

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 062**

51 Int. Cl.:

**A23K 1/00** (2006.01)

**A23K 1/16** (2006.01)

**A23K 1/18** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2009 E 09792339 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **22.06.2011 EP 2334196**

54 Título: **Croqueta de pienso para animales con un núcleo basado en proteínas y métodos relacionados**

30 Prioridad:

**11.09.2008 US 96127 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**16.01.2013**

73 Titular/es:

**THE IAMS COMPANY (100.0%)  
One Procter & Gamble Plaza  
Cincinnati, OH 45202, US**

72 Inventor/es:

**SUNVOLD, GREGORY DEAN;  
BRENT, JOHN LESLIE, JR.;  
CORRIGAN, PATRICK JOSEPH y  
HAYEK, MICHAEL GRIFFIN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 394 062 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Croqueta de pienso para animales con un núcleo basado en proteínas y métodos relacionados

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a croquetas de pienso para animales que tienen un núcleo basado en proteínas que está prácticamente exento de una matriz de almidón gelatinizado. En algunas realizaciones, la croqueta de pienso para animales puede también comprender al menos un recubrimiento activo sobre la superficie del núcleo basado en proteínas. En realizaciones específicas, el recubrimiento activo puede incluir un microorganismo probiótico. Otras realizaciones se refieren a recubrimientos de microorganismos probióticos y a los métodos para evaluar la bioactividad de los probióticos en las composiciones de alimento.

**10 Antecedentes de la invención**

Los piensos para animales del tipo croqueta, como los alimentos para perros y gatos, son productos alimenticios para animales domésticos secos listos para comer. Las croquetas se pueden formar mediante un proceso de extrusión en el que las materias primas de la croqueta se extruyen bajo calor y presión para conformar la forma de la croqueta aglomerada. La tecnología de extrusión proporciona un método barato y eficaz para formular croquetas de pienso para animales tales como las que tienen una matriz de almidón. Durante el proceso de extrusión, la matriz de almidón de forma típica gelatiniza en las condiciones de extrusión.

15 Los mecanismos de defensa para proteger el tracto gastrointestinal (GI) de los mamíferos frente a la colonización por bacterias patógenas son muy complejos. El tracto GI de la mayoría de mamíferos está colonizado por microflora natural y microorganismos patógenos invasivos. En un individuo saludable, esta microflora competitiva está en estado de equilibrio. La modificación del equilibrio de la microflora intestinal puede producir o evitar muchos trastornos GI, tanto en seres humanos como en otras especies de mamíferos, como animales de compañía incluidos, por ejemplo, gatos, perros y conejos. El bienestar de los animales de compañía está estrechamente relacionado con su alimentación y salud GI, y el mantenimiento del equilibrio de la microflora intestinal en estos animales puede dar como resultado animales domésticos más sanos.

20 El número y composición de la microflora intestinal suele ser estable, aunque la edad y la dieta pueden modificarlo. La actividad gástrica, la bilis, la peristalsis intestinal y la inmunidad local son factores que se consideran importantes en la regulación de la flora bacteriana en el intestino delgado de los seres humanos y en diversos mamíferos. A menudo, los trastornos del tracto gastrointestinal de los animales domésticos incluidos los de caninos y felinos, están asociados al exceso de crecimiento bacteriano y a la producción de enterotoxinas por parte de bacterias patógenas. Estos factores desestabilizan el equilibrio de la microflora intestinal y pueden fomentar la inflamación y respuestas inmunitarias aberrantes.

25 Durante los últimos años la investigación ha comenzado a resaltar algunas cepas valiosas de bacterias y su uso potencial como agentes probióticos. Los probióticos se consideran como preparados de bacterias, viables o muertas, los constituyentes de las mismas como, por ejemplo, proteínas o carbohidratos, o bien fracciones purificadas de fermentos bacterianos que estimulan la salud de los mamíferos preservando y/o promoviendo el desarrollo de la microflora natural del tracto GI, y reforzando los controles de las respuestas autoinmunes aberrantes.

30 Es una meta deseada mejorar la salud de los animales de compañía. Sin embargo, muchos de estos ingredientes pueden ser costosos, sensibles a los efectos de la extrusión u otros métodos de producción, y/o sensibles a la estabilidad del producto (exposición al oxígeno o a la humedad). Además, determinar si un probiótico en una composición alimenticia será bioactivo puede presentar problemas. Identificar nuevos diseños de producto que superen estos desafíos puede permitir productos que se fabriquen para satisfacer la meta de los consumidores de proporcionar ventajas de salud mejorada a sus animales de compañía. Así, existe la necesidad de mejorar las matrices de croquetas y de croquetas probióticas y de croquetas de pienso para animales para los animales de compañía. Además, también se necesitan métodos para evaluar la actividad probiótica.

**45 Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a una croqueta de pienso para animales que comprende: una matriz de núcleo basado en proteínas que tiene más de 70% en peso de una proteína vegetal, en el que el núcleo basado en proteínas está exento de una matriz de almidón gelatinizado; y al menos un recubrimiento que comprende una grasa y al menos un aditivo, en el que el recubrimiento está sobre una superficie del núcleo basado en proteínas.

50 La presente invención además abarca un método para conformar una croqueta de pienso para animales que comprende: extruir una matriz de núcleo basado en proteínas que tiene más de 70% en peso de una proteína vegetal, en el que el núcleo basado en proteínas está prácticamente exento de una matriz de almidón gelatinizado; y revestir al menos una parte de la matriz de núcleo basado en proteínas con un recubrimiento que comprende un probiótico.

Además, la presente invención abarca un pienso para animales domésticos del tipo croqueta que comprende: una primera croqueta que comprende: una fuente de proteína de 16% a 50% en peso de la primera croqueta; una fuente de grasa de 5% a 35% en peso de la primera croqueta; y una fuente de carbohidratos; y una segunda croqueta que comprende: una matriz de núcleo basado en proteínas que tiene más de 70% en peso de una proteína vegetal, en el que el núcleo basado en proteínas está exento de una matriz de almidón gelatinizado, en el que la segunda croqueta además comprende: al menos un recubrimiento activo de al menos una parte de una superficie de la matriz de núcleo basado en proteínas y en el que el al menos un recubrimiento activo es un recubrimiento enriquecido en probióticos.

### Breve descripción de los dibujos

Las diferentes realizaciones definidas en la Descripción de la invención se entenderán mejor con referencia a los siguientes dibujos, en los que:

Las Figuras 1-3 ilustran diagramas de flujo que representan las etapas asociadas a las diferentes realizaciones de los métodos para evaluar la bioactividad de una composición alimenticia probiótica.

### Descripción detallada de la invención

#### Definiciones

En la presente memoria, el término “que comprende” significa diferentes componentes utilizados conjuntamente para preparar las composiciones de la presente descripción. Por tanto, las expresiones “que esencialmente consiste en” y “que consiste en” están incluidas en la expresión “que comprende”.

En la presente memoria se entenderá que los artículos que incluyen “el/la”, “un/a”, cuando se usan en una reivindicación o en la memoria descriptiva, se refieren a uno o más de aquello que se reivindica o que se describe.

Según se usa en la presente memoria, las expresiones “incluyen”, “incluye” e “incluidos” deben entenderse como no limitativas.

En la presente memoria, el término “pluralidad” significa más de uno.

En la presente memoria, el término “almidón gelatinizado” incluye almidón que se ha calentado en presencia de agua, de forma que los sitios de los puentes de hidrógeno de la cadena principal de anhidroglucosa del almidón encajan con un puente de hidrógeno con un número superior de moléculas de agua resultando en una estructura más amorfa y menos cristalina.

En la presente memoria, el término “matriz” cuando se usa en referencia al componente de una croqueta, significa que el componente forma una red continua a través de la parte de la croqueta, por ejemplo, el núcleo de la croqueta.

En la presente memoria, el término “prácticamente exento” cuando se usa en referencia al almidón gelatinizado significa que la matriz de núcleo incluye menos del 10% en peso de almidón gelatinizado, o incluso menos del 5% en peso de almidón gelatinizado.

En la presente memoria, el término “croqueta” solo incluye un componente en forma de microgránulo en forma de partículas de piensos animales, tales como piensos para perros y gatos, de forma típica con un contenido en humedad inferior al 12% en peso. Las croquetas pueden tener un intervalo de texturas de dura a blanda. Las croquetas pueden tener un intervalo de estructuras internas de expandida a densa. Las croquetas pueden conformarse mediante un proceso de extrusión.

En la presente memoria, los términos “probiótico” u “organismo probiótico” significan bacterias u otros microorganismos, viables o muertos, sus constituyentes como proteínas o carbohidratos, o fracciones purificadas de fermentos bacterianos, incluyendo aquellos en estado latente y esporas, que son capaces de estimular la salud de mamíferos conservando y/o estimulando la microflora natural del tracto GI, y reforzando los controles normales de las respuestas inmunes aberrantes.

En la presente memoria, el término “enriquecido” significa un objeto o estructura que tiene una cantidad mayor del componente enriquecido en comparación con un objeto o estructura no enriquecida en dicho componente. Según algunas realizaciones, un objeto o estructura enriquecidos tendrá al menos un 5% más del componente enriquecido en comparación con el objeto o estructura no enriquecidos.

En la presente memoria el término “animal” y “animal doméstico” significa un animal domesticado incluyendo aunque no de forma limitativa animales domésticos como perros, gatos, caballos, vacas, hurones, conejos, cerdos y similares. Los perros y gatos domésticos son ejemplos concretos de animales domésticos.

En la presente memoria, los términos “pienso animal”, “composiciones de pienso animal”, “croqueta de pienso para animales”, “pienso para animales domésticos” o “composición alimenticia para animales domésticos” significa una

composición prevista para que sea ingerida por un animal doméstico. Los piensos para animales domésticos pueden incluir, sin limitación, composiciones nutricionalmente equilibradas adecuadas para la alimentación diaria, así como suplementos (p. ej., golosinas) que pueden ser nutricionalmente equilibrados o no.

5 Salvo que se indique lo contrario, todos los niveles del componente o de la composición se refieren a una parte activa de ese componente o composición, y son excluyentes de impurezas, por ejemplo, disolventes residuales o subproductos, que puedan estar presentes en las fuentes comerciales de dichos componentes o composiciones.

Todos los porcentajes y relaciones se calculan en peso salvo que se indique lo contrario. Todos los porcentajes y relaciones se calculan basados en la composición total salvo que se indique lo contrario.

10 Debe entenderse que cada limitación máxima numérica dada en esta memoria descriptiva incluye cada limitación numérica inferior, tal como si las limitaciones numéricas inferiores estuvieran expresadas por escrito en la presente memoria. Cada limitación numérica mínima dada en esta memoria descriptiva incluirá cada limitación numérica superior, tal como si las limitaciones numéricas superiores estuvieran expresadas por escrito en la presente memoria. Cada intervalo numérico dado a lo largo de toda esta memoria descriptiva incluirá cada intervalo numérico más limitado que esté dentro de dicho intervalo numérico más amplio, como si dichos intervalos numéricos más limitados estuvieran todos expresamente indicados en la presente memoria.

15 En la presente memoria se pueden mencionar nombres comerciales para componentes que incluyen diferentes ingredientes utilizados en la presente descripción. Los inventores de la presente invención no pretenden limitarse a materiales con un determinado nombre comercial. En las descripciones de la presente memoria se pueden sustituir y utilizar materiales equivalentes (p. ej., aquellos obtenidos de una fuente diferente con un nombre o número de referencia diferentes).

20 En la descripción de las diferentes realizaciones de la presente descripción, se describen varias realizaciones o rasgos individuales. Como resultará evidente para el técnico en la materia, puede realizarse cualquier combinación de estas realizaciones y características para obtener ejecuciones preferidas de la presente descripción. Aunque se han ilustrado y descrito varias realizaciones y características individuales de la presente invención, se pueden realizar diversos cambios y modificaciones sin por ello abandonar el espíritu y el ámbito de la invención. Como también resultará evidente, puede realizarse cualquier combinación de las realizaciones y características descritas en la anterior descripción para obtener realizaciones preferidas de la invención.

#### Croquetas con núcleo basado en proteínas vegetales

30 Varias realizaciones no limitantes de la presente descripción incluyen una croqueta de pienso para animales que comprende una matriz de núcleo basada en proteínas que está prácticamente exenta de una matriz de almidón gelatinizado. Otras realizaciones incluyen métodos para conformar las composiciones para croquetas de pienso para animales descritas en la presente memoria. Otras realizaciones adicionales de la presente descripción incluyen pienso para animales domésticos del tipo croqueta. En realizaciones específicas, la croqueta de pienso para animales puede estar diseñada para incorporar un recubrimiento que comprende al menos un aditivo, tal como, aunque no de forma limitativa un probiótico y otra sustancia biológica.

35 Según la presente descripción se proporciona una croqueta de pienso para animales que comprende una matriz de núcleo basado en proteínas que tiene más de 70% en peso de una proteína sustancialmente vegetal, en el que el núcleo basado en proteínas está prácticamente exento de una matriz de almidón gelatinizado; y al menos un recubrimiento que comprende una grasa y al menos un aditivo, en el que el recubrimiento está sobre una superficie del núcleo basado en proteínas. En realizaciones específicas, la matriz de núcleo basado en proteínas puede comprender más de 80% en peso de una proteína vegetal. En otras realizaciones adicionales, la matriz de núcleo basado en proteínas puede comprender más de 85%, 90% o incluso 95% en peso de una proteína vegetal. Los ejemplos específicos de proteínas vegetales incluyen proteína derivada de vegetal que esté prácticamente exenta o se pueda modificar o fabricar para que esté prácticamente exenta de almidón gelatinizado. Los ejemplos de proteínas vegetales adecuados para usar en las diferentes realizaciones de la presente descripción incluyen, aunque no de forma limitativa, granos secos para destilar ("DDG"), granos secos para destilar solubles ("DDGS"), 40 concentrado de proteína de maíz ("CPC"), grano molido grueso de gluten de maíz ("CGM"), aislado de proteína de soja ("SPI"), concentrado de proteína de soja ("SPC"), gluten de trigo ("WG"), aislado de proteína de arroz ("RPI"), concentrado de proteína de arroz ("RPC"), concentrado de proteína de sorgo ("SorgPC"), concentrado de proteína de avena ("OPC"), concentrado de proteína de cebada ("BPC"), y combinaciones de cualquiera de los anteriores. En realizaciones concretas, la proteína vegetal puede ser DDGS, CPC, o SPI. En una realización específica, la proteína vegetal puede ser CPC.

55 La proteína de base animal es un componente habitual de piensos animales, especialmente para animales carnívoros u omnívoros. Sin embargo, algunas croquetas basadas en proteínas animales pueden contener compuestos y componentes específicos que proporcionen al pienso animal un olor no deseable. Los piensos animales con aromas deseables pueden atraer al animal a comer un producto nutritivo y puede ser agradable para el dueño del animal doméstico, como en el caso de animales de compañía. Algunas realizaciones de las croquetas

5 basadas en proteínas vegetales de la presente descripción pueden mostrar una reducción de componentes malolientes, tales como ácidos carboxílicos de cadena corta, por ejemplo el ácido 3-metil butanoico, ácido butanoico, ácido pentanoico y ácido hexanoico, que se pueden producir en ciertas fuentes de proteína animal. Además, las fuentes de proteína de carne pueden desarrollar un aroma a grasa oxidada, típico de la grasa rancia. Los compuestos malolientes procedentes de la oxidación de los lípidos pueden incluir, por ejemplo, algunos aldehídos, furanos, productos de la oxidación de alcoholes y cetonas. Las croquetas basadas en proteínas vegetales pueden tener poca grasa y las pequeñas cantidades de grasa en el núcleo de la croqueta de proteínas vegetal pueden ser una grasa pura más estable (por ejemplo, en forma purificada, o con antioxidantes, procedente de una fuente comercial) de forma que dicha croqueta sea menos propensa a desarrollar malos olores asociados con la oxidación de las grasas. De este modo, las croquetas formadas a partir de una matriz de núcleo basado en proteínas vegetales puede mostrar algunas ventajas, como un aroma deseable y un período de validez viable más prolongado, respecto de las croquetas basadas en proteínas animales.

15 Las proteínas basadas en vegetales no se han usado tradicionalmente de forma exclusiva como el componente proteico en piensos animales y piensos para animales domésticos. Esto puede ser especialmente cierto para los piensos animales del tipo croqueta debido a problemas de estabilidad y formulación. Las proteínas vegetales, tales como DDGS, CPC, CGM, SPI, y SPC se encuentran fácilmente comercializadas por fabricantes y productores agrícolas, y algunas proteínas vegetales, tales como por ejemplo, DDG y DDGS, CPC, CGM puede ser subproductos de operaciones de fabricación tales como la producción de etanol. Así, las proteínas basadas en vegetales pueden proporcionar una fuente de proteínas fácilmente disponible y barata.

20 En realizaciones específicas, la croqueta comprende de 25% a 99,99% en peso de la matriz de núcleo basado en proteínas. En otras realizaciones, la croqueta comprende de 50% a 99% en peso de la matriz de núcleo basado en proteínas. Las realizaciones específicas de las croquetas según la presente descripción puede incluir una matriz de núcleo basado en proteínas que puede también comprender uno o más ingredientes adicionales, tales como ingredientes que pueden mejorar el procesamiento, estabilidad, y/o gusto, o proporcionar necesidades nutritivas específicas. Por ejemplo, la matriz de núcleo basado en proteínas puede también comprender al menos uno de los sólidos de jarabe de maíz, minerales, vitaminas, prebióticos (p. ej., fructooligosacáridos, oligofructosacáridos, inulina, achicoria, xilooligosacáridos, mananoligosacáridos, lactosacarosa, galactooligosacáridos, o almidón resistente), aceites vegetales, grasas animales, aceites de pescado, aceites minerales, aminoácidos, fibras, proteínas animales, proteínas de pescado, emulsionantes, coadyuvantes de procesamiento, humectantes y dextrinas.

30 En muchas aplicaciones, se debe agregar almidón al componente proteico del pienso en croquetas para mejorar la estabilidad, tal como para retener los componentes en la forma de la croqueta. En algunas aplicaciones, puede ser deseable proporcionar una croqueta que esté prácticamente exenta de almidón. Sin embargo, la formulación de una croqueta, como una croqueta basada en proteínas sin almidón no es algo directo ya que se reduce la estabilidad de la croqueta sin el almidón. Los inventores de las diferentes realizaciones de la presente descripción han desarrollado metodologías para producir una croqueta extruida con matriz de núcleo basado en proteínas que está prácticamente exento de una matriz de almidón gelatinizado y en donde la croqueta tiene más de 70% en peso de una proteína vegetal. Así, una realización de la presente descripción proporciona una matriz de núcleo basado en proteínas, en donde el núcleo basado en proteínas está prácticamente exento de una matriz de almidón gelatinizado. Las realizaciones específicas pueden comprender un núcleo basado en proteínas que tenga menos del 5%, 2%, 1%, o incluso 0,5% en peso de almidón gelatinizado. En otras realizaciones adicionales, la matriz de núcleo basado en proteínas puede estar prácticamente exenta de almidón gelatinizado. En la presente memoria, el término “prácticamente exento” cuando se usa en referencia a la concentración de un componente específico en una composición significa menos de una cantidad mensurable usando métodos de medida de la concentración habituales en la técnica.

45 Varias realizaciones de la presente descripción pueden proporcionar además una croqueta de pienso para animales que comprende al menos un recubrimiento que comprende al menos un aditivo. Como se describe en la presente memoria, cuando se dice que un recubrimiento está sobre la superficie de la matriz del núcleo, el recubrimiento puede estar bien directamente en contacto con la matriz de núcleo basado en proteínas o bien en contacto con uno o más recubrimientos intermedios sobre la matriz de núcleo basado en proteínas (es decir, como una capa específica en una serie de capas de recubrimiento sobre la superficie de la matriz del núcleo). En realizaciones específicas, el recubrimiento puede comprender una grasa además del al menos un aditivo.

55 En algunas realizaciones, el al menos un recubrimiento también comprende al menos un recubrimiento activo sobre la superficie de la matriz de núcleo basado en proteínas. En la presente memoria, el término “sustancia activa” significa un recubrimiento que comprende un componente activo, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, componentes que pueden transmitir alguna ventaja deseada para la nutrición o la salud del animal que consume el pienso animal o puede transmitir alguna ventaja estética o de sabor al pienso animal. Los ejemplos de componentes activos que se pueden incorporar o añadir a los recubrimientos activos incluyen, aunque no de forma limitativa, fructooligosacáridos (FOS), pasta de remolacha, mananoligosacáridos (MOS), achicoria, fibra de avena, pasta de cítricos, carboximetilcelulosa (CMC), goma guar, goma arábiga, orujo de manzana, fibra de cítricos, extractos de fibra, derivados de fibra, fibra de remolacha seca (con el azúcar extraído), celulosas,  $\alpha$ -celulosa, galactooligosacáridos, xilooligosacáridos, oligoderivados de almidón, inulina, psyllium, pectinas, pectina de cítricos,

5 goma xantano, alginatos, goma talha, beta-glucanos, quitinas, lignina, polisacáridos no de almidón, carragenato, almidón reducido, oligosacáridos de soja, trehalosa, rafinosa, estaquirosa, lactulosa, polidextrosa, oligodextrano, gentiilosacárido, oligosacárido péctico, monosacáridos, disacáridos, hemicelulosa, grano molido grueso de pollo, pollo, subproductos de grano molido grueso de pollo, cordero, grano molido grueso de cordero, pavo, grano molido grueso de pavo, ternera, subproductos de ternera, vísceras, grano molido grueso de pescado, intestinos, canguro, pescado blanco, carne de venado, grano molido grueso de soja, aislado de proteína de soja, concentrado de proteína de soja, grano molido grueso de gluten de maíz, concentrado de proteína de maíz, granos solubles secos destilados, cereales, granos, maíz, trigo, arroz, avena, sémola de maíz, sorgo, sorgo en grano, mijo, salvado de trigo, salvado de avena, amaranto, trigo duro, semolina, grasa de aves de corral, grasa de pollo, grasa de pavo,
 10 grasa de cerdo, manteca de cerdo, sebo, grasa de ternera, aceites vegetales, grasa de ternera, aceite de maíz, aceite de soja, aceite de algodón, aceite de palma, aceite de almendra de palma, aceite de lino, aceite de canola, aceite de colza, aceite de pescado, aceite de menhaden, aceite anchoa, olestra, selenito de sodio, fosfato monosódico, carbonato de calcio, cloruro de potasio, sulfato ferroso, óxido de cinc, cloruro de cinc, sulfato de manganeso, sulfato de cobre, óxido de manganeso, yoduro de potasio, carbonato de cobalto, citrato de potasio,
 15 carbonato de calcio, cloruro de calcio, bisulfato de sodio, cloruro estannoso, fluoruro estannoso, fluoruro de sodio, cloruro de colina, suplemento de vitamina E, ácido ascórbico, acetato de vitamina A, pantotenato de calcio, ácido pantoténico, biotina, mononitrato de tiamina (fuente de vitamina B1), suplemento de vitamina B12, niacina, suplemento de riboflavina (fuente de vitamina B2), inositol, hidrocloreto de piridoxina suplemento de (fuente de vitamina B6), suplemento de vitamina D3, ácido fólico, vitamina C, caldo de ternera, levadura de cerveza seca,
 20 huevo, productos de huevo, grano molido grueso de lino, DL metionina, aminoácidos, cistina, l-triptófano, taurina, carnosina, alanina, cisteína, arginina, metionina, triptófano, lisina, asparagina, ácido aspártico, fenilalanina, valina, treonina, isoleucina, histidina, leucina, glicina, glutamina, tirosina, homocisteína, ornitina, citrulina, ácido glutámico, prolina, serina, polifosfatos, hexametáfosfato de sodio (SHMP), pirofosfato de sodio, tripolifosfato de sodio, gluconato de cobre, triclosano, hidrocloreto de glucosamina, sulfato de condroitina, mejillón verde, mejillón azul, metil sulfonilo metano (MSM), boro, ácido bórico, fitoestrógenos, fitoandrógenos, genisteína, diadzeína, L-carnitina, picolinato de cromo, tripicolinato de cromo, nicotinato de cromo, antimetabolitos de la glucosa, 2-deoxi-D-glucosa, 5-tio-D-glucosa, 3-O-metilglucosa, alcoholes de anhidroazúcar, 1,5-anhidro-D-glucitol, 2,5-anhidro-D-glucitol, 2,5-anhidro-D-manitol,
 25 manoheptulosa, extracto de aguacate que comprende manoheptulosa, modificadores ácido/base, eucalipto, lavanda, menta, extracto de té, extracto de romero, ácido romarínico, extracto de café, ácido cafeico, extracto de cúrcuma, extracto de arándano, extracto de uva, extracto de semilla de uva, extracto de soja, luteína, astaxantina, zeaxantina, bixina, licopeno, beta-caroteno, tocoferoles (vitamina E), vitamina C, vitamina A, materiales vegetales, carotenoides, selenio, co-enzima Q10, ácido araquidónico, ácido alfa-linoleico, ácido gamma linoléico, ácido linoleico, ácido eicosapentanoico, ácido (EPA), ácido docosahexanoico, ácido (DHA) ácido, aceites de pescado enriquecidos en ácidos grasos omega-3, plastificantes, colorantes, aromatizantes, endulzantes, agentes tamponadores, agentes de deslizamiento, vehículos, agentes de ajuste del pH, ingredientes naturales, estabilizantes, aditivos biológicos,
 35 enzimas, proteasas, lipasas, aditivos químicos, refrigerantes, quelantes, desnaturalizantes, fármacos astringentes, emulsionantes, analgésicos externos, compuestos de fragancia, humectantes, agentes opacantes, óxido de cinc, dióxido de titanio, agentes antiespumantes, silicona, conservantes, hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA), galato de propilo, cloruro de benzalconio, EDTA, alcohol bencílico, sorbato de potasio, parabenos, agentes reductores, disolventes, hidrótrofos, agentes solubilizantes, agentes suspensores no tensionactivos, disolventes, agentes acuosos y no acuosos que incrementan la viscosidad, secuestrantes, queratolíticos, colorantes naturales, colorantes sintéticos, y combinaciones de cualquiera de los mismos.

45 Otras realizaciones de la presente descripción pueden comprender croquetas de pienso para animales en donde el al menos un recubrimiento puede comprender al menos un recubrimiento biológico sobre la superficie de la matriz de núcleo basado en proteínas. Los agentes biológicos adecuados contienen, por ejemplo, aunque no de forma limitativa enzimas, anticuerpos, inmunoglobulinas, citoquinas, agentes epigenéticos, y microorganismos y materiales probióticos. En realizaciones específicas, el recubrimiento biológico puede comprender al menos un recubrimiento enriquecido en probióticos. El recubrimiento enriquecido en probióticos puede comprender una sustancia biológica o probiótica seleccionada del grupo que consiste en un componente probiótico que tiene un recuento de
 50 microorganismos probióticos de al menos  $10^5$  CFU/gramo del recubrimiento, levadura, enzimas, anticuerpos, inmunoglobulinas, citoquinas, agentes epigenéticos, y combinaciones de los mismos. En otras realizaciones, el probiótico se puede medir en referencia al peso de la croqueta. Según estas realizaciones, el componente probiótico puede tener un recuento de microorganismos probióticos de al menos  $10^4$  UFC/gramo de la croqueta.

55 El recubrimiento enriquecido en probióticos según realizaciones específicas puede comprender uno o más microorganismos probióticos específicos bacterianos adecuados para el consumo por animales domésticos y eficaces para mejorar el equilibrio microbiano en el tracto gastrointestinal del animal doméstico o para otras ventajas, tales como el alivio o profilaxis de enfermedades o dolencias que pueda tener el animal doméstico. Son adecuados para su uso en la presente invención varios microorganismos probióticos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo WO 03/075676, y la solicitud publicada n.º US-2006/0228448A1. En realizaciones específicas, el
 60 componente probiótico puede seleccionarse de bacterias, levadura o microorganismos de los géneros *Bacillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* (p. ej., *Enterococcus faecium* DSM 10663 y *Enterococcus faecium* SF68), *Lactobacillus*, *Leuconostroc*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Streptococcus*, y mezclas de cualquiera de los mismos. En otras realizaciones, el probiótico puede seleccionarse de los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, y

combinaciones de los mismos. Las del género *bacilo* pueden formar esporas. En otras realizaciones, el probiótico no forma esporas. Los ejemplos no limitativos de bacterias de ácido láctico adecuadas para su uso en la presente invención se incluyen cepas de *streptococcus lactis*, *streptococcus cremoris*, *streptococcus diacetylactis*, *streptococcus thermophilus*, *lactobacillus bulgaricus*, *lactobacillus acidophilus* (p. ej., cepa de *lactobacillus acidophilus* DSM 13241), *lactobacillus helveticus*, *lactobacillus bifidus*, *lactobacillus casei*, *lactobacillus lactis*, *lactobacillus plantarum*, *lactobacillus rhamnosus*, *lactobacillus delbrukii*, *lactobacillus thermophilus*, *lactobacillus fermentii*, *lactobacillus salvarius*, *lactobacillus reuteri*, *bifidobacterium longum*, *bifidobacterium infantis*, *bifidobacterium bifidum*, *bifidobacterium animalis*, *bifidobacterium pseudolongum*, y *pediococcus cerevisiae*, o mezclas de cualquiera de las mismas. En realizaciones específicas, el recubrimiento enriquecido en probióticos puede comprender la cepa bacteriana *Bifidobacterium animalis* AHC7 NCIMB 41199. Otras realizaciones del recubrimiento enriquecido en probióticos puede incluir uno o más de los microorganismos identificados en las solicitudes con n.º US-2005/0152884A1, US-2005/0158294A1, US-2005/0158293A1, US-2005/0175598A1, US-2006/0269534A1 y US-2006/0270020A1 y en la publicación internacional PCT n.º WO 2005/060707A2.

En determinadas realizaciones, el recubrimiento enriquecido en probióticos puede tener un recuento en microorganismos probióticos viables de al menos de aproximadamente  $10^4$  unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de croqueta, o al menos de aproximadamente  $10^5$  UFC por gramo de croqueta, o al menos de aproximadamente  $10^7$  UFC por gramo de croqueta. Por ejemplo, el recubrimiento puede tener un recuento en microorganismos probióticos viables de hasta aproximadamente  $10^{11}$  UFC por gramo de croqueta, o de hasta aproximadamente  $10^9$  UFC por gramo de croqueta, o de hasta aproximadamente  $10^8$  CFU por gramo de croqueta. Las enumeraciones definidas por las UFC se determinan con métodos como los descritos en la publicación n.º US-2006/0228448A1. De forma ventajosa, los recubrimientos enriquecidos en probióticos que se proporcionan en la presente memoria tienen un período de validez de, al menos, aproximadamente tres meses, de forma alternativa de, al menos, aproximadamente seis meses, de forma alternativa de aproximadamente tres meses a aproximadamente veinticuatro meses, de forma alternativa de aproximadamente seis meses aproximadamente dieciocho meses. En realizaciones específicas, los recubrimientos enriquecidos en probióticos pueden tener un período de validez de al menos 16 meses. En la presente memoria, el “término período” de validez se refiere a la propiedad del segundo componente donde 1% o más, de forma alternativa 5% o más, de forma alternativa 10% o más, de forma alternativa 25% o más, de forma alternativa 50% o más, de forma alternativa 75% o más, de los microorganismos probióticos del recubrimiento enriquecido en probióticos son viables en el período de tiempo mencionado después de la exposición a condiciones ambientales.

En realizaciones específicas, el recubrimiento enriquecido en probióticos puede comprender una levadura. Se puede utilizar cualquier variedad de levadura, y será bien conocida en la técnica, como las del género *Saccharomyces* (que incluyen, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* (en ocasiones denominada Levadura de panadería) “,” y “*Candida utilis* (a la que también se denomina *Torulopsis utilis*). En la presente memoria, la levadura incluye, aunque no de forma limitativa, aquellas levaduras que incorporan uno o más componentes integrados en el medioambiente en el que se cultivan, como la levadura enriquecida con minerales. Varios procesos de fermentación son bien conocidos en la técnica.

En otras realizaciones, el recubrimiento enriquecido en probióticos puede comprender una o más enzimas. Las enzimas especialmente incluyen aquellas que tienen una actividad biológica benéfica en un animal doméstico, como las enzimas digestivas u otras enzimas terapéuticas. Entre los ejemplos no limitativos se incluyen proteasas, colagenasas, lipasas, amilasas, celulasas, lisozimas, candidasas, lactasas, quinasas, invertasas, galactosidasas, pectinasas, ribonucleasas (incluyendo las deoxiribonucleasas) y combinaciones de las mismas.

En otras realizaciones, el recubrimiento enriquecido en probióticos puede comprender uno o más anticuerpos. En los recubrimientos de la presente memoria se pueden usar anticuerpos contra virus, bacterias patógenas, parásitos, o similares. Los ejemplos no limitativos incluyen anticuerpos contra la rinotraqueítis felina, la panleucopenia felina, el calicivirus felino, la pneumonitis felina, la leucemia felina, el moquillo canino, el parvovirus canino, el coronavirus, *Borrelia burgdorferi* (Lyme Disease), *Toxoplasma gondii*, *E. coli*, campylobacter, *salmonella*, *clostridia*, bacteriodes, giardia, tenia, lombrices, coccidios, cistopsporidio, y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, el recubrimiento enriquecido en probióticos puede comprender una o más inmunoglobulinas. Entre los ejemplos no limitativos se incluyen la inmunoglobulina A (IgA), la inmunoglobulina M (IgM), la inmunoglobulina G (IgG) y combinaciones de las mismas. En otras realizaciones, el recubrimiento enriquecido en probióticos puede comprender una o más citoquinas. Los ejemplos no limitativos incluyen el factor del crecimiento transformante beta (TGF-beta), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), interleucina-4, interleucina-10, interleucina-12, y combinaciones de los mismos.

El recubrimiento enriquecido en probióticos también puede comprender un prebiótico. El término “prebiótico” incluye sustancias o compuestos que son fermentados por la flora intestinal del animal doméstico y, por lo tanto, estimulan el crecimiento o desarrollo de las bacterias de ácido láctico en el tracto gastrointestinal del animal doméstico a expensas de las bacterias patógenas. El resultado de esta fermentación puede incluir una liberación de ácidos grasos, en especial ácidos grasos de cadena corta en el colon. Esto puede tener el efecto de reducir el valor del pH en el colon. Entre los ejemplos no limitativos de prebióticos adecuados se incluyen los oligosacáridos, como la

inulina y sus productos de hidrólisis, oligofructosa, fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, xilo-oligosacáridos u oligoderivados del almidón. Los prebióticos pueden ser suministrados en cualquier forma que sea adecuada. Por ejemplo, el prebiótico puede ser suministrado en forma de material vegetal que contiene la fibra. Entre los materiales vegetales adecuados se incluyen los espárragos, las alcachofas, las cebollas, el trigo o las achicorías, o residuos de estos materiales vegetales. De forma alternativa, la fibra prebiótica se puede suministrar como un extracto de inulina, por ejemplo los extractos de achicoria son adecuados. Los extractos de inulina adecuados se pueden obtener de Orafti SA de Tirlmont 3300, Bélgica bajo el nombre comercial RAFTILINE. De forma alternativa, la fibra puede estar en forma de fructooligosacárido como el que se obtiene de Orafti SA de Tirlmont 3300, Bélgica bajo la marca comercial RAFTILOSE. Por otra parte, los fructooligosacáridos se pueden obtener hidrolizando la inulina, mediante métodos enzimáticos o utilizando microorganismos.

En realizaciones específicas, la croqueta de pienso para animales de la presente descripción puede comprender de 0,01% a 75% en peso del recubrimiento enriquecido en probióticos. En otras realizaciones, la croqueta puede comprender de 0,3% a 50% o de 0,4% a 25% en peso del recubrimiento enriquecido en probióticos. La cantidad del recubrimiento enriquecido en probióticos utilizado en una realización concreta de la croqueta de pienso para animales puede depender de una variedad de factores, tales como, aunque no de forma limitativa, el tipo o tipos de probióticos, la dieta del animal, las necesidades nutritivas del animal, y/o la formulación del pienso animal. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el pienso animal o la dieta animal puede comprender principalmente las croquetas según la presente descripción. En ese caso, la croqueta puede comprender menor concentración porcentual (en peso) del recubrimiento enriquecido en probióticos. En otras realizaciones, el pienso animal o la dieta puede comprender uno o más de otros ingredientes. Por ejemplo, la presente descripción contempla un pienso animal que comprende dos o más ingredientes tipo croqueta, incluyendo una croqueta activa con una matriz de núcleo basado en proteínas vegetales que está prácticamente exenta de almidón gelatinizado y al menos un recubrimiento enriquecido en probióticos (como se describe con más detalle en la presente memoria) y una o más croquetas tradicionales. En ese caso, la croqueta activa puede comprender una concentración porcentual (en peso) superior del recubrimiento enriquecido en probióticos. La concentración del recubrimiento enriquecido en probióticos incluido en la croqueta se puede determinar fácilmente a partir de la cantidad de probiótico (u otro ingrediente activo) que se desee administrar al animal.

Los materiales del recubrimiento para usar en los recubrimientos activos, tal como un recubrimiento enriquecido en probióticos descrito en la presente memoria, puede mostrar características y rasgos tales como proporcionar estabilidad (como se describe con más detalle en la presente memoria) al ingrediente o ingredientes activo(s), del recubrimiento. Además, como se describe en la presente memoria, si el recubrimiento es un recubrimiento enriquecido en probióticos, el recubrimiento puede formularse también para asegurar que se liberan suficientes microorganismos probióticos en el sistema digestivo del animal (es decir, los probióticos se vuelven bioactivos). Las composiciones de recubrimiento adecuadas para usar en las diferentes realizaciones de la croqueta con un núcleo basado en proteínas y un recubrimiento activo incluyen, aunque no de forma limitativa, manteca de cacao, aceite de almendra de palma, aceite de palma, aceite de algodón, aceite de soja, aceite de canola, aceite de colza, aceite de cacahuete, aceite de manteca, derivados hidrogenados y parcialmente hidrogenados de aceites y grasas (incluyendo los relacionados en la presente memoria), cera, parafina, cera de parafina, aceite de parafina, parafina líquida, parafina sólida, cera candelilla, cera carnaúba, cera microcristalina, cera de abejas, ácidos grasos de cadena larga y ésteres de los mismos, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido láurico, ácido behénico, ácido adípico, glicerol de acetil acilo, monoglicérido acetilado, goma laca, goma laca sin cera, trioleína, chocolate, solución de chocolate, chocolate con leche dulce, sólidos del cacao, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, monoestearato de glicerol, polietilenglicol, pectina, gluten de trigo, lecitina de soja, caseinato de sodio, aislado de proteína de suero, concentrado de proteína de suero, alcohol estearílico, alcohol cetílico, alcohol behenílico, olestra, tristearina, grasa animal, grasa de aves de corral, y mezclas de cualquiera de los mismos. En otras realizaciones, el al menos un recubrimiento adicional puede comprender uno o más aceites vegetales parcialmente hidrogenados o aceites vegetales con un contenido elevado en grasas saturadas (es decir, aceite vegetal que sea sustancialmente sólido a temperatura ambiente). Por ejemplo, el al menos un recubrimiento adicional puede comprender un recubrimiento, que comprende aceite vegetal parcialmente hidrogenado sobre al menos una parte de una superficie del recubrimiento activo o un recubrimiento sobre al menos una parte de una superficie de uno o más recubrimientos intermedios sobre la superficie del recubrimiento activo. Un recubrimiento que comprende aceite vegetal parcialmente hidrogenado puede ayudar en la estabilidad de la croqueta y del probiótico, aumentando de esta forma el período de validez del pienso animal. Por ejemplo, el aceite vegetal parcialmente hidrogenado, tal como aceite de soja, aceite de maíz, aceite de algodón, manteca de cacao, aceite de almendra de palma, aceite de palma, aceite de canola, aceite de colza, aceite de cacahuete, aceite de manteca, y similares (incluyendo mezclas de aceites) pueden evitar la transmisión de agua, la oxidación, u otros procesos de degradación. Los ejemplos adecuados de componentes con una temperatura de punto de fusión superior que se pueden usar como agente de recubrimiento incluyen, aunque no de forma limitativa, a ceras tales como aunque no de forma limitativa, cera candelilla, cera carnaúba, cera microcristalina, y cera de abeja; ácidos grasos y ésteres de los mismos tales como, aunque no de forma limitativa, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, y ácido behénico; aceites y grasas hidrogenados tales como, aunque no de forma limitativa, aceite de soja hidrogenado, aceite de algodón hidrogenado, aceite de palma hidrogenado, aceite de cacahuete hidrogenado, aceite de colza hidrogenado, aceite de maíz hidrogenado, grasa de

aves de corral hidrogenada, sebo hidrogenado, manteca de cerdo hidrogenada y aceite de pescado hidrogenado; glicéridos parciales de grasas y aceites hidrogenados, tales como, aunque no de forma limitativa, todos los relacionados en la presente memoria; alcoholes grasos, tales como, aunque no de forma limitativa, alcohol cetílico, alcohol estearílico, y alcohol behenílico; y combinaciones de cualquiera de los mismos. En algunas realizaciones, el aceite vegetal parcialmente hidrogenado u otra composición de recubrimiento descrita en la presente memoria puede tener un punto de fusión que oscila de 25 °C a 70 °C, o en algunas realizaciones que oscila de 45 °C a 70 °C. En algunas realizaciones, la croqueta puede comprender de 0,01% a 20% en peso del recubrimiento que comprende aceite vegetal parcialmente hidrogenado u otra de las composiciones de recubrimiento descritas en la presente memoria.

Otras realizaciones diferentes de las croquetas de pienso para animales descritas en la presente memoria pueden también comprender al menos un recubrimiento adicional. Por ejemplo, el al menos un recubrimiento adicional puede incluir uno o más recubrimientos que contienen ingredientes activos adicionales (incluyendo los descritos en la presente memoria) o uno o más recubrimientos enriquecidos en probióticos. En otras realizaciones, el uno o más recubrimientos adicionales pueden comprender solo el material de recubrimiento, en el que el uno o más recubrimientos adicionales pueden aumentar la estabilidad de la composición alimenticia.

Las realizaciones específicas de la presente descripción proporcionan una croqueta de pienso para animales que comprende una matriz de núcleo basado en proteínas que tiene más de un 70% en peso de una proteína vegetal, en el que el núcleo basado en proteínas está prácticamente exento de una matriz de almidón gelatinizado; y al menos un recubrimiento activo se encuentra en al menos una parte de la superficie de la matriz de núcleo basado en proteínas. Los ejemplos de proteínas vegetales adecuados se han descrito en la presente memoria. En algunas realizaciones, el al menos un recubrimiento activo comprende al menos un recubrimiento enriquecido en probióticos, tal como un recubrimiento enriquecido en uno o más microorganismos probióticos descritos en la presente memoria.

En algunas realizaciones, las croquetas de pienso para animales de las diferentes realizaciones descritas en la presente memoria incluyen una croqueta que comprende de 25% a 99,99% en peso de una matriz de núcleo basado en proteínas y que comprende de 0,01% a 75% en peso de al menos un recubrimiento activo. Otras realizaciones de las croquetas de pienso para animales pueden comprender de 50% a 99,7% en peso de la matriz de núcleo basado en proteínas y 0,3% a 50% en peso del al menos un recubrimiento activo. Otras realizaciones adicionales de las croquetas de pienso para animales puede comprender de 75% a 99,6% en peso de la matriz de núcleo basado en proteínas y 0,4% a 25% en peso del al menos un recubrimiento activo. Las croquetas de pienso para animales según estas realizaciones pueden comprender de forma adicional al menos un recubrimiento adicional, por ejemplo, un recubrimiento que comprende un aceite vegetal parcialmente hidrogenado, o al menos una parte de una superficie del recubrimiento activo (o uno o más recubrimientos intermedios del recubrimiento activo), como se describe en la presente memoria.

Las realizaciones adicionales de la presente descripción proporcionan métodos para conformar una croqueta de pienso para animales, tal como las diferentes realizaciones de las croquetas de pienso para animales descritas detalladamente en la presente memoria. Según realizaciones específicas, el método puede comprender extraer una matriz de núcleo basado en proteínas, como se describe en la presente memoria, tal como una matriz de núcleo basado en proteínas que tenga más de 70% en peso de una proteína vegetal, y en el que el núcleo basado en proteínas esté prácticamente exento de una matriz de almidón gelatinizado y recubrir al menos una parte de una superficie de la matriz de núcleo basado en proteínas con un recubrimiento, tal como un recubrimiento que comprende como ingrediente activo, un recubrimiento enriquecido en probióticos. En otras realizaciones, el método puede también comprender recubrir al menos una parte de una superficie del recubrimiento probiótico con un segundo recubrimiento o capa. La segunda capa de recubrimiento puede comprender al menos un aceite vegetal parcialmente hidrogenado.

En realizaciones específicas, la extrusión de la matriz de núcleo se puede realizar con un extrusor de tornillo simple, mientras que en otras realizaciones se puede realizar con un extrusor de tornillo doble. La extrusión de la matriz de núcleo que comprende más de 70% en peso de una proteína vegetal tal como DDG, DDGS, CPC, CGM, SPI, WG, SorgPC, OPC, RPC, y/o SPC, puede requerir configuraciones específicas del extrusor para producir un material adecuado para un pienso animal de tipo croqueta. Por ejemplo, pueden requerirse cizalladuras muy elevadas y bajos tiempos de extrusión para evitar una degradación significativa del color y para evitar la polimerización del material dentro del extrusor y producir croquetas que sean duraderas para el procesamiento adicional, tal como recubrir con uno o más recubrimientos.

Las realizaciones adicionales de la presente descripción proporcionan piensos para animales o para animales domésticos del tipo croqueta. El pienso para animales o para animales domésticos del tipo croqueta puede comprender croquetas según cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria. Por ejemplo, según una realización, el pienso animal del tipo croqueta puede comprender una croqueta de pienso para animales y comprender una matriz de núcleo basado en proteínas vegetales que está prácticamente exento de una matriz de almidón gelatinizado, en donde la matriz de núcleo basado en proteínas vegetales comprende hasta 100% de las croquetas totales en el pienso animal. En algunas realizaciones, la croqueta con matriz de núcleo basado en

proteínas vegetales puede comprender de 70% a 100%, en algunas realizaciones de 80% a 100%, o incluso de 90% a 100% de las croquetas totales en el pienso animal.

5 En otra realización, la presente descripción proporciona un pienso animal tipo croqueta que comprende una primera croqueta que comprende una fuente de proteína de 16% a 50% en peso de la primera croqueta, una fuente de grasa de 5% a 35% en peso de la primera croqueta y una fuente de carbohidratos; y una segunda croqueta que comprende una matriz de núcleo basado en proteínas que está prácticamente exento de una matriz de almidón gelatinizado, tal como cualquiera de las croquetas de matriz de núcleo basado en proteínas descrita en la presente memoria.

10 Según estas realizaciones, la primera croqueta puede ser una croqueta que puede proporcionar la proteína, grasa y los carbohidratos necesarios para la dieta para mantener la buena nutrición del animal. En algunas realizaciones, la primera croqueta puede comprender una fuente de proteína que oscila de 0% hasta 50% en peso de la primera croqueta. En otras realizaciones, la fuente de proteína puede oscilar de 16% a 50% en peso, o incluso de 20% a 50% en peso de la primera croqueta. El experto en la técnica reconocerá que se pueden usar muchas formulaciones de croqueta en la primera croqueta para proporcionar la cantidad deseada de proteína, grasa y carbohidratos adicionales. Además, la primera croqueta puede comprender ingredientes adicionales, tales como vitaminas, minerales, colorantes, aromatizantes, y similares.

15 En algunas realizaciones, la segunda croqueta puede comprender hasta 90% de las croquetas del pienso para animales domésticos. Por ejemplo, la segunda croqueta puede comprender de 2% a 90% de las croquetas, o de 2% a 50% de las croquetas, o incluso de 2% a 25% de las croqueta del pienso para animales domésticos. De forma alternativa, las croquetas pueden estar presentes en relaciones específicas de la primera croqueta a la segunda croqueta. Por ejemplo, en las composiciones de alimento para animales domésticos de la presente descripción, la primera croqueta y la segunda croqueta pueden estar presentes en una relación de al menos 2:1, o al menos 5:1, o al menos 10:1, todo en peso. En otra realización de la descripción, la primera croqueta y la segunda croqueta pueden estar presentes en una relación de 2:1 a 50:1, o de 5:1 a 25:1, o de 10:1 a 20:1, todo en peso.

20 En diferentes realizaciones, la segunda croqueta puede también comprender al menos un recubrimiento activo sobre al menos una parte de la superficie de la matriz de núcleo basado en proteínas. Por ejemplo, el al menos un recubrimiento activo puede comprender cualquiera de los recubrimientos activos descritos en la presente memoria. En una realización, el recubrimiento activo puede comprender una grasa que contiene un aditivo, tal como las grasas y aditivos descritos en la presente memoria. En una realización específica, el al menos un recubrimiento activo puede ser un recubrimiento enriquecido en probióticos. Los ejemplos de recubrimientos enriquecidos en probióticos se describen detalladamente en la presente memoria.

25 La composición alimenticia para animales domésticos puede comprender componentes físicamente distintos (es decir, la primera croqueta y la segunda croqueta). El pienso para animales domésticos puede proporcionarse en una variedad de presentaciones diferentes de la primera croqueta y la segunda croqueta. Por ejemplo, la composición alimenticia para animales domésticos puede proporcionarse como una mezcla heterogénea de la primera croqueta y la segunda croqueta. De forma alternativa, la primera croqueta y la segunda croqueta se pueden proporcionar como componentes envasados individualmente, que se pueden combinar de cualquier forma o cantidad deseadas en el momento de la alimentación. De modo ilustrativo, la composición alimenticia para animales domésticos puede comprender un primer dispositivo contenedor y un segundo dispositivo contenedor, en el que el primer dispositivo contenedor contiene al menos una parte del primer componente y el segundo dispositivo contenedor contiene al menos una parte del segundo componente; por ejemplo, el primer dispositivo contenedor puede ser una bolsa mientras que el segundo dispositivo contenedor puede ser un bote. Por comodidad de uso del consumidor, la bolsa que contiene al menos una parte del primer componente puede también contener el bote que contiene al menos una parte del segundo componente. El experto en la técnica entenderá bien otras presentaciones.

30 35 40 45 Las composiciones alimenticias para animales domésticos o componentes de las mismas pueden estar nutricionalmente equilibradas o no. El término “nutricionalmente equilibrado”, tal como se utiliza en la presente memoria en referencia a la composición alimenticia para animales domésticos o a un componente de la misma, significa que la composición o componente tiene nutrientes requeridos conocidos para sustentar la vida en una proporción y unas cantidades adecuadas en función de las recomendaciones de autoridades reconocidas en el campo de la nutrición de animales domésticos, excepto por la necesidad adicional de agua.

50 55 La primera croqueta de las composiciones alimenticias para animales domésticos de la presente descripción comprende una fuente de proteínas una fuente de grasas y una fuente de carbohidratos. Los ejemplos de una primera croqueta incluyen las croquetas tradicionales de alimento para animales domésticos. La primera croqueta por sí misma puede estar nutricionalmente equilibrada o no. En una realización, el primer componente está nutricionalmente equilibrado.

En una realización, la primera croqueta puede comprender, calculado con respecto a la sustancia seca, de 20% a 50% de proteína en bruto, o de 22% a 40% de proteína en bruto en peso de la primera croqueta. El material de la proteína en bruto puede comprender cualquier material que tenga un contenido en proteínas de, al menos, 15% en

peso, ejemplos no limitativos del cual incluyen proteínas vegetales como la soja, la semilla del algodón y los cacahuets, proteínas animales como la caseína, la albúmina y el tejido cárnico. Entre los ejemplos no limitativos de tejido cárnico útiles en la presente invención se incluye la carne fresca y los granos molidos gruesos secos o procesados como grano, molido grueso de pescado, grano molido grueso de aves de corral, grano molido grueso de carne, grano molido grueso de huesos, y similares. Otros tipos de fuentes de proteínas en bruto adecuadas incluyen gluten de trigo o gluten de maíz y proteínas extraídas de fuentes microbianas como la levadura.

La primera croqueta comprende una fuente de grasa. En una realización, la primera croqueta puede comprender, calculado con respecto a la sustancia seca, de 5% a 35% de grasa, preferiblemente de 10% a 30% de grasa, en peso de la primera croqueta. Las fuentes de grasa son ampliamente conocidas, incluyendo cualquier componente que comprenda una fuente de grasa, definida en la presente memoria, que incluya, por ejemplo, cera, grasa, ácidos grasos y lípidos. Los ejemplos específicos de cera, grasa, ácido graso o lípido pueden intercambiarse a menudo según la nomenclatura habitual en la técnica; por ejemplo, un líquido frecuentemente se puede caracterizar como una grasa. Los inventores en la presente memoria no tienen intención de estar limitados por ninguna designación determinada de la nomenclatura, y las clasificaciones de un material determinado como la cera, grasa, ácidos grasos, lípidos, o similares se han realizado sólo por una cuestión de comodidad.

Por ejemplo, el componente lípido puede comprender una grasa que sea un componente de manteca de cacao o un aceite vegetal o un aceite vegetal parcialmente hidrogenado. De forma alternativa o de forma adicional, el componente lípido puede comprender un componente de grasa derivada de animales. Como se conocerá comúnmente en la técnica, el componente de grasa derivada de animales comprende una grasa derivada de un animal. Los ejemplos no limitativos incluyen carne de vacuno, aves de corral, cerdo y cordero (p. ej., manteca de cerdo y sebo). Las grasas lácteas también pueden servir como ejemplo, incluyendo la grasa de la leche, la grasa de la leche fraccionada y la grasa de la mantequilla. De forma alternativa o de forma adicional, el componente lípido puede comprender un ácido graso. Fuentes ilustrativas incluyen los ácidos grasos omega-3 u omega-6. Otros ejemplos de ácidos grasos adecuados pueden incluir el ácido oleico, el ácido esteárico, el ácido palmítico y los ácidos láuricos, incluyendo sales adecuadas de los mismos. Otros ejemplos de ácidos grasos adecuados incluyen los ésteres u otros derivados de los mismos, como el palmitato cetílico, los ácidos grasos monoglicéridos, diglicéridos acéticos, lácticos, o cítricos, isopropilpalmitato, isopropilmiristato, y monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos (algunos de los cuales pueden también estar caracterizados como grasas). De forma alternativa o de forma adicional, las composiciones pueden comprender cera. Por ejemplo, entre las ceras ilustrativas se incluye la cera de parafina, la cera de abejas (p. ej., blanca o amarilla), la cera de carnaúba, la cera de candelilla, la cera microcristalina, la cera de salvado de arroz, la cera de ésteres cetílicos y la cera emulsionante.

Granos o cereales tales como arroz, maíz, milo, sorgo, cebada, alfalfa, trigo, y similares, son fuentes ilustrativas de carbohidratos. Estas fuentes de carbohidratos, y los niveles típicos de las mismas, son ampliamente conocidas en las composiciones alimenticias para animales domésticos tradicionales.

Las presentes composiciones, como las que comprenden un recubrimiento activo, tal como aunque no de forma limitativa, un recubrimiento enriquecido, se pueden usar para aportar ventajas tras el consumo por los animales, como un animal doméstico. Este beneficio generalmente mantiene y mejora la salud general del animal. Los elementos no limitantes de la fisiología y la salud animal que benefician o bien terapéuticamente aliviando los síntomas, o la prevención de enfermedades mediante profilaxis, o la mejora de la salud general, incluyendo el tratamiento del sistema inmunológico, el tratamiento del sistema gastrointestinal, el tratamiento de la piel o el pelaje, el tratamiento del estrés y combinaciones de los mismos. Entre los ejemplos no limitativos que podemos mencionar se incluyen trastornos inflamatorios, inmunodeficiencia, enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome del intestino irritable, cáncer (especialmente el de los sistemas gastrointestinal e inmunológico), otitis externa, enfermedades diarreicas, diarrea asociada a antibióticos, apendicitis, enfermedades autoinmunitarias, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, amiloidosis, artritis reumatoide, artritis, movilidad de las articulaciones, displasia de cadera, diabetes mellitus, insulinoresistencia, infecciones bacterianas, infecciones virales, infecciones por hongos, enfermedad del periodonto, enfermedad urogenital, cistitis idiopática, cistitis intersticial, trauma asociado a una operación quirúrgica, enfermedad metastática inducida por una operación quirúrgica, septicemia, pérdida de peso, aumento de peso, acumulación excesiva de tejido adiposo, anorexia, control de la fiebre, caquexia, curación de heridas, úlceras, infección de la barrera del intestino, alergia, asma, trastornos respiratorios, trastornos circulatorios, enfermedad coronaria, anemia, trastornos del sistema de coagulación de la sangre, enfermedad renal, trastornos del sistema nervioso central, enfermedad hepática, isquemia, trastornos nutricionales, tratamiento o prevención de trastornos en los que está implicado el eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal (HPA), osteoporosis, trastornos endocrinos y trastornos epidérmicos. Se prefiere el tratamiento del tracto gastrointestinal, incluyendo el tratamiento o la prevención de la diarrea; la regulación del sistema inmunológico, preferiblemente el tratamiento o prevención de las enfermedades autoinmunitarias y la inflamación, manteniendo o mejorando la salud de la piel y/o el pelaje, preferiblemente tratando o previniendo las enfermedades atópicas de la piel (p. ej., dermatitis o eccema), el tratamiento o prevención de trastornos en los que está implicado el eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal (HPA), mejorando o reduciendo los efectos del envejecimiento, incluyendo los niveles de actividad y percepción mental, y evitando la pérdida de peso durante la infección y tras la misma. El tratamiento de las diferentes enfermedades descritas en la presente memoria se puede medir con técnicas conocidas por el experto en la técnica, por ejemplo, los métodos de medida descritos en la solicitud publicada con n.º US-2006/0228448A1.

Estabilidad y bioactividad de los probióticos

La producción de una croqueta de pienso para animales que comprende un recubrimiento activo que comprende uno o más probióticos (es decir, un recubrimiento enriquecido en probióticos) puede presentar dificultades y problemas de formulación específicos. Por ejemplo, cuando se produce una croqueta, tal como una croqueta con un recubrimiento enriquecido en probióticos, la croqueta recubierta y el pienso para animales resultante deben tener un período de validez suficiente de forma que los microorganismos del recubrimiento enriquecido en probióticos retengan su actividad tras la venta a un consumidor y su consumo por el animal. La estabilidad del recubrimiento probiótico por tanto es necesaria desde el punto de vista de la satisfacción del consumidor, y también desde el punto de vista de la normativa. Por ejemplo, los probióticos del recubrimiento deben tener una estabilidad suficiente de forma que no pierdan una cantidad perceptible de su actividad probiótica, por ejemplo, por la muerte de los microorganismos probióticos, entre el momento de la formulación en la instalación de producción y el momento del consumo por el animal. Si el consumidor no nota o cree que los probióticos presentes en el recubrimiento proporcionan una ventaja, entonces no adquirirá el producto. Además, algunos organismos legislativos gubernamentales requieren que al menos una determinada cantidad de los probióticos estén activos si un producto se etiqueta, garantiza o publicita como que contiene probióticos y que proporciona determinadas ventajas para la salud proporcionadas por los probióticos. Por al menos estas dos razones, los probióticos de las composiciones de alimento deben demostrar una estabilidad aceptable.

En algunas realizaciones, las croquetas de pienso para animales con la matriz de núcleo basado en proteínas vegetales y al menos un recubrimiento enriquecido en probióticos de la presente descripción pueden tener una estabilidad de al menos 24 meses o más. En realizaciones específicas, los probióticos de las croquetas de pienso para animales pueden tener una estabilidad de al menos 20 meses. En otras realizaciones adicionales, los probióticos de las croquetas de pienso para animales pueden tener una estabilidad de al menos 16 meses. En la presente memoria, los términos “estabilidad” y “estable” significan que durante el tiempo especificado, los microorganismos probióticos activos (o latentes pero capaces de activarse) se encuentran comprendidos en dos unidades logarítmicas respecto del nivel real de probióticos del recubrimiento enriquecido en probióticos del pienso para animales (por ej., si el nivel real de probióticos inmediatamente después de fabricar el alimento es de  $5 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias (UFC) gramo de pienso para animales, entonces el probiótico y el alimento son estables si el nivel de probióticos medido tras un periodo de tiempo es de  $5 \times 10^5$  UFC/gramo del pienso para animales, o superior). Así, los piensos para animales que comprenden uno o más recubrimientos enriquecidos en probióticos como se ha detallado en la presente descripción deberán formularse con ingredientes y metodología de producción que asegure que los microorganismos probióticos en el pienso para animales tienen una estabilidad suficiente.

Para formar un probiótico estable, los microorganismos probióticos deben mantenerse en un estado latente hasta que sean consumidos por el animal. La estabilidad de los probióticos en el recubrimiento enriquecido en probióticos puede depender, al menos en parte, de la capacidad del material de recubrimiento para evitar o reducir la transmisión de agua. Por ejemplo, el agua es un facilitador del crecimiento bacteriano o de microorganismos. Así, si el material de recubrimiento, o los materiales, que rodean los microorganismos probióticos no impiden la transmisión del agua, por ejemplo, procedente de la humedad o de otras fuentes, los microorganismos probióticos pueden estar expuestos al agua, lo que seguidamente puede originar que los microorganismos probióticos salgan de la latencia y comiencen a crecer. Esto representa un problema, porque los microorganismos probióticos solo crecerán durante un corto periodo de tiempo antes de agotar el suministro de alimento que tienen disponible, y mueran. La muerte de los microorganismos probióticos da como resultado una reducción en la actividad del probiótico y una reducción en la actividad global de la composición probiótica de alimento para animales. Así, el recubrimiento enriquecido en probióticos y/o cualquier recubrimiento, o recubrimientos, de la superficie del recubrimiento probiótico deberá tener una propiedad de transmisión de agua lo suficientemente baja para evitar la activación prematura y el crecimiento del microorganismo probiótico antes del consumo por el animal.

Además de los problemas de estabilidad descritos en la presente memoria, otro problema cuando se formula una croqueta de pienso para animales que comprende una matriz de núcleo basado en proteínas y al menos un recubrimiento probiótico es la bioactividad de los microorganismos probióticos. Esto puede ser también un problema con recubrimientos que contienen otros aditivos y agentes biológicos. Esto es, la croqueta de pienso para animales debe ser capaz de suministrar eficazmente suficiente cantidad de microorganismos probióticos (u otros aditivos y agentes biológicos) al sistema digestivo del animal tras el consumo de la croqueta de pienso para animales. Los agentes biológicos puede incluir, aunque no de forma limitativa, enzimas, anticuerpos, inmunoglobulinas, y similares. Este problema particular puede a veces entrar en conflicto con el objetivo de producir una croqueta de pienso para animales con un recubrimiento enriquecido en probióticos, como se ha descrito en la presente memoria. Por ejemplo, la producción de una croqueta de pienso para animales con un recubrimiento enriquecido en probióticos muy estable (es decir, uno en que los microorganismos probióticos sigan siendo viables durante un periodo de tiempo prolongado) puede dar como resultado una bioactividad reducida del microorganismo probiótico, por ejemplo, cuando el material de recubrimiento proporciona demasiada protección a los microorganismos probióticos y evitan que el probiótico se disperse en el área objetivo (por ejemplo, el intestino delgado o el intestino grueso) durante el proceso de digestión. Algunos materiales de recubrimiento convencionales pueden proporcionar estabilidad al microorganismo probiótico, pero no proporcionan suficiente bioactividad del microorganismo probiótico en el tracto

digestivo del animal. De forma alternativa, otros materiales de recubrimiento pueden proporcionar niveles de bioactividad aceptables, pero no proporcionarán la necesaria estabilidad a la composición alimenticia que comprende el probiótico.

5 Así, según diferentes realizaciones, la presente descripción proporciona un recubrimiento o matriz de recubrimiento adecuado para usar con un material probiótico o microorganismo y otra sustancia biológica que se puede usar para recubrir al menos una parte de una croqueta de pienso para animales, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, las composiciones de matriz de núcleo basado en proteínas vegetales descritas en la presente memoria. Los materiales de recubrimiento descritos en la presente memoria se pueden usar como matriz para uno o más materiales o microorganismos probióticos para formar un recubrimiento enriquecido en probióticos sobre una matriz de núcleo. De forma alternativa, o adicional, los materiales de recubrimiento descritos en la presente memoria se pueden usar para formar uno o más recubrimientos adicionales sobre una superficie exterior de un recubrimiento enriquecido en probióticos. En otras realizaciones, los materiales de recubrimiento descritos en la presente memoria se pueden usar como un recubrimiento entre una matriz de núcleo y un recubrimiento enriquecido en probióticos, por ejemplo, para impedir la transmisión de humedad desde la matriz de núcleo hasta el recubrimiento enriquecido en probióticos. Los recubrimientos que comprenden agentes biológicos también se pueden recubrir con estos materiales. Los materiales de recubrimiento según estas realizaciones proporcionan recubrimientos enriquecidos en probióticos que proporcionan una estabilidad y bioactividad suficientes de los probióticos. Por ejemplo, como se ha descrito en la presente memoria, los recubrimientos pueden proporcionar una estabilidad de al menos 24 meses, o más para los probióticos del material de recubrimiento. En otras realizaciones, los recubrimientos pueden proporcionar estabilidades de al menos 20 meses o más, o incluso al menos de 16 meses o más. En otras realizaciones adicionales, se pueden proporcionar duraciones de la estabilidad más cortas, tales como estabilidades de al menos 12 meses, o incluso al menos 8 meses. Además de la estabilidad, los materiales de recubrimiento pueden proporcionar también suficiente bioactividad de forma que los microorganismos y materiales o probióticos se liberen en el intestino y se vuelvan bioactivos, proporcionando de esta forma la ventaja para la salud deseada.

25 Los ejemplos de materiales de recubrimiento de las diferentes realizaciones de la presente memoria incluyen materiales que proporcionan hidrofobicidad suficiente para evitar la transmisión de cantidades significativas de agua pero permitiendo aún que el probiótico u otros agentes biológicos incluidos en el recubrimiento se vuelvan bioactivos. Los materiales y composiciones de recubrimiento incluyen, aunque no de forma limitativa, manteca de cacao, aceite de almendra de palma, aceite de palma, aceite de algodón, aceite de soja, aceite de canola, aceite de colza, aceite de cacahuete, aceite de manteca, derivados hidrogenados y parcialmente hidrogenados de aceites y grasas (incluyendo los relacionados en la presente memoria), cera, parafina, cera de parafina, aceite de parafina, parafina líquida, parafina sólida, cera candelilla, cera carnaúba, cera microcristalina, cera de abejas, ácidos grasos de cadena larga y ésteres de los mismos, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido láurico, ácido behénico, ácido adípico, glicerol de acetil acilo, monoglicérido acetilado, goma laca, goma laca sin cera, trioleína, chocolate, solución de chocolate, chocolate con leche dulce, sólidos del cacao, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, monoestearato de glicerol, polietilenglicol, pectina, gluten de trigo, lecitina de soja, caseinato de sodio, aislado de proteína de suero, concentrado de proteína de suero, alcohol estearílico, alcohol cetílico, alcohol behenílico, olestra, tristearina, grasa animal, grasa de aves de corral, y mezclas o combinaciones de cualquiera de los mismos. En otras realizaciones, los materiales o composiciones de recubrimiento pueden comprender un aceite vegetal parcialmente hidrogenado o un aceite vegetal con un elevado contenido en grasas saturadas (es decir, un aceite vegetal que sea sustancialmente sólido a temperatura ambiente), incluyendo mezclas de dichos aceites vegetales. Por ejemplo, los materiales de recubrimiento pueden comprender un aceite vegetal parcialmente hidrogenado, tal como aceite de soja parcialmente hidrogenado, aceite de maíz, aceite de algodón, manteca de cacao, aceite de almendra de palma, aceite de palma, aceite de canola, aceite de colza, aceite de cacahuete, aceite de manteca, y similares (incluyendo mezclas y combinaciones de aceites), puede evitar la transmisión de agua, proporcionando de esta forma una estabilidad aceptable permitiendo al mismo tiempo niveles aceptables de sustancias bioactivas. Los ejemplos adecuados de otros componentes con una temperatura de punto de fusión superior que también se pueden usar como composición de recubrimiento incluyen, aunque no de forma limitativa, a ceras tales como aunque no de forma limitativa, cera candelilla, cera carnaúba, cera microcristalina, y cera de abeja; ácidos grasos y ésteres de los mismos tales como, aunque no de forma limitativa, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, y ácido behénico; aceites y grasas hidrogenados tales como, aunque no de forma limitativa, aceite de soja hidrogenado, aceite de algodón hidrogenado, aceite de palma hidrogenado, aceite de cacahuete hidrogenado, aceite de colza hidrogenado, aceite de maíz hidrogenado, grasa de aves de corral hidrogenada, sebo hidrogenado, manteca de cerdo hidrogenada y aceite de pescado hidrogenado; glicéridos parciales de grasas y aceites hidrogenados, tales como, aunque no de forma limitativa, todos los relacionados en la presente memoria; alcoholes grasos, tales como, aunque no de forma limitativa, alcohol cetílico, alcohol estearílico, y alcohol behenílico; y combinaciones de cualquiera de los mismos. Según una realización específica, la presente descripción proporciona un recubrimiento que comprende una cera de parafina, un aceite vegetal parcialmente hidrogenado (por ejemplo, una mezcla de aceite de algodón y aceite de soja parcialmente hidrogenados, tal como, aunque no de forma limitativa, K.L.X. o un aceite de almendra de palma parcialmente hidrogenado, tal como, aunque no de forma limitativa, Paramount B, ambos de los cuáles son comercializados por Lodders Croklaan NA, Channahon, IL), y mezclas de cera de parafina y el aceite vegetal parcialmente hidrogenado.

Según determinadas realizaciones, la cantidad de material de recubrimiento utilizado en el recubrimiento enriquecido en probióticos puede afectar tanto a la estabilidad como a la bioactividad. Por ejemplo, cuando se usa una mayor cantidad de material de recubrimiento, la resistencia del recubrimiento a la transmisión de agua aumenta por lo general. Sin embargo, cuando la cantidad de material de recubrimiento aumenta, la bioactividad del probiótico puede disminuir, ya que se debe eliminar o digerir más recubrimiento para que se pueda liberar el probiótico y que se vuelva bioactivo en el intestino del animal. Según determinadas realizaciones, la cantidad de material de recubrimiento en el recubrimiento enriquecido en probióticos puede estar en un intervalo de 0,01% a 75% en peso del peso total de la croqueta. En otras realizaciones, la cantidad de material de recubrimiento en el recubrimiento enriquecido en probióticos puede estar en un intervalo de 0,1% a 30% en peso del peso total de la croqueta, o incluso de 0,1% a 3% en peso del peso total de la croqueta.

A continuación, las composiciones alimenticias se evalúan respecto de su capacidad para suministrar un probiótico bioactivo (340), por ejemplo cuantificando la cantidad de marcador derivado medido en la muestra de ensayo. Si se considera que la composición que suministra el probiótico es un candidato poco satisfactorio, la prueba se suspende para desarrollar una nueva composición (300) que suministre el probiótico. Si se considera que la composición suministra el probiótico es un candidato aceptable, la prueba continúa (350), y se analizan muestras de ensayo adicionales procedentes del sujeto de muestra en busca de una o más citoquinas de la sangre, poblaciones de bacterias fecales, consistencia de las heces, lactato fecal, ácidos grasos de cadena corta fecales, e inmunoglobulinas de la sangre hasta el final de la prueba.

En realizaciones específicas de los métodos de ensayo descritos en la presente memoria, los métodos pueden incluir métodos para evaluar la bioactividad del probiótico en una composición alimenticia para animales, tal como una composición alimenticia para un animal de compañía, por ejemplo una composición alimenticia para perros o una composición alimenticia para gatos. En realizaciones específicas, la composición alimenticia puede ser una composición alimenticia para un animal de compañía que comprende un pienso animal de tipo croqueta que tiene un recubrimiento enriquecido en probióticos. Ejemplos de piensos animales de tipo croqueta con recubrimientos enriquecidos en probióticos incluyen, aunque no de forma limitativa a las croquetas basadas en proteína vegetal con al menos un recubrimiento probiótico según cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

En este Ejemplo, se ha producido una realización de una matriz de núcleo basado en proteínas vegetales que comprende una partícula alimenticia en forma de una croqueta seca que tiene un tamaño, densidad y forma adecuadas para el recubrimiento y adición a un alimento seco y/o blando típico para animales domésticos.

La composición de la matriz de núcleo basado en proteínas vegetales se define en la Tabla 1. Las partículas alimenticias en forma de una croqueta seca que tiene un tamaño, densidad y forma adecuadas para el recubrimiento y adición a un alimento seco y/o blando típico para animales domésticos se produce a partir de los ingredientes secos de la Tabla 1 mediante el siguiente proceso. Los ingredientes secos se agregan a un mezclador discontinuo de 1000 kg y se mezclan lo suficiente para conseguir una mezcla homogénea. Los ingredientes líquidos se combinan con los ingredientes secos en un mezclador continuo Modelo DDC16 de Wenger Manufacturing, Inc. (Sabetha, KS, EE. UU.). Los ingredientes líquidos son agua a aproximadamente 22 °C, vapor a aproximadamente 100 °C, y grasa de aves de corral a aproximadamente 32 °C. Los ingredientes secos se agregan a una velocidad de aproximadamente 1000 kg por hora.

Tabla 1: Composición de croqueta – Ingredientes secos

Ingredientes secos	Porcentaje en peso
Concentrado de proteína de maíz	93,5
Producto de huevo secado	2,1
Carbonato cálcico	1,1
Fructooligosacáridos	0,9
Cloruro potásico	0,8
Monofosfato sódico	0,6

Ingredientes secos	Porcentaje en peso
Premezcla de vitaminas	0,4
Premezcla de minerales	0,3
Cloruro de colina	0,2
DL-metionina	0,1

5 La mezcla resultante se agregó continuamente a un extrusor de doble tornillo Modelo TX85 de Wenger Manufacturing, Inc. (Sabetha, KS, EE. UU.). Las temperaturas del cilindro iban desde 52 °C cerca de la entrada del extrusor a aproximadamente 114 °C cerca de la salida del extrusor. Se agregó agua a una velocidad de 20 kg por hora. A una velocidad del tornillo del extrusor de 461 rpm y una carga del motor de 84%, las partículas se extruyen con un contenido en humedad de 18% como tales con una densidad aparente en húmedo de 214 gramos por litro. Las partículas se han creado por extrusión a través de seis aberturas de 6,8 milímetros de diámetro, expansión hasta aproximadamente 12 milímetros de diámetro, y se corta a una longitud de aproximadamente 8 milímetros de espesor. Estas partículas se transportan hasta un secador para conseguir un contenido en humedad de las partículas de 6,2% como tales, 242 gramos por litro de densidad aparente y se calcula que tiene un contenido en sólidos de concentrado de proteína de maíz de aproximadamente 87% como tales. La matriz de núcleo basado en proteínas vegetales resultante se puede recubrir como se describe en la presente memoria.

Ejemplo 2

15 En este Ejemplo, se ha producido una realización de una matriz de núcleo basado en proteínas vegetales que comprende partículas alimenticias de mayor diámetro secas que tienen un tamaño, densidad y forma adecuadas para el recubrimiento y adición a un alimento seco y/o blando típico para animales domésticos.

20 La composición de la matriz de núcleo basado en proteínas vegetales se define en la Tabla 2. Las partículas alimenticias en forma de una croqueta seca que tiene un tamaño, densidad y forma adecuadas para el recubrimiento y adición a un alimento seco y/o blando típico para animales domésticos se produce a partir de los ingredientes secos de la Tabla 2 mediante el siguiente proceso. Los ingredientes secos se agregan a un mezclador discontinuo de 1000 kg y se mezclan lo suficiente para conseguir una mezcla homogénea. Los ingredientes líquidos se combinan con los ingredientes secos en un mezclador continuo Modelo DDC16 de Wenger Manufacturing, Inc. (Sabetha, KS, EE. UU.). Los ingredientes líquidos son agua a aproximadamente 23 °C, vapor a aproximadamente 100 °C, y grasa de aves de corral a aproximadamente 40 °C. Los ingredientes secos se agregan a una velocidad de 25 aproximadamente 888 kg por hora. Se agregó agua a una velocidad de 127 kg por hora. Se agregó vapor a una velocidad de 90 kg por hora. La grasa de aves de corral se agregó a una velocidad de 9 kg por hora. Los ingredientes se mezclaron con un tiempo de retención promedio de aproximadamente 3,4 min y sale por el mezclador continuo a aproximadamente 80 °C.

Tabla 2: Composición de croqueta – Ingredientes secos

Ingredientes secos	Porcentaje en peso
Concentrado de proteína de maíz	93,5
Producto de huevo secado	2,1
Carbonato cálcico	1,1
Fructooligosacáridos	0,9
Cloruro potásico	0,8
Monofosfato sódico	0,6
Premezcla de vitaminas	0,4
Premezcla de minerales	0,3
Cloruro de colina	0,2
DL-metionina	0,1

La mezcla resultante se agregó continuamente a un extrusor de doble tornillo Modelo TX85 de Wenger Manufacturing, Inc. (Sabetha, KS, EE. UU.). Las temperaturas del cilindro iban desde 52 °C cerca de la entrada del extrusor a aproximadamente 117 °C cerca de la salida del extrusor. Se agregó agua a una velocidad de 27 kg por hora. A una velocidad del tornillo del extrusor de 461 rpm y una carga del motor de 75%, las partículas se extruyen con un contenido en humedad de 20% como tales con una densidad aparente en húmedo de 320 gramos por litro. Las partículas se han creado por extrusión a través de dos aberturas de 12,4 milímetros de diámetro, expansión hasta aproximadamente 16 milímetros de diámetro, y se corta a una longitud de aproximadamente 10 milímetros de espesor. Estas partículas se transportan hasta un secador para conseguir un contenido en humedad de las partículas de 6,2% como tales, 369 gramos por litro, de densidad aparente y se calcula que tiene un contenido en sólidos de concentrado de proteína de maíz de aproximadamente 86% como tales. La matriz de núcleo basado en proteínas vegetales resultante se puede recubrir como se describe en la presente memoria.

Ejemplo 3

En este Ejemplo, se produce una realización de una matriz de núcleo basado en proteínas vegetales que comprende 100% en peso de una materia proteica vegetal seca formulada en partículas alimenticias secas de tamaño menor que tienen un tamaño, densidad y forma adecuadas para el recubrimiento y adición a un alimento seco y/o blando típico para animales domésticos.

La composición de la matriz de núcleo basado en proteínas vegetales se define en la Tabla 3. Las partículas alimenticias en forma de una croqueta seca que tiene un tamaño, densidad y forma adecuadas para el recubrimiento y adición a un alimento seco y/o blando típico para animales domésticos se produce a partir de los ingredientes secos de la Tabla 3 mediante el siguiente proceso. Los ingredientes líquidos se combinan con el ingrediente seco en un mezclador continuo Modelo DDC16 de Wenger Manufacturing, Inc. (Sabetha, KS, EE. UU.). Los ingredientes líquidos son agua a aproximadamente 23 °C, vapor a aproximadamente 100 °C, y grasa de aves de corral a aproximadamente 32 °C. Los ingredientes secos se agregan a una velocidad de aproximadamente 698 kg por hora. Se agregó agua a una velocidad de 105 kg por hora. Se agregó vapor a una velocidad de 70 kg por hora. La grasa de aves de corral se agregó a una velocidad de 7 kg por hora. Los ingredientes se mezclaron con un tiempo de retención promedio de aproximadamente 3,9 min y salen por el mezclador continuo a aproximadamente 80 °C.

La mezcla resultante se agregó continuamente a un extrusor de doble tornillo Modelo TX85 de Wenger Manufacturing, Inc. (Sabetha, KS, EE. UU.). Las temperaturas del cilindro iban desde 53 °C cerca de la entrada del extrusor a aproximadamente 96 °C cerca de la salida del extrusor. Se agregó agua a una velocidad de 28 kg por hora. A una velocidad del tornillo del extrusor de 401 rpm y una carga del motor de 80%, las partículas se extruyen con un contenido en humedad de 20% como tales con una densidad aparente en húmedo de 248 gramos por litro. Las partículas se han creado por extrusión a través de dieciocho aberturas de 3,5 milímetros de diámetro, expansión hasta aproximadamente 5,7 milímetros de diámetro, y se corta a una longitud de aproximadamente 4,2 milímetros de espesor. Estas partículas se transportan hasta un secador para conseguir un contenido en humedad de las partículas de 5,9% como tales, 299 gramos por litro, de densidad aparente y se calcula que tiene un contenido en sólidos de concentrado de proteína de maíz de aproximadamente 93% como tales. La matriz de núcleo basado en proteínas vegetales resultante se puede recubrir como se describe en la presente memoria.

Tabla 3: Composición de croqueta – Ingredientes secos

40

Ingrediente seco	Porcentaje en peso
Concentrado de proteína de maíz	100

Ejemplo 4

En este Ejemplo, se produce una realización de una matriz de núcleo basado en proteínas vegetales que comprende proteínas vegetales y una fuente alternativa de proteínas formulada en una partícula alimenticia seca que tiene un tamaño, densidad y forma adecuadas para el recubrimiento y adición a un alimento seco y/o blando típico para animales domésticos.

La composición de la matriz de núcleo basado en proteínas vegetales incluyendo una fuente alternativa de proteínas (subproducto de carne de pollo) se define en la Tabla 4. Las partículas alimenticias en forma de una croqueta seca que tiene un tamaño, densidad y forma adecuadas para el recubrimiento y adición a un alimento seco y/o blando típico para animales domésticos se produce a partir de los ingredientes secos de la Tabla 4 mediante el siguiente proceso. Los ingredientes secos se agregan a un mezclador discontinuo de 1000 kg y se mezclan lo suficiente para conseguir una mezcla homogénea. Los ingredientes líquidos se combinan con los ingredientes secos en un

mezclador continuo Modelo DDC16 de Wenger Manufacturing, Inc. (Sabetha, KS, EE. UU.). Los ingredientes líquidos son agua a aproximadamente 23 °C, vapor a aproximadamente 100 °C, y grasa de aves de corral a aproximadamente 32 °C. Los ingredientes secos se agregan a una velocidad de aproximadamente 995 kg por hora. Se agregó agua a una velocidad de 128 kg por hora. Se agregó vapor a una velocidad de 99 kg por hora. La grasa de aves de corral se agregó a una velocidad de 7,5 kg por hora. Los ingredientes se mezclaron con un tiempo de retención promedio de aproximadamente 4 min y sale por el mezclador continuo a aproximadamente 86 °C.

La mezcla resultante se agregó continuamente a un extrusor de doble tornillo Modelo TX85 de Wenger Manufacturing, Inc. (Sabetha, KS, EE. UU.). Las temperaturas del cilindro iban desde 53 °C cerca de la entrada del extrusor a aproximadamente 120 °C cerca de la salida del extrusor. Se agregó agua a una velocidad de 20 kg por hora. A una velocidad del tornillo del extrusor de 461 rpm y una carga del motor de 76%, las partículas se extruyen con un contenido en humedad de 19% como tales con una densidad aparente en húmedo de 392 gramos por litro. Las partículas se han creado por extrusión a través de seis aberturas de 6,8 milímetros de diámetro, expansión hasta aproximadamente 8 milímetros de diámetro, y se corta a una longitud de aproximadamente 7,5 milímetros de espesor. Estas partículas se transportan hasta un secador para conseguir un contenido en humedad de las partículas de 5,6% como tales, 397 gramos por litro, de densidad aparente y se calcula que tiene un contenido en sólidos de concentrado de proteína de maíz de aproximadamente 67% como tales. La matriz de núcleo basado en proteínas vegetales resultante se puede recubrir como se describe en la presente memoria.

Tabla 4: Composición de croqueta – Ingredientes secos

Ingredientes secos	Porcentaje en peso
Concentrado de proteína de maíz	71,4
Grano molido grueso a partir de subproducto de pollo	22,1
Producto de huevo secado	2,1
Carbonato cálcico	1,1
Fructooligosacáridos	0,9
Cloruro potásico	0,8
Monofosfato sódico	0,6
Premezcla de vitaminas	0,4
Premezcla de minerales	0,3
Cloruro de colina	0,2
DL-metionina	0,1

Ejemplo 5

En este Ejemplo, se produce una realización de una matriz de núcleo basado en proteínas vegetales que comprende 100% en peso de una materia proteica vegetal seca formulada en partículas alimenticias secas que tienen un tamaño, densidad y forma adecuadas para el recubrimiento y adición a un alimento seco y/o blando típico para animales domésticos. Como alternativa a la extrusión con doble tornillo, se emplea la extrusión de tornillo simple para preparar las partículas alimenticias secas.

La composición de la matriz de núcleo basado en proteínas vegetales se define en la Tabla 5. Las partículas alimenticias en forma de una croqueta seca que tiene un tamaño, densidad y forma adecuadas para el recubrimiento y adición a un alimento seco y/o blando típico para animales domésticos se produce a partir de los ingredientes secos de la Tabla 5 mediante el siguiente proceso. Los ingredientes líquidos se combinan con el ingrediente seco en un mezclador continuo Modelo DDC16 de Wenger Manufacturing, Inc. (Sabetha, KS, EE. UU.). Los ingredientes líquidos son agua a aproximadamente 23 °C, vapor a aproximadamente 100 °C, y grasa de aves de corral caliente. Los ingredientes secos se agregan a una velocidad de aproximadamente 1496 kg por hora. Se agregó agua a una velocidad de 224 kg por hora. Se agregó vapor a una velocidad de 152 kg por hora. La grasa de aves de corral se agregó a una velocidad de 15 kg por hora. Los ingredientes salen del mezclador continuo a aproximadamente 95 °C.

La mezcla resultante se agregó continuamente a un extrusor X165 de tornillo simple de Wenger Manufacturing, Inc. (Sabetha, KS, EE. UU.). Las temperaturas del cilindro iban desde 47 °C cerca de la entrada del extrusor, 82 °C cerca de la inyección de vapor, hasta aproximadamente 62 °C cerca de la salida del extrusor. Se agregó agua a una velocidad de 30 kg por hora. Se agregó vapor a una velocidad de 40 kg por hora. A una velocidad del tornillo del extrusor de 240 rpm y una carga del 89%, las partículas cohesivas se extruyen con un contenido en humedad de 23% como tales con una densidad aparente en húmedo de 242 gramos por litro. Las partículas se han creado por extrusión a través de cuatro aberturas de 6,4 milímetros de diámetro, expansión hasta aproximadamente 8,6 milímetros de diámetro, y se corta a una longitud de aproximadamente 7,2 milímetros de espesor. Estas partículas se transportan hasta un secador para conseguir un contenido en humedad de las partículas de 6,6% como tales, 392 gramos por litro, de densidad aparente y se calcula que tiene un contenido en sólidos de concentrado de proteína de maíz de aproximadamente 92% como tales. La matriz de núcleo basado en proteínas vegetales resultante se puede recubrir como se describe en la presente memoria.

Tabla 5: Composición de croqueta – Ingredientes secos

Ingrediente seco	Porcentaje en peso
Concentrado de proteína de maíz	100

Ejemplo 6

En este Ejemplo, se produce una realización de una matriz de núcleo basado en proteínas vegetales que comprende una materia proteica vegetal seca formulada en partículas alimenticias secas que tienen un tamaño, densidad y forma adecuadas para el recubrimiento y adición a un alimento seco y/o blando típico para animales domésticos. Se pueden crear partículas de colores alternativos agregando colorantes. En el presente Ejemplo, se agrega colorante de caramelo líquido.

La composición de la matriz de núcleo basado en proteínas vegetales se define en la Tabla 6. Las partículas alimenticias en forma de una croqueta seca que tiene un tamaño, densidad y forma adecuadas para el recubrimiento y adición a un alimento seco y/o blando típico para animales domésticos se produce a partir de los ingredientes secos de la Tabla 6 mediante el siguiente proceso. Los ingredientes líquidos se combinan con los ingredientes secos en un mezclador continuo Modelo DC de Wenger Manufacturing, Inc. (Sabetha, KS, EE. UU.). Los ingredientes líquidos son agua, vapor a aproximadamente 100 °C, y caramelo a temperatura ambiente. Los ingredientes secos se agregan a una velocidad de aproximadamente 180 kg por hora. El agua se agregó a una velocidad de aproximadamente 24 kg por hora. Se agregó vapor. El caramelo líquido se agregó a una velocidad de 6 kg por hora. Los ingredientes salen del mezclador continuo a aproximadamente 74 °C.

La mezcla resultante se agregó continuamente a un extrusor X20 de tornillo simple de Wenger Manufacturing, Inc. (Sabetha, KS, EE. UU.). Las temperaturas del cilindro iban desde 74 °C cerca de la entrada del extrusor, seguido por 76 °C y 97 °C, hasta aproximadamente 136 °C cerca de la salida del extrusor. A una velocidad del tornillo del extrusor de 500 rpm y una carga del motor de aproximadamente 48%, las partículas se extruyen con un contenido en humedad de 18% como tales con una densidad aparente en húmedo de 350 gramos por litro. Las partículas se han creado por extrusión a través de una abertura de 5,9 milímetros de diámetro, expansión hasta aproximadamente 8,8 milímetros de diámetro, y se corta a una longitud de aproximadamente 7,2 milímetros de espesor. Estas partículas se transportan hasta un secador para conseguir un contenido en humedad de las partículas de 9% como tales, 367 gramos por litro, de densidad aparente y se calcula que tiene un contenido en sólidos de concentrado de proteína de maíz de aproximadamente 83% como tales. La matriz de núcleo basado en proteínas vegetales resultante se puede recubrir como se describe en la presente memoria.

Tabla 6: Composición de croqueta – Ingredientes secos

Ingredientes secos	Porcentaje en peso
Concentrado de proteína de maíz	93,5
Producto de huevo seco	2,1
Carbonato cálcico	1,0
Fructooligosacáridos	0,9

Cloruro potásico	0,8
Monofosfato sódico	0,6
Premezcla de vitaminas	0,4
Premezcla de minerales	0,3
Cloruro de colina	0,2
DL-metionina	0,1

Ejemplo 7

5 En este Ejemplo, se produce una realización de una matriz de núcleo basado en proteínas vegetales que comprende una materia proteica vegetal seca formulada en partículas alimenticias secas que tienen un tamaño, densidad y forma adecuadas para el recubrimiento y adición a un alimento seco y/o blando típico para animales domésticos. Se pueden crear densidades de partícula alternativa agregando grasa (grasa líquida de aves de corral) y una abertura de la matriz más grande.

10 La composición de la matriz de núcleo basado en proteínas vegetales se define en la Tabla 7. Las partículas alimenticias en forma de una croqueta seca que tiene un tamaño, densidad y forma adecuadas para el recubrimiento y adición a un alimento seco y/o blando típico para animales domésticos se produce a partir de los ingredientes secos de la Tabla 7 mediante el siguiente proceso. Los ingredientes líquidos se combinan con el ingrediente seco en un mezclador continuo Modelo DC de Wenger Manufacturing, Inc. (Sabetha, KS, EE. UU.). Los ingredientes líquidos son agua, vapor a aproximadamente 100 °C, grasa de aves de corral a aproximadamente 40 °C, y caramelo a temperatura ambiente. Los ingredientes secos se agregan a una velocidad de aproximadamente 180 kg por hora. El agua se agregó a una velocidad de aproximadamente 11 kg por hora. Se agregó vapor. El caramelo líquido se agregó a una velocidad de aproximadamente 6 kg por hora. La grasa de aves de corral se agregó a una velocidad de 4,9 kg por hora. Los ingredientes salen del mezclador continuo a aproximadamente 93 °C.

20 La mezcla resultante se agregó continuamente a un extrusor X20 de tornillo simple de Wenger Manufacturing, Inc. (Sabetha, KS, EE. UU.). Las temperaturas del cilindro iban desde 86 °C cerca de la entrada del extrusor, seguido por 74 °C y 108 °C, hasta aproximadamente 141 °C cerca de la salida del extrusor. A una velocidad del tornillo del extrusor de 500 rpm y una carga del motor de aproximadamente 42%, las partículas se extruyen con un contenido en humedad de 15,7% como tales con una densidad aparente en húmedo de 430 gramos por litro. Las partículas se han creado por extrusión a través de una abertura de 8,1 milímetros de diámetro, expansión hasta aproximadamente 11,1 milímetros de diámetro, y se corta a una longitud de aproximadamente 7,4 milímetros de espesor. Estas partículas se transportan hasta un secador para conseguir un contenido en humedad de las partículas de 6,5% como tales, 430 gramos por litro, de densidad aparente y se calcula que tiene un contenido en sólidos de concentrado de proteína de maíz de aproximadamente 86% como tales.

Tabla 7: Composición de croqueta – Ingredientes secos

Ingredientes secos	Porcentaje en peso
Concentrado de proteína de maíz	93,5
Producto de huevo seco	2,1
Carbonato cálcico	1,0
Fructooligosacáridos	0,9
Cloruro potásico	0,8
Monofosfato sódico	0,6
Premezcla de vitaminas	0,4
Premezcla de minerales	0,3
Cloruro de colina	0,2

Ejemplo 8: Ejemplo de recubrimiento

En este Ejemplo, una matriz de núcleo basado en proteínas vegetales se recubre con un recubrimiento enriquecido en probióticos para fabricar una croqueta activa. Para fabricar un alimento para perros enriquecido en probióticos, la croqueta activa (es decir, una que esté enriquecida en probióticos) se mezcló con una croqueta no enriquecida en probióticos.

La croqueta activa se fabricó usando aproximadamente 8000 g de croquetas núcleo que consistían en una proteína vegetal extruida (producida según el método descrito en el Ejemplo 1) que se ha introducido en un mezclador de paletas desde una tolva situada por encima del mezclador de paletas. El mezclador es un mezclador de zona fluidificada modelo Bella de 32 litros de capacidad fabricado por Dynamic Air Inc., St Paul, Minn., EE. UU. Las croquetas se han enfriado previamente en un refrigerador a aproximadamente 0 °C antes de agregarlas al mezclador. Una vez las croquetas se han agregado al mezclador, las paletas se hacen girar para fluidizar las croquetas. Las paletas se hacen girar a aproximadamente 94 rpm y un número de Froude de aproximadamente 1,1.

Aproximadamente 6,6 g de una *Bifidobacteria animalis* AHC7 (NCIMB 41199) deshidratada con una actividad de  $1,5 \times 10^{11}$  unidades formadoras de colonia por gramo se mezclaron completamente en aproximadamente 2000 g de grasa con un mezclador de cocina para formar una mezcla. La grasa de elevado punto de fusión es K.L.X., una mezcla parcialmente hidrogenado de aceite de soja/algodón fabricado por Loders Croklaan, Inc., Channahon, IL, EE. UU. La mezcla de grasa-bifidobacteria se agrega a las croquetas en el mezclador fluidizado a lo largo de aproximadamente un minuto bombeando la mezcla desde un vaso de precipitados a través de un tubo de silicona hasta un punto aproximadamente 25 cm por encima de la zona fluidizada en el centro de los mezcladores usando una bomba peristáltica Cole-Parmer modelo 07550-30 con dos cabezales de bomba Masterflex L/S Easyload II paralelos. La temperatura de la grasa es aproximadamente 56 °C y se agrega en el centro del mezclador en la zona fluidizada. Al final de la adición de la mezcla, el mezclado de las croquetas con las paletas continúa durante aproximadamente 10 segundos, a continuación, se abre la compuerta situada en el fondo del mezclador para vaciar las croquetas recubiertas en un receptor metálico.

El examen visual de las croquetas muestra que la mezcla está recubierta de forma uniforme sobre la superficie de las croquetas para formar una capa de grasa sólida. El corte de algunas croquetas por la mitad confirma que la distribución de la grasa sólida alrededor de la superficie de las croquetas individuales es sustancialmente regular. La prueba posterior del cultivo bacteriano realizado sobre el producto muestra que la actividad cumple el objetivo deseado de  $2 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias por 20 g de croquetas recubiertas. Las croquetas no enriquecidas en probióticos consistentes en croquetas de pienso para perros (Iams MiniChunks, comercializado por the Iams Co. Dayton, OH, EE. UU.) que comprenden 27,4% de proteína, 15,9% de grasa, 7,4% de humedad y 7,4% de ceniza. El producto final es una mezcla de 10% en peso de croqueta activa con un 90% de croquetas no enriquecidas en probióticos.

Ejemplo 9: Ejemplo de recubrimiento

En este Ejemplo, una matriz de núcleo basado en proteínas vegetales se recubre con un recubrimiento y un segundo recubrimiento superior enriquecido en probióticos para fabricar una croqueta activa. Para fabricar un alimento para perros enriquecido en probióticos, la croqueta activa (es decir, una que esté enriquecida en probióticos) se mezcló con una croqueta no enriquecida en probióticos.

La croqueta activa se fabricó usando aproximadamente 8000 g de croquetas núcleo que consistían en una proteína vegetal extruida (producida según el método descrito en el Ejemplo 1) que se ha introducido en un mezclador de paletas mediante una tolva situada por encima del mezclador de paletas. El mezclador es un mezclador de zona fluidificada modelo Bella de 32 litros de capacidad fabricado por Dynamic Air Inc., St Paul, Minn., EE. UU. Las croquetas se han enfriado previamente en un refrigerador a aproximadamente 0 °C antes de agregarlas al mezclador. Una vez las croquetas se han agregado al mezclador, las paletas se hacen girar para fluidizar las croquetas. Las paletas se hacen girar a aproximadamente 94 rpm y un número de Froude de aproximadamente 1,1.

La grasa de elevado punto de fusión del primer recubrimiento enriquecido en probióticos es aceite de almendra de palma parcialmente hidrogenado de la marca Paramount B fabricado por Loders Croklaan, Inc., Channahon, IL, EE. UU. Aproximadamente 7,1 g de una *Bifidobacteria animalis* AHC7 (NCIMB 41199) deshidratada con una actividad de  $1,5 \times 10^{11}$  unidades formadoras de colonia por gramo se mezclaron completamente en aproximadamente 1100 g de Paramount B grasa con un mezclador de cocina para formar una mezcla. La mezcla de grasa-bifidobacteria se agrega al mezclador fluidizado a lo largo de aproximadamente un minuto bombeando la mezcla desde un vaso de precipitados a través de un tubo de silicona hasta un punto aproximadamente 25 cm por encima de la zona fluidizada en el centro de los mezcladores usando una bomba peristáltica Cole-Parmer modelo 07550-30 con dos cabezales de bomba Masterflex L/S Easyload II paralelos. La temperatura de Paramount B la grasa es aproximadamente 37 °C y se agrega en el centro del mezclador en la zona fluidizada. Al final de la adición de la

mezcla, el mezclado de las croquetas con las paletas continúa durante aproximadamente 10 segundos, a continuación, se abre la compuerta situada en el fondo del mezclador para vaciar las croquetas recubiertas en un receptor metálico.

5 La grasa de alto punto de fusión del segundo recubrimiento exterior es K.L.X., una mezcla de aceite de soja/algodón parcialmente hidrogenado fabricado por Loders Croklann, Inc., Channahon, IL, EE. UU. A continuación, las croquetas revestidas se devuelven al enfriador para enfriarse a aproximadamente 0 °C. Las croquetas recubiertas enfriadas se devuelven al mezclador de paletas, y el K.L.X. fundido a aproximadamente 56 °C se agregó al mezclador de la misma forma que el primer recubrimiento de Paramount B. Al final de la adición de la grasa, el  
10 mezclado de las croquetas con las paletas continúa durante aproximadamente 10 segundos, a continuación, se abre la compuerta situada en el fondo del mezclador para vaciar las croquetas recubiertas en un receptor metálico.

El examen visual de las croquetas muestra que las grasas están recubiertas de forma uniforme sobre la superficie de las croquetas para formar dos capas de grasa sólida. El corte de algunas croquetas por la mitad confirma que la distribución de los recubrimientos de grasa sólida alrededor de la superficie de las croquetas individuales es sustancialmente regular. La prueba posterior del cultivo bacteriano realizado sobre el producto muestra que la actividad cumple el objetivo deseado de  $2 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias por 20 g de croquetas recubiertas. Las croquetas no enriquecidas en probióticos consistentes en croquetas de pienso para perros (Iams MiniChunks, comercializado por the Iams Co. Dayton, OH, EE. UU.) que comprenden 27,4% de proteína, 15,9% de grasa, 7,4% de humedad y 7,4% de ceniza. El producto final es una mezcla de 10% en peso de croqueta activa con un 90% de croquetas no enriquecidas en probióticos.

#### 20 Ejemplo 10: Análisis de aroma

En este ejemplo, el aroma de una croqueta formada a partir de una matriz de núcleo basado en proteínas vegetales se compara con el aroma de croquetas formadas a partir de una croqueta de proteína procedente de una fuente animal (pollo). En piensos animales, un aroma deseable puede atraer al animal a alimentarse de un producto nutritivo y puede ser también agradable para el dueño. El presente Ejemplo usa cromatografía de gases/espectrometría de masas con microextracción en fase sólida (SPME-GC-MS) para analizar las muestras de pienso para animales domésticos para encontrar los compuestos asociados con los compuestos de buen aroma y los compuestos con malos olores.

Se usó el siguiente procedimiento para analizar los componentes volátiles del espacio superior por encima de una muestra de pienso para animales domésticos. Una croqueta que tenía una matriz de núcleo basado en proteínas (CPC) vegetales se comparó con una croqueta conformada usando grano molido grueso de subproducto de pollo. El producto croqueta se pesó (1,95 – 2,00 g) en el interior de un vial SPME de espacio superior (22 ml con tapón de septo), y se tapó el vial. Se prepararon duplicados de la muestra a analizar. Las muestras se colocaron en la bandeja de automuestreador del automuestreador Gerstel MPS 2 (Gerstel, Inc. Linthicom, MD, EE. UU.). Las muestras se calentaron a 75 °C durante 10 minutos (tiempo de equilibrado) y a continuación se muestrearon con una fibra Carb/DVB/PDMS SPME de 2 cm (Supelco, Bellefonte, PA, EE. UU.) a 75 °C durante 10 min. La fibra SPME se desorbió a continuación en la entrada del CG (250 °C) de un equipo Agilent 6890GC-5973 MS durante 8 min. El CG está equipado con una columna Restek Stabilwax 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm film. La temperatura del GC es inicialmente de 50 °C y se mantuvo a esta temperatura durante 1 min, a continuación ascendió con pendiente de 15 °C/min hasta 240 °C y se mantuvo durante 5 min. El cromatograma se midió contra los tiempos de retención habituales/iones diana con el software Chemstation, correspondiendo los picos a los compuestos específicos recogidos mediante cromatogramas de extracción de iones (EIC).

El análisis mediante SPME-GC-MS de las croquetas reveló que las croquetas fabricadas con CPC daban como resultado productos de olor inferior al de la croqueta fabricada con grano molido grueso de subproducto de pollo (CBPM). La croqueta CPC demostró una reducción sustancial en ácidos malolientes, ácido 3-metil butírico, ácido butanoico, ácido pentanoico y ácido hexanoico, en comparación con la croqueta de CBPM. Los resultados de los compuestos ácidos malolientes se presentan en la Tabla 8.

Análisis mediante SPME-GC-MS de las croquetas para detectar malos olores derivados del aroma de grasas oxidadas resultantes del enranciamiento. La grasa de la croqueta CPC procede de una fuente de materias primas independiente (grasa de pollo) que se ha estabilizado como una fuente pura de grasa. La croqueta basada en CPC mostró una cantidad muy inferior de compuestos procedentes de la oxidación de líquidos en comparación con la croqueta CBPM.

Los resultados de los compuestos de oxidación malolientes se presentan en la Tabla 9.

Las magnitudes y los valores descritos en la presente memoria no deben entenderse como estrictamente limitados a los valores numéricos exactos mencionados. En su lugar, a menos que se indique lo contrario, cada magnitud expresa tanto el valor mencionado, como un intervalo funcionalmente equivalente aproximado a ese valor. Por ejemplo, una magnitud descrita como “40 mm” significa “aproximadamente 40 mm”.

Tabla 8: Contenido en ácidos malolientes

ES 2 394 062 T3

<u>Producto</u>	<u>Ácido acético</u>	<u>Ácido propiónico</u>	<u>Ácido 3-metilbutírico</u>	<u>Ácido butanoico</u>	<u>Ácido pentanoico</u>	<u>Ácido hexanoico</u>	<u>Ácido 4-metilpentanoico</u>
Croquetas basadas en pollo n.º 1	1871243 6	6651430	892996	10342749	2933528	6494897	127987
Croquetas basadas en pollo n.º 2	1940859 7	6550664	2710114	42450011	1336058	1644489	304991
Croquetas basadas en concentrado de proteína de maíz.	1609562 3	3078146	801862	8028607	575071	1746261	118810

Tabla 9: Compuestos malolientes procedentes de la oxidación de lípidos

<u>Producto</u>	<u>Hexanal</u>	<u>Heptanal</u>	<u>2-Pentilfurano</u>	<u>Octanal</u>	<u>1-Octen-3-ol</u>	<u>3,5-Octadien-3-ona</u>	<u>Nonanal</u>
Croquetas basadas en pollo n.º 1	7864360	2733784	2778785	1142677	6661130	1750431	2034848
Croquetas basadas en pollo n.º 2	1609501	970282	2070812	277503	4090726	374212	911914
Croquetas basadas en concentrado de proteína de maíz.	1655605	921055	1149164	307426	1827551	394194	965334

5

**REIVINDICACIONES**

1. Una croqueta de pienso para animales que comprende:  
 5 una matriz de núcleo basado en proteínas que tiene más de 70% en peso de una proteína vegetal, en donde el núcleo basado en proteínas está exento de una matriz de almidón gelatinizado; y  
 al menos un recubrimiento que comprende una grasa y al menos un aditivo, en donde el recubrimiento está sobre la superficie del núcleo basado en proteínas.
2. La croqueta de pienso para animales de la reivindicación 1, en donde la matriz de núcleo basado en proteínas comprende una proteína vegetal seleccionada del grupo que consiste en grano seco para destilar, grano seco para destilar soluble, concentrado de proteína de maíz, grano molido grueso de gluten de maíz, aislado de proteína de soja, concentrado de proteína de soja, gluten de trigo, y combinaciones de cualquiera de los mismos.
3. La croqueta de pienso para animales de la reivindicación 1, en donde la croqueta comprende de 25% a 99,99% en peso de la matriz de núcleo basado en proteínas.
- 15 4. La croqueta de pienso para animales de la reivindicación 1, en donde el al menos un recubrimiento comprende al menos un recubrimiento activo sobre la superficie de la matriz de núcleo basado en proteínas.
5. La croqueta de pienso para animales de la reivindicación 1, en donde el al menos un recubrimiento comprende al menos un recubrimiento biológico sobre la superficie de la matriz de núcleo basado en proteínas.
- 20 6. La croqueta de pienso para animales de la reivindicación 5, en donde el al menos un recubrimiento biológico comprende al menos un recubrimiento enriquecido en probióticos.
7. La croqueta de pienso para animales de la reivindicación 6, en donde la croqueta comprende de 0,01% a 75% en peso del recubrimiento enriquecido en probióticos.
8. Un método para conformar una croqueta de pienso para animales que comprende:  
 25 extruir una matriz de núcleo basado en proteínas que tiene más de 70% en peso de una proteína vegetal, en donde el núcleo basado en proteínas está prácticamente exento de una matriz de almidón gelatinizado; y  
 recubrir al menos una parte de una superficie de la matriz de núcleo basado en proteínas con un recubrimiento que comprende un probiótico.
9. El método de la reivindicación 8, en donde la matriz de núcleo basado en proteínas comprende una proteína vegetal seleccionada del grupo que consiste en grano seco para destilar, grano seco para destilar soluble, concentrado de proteína de maíz, grano molido grueso de gluten de maíz, aislado de proteína de soja, concentrado de proteína de soja, gluten de trigo, y combinaciones de cualquiera de los mismos.
- 30 10. El método de la reivindicación 8, que además comprende recubrir al menos una parte de una superficie del recubrimiento probiótico con un segundo recubrimiento que comprende al menos un aceite vegetal parcialmente hidrogenado.
- 35 11. Un alimento para animales domésticos de tipo croqueta que comprende:  
 una primera croqueta que comprende:  
 una fuente de proteína de 16% a 50% en peso de la primera croqueta;  
 una fuente de grasa de 5% a 35% en peso de la primera croqueta; y  
 una fuente de carbohidratos; y  
 40 una segunda croqueta que comprende:  
 una matriz de núcleo basado en proteínas que tiene *más de 70% en peso de una proteína vegetal, en donde el núcleo basado en proteínas* está exento de una matriz de almidón gelatinizado, en el que la segunda croqueta comprende además: al menos un recubrimiento activo sobre al menos una parte de la superficie de la matriz de núcleo basado en proteínas y en donde el al menos un recubrimiento activo es  
 45 un recubrimiento enriquecido en probióticos.