* (K88) challenge when fed diets containing spray-dried porcine plasma or pea protein isolate plus egg yolk antibody, zinc oxide, fumaric acid, or antibiotic. *J. Anim. Sci.* 81:1790-1798.
- Paloheimo, M., J. Piironen, and J. Vehmaanpera. 2011. Xylanases and cellulases as feed additives. In: M. R. Bedford, and G. G. Partridge, editors, *Enzymes in farm animal nutrition* 2nd ed. CAB International, Wallingford, UK. p. 12-53.
- Passos, A. A., I. Park, P. Ferket, E. von Heimendahl, S. W. Kim. 2015. Effect of dietary supplementation of xylanase on apparent ileal digestibility of nutrients, viscosity of digesta, and intestinal morphology of growing pigs fed corn and soybean meal based diet. *Animal Nutrition* 1:19-23
- Pedersen, M.B., S. Yu, P. Plumstead, and S. Dalsgaard. 2012. Comparison of four feed proteases for improvement of nutritive value of poultry feather meal. *J. Anim. Sci.* 90:350-352.
- Piva, A., V. Pizzamiglio, M. Morlacchini, M. Tedeschi, and G. Piva. 2007. Lipid microencapsulation allows slow release of organic acids and natural identical flavors along the swine intestine. *J. Anim. Sci.*, 85:486-493.
- Qiao, S. Y., D. F. Li, J. Y. Jiang, H. J. Zhou, J. S. Li and P. A. Thacker. 2003. Effect of moist extruded full-fat soybeans on gut morphology and mucosal cell turnover rate (Time) of weanling pigs. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 16:63-69.
- Ray, B. 1992. Control by low pH and organic acids. In: B. Ray, editor, *Food Biopreservatives of Microbial Origin*. CRC Press, Boca Raton, FL. p.463-470.

- Risley, C. R., E. T. Kornegay, M. D. Lindemann, C. M. Wood, and W. N. Eigel. 1992. Effect of feeding organic acids on selected intestinal content measurements at varying times postweaning in pigs. *J. Anim. Sci.* 70:196-206.
- Sáens, Y., L Briñas, E. Domínguez, J. Ruiz, M. Zarazaga, J. Vila, C. Torres. 2004. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotics-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 48:3996-4001.
- Subramaniyan, S., and P. Prema. 2002. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *CRC Cr. Rev. Biotechn.* 22:33-64.
- Sun, P., D. F. Li, Z. J. Li, B. Dong and F. L. Wang. 2007. Effects of glycinin on IgE-mediated increase of mast cell numbers and histamine release in the small intestine. *J. Nutr. Biochem.* 19:627-633.
- Taylor, W. H. 1959. Studies on gastric proteolysis. *Biochem. J.* 71:627-632.
- Tervila-Wilo, A., T. Parkkonen, A. Morgan, M. Hopekoski-Nurminen, K. Poutanen, P. Heikkinen, and K. Autio. 1996. In vitro digestion of wheat microstructure with xylanase and cellulase from *Trichoderma reesei*. *J. Cereal Sci.* 24:215-225.
- Torrallardona, D., I. Badiola, and J. Broz. 2007. Effects of benzoic acid on performance and ecology of gastrointestinal microbiota in weanling piglets. *Livest. Sci.* 108:210-213.
- Yoo, J. S., H. D. Jang, J. H. Lee and I. H. Kim. 2009. Effect of fermented soy bean protein on nitrogen balance and apparent fecal and ileal digestibility in weaned pigs. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 22:1167-1173.
- Walsh, M. C., D. M. Sholly, R. B. Hinson, S. A. Trapp, A. L. Sutton, J. S. Radcliffe, J. W. Smith II, and B. T. Richert. 2007. Effects of acid LAC and Kem-Gest acid blends on growth performance and microbial shedding in weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 85:459-467.
- Wang, D., X. S. Piao, Z. K. Zeng, T. Lu, Q. Zhang, P. F. Li, L. F. Xue, and S. W. Kim. 2011a. Effects of keratinase on performance, nutrient utilization, intestinal morphology, intestinal ecology and inflammatory response of weaned piglets fed diets with different levels of crude protein. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 24:1718-1728
- Wang, D., Z. Zhikai, X. Piao, P. Li, L. Xue, Q. Zhang, X. Han, H. Zhang, B. Dong, and S. W. Kim. 2011b. Effects of keratinase supplementation of corn-soybean meal based

diets on apparent ileal amino acid digestibility in growing pigs and serum amino acids, cytokines, immunoglobulin levels and loin muscle area in nursery pigs. *Arch. Anim. Nutr.* 56:290-302.

Ward, N.E., B. A. Slominski, and S. R. Fernandez. 2008. Nontstarch polysaccharide content of corn grain. *Poultry Sci.* 87 (Suppl. 1): MP286.(Abstr)

Willamil, J., I. Badiola, E. Devillard, P. A. Geraert, and D. Torrallardona. 2012. Wheat-barley-rye- or corn-fed growing pigs respond differently to dietary supplementation with a carbohydrase complex. *J. Anim. Sci.* 90:824–832.

Woyengo, T. A., J. S. Sands, W. Guenter, and C. M. Nyachoti. 2008. Nutrient digestibility and performance responses of growing pigs fed phytase- and xylanase-supplemented wheat-based diets. *J. Anim. Sci.* 86:848-857.

Zhao, Y., Qin G, Sun Z, Zhang X, Bao N, Wang T, Zhang B, Zhang BL, Zhu D, Sun L. 2008. Disappearance of immunoreactive glycinin and b-conglycinin in the digestive tract of piglets. *Arch Anim Nutr.* 62:322–330.

Zanotto, D. L., A. L. Guidoni, A. A. Passos, J. Leczniesky, and G. J. M. M. Lima. 2010. Effects of exogenous enzymes and particle size on corn energy values for growing pigs. In: *Proceedings of the Allen D. Leman Swine Conference*, St. Paul, MN. p.195