

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 485**

51 Int. Cl.:

A23K 50/20 (2006.01)

A23K 20/10 (2006.01)

A23K 20/111 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.09.2009 PCT/EP2009/061586**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2010 WO10060660**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2009 E 09782724 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2348882**

54 Título: **Uso de sustancias naturales como aditivos para piensos para animales del género equidae**

30 Prioridad:

27.11.2008 EP 08020629

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

09.05.2017

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**FREHNER, MARCO;
PHILIPPS-WLEMANN, PETRA;
ELGAARD, BIRGIT y
LOSA, RICCARDO**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 611 485 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

Uso de sustancias naturales como aditivos para piensos para animales del género equidae

El presente invento se refiere al uso de compuestos activos naturales de guayacol, cúrcuma y timol en la producción de una dieta para caballos.

- 5 Más particularmente, el invento se refiere al uso de los tres compuestos que se han definido más arriba para el mejoramiento de la digestibilidad de la dieta, una estabilidad intestinal mejorada, una mejor ingestión del pienso (un apetito mejorado) y un mejor bienestar, y para estabilizar o modular la microflora intestinal del animal.

Además, el presente invento se refiere a una nueva composición de pienso para animales del género equidae, cuya composición comprende los tres compuestos activos de guayacol, cúrcuma y timol.

- 10 El término dieta, pienso o composición de pienso significa cualquier compuesto, preparado, mezcla o composición que se adecue, o se destine a una ingestión por el animal.

El género equidae abarca a los caballos. A diferencia de un rumiante, la capacidad intestinal de estos animales en relación con su tamaño corporal es pequeña. Esto requiere que el animal tenga que consumir pequeñas cantidades de pienso a intervalos relativamente frecuentes.

- 15 A causa de la ingestión continua de pequeñas cantidades de pienso, los caballos tienen - en el estado natural - un flujo relativamente constante de sustrato disponible para bacterias del intestino posterior, que permite una digestión adaptada natural del pienso. Sin embargo, dentro de prácticas pecuarias corrientes, esto con frecuencia no se da el caso. En vez de ello, los animales consumen una porción significativa de su dieta a lo largo de un breve período de tiempo. Especialmente los caballos de alto rendimiento, tales como por ejemplo los caballos de carreras, son alimentados con una dieta que es rica en hidratos de carbono para obtener una energía aumentada en un período de tiempo muy breve, preferiblemente ad libitum.
- 20

- Estos métodos de alimentación no naturales dan como resultado un movimiento errático de la ingesta a través del tracto gastrointestinal. Una parte mayoritaria de la dieta llega con frecuencia al intestino posterior relativamente sin degradar. Esto permite una fermentación bacteriana que provoca un significativo cambio en el pH intestinal, a saber desde un pH de 7 hasta un pH en el intestino ciego de < 6,5, lo cual, a su vez, da como resultado unas fluctuaciones en la especie y en las densidades de las poblaciones bacterianas colónicas. Esta desestabilización del intestino está asociada principalmente con una pérdida de apetito, que puede ser observada por una actividad de masticación reducida y, en una etapa posterior, por graves enfermedades metabólicas, tales como por ejemplo un cólico, un colapso, una azoturia y otros problemas digestivos relacionados.
- 25

- 30 Actualmente no se conoce ninguna manera de controlar el pH intestinal, ni de estimular o modificar unas poblaciones bacterianas intestinales en los caballos, aparte de la metodología de alimentación y el uso restrictivo de ciertos ingredientes.

- Por lo tanto existe una necesidad de una composición de pienso para usarse en la alimentación pecuaria que impida un cólico, un colapso y otros trastornos digestivos y que se pueda administrar al animal con el fin de estimular el apetito así como los movimientos de las mandíbulas y las velocidades de masticación.
- 35

A la vista de las deficiencias de la técnica anterior, que más arriba se han descrito, y otras metas relacionadas bien conocidas en la especialidad, un objeto del presente invento es proporcionar un aditivo para piensos que estimule la digestibilidad de la dieta, la estabilidad intestinal, la ingestión de pienso, el apetito del animal y que establezca o module a la microflora intestinal del animal.

- 40 Otro objeto del presente invento es proporcionar un aditivo para piensos que establezca el pH intestinal, preferiblemente mantenga al pH en un nivel > 6,3 con el objetivo específico de mantener el pH intestinal en unos niveles que impidan la formación de enfermedades asociadas con unos intervalos de pH más pequeños que 6,3.

Este y otros objetos pueden resultar más evidentes a un experto en la especialidad después de repasar la materia objetivo de este invento, como se detalla aquí.

- 45 Los inventores de la presente solicitud encontraron sorprendentemente que los compuestos que más arriba se han descrito, especialmente unas combinaciones de los mismos, tienen un gran potencial para usarse en piensos para caballos, p.ej. para mejorar la digestibilidad de la dieta, la estabilidad intestinal, la ingestión del pienso, el apetito y para modular la microflora intestinal del animal.

- El término "intestino", tal como se utiliza en el presente contexto, designa el tracto gastrointestinal o digestivo (también citado como el canal alimentario) y se refiere al sistema de órganos dentro de animales multicelulares que recibe el alimento, lo digiere para extraer energía y nutrientes y expulsa el material de desecho remanente.
- 5 El término "microflora" intestinal, tal como se usa en el presente contexto, se refiere a los cultivos microbianos naturales que residen en el intestino y mantienen la salud ayudando a una apropiada digestión
- El término "modula" o "estimula" tal como se usa en el presente contexto en conexión con la microflora intestinal significa generalmente cambiar, manipular, alterar o ajustar la función o el estado de la misma en un animal sano y que funciona normalmente, es decir un uso no terapéutico.
- 10 En un segundo aspecto, el presente invento proporciona una composición de pienso para caballos que comprende los tres compuestos activos de guayacol, cúrcuma y timol.
- El presente invento proporciona también un método de alimentar a animales con los tres compuestos que se han definido más arriba para el mejoramiento de la digestibilidad de la dieta, conseguir una estabilidad intestinal mejorada, una mejor ingestión del pienso y un mejor bienestar y para estabilizar o modular la microflora intestinal del animal.
- 15 Los compuestos de acuerdo con el invento están disponibles comercialmente o se pueden preparar con facilidad por una persona experta usando procedimientos y métodos bien conocidos en la técnica anterior.
- Los compuestos del invento se pueden usar en la forma de extractos o mezclas de extractos naturales disponibles o en la forma de una sustancia natural.
- 20 El término "extracto", tal como se usa en el presente contexto, incluye unas composiciones obtenidas mediante una extracción con disolventes (que también se conocen como "aceites extraídos"), una destilación con vapor de agua (que se conocen también como "aceites esenciales") u otros métodos conocidos por una persona experta. Unos apropiados disolventes para la extracción incluyen unos alcoholes tales como etanol.
- Por la expresión "natural" y "sustancia natural" se entiende en este contexto una sustancia que se compone de compuestos que se presentan en la naturaleza y se obtienen a partir de productos naturales o por medio de una síntesis.
- 25 Al (a los) compuesto(s) activos o a la(s) mezcla(s) de los mismos o a una sustancia natural o a un extracto se les pueden añadir otros ingredientes activos en cantidades minoritarias. Ejemplos de tales ingredientes son: capsaicina, tanino, piperina, carvacrol, trimetilamina, 3,4, xilenol, alcohol furfurílico, propilideno, butilideno, ftalidas, gingerol, aceite de lavanda; deca-, undeca-, dodecalactonas, iononas, irona, resorcinol, aceite de menta piperita, alfa-pineno;
- 30 limoneno, anetol, linalool, dihidrojasmonato de metilo; carvacrol, ácido propiónico, acético o butírico, aceite de romero, aceite de clavo, geraniol, terpineol, citronelol; los salicilatos de amilo y/o de bencilo, cinamaldehído, vainillina, un polifenol vegetal (tanino) y mezclas de los mismos.
- Si se prefiere una mezcla de los tres compuestos que se han especificado más arriba, se usan cúrcuma y/o timol como un componente principal de la mezcla, es decir una composición de pienso para caballos. Apropiadamente, la mezcla contiene 10-40 % en peso de timol y/o cúrcuma, 5-30 % en peso de guayacol y opcionalmente 2-15 % en peso de 3-metil-fenol y/o eugenol y/o eucaliptol y/o L-mentol, en donde las cantidades se calculan con relación a la cantidad total de dichos componentes. La cantidad total de estos ingredientes activos puede variar dentro de amplios límites, pero finalmente se usan en el pienso para caballos de 1 a 500 ppm (partes por millón), preferiblemente entre 5 y 150 ppm, calculadas con respecto al peso en seco del pienso para caballos.
- 35 En un ejemplo preferido, la composición comprende los tres compuestos cúrcuma, timol y guayacol como componentes principales de la mezcla. Apropiadamente, la mezcla contiene 25-35 % en peso de timol, 20-30 % en peso de cúrcuma, 15-25 % en peso de guayacol y opcionalmente 5-10 % en peso de 3-metil-fenol y/o eugenol y/o eucaliptol y/o L-mentol y 1-5 % en peso de piperina.
- 40 Todos los compuestos que se han definido aquí anteriormente (compuestos activos e ingredientes adicionales) se pueden usar en la alimentación de animales en forma de una composición de pienso. En dicha composición de pienso los compuestos se pueden usar en combinación con un compuesto tensioactivo emulsionante. El agente emulsionante se puede seleccionar ventajosamente entre los que tienen una naturaleza bastante hidrófila, por ejemplo entre ésteres de poligliceroles de ácidos grasos tales como ácido ricinoleico esterificado o ésteres de propilen glicol de ácidos grasos, ésteres sacáricos o glicéridos sacáricos, un poli(etilen glicol), lecitina, etc.
- 45 Otra característica de la composición de pienso puede consistir en que los compuestos de aceites esenciales presentes en la composición son adsorbidos sobre un vehículo vegetal y/o mineral, en donde el vehículo mineral se
- 50

selecciona por ejemplo entre el conjunto que se compone de dióxido de silicio, los silicatos de aluminio y de magnesio y en donde el vehículo vegetal se selecciona por ejemplo entre el conjunto que se compone de fibras, tales como por ejemplo fibras de madera, semolina de trigo y derivados lácteos.

5 La incorporación de la composición de pienso que contiene el (los) compuesto(s) activo(s) dentro de un pienso final para animales, por ejemplo un pienso para caballos, se puede llevar a cabo preparando una premezcla de los ingredientes activos y otros aditivos apropiados. Dicha premezcla puede comprender 2-10 % en peso de la mezcla activa o sustancia o extracto natural, 0-40 % en peso de otros aditivos convencionales, tales como aromatizantes, y 50-98 % en peso de cualquier soporte absorbente convencional.

10 El soporte puede contener por ejemplo 40-50 % en peso de fibras de madera, 8-10 % en peso de estearina, 4-5 % en peso de polvo de cúrcuma, 4-5 % en peso de polvo de romero, 22-28 % en peso de piedra caliza, 1-3 % en peso de una goma, tal como goma arábiga, 5-50 % en peso de azúcares y/o almidones y 5-15 % en peso de agua.

Esta premezcla es mezclada luego con vitaminas, sales minerales y otros ingredientes aditivos para piensos y finalmente se añade luego al pienso en unas cantidades tales que este pienso contendrá finalmente 1-500 ppm, preferiblemente 100-400 ppm o 150-300 ppm de la mezcla de ingredientes activos de acuerdo con el invento.

15 Unos ejemplos de dosificaciones particularmente preferidas de, por ejemplo, los tres compuestos timol, cúrcuma y guayacol en un pienso final para caballos están independientemente unos de otros en los siguientes intervalos: timol entre 30 y 150 ppm, preferiblemente entre 50 y 100 ppm; cúrcuma entre 20 y 100 ppm, preferiblemente entre 30 y 80 ppm; guayacol entre 10 y 80 ppm, preferiblemente entre 25 y 60 ppm.

20 Otros opcionales ingredientes aditivos para piensos son agentes colorantes, p.ej. carotenoides tales como beta-caroteno, astaxantina y luteína; compuestos de aroma (aromáticos), estabilizadores, péptidos antimicrobianos; ácidos grasos poliinsaturados; y/o por lo menos una enzima seleccionada entre fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); xilanasa (EC 3.2.1.8); galactanasa (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22); una proteasa (EC 3.4.); fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5); fosfolipasa C (EC 3.1.4.3); fosfolipasa D (EC 3.1.4.4); una amilasa tal como, por ejemplo, alfa-amilasa (EC 3.2.1.1); y/o beta-glucanasa (EC 3.2.1.4 o EC 3.2.1.6).

Ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados son unos ácidos grasos poliinsaturados de C18, C20 y C22 tales como ácido araquidónico, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico y ácido gamma-linoleico.

30 El término "pienso para caballos", tal como se usa en presente contexto, incluye una composición de pienso de acuerdo con el invento y los componentes que se han descrito más arriba. Típicamente, un pienso para caballos incluye una harina para caballos como un componente. Apropiadamente, el pienso para caballos está en la forma de escamas o gránulos, por ejemplo gránulos extrudidos.

35 Un pienso para caballos tiene una composición aproximada de 8-20 % en peso de proteínas, y 3-15 % en peso de humedad. Unos caballos de alto rendimiento viven en unas condiciones que están caracterizadas por una alta necesidad de energía. Por ejemplo, un típico pienso para caballos, concretamente para caballos de carreras, comprende una cantidad aumentada de un almidón rico en energía, por ejemplo almidón de maíz. La utilización del almidón disminuye notablemente cuando la ingestión aumenta por debajo de los niveles de mantenimiento puesto que el caballo tiene una fuente limitada de enzimas, especialmente amilasas, que son capaces de reducir al almidón. Estos métodos de alimentación no naturales dan como resultado problemas, como se ha debatido más arriba.

40 Los inventores de la presente solicitud encontraron sorprendentemente que los compuestos que más arriba se han definido, especialmente unas combinaciones de los mismos, tienen también un gran potencial para la estimulación de enzimas digestivas, tales como por ejemplo amilasas producidas a partir tanto del páncreas como de la mucosa intestinal.

45 Por lo tanto, el invento se refiere también al uso de los tres compuestos que se han definido más arriba para la estimulación de enzimas digestivas, preferiblemente amilasas.

Otro objeto del presente invento es proporcionar unas amilasas alternativas, preferiblemente mejoradas, que se pueden usar en combinación con los compuestos de aceites esenciales que más arriba se han definido para mejorar la utilización de los piensos, es decir para degradar el almidón en el rumen, en los intestinos gruesos y/o en los intestinos delgados.

50 Por lo tanto el presente invento se refiere también al uso de los tres compuestos que se han definido más arriba en combinación con una amilasa en piensos para animales del género equidae, tales como caballos, en particular para mejorar la degradación de almidón. El invento se refiere además a unas composiciones tales como unos piensos y

unos aditivos para piensos que comprenden una amilasa, por ejemplo una amilasa bacteriana, en combinación con unos compuestos de aceites esenciales que se han definido más arriba.

5 Las amilasas útiles de acuerdo con el invento pueden tener además, o de manera alternativa, propiedades mejoradas tales como el perfil de dosis y respuesta, el perfil de pH, la estabilidad en granulación, la estabilidad en temperatura, la estabilidad de sales biliares, la estabilidad de proteasas y/o la estabilidad específica.

En el presente contexto, una amilasa es una enzima que cataliza la endo-hidrólisis de almidón y/o otros oligo- y polisacáridos lineales y ramificados. En una forma de realización particular, la amilasa destinada a su uso de acuerdo con el invento tiene una actividad de alfa-amilasa, es decir cataliza la endohidrólisis de enlaces 1,4-alfa-glucosídicos en oligosacáridos y polisacáridos.

10 Las alfa-amilasas actúan p.ej. sobre almidón, glicógeno y polisacáridos y oligosacáridos relacionados de una manera aleatoria liberando grupos reductores en la configuración alfa.

15 En una forma preferida de realización del invento es una alfa-amilasa (nombre sistemático: 1,4-alfa-D-glucano glucanohidrolasa). En otras formas de realización, la amilasa del invento pertenece al grupo de amilasas EC 3.2.1. tales como EC 3.2.1.1. (alfa-amilasa), EC 3.2.1.2 (beta-amilasa), EC 3.2.1.3 (1,4-alfa-glucosidasa, amiloglucosidasa o glucoamilasa), EC 3.2.1.20 (alfa-glucosidasa), EC 3.2.1.60 (glucano 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa), EC 3.2.1.68 (isoamilasa), EC 3.2.1.98 (glucano 1,4-alfa-maltohexosidasa) o EC 3.2.1.133 (glucano 1,4-alfa-maltohidrolasa).

20 En una forma preferida de realización la amilasa destinada a su uso de acuerdo con el invento puede ser, o es, clasificada como perteneciente al grupo EC 3.2.1.1. Los números EC se refieren a la Nomenclatura de Enzimas de 1992 de NC-IUBMB, Academic Press, San Diego, California, incluyendo los suplementos 1-5 publicados en Eur. J. Biochem. 1994, 223, 1-5; Eur. J. Biochem. 1995, 232, 1-6; Eur. J. Biochem. 1996, 237, 1-5; Eur. J. Biochem. 1997, 250, 1-6; y Eur. J. Biochem. 1999, 264, 610-650; respectivamente. La nomenclatura es suplementada y puesta al día regularmente, véase p.ej. en <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html>.

25 La actividad de amilasa se puede determinar mediante cualquier ensayo apropiado. Generalmente el pH del ensayo y la temperatura del ensayo se pueden adaptar a la enzima en cuestión. Ejemplos de valores del pH de ensayo son los pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12. Ejemplos de temperaturas del ensayo son 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90 o 95°C. Unos valores del pH y unas temperaturas preferidos/as están en la región fisiológica, tales como unos valores del pH de 3, 4, 5, 6, 7 ó 8 y unas temperaturas de 30, 35, 37 o 40°C. Se puede usar el siguiente ensayo de amilasa: Substrato: tabletas de Phadebas (de Pharmacia Diagnostics; un polímero de almidón reticulado, insoluble y coloreado de azul, que se mezcla con una albúmina de suero bovino y una sustancia tamponadora y se fabrica en la forma de tabletas). Temperatura del ensayo: 37°C. Valor del pH del ensayo: 4,3 (o 7,0, si se desea). Tiempo de reacción: 20 min. Después de su suspensión en agua, el almidón es hidrolizado por la alfa-amilasa proporcionando unos fragmentos solubles de color azul. La absorbencia de la resultante solución de color azul, medida a 620 nm, es una función de la actividad de alfa-amilasa. Una Unidad de alfa-Amilasa Fúngica (1 FAU) es la cantidad de enzima que descompone 5,26 g de almidón por hora en las condiciones normalizadas de ensayo. Un almidón preferido es Merck, Amylum solubile Erg. B. 6, Tanda 9947275. Una descripción más detallada del ensayo, APTSMYQI-3207, está disponible a petición en Novozymes A/S, Krogshoejvej 36, DK-2880 Bagsvaerd, Dinamarca.

40 En una forma particular de realización, la amilasa, en la forma en la que ella es añadida al pienso, o cuando es incluida en un aditivo para pienso, está bien definida. El concepto de "bien definida" significa que la preparación de amilasa es pura en por lo menos un 50 % sobre una base de proteína. En otras formas de realización particulares, la preparación de amilasa es pura en por lo menos 60, 70, 80, 85, 88, 90, 92, 94 o en por lo menos 95 %. La pureza puede ser determinada por cualquier método conocido en la especialidad, p.ej. mediante una SDS-PAGE, o una cromatografía de exclusión de tamaños (véase el Ejemplo 12 del documento WO 01/58275).

45 Un preparado de una amilasa bien definida es ventajoso. Por ejemplo, es mucho más fácil añadir dosificadamente de manera correcta al pienso una amilasa que está esencialmente exenta de otras enzimas interferentes o contaminantes. El término "añadir dosificadamente de manera correcta" se refiere en particular al objetivo de obtener unos resultados coherentes y constantes, y la capacidad de optimizar la dosificación basándose en el efecto deseado.

50 Unos preparados de amilasas con unas purezas de este orden de magnitud son obtenibles en particular usando unos métodos recombinantes de producción, mientras que ellos no se obtienen con tanta facilidad y también son susceptibles a una variación mucho mayor de una tanda a otra tanda cuando se producen por métodos de fermentación tradicionales.

El aislamiento, la purificación y la concentración de la amilasa del invento se pueden llevar a cabo por medios convencionales. Por ejemplo, ella se puede recuperar a partir de un caldo de fermentación por procesos convencionales incluyendo, pero sin limitarse a, los de centrifugación, filtración, extracción, secado por atomización,

5 evaporación o precipitación, y se puede purificar ulteriormente por una diversidad de procesos conocidos en la especialidad, que incluyen, pero no se limitan a, procesos de cromatografía (p.ej. de intercambio de iones, de afinidad, hidrófoba, cromatoenfoco y exclusión de tamaños), procesos electroforéticos (p.ej. enfoque isoelectrico preparativo), de solubilidad diferencial (p.ej. precipitación con sulfato de amonio), SDS-PAGE, o extracción (véase, p.ej. Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Ryden, coordinadores de edición, VCH Publishers, New York, 1989). La amilasa purificada puede ser formulada, tal como se conoce en la especialidad, en forma de un producto líquido o sólido que es apropiado para usarse en piensos para animales y/o aditivos para piensos para animales.

10 La amilasa bacteriana destinada a usarse de acuerdo con el invento es incluida en dietas para caballos o aditivos para piensos para caballos en una cantidad efectiva. Actualmente se considera que una cantidad efectiva está por debajo de 1.000 mg de proteína enzima por kg de materia seca de dieta (ppm), preferiblemente por debajo de 800, 600, 500, 400 o por debajo de 300 ppm. En una forma de realización preferida, la dosificación de la amilasa está por debajo de 200 mg de proteína enzima por kg de materia seca de dieta, preferiblemente por debajo de 150, 100, 90, 80, 70, 60 o por debajo de 50 ppm. En una forma de realización incluso más preferida, la dosificación de la amilasa está por debajo de 40, 35, 30, 25 o por debajo de 20 ppm. En una forma de realización sumamente preferida la dosificación de la amilasa está por debajo de 15, 12, 10, 9, 8 o por debajo de 7 mg de proteína enzima por kg de materia seca de dieta. Por otro lado, una cantidad efectiva puede estar por encima de 0,01 mg de proteína de enzima por kg de materia seca de dieta, preferiblemente por encima de 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,75, 1, 2, 3 o por encima de 4 mg de proteína enzima por kg de materia seca de dieta (ppm).. Correspondientemente, unos ejemplos no limitativos de intervalos de dosis preferidos son los de: 0,10-50 mg de proteína enzima/kg, preferiblemente 0,50-10, 1-9, 2-8, 3-8 o 4-7 mg de proteína enzima/kg. Ejemplos adicionales de intervalos de dosificación preferidos, todos ellos en ppm, son los de: 1-35, 1-30, 2-25, 3-20 y 4-15.

20 Para determinar los mg de proteína amilasa por kg de pienso, la amilasa es purificada a partir de la composición de pienso y la actividad específica de la amilasa purificada es determinada usando el deseado ensayo de amilasa. La actividad de amilasa de la composición de pienso es como tal se determina también usando el mismo ensayo y, sobre la base de estas dos determinaciones, se calcula la dosificación en mg de proteína enzima amilasa por kg de pienso.

25 Los mismos principios se aplican para determinar los mg de proteína amilasa en aditivos para piensos. Desde luego, si está disponible una muestra de la amilasa usada para preparar el aditivo para piensos o el pienso, la actividad específica se determina a partir de esta muestra (no hay necesidad de purificar la amilasa a partir de la composición de pienso o del aditivo).

30 La amilasa destinada a usarse de acuerdo con el invento se deriva preferiblemente de una cepa de Bacillus, tal como cepas de Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus circulans, Bacillus halmapalus, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Bacillus sp., Bacillus stearothermophilus y Bacillus subtilis; preferiblemente a partir de cepas de Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus halmapalus, Bacillus licheniformis, Bacillus sp., Bacillus subtilis y Bacillus stearothermophilus; más preferiblemente a partir de cepas de Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus halmapalus, Bacillus licheniformis, Bacillus sp. y Bacillus stearothermophilus; incluso más preferiblemente a partir de Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus halmapalus, Bacillus sp. y Bacillus stearothermophilus; de manera sumamente preferible a partir de Bacillus stearothermophilus.

35 Ejemplos no limitativos de amilasas destinadas a usarse de acuerdo con el invento son las que se derivan de Bacillus licheniformis, tal como el nombre de entrada en Swissprot AMY_BACLI y el número de acceso primario P06278; de Bacillus amyloliquefaciens, tal como el nombre de entrada en Swissprot AMY_BACAM y el número de acceso primario P00692; de Bacillus megaterium, tal como el nombre de entrada en Swissprot AMY_BACME y el número de acceso primario P20845; de Bacillus circulans, tal como el nombre de entrada en Swissprot AMY_BACCI y el número de acceso primario P08137; de Bacillus stearothermophilus, tal como el nombre de entrada en Swissprot AMY_BACST y el número de acceso primario P06279. Otro ejemplo se deriva de Bacillus subtilis, tal como el nombre de entrada en Swissprot AMY_BACSU y el número de acceso primario P00691

40 Para las finalidades del presente invento, unas amilasas preferidas son las amilasas que están contenidas en los siguientes productos comerciales: BAN, Stainzyme, Termamyl SC, Natalase y Duramyl (todos de Novozymes).

45 Otros ejemplos particulares de amilasas destinados a usarse de acuerdo con el invento son las amilasas contenidas en los productos comerciales Validase BAA y Validase HT (de Valley Research).

50 Todavía otras ejemplos particulares adicionales de amilasas destinadas al uso de acuerdo con el invento son las amilasas contenidas en los siguientes productos comerciales: Clarase, DexLo, GC 262 SP, G-Zyme G990, G-Zyme G995, G-Zyme G997, G-Zyme G998, HTAA, Optimax 7525, Purastar OxAm, Purastar ST, Spezyme AA, Spezyme Alpha, Spezyme BBA, Spezyme Delta AA, Spezyme DBA, Spezyme Ethyl, Spezyme Fred (GC521), Spezyme HPA, Spezyme Extra y Ultraphlow (todos de Genencor); Validase HT340L, Valley Thin 340L (todos de Valley Research); Avizyme 1500, Dextro 300 L, Kleistase, Maltazyme, Maxamyl, Thermozyyme, Thermatex, Starzyme HT 120 L, Starzyme Super Conc y Ultraphlo.

5 El invento descrito y reivindicado en el presente contexto no ha de ser limitado en su alcance por las formas de realización específicas que aquí se describen, puesto que se pretende que estas formas de realización sirvan como ilustraciones de varios aspectos del invento. Se pretende que cualesquiera formas de realización equivalentes estén dentro del alcance de este invento. Desde luego, diversas modificaciones del invento, además de las mostradas y descritas en el presente contexto, resultarán evidentes a los expertos en la especialidad a partir de la precedente descripción. Se pretende que también dichas modificaciones caigan dentro del alcance de las reivindicaciones anejas.

Se pretende que el siguiente Ejemplo específico ilustre el invento.

Ejemplo 1: Pienso para caballos

10 Un pienso compuesto para caballos ("High Energy Müsli, Eggersmann"), que contiene una mezcla de compuestos de acuerdo con el invento, se puede preparar mezclando conjuntamente los siguientes ingredientes usando un convencional aparato mezclador a la temperatura ambiente.

Ingrediente	Cantidad (por kg)
Cebada (escamas)	356 g
Maíz	264 g
Harina de soja	87 g
Melaza	57g
Aceite	51 g
Maíz expandido	50 g
Guisantes (escamas)	44 g
Salvado de trigo	41 g
DCP	10 g
NaCl	6 g
MgO	2 g
Levadura de cerveza, secada	1 g
Residuos de cervecero	1 g
Premezcla de vitaminas y elementos traza	30 g
Timol	5 mg
Cúrcuma	2 mg
Guayacol	0,35 mg

15 Ejemplo 2: Efecto de compuestos de aceites esenciales sobre la palatabilidad, el pH cecal, los ácidos grasos volátiles cecales y las concentraciones de amoníaco y los números de protozoos cecales

Se realizó una prueba con tres caballos. Junto a un tratamiento testigo no suplementado se añadieron 312,5 mg de una composición de pienso que comprendía timol, cúrcuma y guayacol (citada aquí abreviadamente por el nombre CRINA) se añadió a un kg de pienso.

20 La composición CRINA comprende como ingredientes activos principales los siguientes compuestos, en donde estos compuestos se mezclan sobre un vehículo vegetal y mineral que comprende fibras de vidrio, semolina de trigo y carbonato de calcio:

Composición CRINA:

Ingredientes activos	% (p/p)	
Timol	10	100 g/kg
Cúrcuma en polvo	8	80 g/kg
Guayacol	8	60 g/kg

Aplicación en mg/día/100 kg corporal: 60

El estudio se realizó con 3 caballos castrados (trotones noruegos de sangre fría) con una edad de 8-11 años y con unos pesos corporales de 530-560 kg en el establo experimental de la Universidad Noruega de Ciencias de la Vida, Aas, Noruega.

5 Los caballos se mantuvieron en los establos acomodados en lechos de virutas de madera y se ejercitaron diariamente durante una hora en una máquina rotatoria de ejercicios al aire libre controlada por ordenador (Ø 27 m)

Hubo dos intensidades de ejercicio:

1. Intensidad de ejercicio 1: Paseo (40 minutos), trote lento (20 minutos).
2. Intensidad de ejercicio 2: Paseo (20 minutos), trote lento (20 minutos), medio galope (20 minutos)
3. Velocidad: Paseo (1,8 m/s), trote lento (3,5-4,0 m/s), medio galope (6,5 m/s).

10 Piensos y alimentación

Las raciones diarias se componían de heno de prado (principalmente hierba timotea) y ya sea cebada granulada con 3 % de melaza (dieta testigo) o bien cebada granulada con 3 % de melaza y 0,03125 % de CRINA (dieta experimental).

15 Tabla 1. Raciones diarias de heno y cebada granulada (kg).

Comida	Nivel de ejercicio 1		Nivel de ejercicio 2	
	Heno de prado	Cebada granulada ^{ab}	Heno de prado	Cebada granulada ^{ab}
Por la mañana, 08:00 h	2	2,2	2	2,2
Por el mediodía, 14:00 h	2	0	2	0,5
Por la noche, 19:00 h	3	0	3	0,5

a Dieta testigo: Cebada granulada sin CRINA.
b Dieta CRINA: Cebada granulada con CRINA.

20 La cantidad de cebada granulada se había aumentado en el Nivel de ejercicio 2. Sin embargo, la comida por la mañana era idéntica en ambos niveles de ejercicio. Un heno de prado de la misma cosecha se usó a lo largo de todo el experimento. (Análisis químico del heno: Materia seca (92,2%), Cenizas (5,25%), NDF (57,8%), N de Kjeldahl (11,4%); El contenido de almidón de la cebada era de 52,1%.)

Diseño experimental

25 El experimento se dividió en 4 periodos de acuerdo con la dieta y la intensidad de ejercicio (Tabla 2). Cada período constaba de un período de preparación de 23 días antes del muestreo del fluido cecal en los días 24 y 27, y el registro del pH cecal en el día 28. Después de un análisis químico, se calcularon las medias de los datos procedentes de los días 24 y 27 y se usaron para el análisis estadístico

Tabla 2. Tratamientos dietéticos e intensidades de ejercicio.

Período	Intensidad de ejercicio	Dieta		
		Caballo 1	Caballo 2	Caballo 3
1	1	Testigo	Experimental	Testigo
2	1	Experimental	Testigo	Experimental
3	2	Testigo	Experimental	Testigo
4	2	Experimental	Testigo	Experimental

Análisis químico

30 La materia seca se determinó en unas muestras secadas en horno a 103°C durante un mínimo de 16 horas. Las cenizas y el N de Kjeldahl se determinaron de acuerdo con AOAC (1990). La NDF se determinó tal como se describió por Goering y van Soest (1970) con la modificación de que las muestras no fueron lavadas en acetona. Se usó el método de Mcleary y colaboradores (1994) para determinar el almidón sin ninguna corrección para azúcar.

Los ácidos volátiles en un líquido cecal se determinaron por cromatografía de gases por el Sistema Perkin-Elmer Auto (de Perkin-Elmer Inc., Norwalk, CT, EE.UU.) usando una columna ECONO-Cap™ (Alltech Associates Inc.,

Deerfield, IL, EE.UU.). El nitrógeno de amoníaco (NH₃-N) en el fluido cecal se ensayó usando el proceso de Tingwall (1978) y el analizador por inyección de flujo FIA 5035 Spectrophotometer; Techato AB, Høganäs, Suecia.

Medición del pH: El pH se midió colocando un electrodo para pH directamente en el intestino ciego usando la fístula y los valores se registraron automáticamente cada 5 segundos (WTW-pH 340, Ehlert & Partner, Alemania).

- 5 Muestreo del contenido cecal: El contenido cecal se evacuó manualmente a través de la fístula cecal antes de la comida mañanera y 3 horas y 6 horas después de la alimentación. Se guardaron diez ml en unos tubos que contenían 1 ml de ácido fórmico y se almacenaron a 4°C hasta el análisis de VFA.

Análisis estadístico

10 El análisis estadístico de la palatabilidad (tiempo hasta que se coman los concentrados después de la comida mañanera) se realizó usando el proceso Proc Mixed de SAS (1998). La declaración repetida se usó para indicar las variables (repetidas) dentro de un individuo (registros individuales diarios del tiempo de comer). En el modelo, los efectos fijados fueron un caballo y una dieta individuales. El tiempo (día) fue definido como "un efecto aleatorio". La estructura de covarianza de las mediciones repetidas era una simetría compuesta (tipo = cs).

15 Los análisis estadísticos de la VFA cecal se realizaron usando el proceso GLM de SAS (1998). Se calcularon las medias para muestras procedentes de los días 24 y 27 en cada período, y se usaron para el análisis estadístico. El caballo, la dieta y la intensidad de ejercicio individuales se incluyeron en el modelo estadístico como efectos explicatorios. El efecto de la intensidad de ejercicio no era significativo y se eliminó desde el modelo. Las medias fueron separadas de acuerdo con el ensayo de la diferencia significativa mínimo (LSD). Todos los resultados son presentados como LSMEANS para cada tratamiento. En el apéndice los valores se dan como media ± desviación
20 típica.

Resultados

Palatabilidad

25 El tiempo que cada caballo necesitaba para comer la comida mañanera de cebada granulada se registró durante 34 días consecutivos. No hubo ningún efecto de la intensidad de ejercicio, por lo que este efecto fue excluido desde el modelo. Los caballos consumían la comida mañanera de concentrados con mayor rapidez cuando se incluía CRINA en la cebada granulada (16,9 min) en comparación con el testigo sin CRINA (19,5 min) (p < 0,001). Los residuos de pienso se registraron en 7 ocasiones, seis veces con la dieta testigo y una vez con la dieta CRINA. Cuando los residuos fueron registrados en la dieta CRINA (0,1 kg) fue la primera vez que a un caballo se le ofreció un pienso con CRINA.

30 Hubo también un efecto de un caballo individual (p < 0,001), pero no hubo ninguna interacción entre un caballo y una dieta (Figura 1 y Tabla 3 – Tiempo consumido para comer la comida mañanera de concentrados). El Caballo 2 tenía la más alta diferencia en cuanto al tiempo de comer entre la dieta testigo y la dieta CRINA. Este caballo podría ser caracterizado como un "comedor lento" y es en general un caballo difícil de alimentar puesto que él con frecuencia reacciona a nuevos piensos o cantidades de pienso dejando residuos. Hubo también una marcada diferencia entre
35 dietas para el Caballo 1 que podría ser caracterizado como un "caballo normal" cuando él viene a ingerir pienso. El Caballo 3, sin embargo, comería aproximadamente todo lo que se le ofreciese y nosotros podríamos ver una muy pequeña diferencia en el tiempo consumido para comer las diferentes dietas. Incluso aunque hubiesen solamente tres caballos individuales en esta prueba era interesante observar que el efecto de CRINA sobre la palatabilidad (tiempo para comer) era más pronunciado para el comedor lento que para el comedor rápido.

40 Tabla 3. Tiempo consumido en comer la comida mañanera de concentrados (min).

	Dieta	
	Testigo	CRINA
Media	20,3 ± 8,2	16,0 ± 4,5
Caballo 1	15,7 ± 3,4	13,3 ± 1,0
Caballo 2	28,1 ± 7,3	22,8 ± 3,9
Caballo 3	14,1 ± 1,9	13,9 ± 0,9

45 De acuerdo con la bibliografía, el tiempo normal promedio para comer un kg de concentrado granulado es de aproximadamente 10 minutos para caballos grandes, pero con grandes variaciones individuales (Meyer, H., L. Ahlswede y H. Reinhard, 1975. Untersuchungen über Fressdauer, Kaufrequenz und Futterzerkleinerung beim Pferd.

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 82, 54-58.). En el presente estudio, el caballo 1 y el caballo 3 son más rápidos y el caballo 2 es más lento en comparación con estas figuras.

Valores de pH cecales

5 Registrando el valor del pH en el ciego cada 5 minutos durante 6 horas después de la alimentación se dio una buena imagen de los cambios en el pH cecal (Figura 2 - Valores del pH cecal).

10 El pH cecal estaba próximo a 7,0 al período de registro. A aproximadamente los 60 minutos después de la alimentación, los valores comenzaron a disminuir independientemente de la dieta. En la dieta CRINA los valores alcanzaron un mínimo de 6,35 a aproximadamente los 200 minutos y comenzaron a aumentar nuevamente a los 225 minutos. En el final del período de registro (335 minutos después de la alimentación) el valor del pH era de 6,6. En la dieta testigo, sin embargo, los valores se mantuvieron descendentes hasta que se alcanzaron los valores más bajos (6,1) a los 280 minutos después de la alimentación. Después de esto, los valores aumentaron hasta 6,2 hacia el final del período de registro. La Figura 2 muestra con claridad que la CRINA había afectado a los cambios en el pH cecal.

Ácidos grasos volátiles

15 La cantidad de ácidos grasos volátiles totales (VFA) en un fluido cecal no fue influenciada por la dieta. Los valores para la dieta testigo y la dieta CRINA fueron de 50,22 y 50,48 mmol/l, respectivamente (p=0,91) (Figura 3 – ácidos grasos volátiles cecales totales (mmol/l) y Tabla 4).

Tabla 4. Concentraciones de VFA cecales totales y % molar de VFA y concentración de nitrógeno de amoníaco cecal (media ± desviación típica).

	Horas después de la alimentación			Media
	0	3	6	
VFA cecales totales, mmol/l:				
Dieta testigo	48,1 ± 13,5	51,3 ± 8,4	51,2 ± 9,6	50,2 ± 10,2
Dieta CRINA	43,9 ± 5,6	48,6 ± 8,5	58,9 ± 9,4	50,5 ± 9,9
Acetato, % molar:				
Dieta testigo	74,1 ± 2,3	73,6 ± 4,7	70,2 ± 5,2	72,6 ± 4,4
Dieta CRINA	73,0 ± 1,7	69,7 ± 2,1	68,0 ± 2,2	70,2 ± 2,8
Propionato, % molar:				
Dieta testigo	18,5 ± 3,0	15,9 ± 3,5	20,5 ± 4,6	18,3 ± 4,0
Dieta CRINA	19,7 ± 1,3	19,8 ± 2,4	24,1 ± 1,9	21,2 ± 2,8
Butirato, % molar:				
Dieta testigo	6,2 ± 0,6	7,8 ± 0,5	7,7 ± 0,8	7,2 ± 1,0
Dieta CRINA	6,1 ± 0,7	6,7 ± 1,2	6,7 ± 1,3	6,5 ± 1,1

Sin embargo, los porcentajes molares de los diferentes VFA's fueron influenciados por la dieta.

20 Para la dieta testigo y la dieta CRINA los porcentajes molares de acetato fueron de 72,63 y 70,22, respectivamente (p < 0,001). Estas diferencias eran solamente significativas (p < 0,05) a las 3 horas después de la alimentación (Figura 4 – porcentaje molar de acetato cecal).

25 El porcentaje molar de propionato era más bajo en la dieta testigo que en la dieta CRINA, 18,31 y 21,22, respectivamente (p < 0,003). Estas diferencias podrían observarse en los tiempos 0, 3 y 6 horas después de la alimentación y alcanzaron un nivel significativo en los tiempos 3 y 6 horas después de la alimentación (Figura 5 – porcentaje molar de propionato cecal).

30 El porcentaje molar de butirato era más alto en la dieta testigo que en la dieta CRINA, 7,25 y 6,47, respectivamente (p < 0,01). Estas diferencias alcanzaron un nivel significativo en los tiempos de 3 y 6 horas después de la alimentación (p < 0,05) (Figura 6 - porcentaje molar de butirato cecal).

Conclusiones

- La inclusión de CRINA en la cebada granulada mejoraba la palatabilidad medida como el tiempo consumido para comer la comida mañanera de concentrados y también redujo las negativas.
- 5 - Los valores del pH cecal eran influenciados por la dieta. La caída en el pH hasta 6 horas después de la alimentación era menor cuando los caballos se alimentaban con la dieta CRINA que cuando lo hacían con la dieta testigo.
- La concentración de ácidos grasos volátiles totales cecales no era influenciada por la dieta.
- El porcentaje molar de los ácidos grasos volátiles cecales era influenciado por la dieta, puesto que las cantidades de acetato (C2) y de butirato (C4) fueron reducidas mientras que la cantidad de propionato (C3) aumentaba en la dieta CRINA.
- 10

El hecho de añadir CRINA a la cebada granulada (dieta CRINA) tenía un efecto positivo sobre la palatabilidad medida como el tiempo consumido para comer la comida mañanera de concentrado ($p < 0,001$). En la dieta CRINA, la caída en los valores del pH cecal después de la comida mañanera era reducida. Había también un efecto de CRINA sobre los porcentajes molares de ácidos grasos volátiles cecales (VFA), con una reducción de las cantidades de acetato ($p < 0,001$) y de butirato ($p < 0,01$), y una proporciones aumentadas de piruvato ($p < 0,003$). La concentración de VFA cecales totales no difiere entre dietas. No hubo ningún efecto de CRINA sobre la concentración de amoníaco cecal o la concentración de protozoos en el fluido cecal. La intensidad de ejercicio no influye sobre ninguno de los parámetros registrados.

15

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una cantidad efectiva de una mezcla de compuestos activos naturales, en donde dicha mezcla comprende guayacol, cúrcuma y timol, para usarse en estabilizar el pH intestinal en un nivel > 6,3 en caballos, y en donde el timol, la cúrcuma y el guayacol se usan en unas cantidades suficientes para proporcionar una dosificación diaria de 0,25 mg por 1 mg de timol y de cúrcuma y de 0,1 mg a 0,5 mg de guayacol por kg de peso corporal del individuo al que ella se ha de administrar.
2. Una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha mezcla es combinada con una amilasa para mejorar la utilización del pienso, es decir para degradar el almidón en los intestinos gruesos y/o en los intestinos delgados.

Figura 1

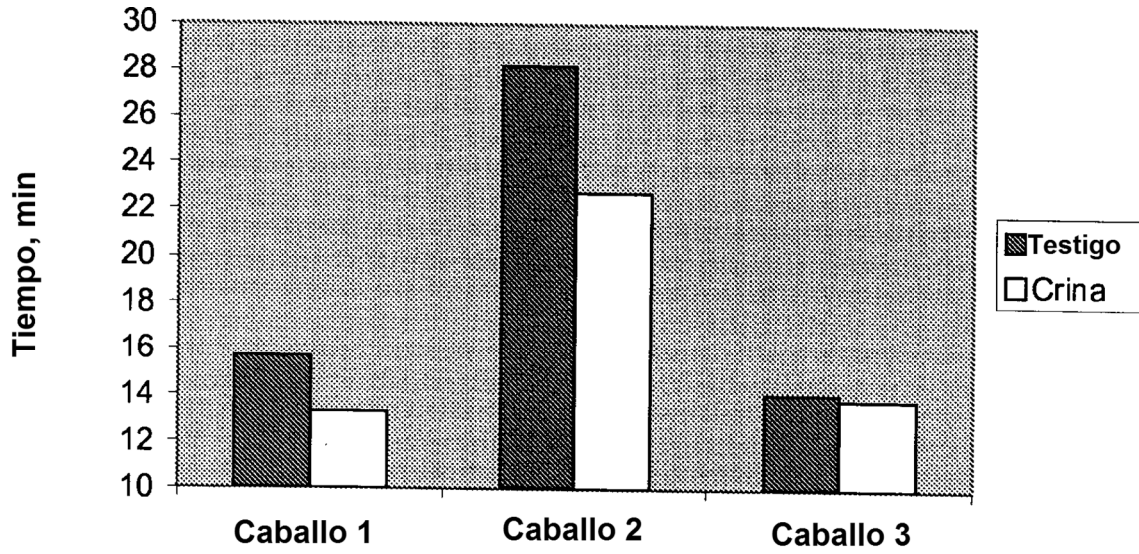


Figura 2

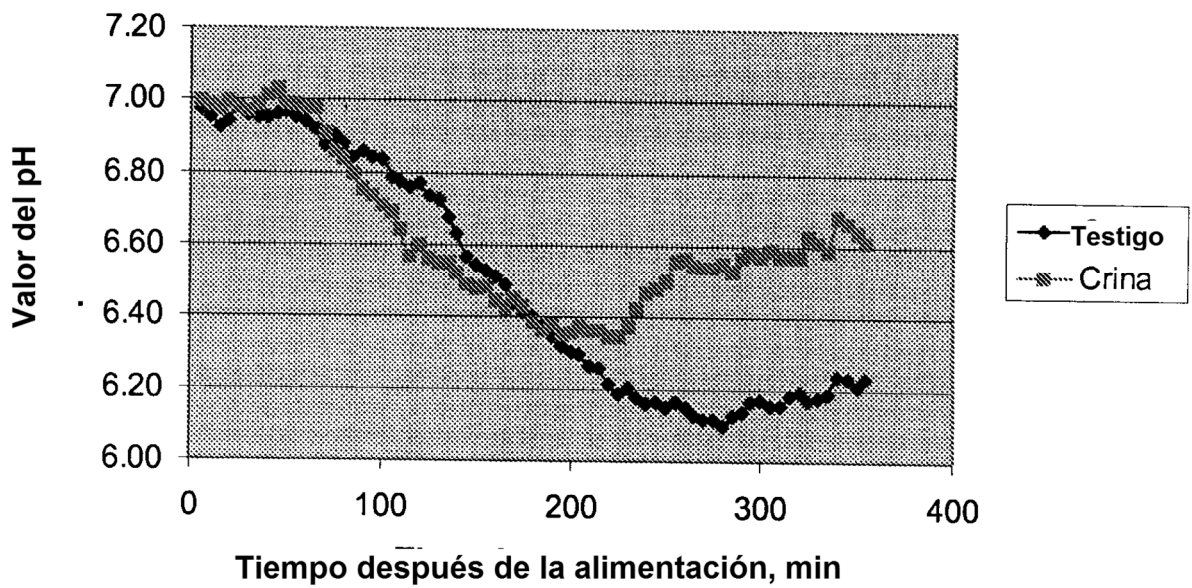


Figura 3

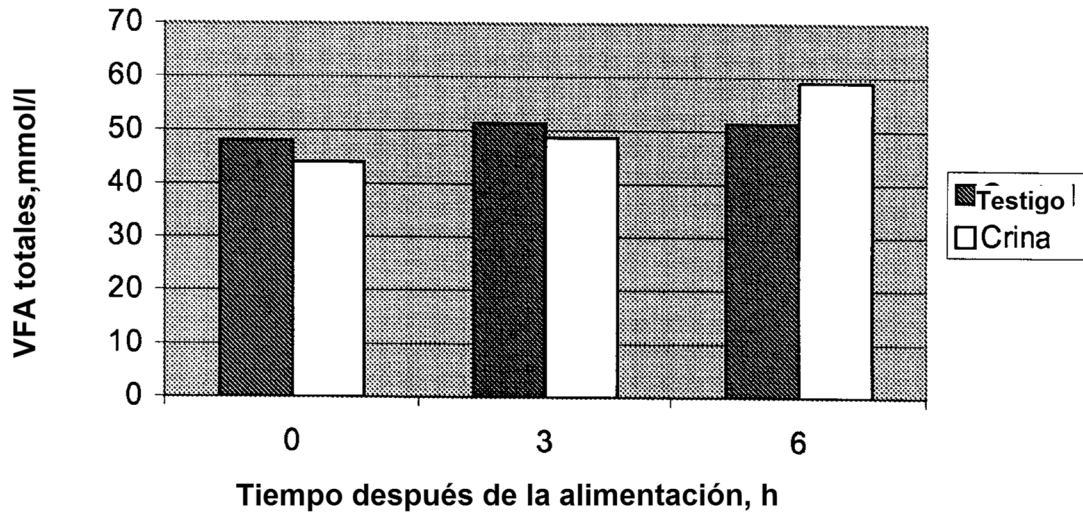


Figura 4

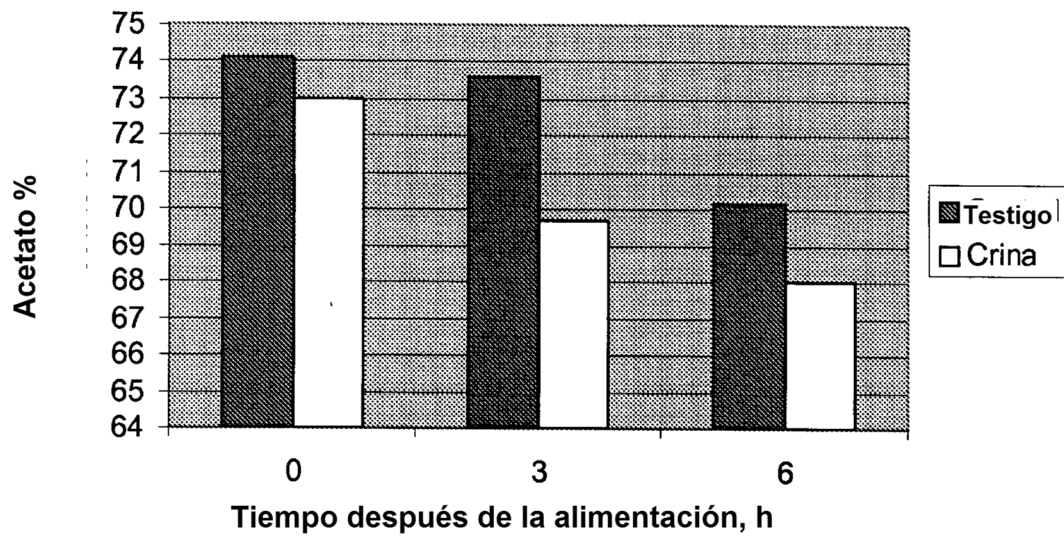


Figura 5

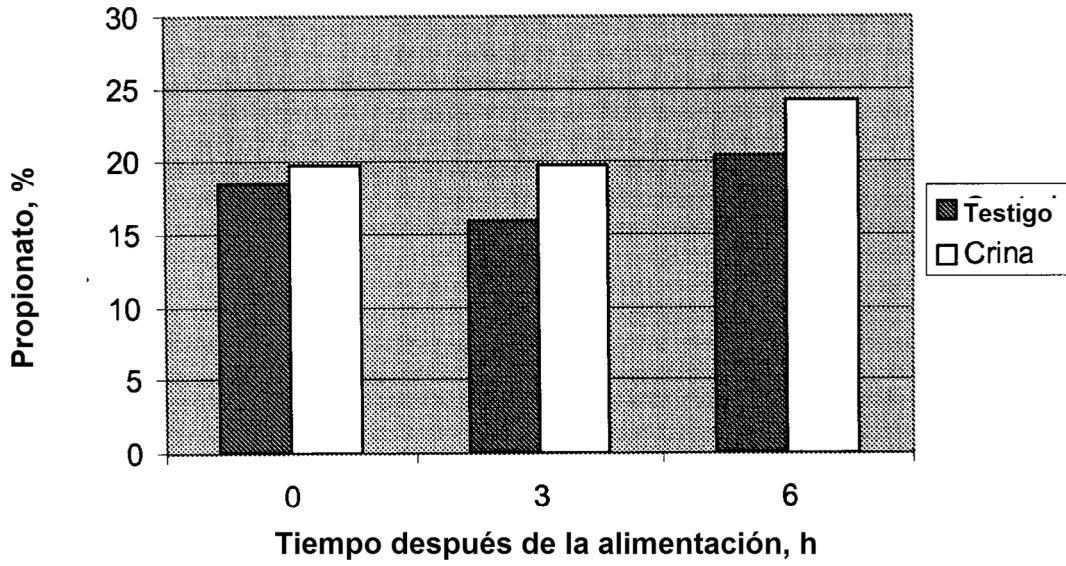


Figura 6

