

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 543**

51 Int. Cl.:

<b>C12R 1/00</b>	(2006.01) <b>A23K 50/30</b>	(2006.01)
<b>C12R 1/125</b>	(2006.01) <b>A23K 50/60</b>	(2006.01)
<b>A23K 40/10</b>	(2006.01) <b>C12R 1/10</b>	(2006.01)
<b>A23K 40/30</b>	(2006.01)	
<b>A23K 10/18</b>	(2006.01)	
<b>A23K 20/189</b>	(2006.01)	
<b>C12N 1/20</b>	(2006.01)	
<b>C12N 9/16</b>	(2006.01)	
<b>C12N 9/50</b>	(2006.01)	
<b>A23K 50/75</b>	(2006.01)	

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.01.2012 PCT/GB2012/050123**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2012 WO12110777**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2012 E 12701263 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2675285**

54 Título: **Composición de aditivo alimentario**

30 Prioridad:

**18.02.2011 GB 201102865**

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

**05.03.2018**

73 Titular/es:

**DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS  
(100.0%)  
Langebrogade 1 P.O. Box 17  
1001 Copenhagen K, DK**

72 Inventor/es:

**MILLÁN, LUIS FERNANDO ROMERO**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 657 543 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

Composición de aditivo alimentario

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos para mejorar composiciones alimentarias que usan un microorganismo de alimentación directa en combinación con una combinación específica de enzimas, y a una composición de aditivo alimentario que comprende un microorganismo de alimentación directa en combinación con una combinación específica de enzimas. La presente invención se refiere además a usos y kits.

### Antecedentes de la invención

10 Las enzimas suplementarias se usan como aditivos para alimentación animal, particularmente alimentos para aves de corral y porcino, como medio para mejorar la utilización de nutrientes y las características de rendimiento de producción. Están disponibles mezclas de enzimas para mejorar el valor nutricional de dietas que contienen harina de soja, harinas de proteína animal o subproductos alimenticios ricos en fibra.

15 El concepto de microorganismos de alimentación directa (DFM) implica la alimentación de microorganismos beneficiosos para los animales, tal como el ganado lechero cuando están bajo períodos de estrés (enfermedad, cambios en la ración, cambios ambientales o de producción). Probióticos es otro término para esta categoría de aditivos alimentarios. Se ha demostrado que los probióticos o DFM mejoran el rendimiento animal en estudios controlados. DFM incluye bacterias de alimentación directa y/o productos basados en levadura.

20 Aunque se han contemplado combinaciones de DFM con algunas enzimas, la interacción entre DFM y las enzimas nunca se ha entendido completamente. La presente invención se refiere a nuevas combinaciones específicas que sorprendentemente mejoran significativamente las características de rendimiento de producción en animales.

El documento CN 101181016A se refiere a un pienso para gallinas para mejorar el rendimiento de la puesta de huevos.

Wang et al., 2006, J. Appl. Pavipollo. Res. 15: 544-550 describe los efectos de versazima, un aditivo alimentario de queratinasa, sobre el peso corporal, conversión alimenticia y rendimiento de pechuga de pollos de engorde.

25 Ravindra et al., 2000, British Poultry Science 41: 193-200 describe la respuesta de pollos de engorde a suplementos de fitasa microbiana según se ve influenciado por ácido fítico de la dieta y niveles de fósforo no fitato.

El documento WO 03/062409 se refiere a composiciones que comprenden al menos dos enzimas termoestables seleccionadas del grupo que consiste en: endoglucanasa, xilanasas, fitasa, proteasa, galactanasa, mananasa, dextranasa y alfa-galactosidasa.

30 El documento de EEUU 2007/02088 se refiere a composiciones de microorganismos para tratar y prevenir enfermedades de aves de corral y mejorar la conversión alimenticia en aves de corral.

### Compendio de la invención

Un hallazgo trascendental de la presente invención es que un DFM en combinación con una proteasa y una fitasa tiene efectos beneficiosos significativos en el rendimiento de un animal.

35 En particular, un hallazgo seminal de la presente invención es que un DFM en combinación con una proteasa y fitasa tiene efectos beneficiosos significativos en el rendimiento de un animal, que incluye la mejora de uno o más de los siguientes: índice de conversión del alimento (ICA), capacidad de digerir una materia prima (p. ej., digestibilidad de nutrientes, tal como digestibilidad de aminoácidos), retención de nitrógeno, supervivencia, rendimiento en carcasa, tasa de crecimiento, ganancia de peso, eficiencia de la alimentación, resistencia de los animales a enteritis necrótica, respuesta inmune del sujeto, el crecimiento de bacterias beneficiosas en el tracto gastrointestinal de un sujeto.

Otro efecto sorprendente de la presente invención es que puede reducir la excreción de nutrientes en el estiércol (por ejemplo, reducir el nitrógeno y fósforo) contenido del estiércol de un sujeto.

45 Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición de aditivo alimentario que comprende un microorganismo de alimentación directa (DFM) en combinación con una subtilisina y una 6-fitasa, en el que el microorganismo de alimentación directa es un microorganismo de alimentación directa antipatógeno, en el que el microorganismo de alimentación directa es un antipatógeno cuando produce una densidad óptica reducida (DO) comparado con un control en el siguiente ensayo DFM:

i) se siembran tubos con un agente patógeno representativo de un grupo representativo;

ii) se agrega sobrenadante de un DFM potencial cultivado aeróbicamente o anaeróbicamente a los tubos sembrados y se incuba; y

iii) después de la incubación, se mide la DO de los tubos tratados con control y sobrenadante para cada patógeno,

5 además en el que el DFM está presente en una dosis entre  $3,75 \times 10^7$  UFC/g de composición de aditivo alimentario y  $1 \times 10^{11}$  UFC/g de composición de aditivo alimentario, la subtilisina está presente en una dosis entre 1.000 UP/g de composición de aditivo alimentario y 60.000 UP/g de composición de aditivo alimentario, y la 6-fitasa está presente en una dosis entre 200 FTU/g de composición de aditivo alimentario y 40.000 FTU/g de composición de aditivo alimentario, y

10 en el que DFM comprende una bacteria de una o más de las siguientes especies: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y sus combinaciones.

15 En una realización, el microorganismo de alimentación directa puede ser una bacteria viable. En una realización, el microorganismo de alimentación directa es una o más de las siguientes cepas: cepas 3A-P4 de *Bacillus subtilis* (PTA-6506); 15A-P4 (PTA-6507); 22C-P1 (PTA-6508); 2084 (NRRL B-500130); LSSA01 (NRRL-B-50104); BS27 (NRRL B-50105); BS 18 (NRRL B-50633); y BS 278 (NRRL B-50634). En una realización, el microorganismo de alimentación directa está en la forma de una endospora. En una realización, la fitasa es una fitasa de *E. coli* o una fitasa de *Buttiauxella* o fitasa de *Hafnia* o fitasa de *Citrobacter* o una Fitasa de *Aspergillus* o una fitasa de *Penicillium* o una fitasa de *Trichoderma* o una fitasa de *E. coli* o una fitasa de *Hansenula*.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición de aditivo alimentario según la presente invención para su uso en la mejora de la resistencia de un sujeto avícola a la enteritis necrótica o para su uso en la mejora del índice de conversión del alimento (ICA) en un sujeto avícola o su uso para la mejora de la ganancia de peso en un sujeto avícola o para su uso en la mejora de la eficiencia de la alimentación en un sujeto avícola.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende una composición de aditivo alimentario según la presente invención e instrucciones para la administración.

25 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar una composición de aditivo alimentario según la presente invención, que comprende mezclar un microorganismo de alimentación directa con una subtilisina y una 6-fitasa y (opcionalmente) envasar.

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona un alimento que comprende una composición de aditivo alimentario según la presente invención, en el que la 6-fitasa está presente a una dosis entre 400 FTU/kg de alimento y 1.000 FTU/kg de alimento, la subtilisina está presente a una dosis entre 2.000 PU/kg de alimento y 6.000 PU/kg de alimento y el DFM está presente a una dosis de  $7,5 \times 10^4$  UFC/g de alimento y  $1 \times 10^7$  UFC/g de alimento.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de preparación de un alimento que comprende mezclar un componente alimentario con una composición de aditivo alimentario según la presente invención.

35 En otro aspecto, la presente invención proporciona una premezcla que comprende una composición de aditivo alimentario según la presente invención. En una realización, la premezcla comprende al menos un mineral y/o al menos una vitamina.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición de aditivo alimentario según la presente invención para usar en la prevención y/o tratamiento de la enteritis necrótica en un sujeto avícola.

Se describe una composición de aditivo alimentario que comprende (o consiste esencialmente en o consiste en) un microorganismo de alimentación directa en combinación con una proteasa y una fitasa.

40 Se describe un método para mejorar el rendimiento de un sujeto o para mejorar la digestibilidad de una materia prima en un alimento (por ejemplo, digestibilidad de nutrientes, tal como digestibilidad de aminoácidos), o para mejorar la retención de nitrógeno, o para evitar los efectos negativos de la enteritis necrótica o para mejorar el índice de conversión del alimento (ICA) o para mejorar el aumento de peso en un sujeto o para mejorar la eficiencia alimentaria en un sujeto o para modular (por ejemplo, mejorar) la respuesta inmune del sujeto o para promover el crecimiento de bacterias beneficiosas en el tracto gastrointestinal de un sujeto o para reducir las poblaciones de bacterias patógenas en el tracto gastrointestinal de un sujeto, o para reducir la excreción de nutrientes en el estiércol, cuyo método comprende administrar a un sujeto un microorganismo de alimentación directa en combinación con una proteasa y una fitasa.

50 Se describe el uso de un microorganismo de alimentación directa en combinación con una proteasa y una fitasa para mejorar el rendimiento de un sujeto o para mejorar la digestibilidad de una materia prima en un alimento (por ejemplo, digestibilidad de nutrientes, tal como digestibilidad de aminoácidos) o para mejorar la retención de nitrógeno o para evitar los efectos negativos de la enteritis necrótica o para mejorar el índice de conversión de alimento (ICA) o para mejorar el aumento de peso en un sujeto o para mejorar la eficiencia alimentaria en un sujeto o para modular (por ejemplo, mejorar) la respuesta inmune del sujeto o para promover el crecimiento de bacterias

beneficiosas en el tracto gastrointestinal de un sujeto o para reducir las poblaciones de bacterias patógenas en el tracto gastrointestinal de un sujeto, o para reducir la excreción de nutrientes en el estiércol.

5 Se describe un kit que comprende un microorganismo de alimentación directa, una proteasa, una fitasa (y opcionalmente al menos una vitamina y/o opcionalmente al menos un mineral) e instrucciones para la administración. Se describe un método para preparar una composición de aditivo alimentario, que comprende mezclar un microorganismo de alimentación directa con una proteasa y una fitasa y (opcionalmente) envasar. Se describe alimento o producto alimentario que comprenden una composición de aditivo alimentario que comprende (o que consiste esencialmente en o que consiste en) un microorganismo de alimentación directa en combinación con una proteasa y una fitasa.

10 Se describe una composición de aditivo alimentario que comprende (o que consiste esencialmente en o que consiste en) un microorganismo de alimentación directa en combinación con una proteasa y una fitasa, y al menos un mineral y/o al menos una vitamina.

15 Se describe un método de preparar un producto alimentario que comprende mezclar un componente alimentario con una composición de aditivo alimentario que comprende (o que consiste esencialmente en o que consiste en) un microorganismo de alimentación directa en combinación con una proteasa y una fitasa. Se describe una composición de aditivo alimentario para prevenir y/o tratar coccidiosis y/o enteritis necrótica en un sujeto. Se describe un método de prevenir y/o tratar enteritis necrótica y/o coccidiosis en el que se administra a un sujeto una cantidad eficaz de una composición de aditivo alimentario según la presente invención.

**Breve descripción de los dibujos**

20 La figura 1 muestra que una combinación de DFM (Enviva Pro® disponible de Danisco A/S) con una combinación de una proteasa (por ejemplo, proteasa de *Bacillus subtilis*) y una fitasa (por ejemplo, 500 FTU/kg de Phyzyme XP (una fitasa de *E. coli*) disponible de Danisco A/S) mejora significativamente (reduce) las lesiones de enteritis necrótica el intestino de los animales comparados con el control objetivo.

25 La figura 2 muestra el porcentaje de mortalidad relacionado con las lesiones de enteritis necrótica (NE) de 20 a 42 d de edad. Una combinación de DFM (Enviva Pro® disponible de Danisco A/S) con una combinación de una proteasa (p. ej., proteasa de *Bacillus subtilis*) y una fitasa (por ejemplo, 500 FTU/kg de Phyzyme XP (una fitasa de *E. coli*) disponible en Danisco A/S) mejoró significativamente (redujo) la mortalidad por NE.

30 La figura 3 muestra la ganancia de peso corporal de pollos de engorde de 0 a 23 d en un modelo de desafío de enteritis necrótica. Una combinación de (Enviva Pro® disponible de Danisco A/S) con una combinación de una proteasa (p. ej., *Bacillus subtilis* proteasa) y una fitasa (por ejemplo, 500 FTU/kg de Phyzyme XP (una fitasa de *E. coli*) disponible de Danisco A/S) mejoró significativamente la ganancia de peso corporal (ganancia de PC) en pollos de engorde desafiados con *Clostridium perfringens* en comparación con el control objetivo.

La figura 4 muestra la ganancia de peso corporal de pollos de engorde de 0 a 12 días en el modelo de desafío a enteritis necrótica. EEM combinado = 4,86.

35 La figura 5 muestra la relación de conversión del alimento de pollos de engorde en un modelo de desafío a enteritis necrótica. EEM combinado = 0,026.

La figura 6 muestra la relación de conversión del alimento de pollos de engorde de 0-23 d en un modelo de desafío a enteritis necrótica. EEM combinado = 0,022.

40 La figura 7 muestra un mapa de calor de perfiles de expresión de genes de interés para todos los tratamientos del yeyuno a los 23 días de edad.

Control no objetivo = control no objetivo + fitasa

CO = control objetivo + fitasa

CO + Proteasa = control objetivo + fitasa + proteasa

CO + EP = control objetivo + fitasa + Enviva Pro

45 CO + EP + Proteasa = control objetivo + fitasa + proteasa + Enviva Pro

La Figura 8 muestra un mapa de calor del perfil de expresión de la alfa amilasa de pollo para todos los tratamientos en el páncreas a los 23 días de edad.

Control no objetivo = control no objetivo + fitasa

CO = control objetivo + fitasa

50 CO + Proteasa = control objetivo + fitasa + proteasa

CO + EP = control objetivo + fitasa + Enviva Pro

CO + EP + Proteasa = control objetivo + fitasa + proteasa + Enviva Pro

### Descripción detallada de la invención.

5 Preferentemente, cada una de las enzimas utilizadas en la presente invención son exógenas al DFM. En otras palabras, las enzimas se añaden preferentemente o se mezclan con el DFM.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta memoria. Singleton, et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 20 ED., John Wiley and Sons, New York (1994), y Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991) proporciona a un técnico un diccionario general de muchos de los términos utilizados en esta descripción.

Esta descripción no está limitada por los métodos de ejemplos y materiales descritos en la presente memoria, y cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria se pueden usar en la práctica o prueba de realizaciones de esta descripción revelación. Los rangos numéricos son inclusivos de los números que definen el rango. A menos que se indique lo contrario, cualquier secuencia de aminoácidos está escrita de izquierda a derecha con una orientación de 5 'a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación amino a carboxi, respectivamente.

Los encabezamientos proporcionados en la presente memoria no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la presente descripción que se pueden tener por referencia a la especificación como un todo. Por consiguiente, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen más completamente por referencia a la especificación como un todo.

Los aminoácidos se denominan en la presente memoria usando el nombre del aminoácido, la abreviatura de tres letras o la abreviatura de una única letra.

El término "proteína", como se usa en la presente memoria, incluye proteínas, polipéptidos y péptidos.

25 Tal como se usa en la presente memoria, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "polipéptido" y/o el término "proteína". En algunos casos, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "péptido". En algunos casos, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "enzima".

Los términos "proteína" y "polipéptido" se usan indistintamente en la presente memoria. En la presente descripción y reivindicaciones, se pueden usar los códigos convencionales de una letra y tres letras para restos de aminoácidos. El código de 3 letras para aminoácidos se define en conformidad con la comisión conjunta de nomenclatura bioquímica (JCBN) de IUPACIUB. También se entiende que un polipéptido se puede codificar por más de una secuencia de nucleótidos debido a la degeneración del código genético.

Otras definiciones de términos pueden aparecer a lo largo de la especificación

35 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima de la unidad del límite inferior a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de ese intervalo también está específicamente incluido. Cada rango más pequeño entre cualquier valor declarado o valor intermedio en un intervalo establecido y cualquier otro valor establecido o incluido en ese intervalo establecido está englobado dentro de esta descripción. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños se pueden incluir o excluir en el intervalo independientemente, y cada intervalo donde cualquiera, ninguno o ambos límites están incluidos en los intervalos más pequeños también se engloban dentro de esta descripción, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Donde el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos excluyen uno o ambos de esos límites incluidos también se incluyen en esta descripción.

45 Hay que señalar que, como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno", y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una enzima" incluye una pluralidad de dichos agentes candidatos y la referencia a "el alimento" incluye la referencia a uno o más alimentos y sus equivalentes conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

Las publicaciones descritas en la presente memoria se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en este documento debe interpretarse como una admisión de que tales publicaciones constituyen la técnica previa a las reivindicaciones adjuntas a esta memoria.

50 Las enzimas para uso en la presente invención se pueden producir o bien por cultivo sólido o sumergido, que incluye procesos por lotes, alimentados por lotes y de flujo continuo. El cultivo se lleva a cabo en un medio de crecimiento que comprende un medio salino mineral acuoso, factores de crecimiento orgánicos, el material de fuente de carbono y energía, oxígeno molecular y, por supuesto, un inóculo inicial de una o más especies particulares de microorganismos a emplear.

Microorganismo de alimentación directa (DFM)

El término "microbio" en la presente memoria se usa indistintamente con "microorganismo".

Preferentemente el DFM descrito en la presente memoria comprende un microorganismo viable. Preferentemente el DFM descrito en la presente memoria comprende una bacteria viable o una levadura viable o un hongo viable.

5 Preferentemente el DFM comprende una bacteria viable.

El término "microorganismo viable" significa un microorganismo que es metabólicamente activo o capaz de diferenciarse.

10 En una realización el DFM puede ser una bacteria formadora de esporas y de por tanto el término DFM puede estar comprendido por o contiene esporas, por ejemplo, esporas bacterianas. Por lo tanto en una realización, el término "microorganismo viable" como se usa en la presente memoria puede incluir esporas microbianas, tal como endosporas o conidios.

En otra realización el DFM en la composición de aditivo alimentario según la presente invención no está compuesta por o no contiene esporas microbianas, por ejemplo, endosporas o conidios.

15 El microorganismo puede ser un microorganismo de origen natural o puede ser un microorganismo transformado. El microorganismo también puede ser una combinación de microorganismos adecuados.

El DFM descrito en la presente memoria puede ser uno o más de los siguientes: una bacteria, una levadura, un hongo.

Preferentemente, el DFM según la presente invención es un microorganismo probiótico.

20 El término microorganismo de alimentación directa (DFM) descrito en la presente memoria puede englobar bacterias de alimentación directa, levadura de alimentación directa, hongos de alimentación directa y sus combinaciones.

Preferentemente el DFM es una bacteria de alimentación directa.

Preferentemente, el DFM es una combinación que comprende dos o más bacterias, por ejemplo tres o más o cuatro o más; o el DFM es una combinación que comprende dos o más cepas bacterianas, por ejemplo, tres o más o cuatro o más.

25 Preferentemente la bacteria o bacterias está o están aisladas.

Adecuadamente el DFM descrito en la presente memoria puede comprender una bacteria de una o más de los siguientes géneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* y *Megasphaera* y sus combinaciones.

30 El DFM descrito en la presente memoria se puede seleccionar de la siguiente *Bacillus* spp: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens*.

Según la presente invención, el DFM comprende una bacteria de una o más de las siguientes especies: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y sus combinaciones.

En una realización, el DFM puede ser una combinación que comprende dos o más cepas de *Bacillus*.

35 En una realización, el DFM puede ser una combinación de dos o más cepas de *Bacillus subtilis* 3A-P4 (PTA-6506); 15A-P4 (PTA-6507); 22C-P1 (PTA-6508); 2084 (NRRL B-500130); LSSA01 (NRRL-B-50104); BS27 (NRRL B-50105); BS 18 (NRRL B-50633); y BS 278 (NRRL B-50634).

Las cepas 3A-P4 (PTA-6506), 15A-P4 (PTA-6507) y 22C-P1 (PTA-6508) están públicamente disponible de American Type Culture Collection (ATCC).

40 Las cepas 2084 (NRRL B-500130); LSSA01 (NRRL-B-50104); BS27 (NRRL B-50105) están disponibles públicamente en Agriculture Research Service Culture Collection (NRRL). La cepa *Bacillus subtilis* LSSA01 a veces se nombra *B. subtilis* 8.

Estas cepas se muestran en el documento EEUU 7.754.469 B2.

45 *Bacillus subtilis* BS 18 y *Bacillus subtilis* BS 278 fueron depositadas por Andy Madisen de W227 N752 Westmoun Dr. Waukesha, WI 53186, EE.UU. para Danisco USA Inc. de W227 N752 Westmound Dr. Waukesha, WI 53186, EE.UU. bajo el Tratado de Budapest en Agriculture Research Service Culture Collection (NRRL) en 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, Estados Unidos de América, con los números de depósito NRRL B-50633 y NRRL B-50634, respectivamente el 9 de enero de 2012.

Andy Madisen de W227 N752 Westmound Dr. Waukesha, WI 53186, EE.UU., y Danisco EE.UU. Inc. de W227 N752 Westmound Dr. Waukesha, WI 53186, EE. UU. autorizan a Danisco A/S de Langebrogade 1, PO Box 17, DK-1001, Copenhagen K, Dinamarca, para referirse a estos materiales biológicos depositados en esta solicitud de patente y han dado consentimiento sin reservas e irrevocable para que el material depositado se ponga a disposición del público.

5

En algunas realizaciones el DFM puede ser una combinación que comprende las cepas de *Bacillus subtilis* como se detalla en la tabla siguiente:

Cepa de <i>B. subtilis</i>	Bs 2084	Bs 8 (LSSAO1)	Bs 3A-P4	Bs 15A-P4	Bs 278	Bs 18	Bs 22C-P1
Combinación DFM comprende	X	X	X	X			
	X	X	X				
	X	X			X		
	X	X		X			
	X		X	X			
		X	X	X			
	X	X				X	
				X	X		X
	X	X				X	

El DFM descrito en la presente memoria se puede seleccionar a partir de *Lactococcus* spp: *Lactococcus cremoris* y *Lactococcus lactis* y sus combinaciones.

- 10 El DFM descritos en la presente memoria se puede seleccionar a partir de *Lactobacillus* spp *Lactobacillus*: *buchneri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus delbreuckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum*,  
 15 *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii* y *Lactobacillus jensenii*, y combinaciones de cualquiera de ellos.

- El DFM descrito en la presente memoria se puede seleccionar a partir de *Bifidobacteria* spp: *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium adolescentis* y  
 20 *Bifidobacterium angulatum*, y combinaciones de cualquiera de ellos.

- Adecuadamente, el DFM descrito en la presente memoria puede comprender una bacteria de una o más de las siguientes especies: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus* spp y *Pediococcus* spp, *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* spp, *Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bacillus subtilis*, *Propionibacterium thoenii*,  
 25 *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Megasphaera elsdenii*, *Clostridium butyricum*, *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis*, *Lactobacillus reuteri*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus salivarius* ssp. *Salivarius*, *Propionibacteria* sp y sus combinaciones.

La bacteria de alimentación directa utilizada en la presente invención puede ser del mismo tipo (género, especie y cepa) o puede comprender una mezcla de géneros, especies y/o cepas.

- 30 Adecuadamente el DFM descrito en la presente memoria puede ser uno o más de los productos o los microorganismos contenidos en esos productos según la siguiente tabla:

Nombre del producto	Empresa	Microorganismo(s)	Ingredientes simbióticos
Enviva Pro®, (antiguamente conocido como Avicorr®)	Danisco A/S	<i>Bacillus subtilis</i> cepa 2084 n° de acceso NRR1 B-50013, <i>Bacillus subtilis</i> cepa LSSAO1 n° de acceso NRRL B-50104 y <i>Bacillus subtilis</i> cepa 15A-P4 ATCC n° de acceso PTA-6507	

ES 2 657 543 T3

Nombre del producto	Empresa	Microorganismo(s)	Ingredientes simbióticos
Calsporin®	Calpis-Japan	<i>Bacillus subtilis</i> cepa C3102	
Clostat®	Kemin Industries Inc.	<i>Bacillus subtilis</i> cepa PB6	
Cylactin®	DSM	<i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415 (SF68)	
Gallipro®	Chr. Hansen A/S	<i>Bacillus subtilis</i> cepa C3102	
Gallipro® & GallipoMax®			
Gallipro® Tect®	Chr. Hansen A/S	<i>Bacillus licheniformis</i>	
Poultry Star®	Biomin, Inc	<i>Enterococcus</i> y <i>Pediococcus</i>	Fructo oligosacáridos
Protexin®	Protexin Int	<i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> y otros	
Proflora®	Alpharma Inc.	<i>Bacillus subtilis</i> cepa QST 713	β-mos β-manan oligosacáridos y β-glucanos
Ecobiol® & Ecobiol® Plus	Norel S.A.	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CECT-5940	
Fortiflora®		<i>Enterococcus faecium</i> SF68	
BioPlus2B®	DSM	<i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus licheniformis</i>	
Lactiferm®	Chr. Hansen	Bacteria ácido láctica 7 y <i>Enterococcus faecium</i>	
CSI®	Danisco A/S	Cepa de <i>Bacillus</i>	
Yea-Sacc®	Alltech	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Biomin IMB52®	Biomin	<i>Enterococcus faecium</i>	
Bioimin C5®	Biomin	<i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>animalis</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Lactobacillus salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> ,	
Biacton®	ChemVet	<i>Lactobacillus farciminis</i>	
Oralin E1707®	Chevita GmbH	<i>Enterococcus faecium</i>	
Probios-pioneer	Chr. Hansen	<i>Enterococcus faecium</i> (2 cepas)	
PDFM®		<i>Lactobacillus lactis</i> DSM 11037	
Sorbiflore®	Danisco Nutrition Animal	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Lactobacillus farciminis</i>	
Animavit®	KRKA	<i>Bacillus subtilis</i>	
Bonvital®	Lactosan GmbH	<i>Enterococcus faecium</i>	
Levucell SB 20®	Lallemand	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Levucell SC 0 & SC 10® ME	Lallemand	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Bactocell	Lallemand	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
Actisaf® (antiguamente BioSaf®)	Le Saffre	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Actisaf® SC47	Le Saffre	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC Sc47	

Nombre del producto	Empresa	Microorganismo(s)	Ingredientes simbióticos
Miya-Gold®	Miyarisan Pharma	<i>Clostridium butyricum</i>	
Fecinor y Fecinor Plus®	Norel S.A.	<i>Enterococcus faecium</i>	
InterSwine®	Integro Gida ve Ticaret AS representado por RM Associates Ltd	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC R-625	
BioSprint®	ProSol SpA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Provita®	Provita	<i>Enterococcus faecium</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	
PepSoyGen-C	Regal BV (Nutraferma)	<i>Bacillus subtilis</i> y <i>Aspergillus oryzae</i>	
Toyocerin®	Rubinum	<i>Bacillus cereus</i>	
TOYOCERIN®	Rubinum	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i> NCIMB 40112/CNCM I-1012	

En una forma de realización adecuada el DFM puede ser Enviva Pro®. Enviva Pro® está disponible comercialmente en Danisco A/S y es una combinación de *Bacillus* cepa 2084, n° de acceso NRRI B-50013, *Bacillus* cepa LSSAO1, n° de acceso NRRL B-50104 y *Bacillus* cepa 15A-P4 ATCC n° de acceso PTA-6507 (como se muestra en el documento EEUU 7.754.469 B).

5 Adecuadamente, el DFM puede comprender una levadura del género: *Saccharomyces* spp.

Preferentemente el DFM a utilizar según la presente invención es un microorganismo que es generalmente reconocido como seguro y, que preferentemente está aprobado por GRAS.

10 Un experto fácilmente será consciente de especies y cepas de microorganismos específicos de los géneros descritos en la presente memoria que se usan en la industria alimentaria y/o agrícola y que generalmente se consideran adecuados para consumo animal.

Preferentemente, el DFM utilizado según la presente invención es uno que es adecuado para consumo animal.

15 Ventajosamente, cuando el producto es un alimento o una composición de aditivo alimentario, el DFM viable debe permanecer eficaz a lo largo de la fecha normal de "límite de venta" o "caducidad" del producto durante el cual el alimento o composición de aditivo alimentario se ofrece a la venta por el minorista. Los períodos de tiempo deseados y la vida útil normal variarán de alimento a alimento y los expertos en la técnica reconocerán que los tiempos de conservación variarán según el tipo de alimento, el tamaño del alimento, temperaturas de almacenamiento, condiciones de procesamiento, material de embalaje y equipos de embalaje.

20 En algunas realizaciones es importante que el DFM sea tolerante al calor, es decir, sea termotolerantes. Esto es particularmente el caso donde la alimentación es granulada. Por lo tanto en una realización el DFM puede ser un microorganismo termotolerante, tal como una bacteria termotolerante, que incluye, por ejemplo, *Bacillus* spp.

En algunas realizaciones puede ser preferente que el DFM sea una bacteria productora de esporas, tal como *Bacilli*, por ejemplo, *Bacillus* spp. Los bacilos son capaces de formar endosporas estables cuando las condiciones de crecimiento son desfavorables y son muy resistentes al calor, pH, humedad y desinfectantes.

25 En una realización adecuada el DFM puede disminuir o prevenir establecimiento intestinal de microorganismo patógenos (tales como *Clostridium perfringens* y/o *E. coli* y/o *Salmonella* spp y/o *Campylobacter* spp.).

30 El DFM descrito en la presente memoria puede ser cualquier DFM adecuado. En una realización, el siguiente ensayo "ensayo DFM" se puede usar para determinar la idoneidad de un microorganismo para ser un DFM. Para evitar dudas un DFM seleccionado como una cepa inhibidora (o un DFM antipatógeno) de acuerdo con el "ensayo DFM" mostrado en la presente memoria es un DFM adecuado para usar como se describe en la presente memoria, es decir, en la composición de aditivo alimentario descrita en la presente memoria.

Ensayo DFM:

Se sembraron tubos cada uno con un patógeno representante de un grupo representativo.

El sobrenadante de un DFM potencial que crece aeróbicamente o anaeróbicamente se añadió a los tubos sembrados y se incubaron.

Después de incubación, se midió la densidad óptica (DO) del control y tubos tratados con sobrenadante para cada patógeno.

Las colonias de cepas (DFM potencial) que producían una DO baja en comparación con el control se clasificaron como una cepa inhibidora (o un DFM antipatógeno).

- 5 El ensayo DFM tal como se usa en la presente memoria se explica con más detalle en el documento US2009/0280090.

10 Preferentemente el patógeno representativo utilizado en el ensayo es uno (o más) de los siguientes: *Clostridium*, tales como *Clostridium perfringens* y/o *Clostridium difficile*, y/o *E. coli* y/o *Salmonella* spp y/o *Campylobacter* spp. En una realización preferente el ensayo se realiza con uno o más de *Clostridium perfringens* y/o *Clostridium difficile* y/o *E. coli*, preferentemente *Clostridium perfringens* y/o *Clostridium difficile*, más preferentemente *Clostridium perfringens*.

El DFM de la presente invención es un DFM antipatógeno.

El término "antipatógeno" como se usa en la presente memoria significa que el DFM contrarresta un efecto (por ejemplo, un efecto negativo) de un patógeno.

- 15 En una realización para determinar si un DFM es un antipatógeno según la presente invención se puede usar el ensayo DFM mencionado anteriormente. Se considera que un DFM es un antipatógeno o un DFM antipatógeno si se clasifica como una cepa inhibidora en el ensayo DFM mencionado anteriormente, particularmente cuando el patógeno es *Clostridium perfringens*.

En una realización el DFM antipatógeno puede ser una o más de las siguientes bacterias:

- 20 *Bacillus subtilis* cepa 2084 n° de acceso NRRL B-50013,  
*Bacillus subtilis* cepa LSSAO1 n° de acceso NRRL B-50104,  
*Bacillus subtilis* cepa 15A-P4 ATCC n° de acceso PTA-6507,  
*Bacillus subtilis* cepa 3A-P4 ATCC n° de acceso PTA-6506, y  
*Bacillus subtilis* cepa BS27 ATCC n° de acceso NRRL B-50105.

- 25 Para evitar la duda estas cepas están disponibles y son referidas en la patente de EEUU 7.754.459 B.

En una realización el DFM usado según la presente invención no es *Lactobacillus gasseri* BNR 17 cepa con n° de acceso KCTC 10902BP como se muestra en la patente WO2008/016214.

Preferentemente el DFM no es un microorganismo inactivado.

30 El DFM como se usa en la presente memoria es una composición que comprende uno o más microorganismos DFM según se describe en la presente memoria. La composición adicionalmente puede comprender las enzimas de la presente invención. La composición puede alimentar a un animal como un microbio de alimentación directa (DFM). Se pueden añadir uno o más vehículo(s) u otros ingredientes al DFM. El DFM se puede presentar en formas físicas variadas, por ejemplo, como una cobertura, como un concentrado soluble en agua para usar como un empapador líquido o para añadir a un sustituto de leche, cápsula de gelatina o geles. En una realización de la forma de  
35 cobertura, se añade producto de fermentación liofilizado a un vehículo tal como suero, maltodextrina, sacarosa, dextrosa, piedra caliza (carbonato cálcico), cáscaras de arroz, cultivo de levadura, almidón seco, y/o aluminio silicato de sodio. En una realización del concentrado soluble en agua para un empapador líquido o complemento de sustituto de leche, se añade el producto de fermentación liofilizado a un vehículo soluble en agua, tal como suero, maltodextrina, almidón seco, aluminio silicato de sodio, y se añade un líquido para formar el empapador o el  
40 complemento a leche o un sustituto de leche. En una realización de la forma de cápsula de gelatina, se añade el producto de fermentación liofilizado a un vehículo, tal como suero, maltodextrina, azúcar, piedra caliza (carbonato cálcico), cáscaras de arroz, cultivo de levadura, almidón seco, y/o aluminio silicato de sodio. En una realización, la bacteria y el vehículo están incluidos en una cápsula de gelatina degradable. En una realización de la forma de geles, el producto de fermentación liofilizado se añade a un vehículo, tal como aceite vegetal, sacarosa, dióxido de  
45 silicio, polisorbato 80, propilén glicol, hidroxianisol butilato, ácido cítrico, etoxiquina, y/o colorantes artificiales para formar el gel.

El DFM(s) opcionalmente se puede administrar con una formulación seca de aditivos que incluyen pero no es limitante sustratos de crecimiento, enzimas, azúcares, hidratos de carbono, extractos y micro-ingredientes promotores de crecimiento. Los azúcares pueden incluir los siguientes: lactosa; maltosa; dextrosa; maltodextrina; glucosa; fructosa; manosa; tagatosa; sorbosa; rafinosa; y galactosa. Los azúcares están de 50-95%, bien individualmente o en combinación. Los extractos pueden incluir levaduras o fermentación de levaduras secas solubles de 5-50%. Los sustratos de crecimiento pueden incluir: tripticasa, de 5-25%; lactato de sodio, de 5-30%; y,

Tween 80, de 1-5%. Los hidratos de carbono pueden incluir manitol, sorbitol, adonitol y arabitol. Los hidratos de carbono están de 5-50% individualmente o en combinación. Los micro-ingredientes pueden incluir los siguientes: carbonato de calcio, de 0,5-5,0%; cloruro de calcio de 0,5-5,0%; fosfato de dipotasio, de 0,5-5,0%; fosfato de calcio, de 0,5-5,0%; proteinato de manganeso, de 0,25-1,00%; y, manganeso, de 0,25-1,0%.

5 Para preparar DFM(s) descrito en la presente memoria, el cultivo(s) y vehículo(s) (cuando se usa) se puede añadir a una mezcladora de cintas o palas y mezclar durante aproximadamente 15 minutos, aunque el tiempo se puede aumentar o disminuir. Los componentes se combinan de modo que resulta una mezcla uniforme de los cultivos y vehículos. El producto final preferentemente es un polvo seco, fluyente. El DFM(s) o composición que lo comprende después se puede añadir a un alimento animal o una premezcla alimentaria, añadir al agua del animal, o administrar por otras vías conocidas en la técnica (preferentemente simultáneamente con las enzimas de la presente invención).  
10 Un alimento para un animal se puede complementar con uno o más DFM(s) descrito en la presente memoria o con una composición descrita en la presente memoria.

Por "una mezcla de al menos dos cepas", se entiende una mezcla de dos, tres, cuatro, cinco, seis, o incluso más cepas. En algunas realizaciones de una mezcla de cepas, las proporciones pueden variar de 1% a 99%. Otras realizaciones de una mezcla de cepas son de 25% a 75%. Realizaciones adicionales de una mezcla de cepas son aproximadamente 50% de cada cepa. Cuando una mezcla comprende más de dos cepas, las cepas pueden estar presentes en proporciones significativamente iguales o en proporciones diferentes en la mezcla.

El DFM se puede dosificar apropiadamente.

Las dosis apropiadas de DFM en el alimento pueden estar entre aproximadamente  $1 \times 10^3$  UFC/g de alimento a aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC/g de alimento, apropiadamente entre aproximadamente  $1 \times 10^4$  UFC/g de alimento a aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/g de alimento, apropiadamente entre aproximadamente  $7,5 \times 10^4$  UFC/g de alimento a aproximadamente  $1 \times 10^7$  UFC/g de alimento.

El DFM se puede dosificar en el producto alimentario a más de aproximadamente  $1 \times 10^3$  UFC/g de alimento, apropiadamente más de aproximadamente  $1 \times 10^4$  UFC/g de alimento, apropiadamente más de aproximadamente  $7,5 \times 10^4$  UFC/g de alimento.

Dosis apropiadas de DFM en la composición de aditivo alimentario pueden estar entre aproximadamente  $1 \times 10^5$  UFC/g de composición a aproximadamente  $1 \times 10^{13}$  UFC/g de composición, apropiadamente entre aproximadamente  $1 \times 10^6$  UFC/g de composición a aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  UFC/g de composición, apropiadamente entre aproximadamente  $3,75 \times 10^7$  UFC/g de composición a aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  UFC/g de composición.

El DFM se puede dosificar en la composición de aditivo alimentario a más de aproximadamente  $1 \times 10^5$  UFC/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente  $1 \times 10^6$  UFC/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente  $3,75 \times 10^7$  UFC/g de composición.

El DFM se puede dosificar en la composición de aditivo alimentario a más de aproximadamente  $2 \times 10^5$  UFC/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente  $2 \times 10^6$  UFC/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente  $3,75 \times 10^7$  UFC/g de composición.

Como se usa en la presente memoria el término "UFC" significa unidades formadoras de colonias y es una medida de las células viables en las que una colonia representa un agregado de células que derivan de una única célula progenitor.

#### Proteasa

El término proteasa como se utiliza aquí es sinónimo de peptidasa o proteinasa.

La proteasa para su uso en la presente invención es una subtilisina (EC 3.4.21.62). También se describe una bacilolisina (CE 3.4.24.28) o una proteasa alcalina serina (EC 3.4.21.x) o una queratinasa (CE 3.4.xx).

La proteasa según la presente invención es una subtilisina.

Las proteasas adecuadas incluyen las de origen animal, vegetal o microbiano. También son adecuados mutantes modificados químicamente o por ingeniería de proteínas. La proteasa puede ser una serina proteasa o una metalproteasa, por ejemplo, una proteasa microbiana alcalina o una proteasa similar a tripsina. Ejemplos de proteasas alcalinas son subtilisinas, especialmente las derivadas de *Bacillus* sp., por ejemplo, subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, subtilisina 309 (véase, por ejemplo, la patente de EEUU n° 6.287.841), subtilisina 147, y subtilisina 168 (véase, por ejemplo, la patente WO 89/06279). Ejemplos de proteasas de tipo tripsina son tripsina (por ejemplo, de origen porcino o bovino), y proteasas *Fusarium* (véase, por ejemplo, WO 89/06270 y WO 94/25583). Ejemplos de proteasas útiles también incluyen, pero no se limitan a las variantes descritas en WO 92/19729 y WO 98/20115.

En una realización preferente, la subtilisina para su uso en la presente invención puede ser una o más de las subtilisinas en uno o más de los siguientes productos comerciales:

Nombre comercial ®	Empresa	Tipo de proteasa	Fuente de proteasa
Avizyme 1100	Danisco A/S	Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Avizyme 1202	Danisco A/S	Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Avizyme 1302	Danisco A/S	Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Avizyme 1500	Danisco A/S	Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Avizyme 1505	Danisco A/S	Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Kemzyme Plus Dry	Kemin	Bacilolisina	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Kemzyme W Dry	Kemin	Bacilolisina	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Natuzyme	Bioproton	Proteasa	<i>Trichoderma longibrachiatum/</i> <i>Trichoderma reesei</i>
Porzyme 8300	Danisco	Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Ronozyme ProAct®	DSM/Novozymes	Proteasa alcalina serina	<i>Gen Nocardioopsis prasina</i> expresado en <i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i>
Versazyme Cibenza DP100	Novus	Queratinasa	<i>Bacillus licheniformis</i>

En una realización la proteasa puede ser una proteasa de *B. subtilis*.

Se describe una proteasa *Nocardioopsis* disponible de Novozymes A/S.

5 Preferentemente, la proteasa está presente en el pienso en intervalo de aproximadamente 1.000 PU/kg a aproximadamente 20.000 PU/kg de alimento, más preferentemente de aproximadamente 1.500 PU/kg de alimento a aproximadamente 10.000 PU/kg de alimento, más preferentemente aproximadamente 2.000 PU/kg de alimento a aproximadamente 6.000 PU/kg de alimento.

La proteasa puede estar presente en el producto alimentario en más de aproximadamente 1.000 PU/kg de alimento, adecuadamente más de aproximadamente 1.500 PU/kg de alimento, adecuadamente más de aproximadamente 2.000 PU/kg de alimento.

10 La proteasa puede estar presente en el producto alimentario a menos de aproximadamente 20.000 PU/kg de alimento, adecuadamente menos de aproximadamente 10.000 PU/kg de alimento, adecuadamente menos de aproximadamente 7.000 PU/kg de alimento, adecuadamente menos de aproximadamente 6.000 PU/kg de alimento.

15 Preferentemente, la proteasa está presente en la composición de aditivo alimentario en intervalo de aproximadamente 200 UP/g a aproximadamente 400.000 UP/g de composición, más preferentemente de aproximadamente 300 UP/g de composición a aproximadamente 200.000 UP/g de composición, e incluso más preferentemente de aproximadamente 5.000 UP/g de composición a aproximadamente 100.000 UP/g de composición, e incluso más preferentemente de aproximadamente 700 UP/g de composición a aproximadamente 70.000 UP/g de composición, e incluso más preferentemente aproximadamente 1.000 UP/g de composición a aproximadamente 60.000 UP/g de composición.

20 La proteasa puede estar presente en la composición de aditivo alimentario en más de aproximadamente 200 UP/g de composición, adecuadamente más de aproximadamente 300 UP/g de composición, adecuadamente más de aproximadamente 400 UP/g de composición, adecuadamente más de aproximadamente 500 UP/g de composición, adecuadamente más de aproximadamente 750 UP/g de composición, adecuadamente más de aproximadamente 1.000 UP/g de composición.

25 La proteasa puede estar presente en la composición de aditivo alimentario a menos de aproximadamente 400.000 UP/g de composición, adecuadamente menos de aproximadamente 200.000 UP/g de composición, adecuadamente menos de aproximadamente 100.000 UP/g de composición, adecuadamente menos de aproximadamente 80.000 UP/g de composición, adecuadamente menos de aproximadamente 70.000 UP/g de composición, adecuadamente menos de aproximadamente 60.000 UP/g de composición.

30 Se entenderá que una unidad de la proteasa (UP) es la cantidad de enzima que libera del sustrato (disolución de caseína 0,6%) un microgramo de compuesto fenólico (expresado como equivalentes de tirosina) en un minuto a pH 7,5 (40 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/tampón de ácido láctico) y 40°C. Esto puede ser denominado como el ensayo para determinar 1 UP.

En una realización adecuada la enzima se clasifica utilizando la clasificación de E.C. anterior, y la clasificación E.C. designa una enzima que tiene esa actividad cuando se prueba en el ensayo mostrado en el presente documento para determinar 1 UP.

Fitasa

- 5 La fitasa para su uso en la presente invención es un 6-fitasa (clasificadas como EC 3.1.3.26). Describimos una 3-fitasa (clasificada como EC 3.1.3.8).

Según la presente invención, la fitasa es una 6-fitasa (EC 3.1.3.26).

En una realización preferida, la 6-fitasa para su uso en la presente invención puede ser una o más de la 6-fitasa en uno o más de los siguientes productos comerciales:

Producto® comercial	Empresa	Tipo de fitasa	Fuente de fitasa
Finase	AB Vista	3-fitasa	<i>Trichoderma reesei</i>
Finase EC	AB Vista	6-fitasa	Gen <i>E. coli</i> expresado en <i>Trichoderma reesei</i>
Natuphos	BASF	3-fitasa	<i>Aspergillus Niger</i>
Natuzyne	Bioproton	Fitasa (tipo no especificado)	<i>Trichoderma longibrachiatum/Trichoderma reesei</i>
OPTIPHOS®	Huvepharma AD	6-fitasa	Gen <i>E. coli</i> expresado en <i>Pichia pastoris</i>
Phytase sp1002	DSM	3-fitasa	Un gen consenso expresada en <i>Hansenula polymorpha</i>
Phyzyme XP	Danisco	6-fitasa	Gen <i>E. coli</i> expresado en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Quantum 2500D, 5000L	AB Vista	6-fitasa	Gen <i>E. coli</i> expresado en <i>Pichia pastoris</i> o <i>Trichoderma</i>
Ronozyne Hi-Phos (M/L)	DSN/Novozymes	6-fitasa	Gen <i>Citrobacter braakii</i> expresado en <i>Aspergillus oryzae</i>
Ronozyne NP	DSN/Novozymes	6-fitasa	Gen <i>Peniphora lycii</i> expresado en <i>Aspergillus oryzae</i>
Ronozyne P	DSN/Novozymes	6-fitasa	Gen <i>Peniphora lycii</i> expresado en <i>Aspergillus oryzae</i>
Rovabio PHY	Adisseo	3-fitasa	<i>Penicillium funiculosum</i>

- 10 El término gen consenso como se usa en la presente memoria significa que el vector ADN usado para transformar el organismo contiene un gen sintético de fitasa basado en una secuencia consenso, un gen URA de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* no patógena y el origen de replicación del plásmido de *Escherichia coli* pBR322.

- 15 En una realización la fitasa es una fitasa de *Citrobacter* que deriva de p. ej. *Citrobacter freundii*, preferentemente *C. freundii* NCIMB 41247 y sus variantes p. ej. según se describe en la patente WO2006/038062 y WO2006/038128, *Citrobacter braakii* YH-15 según se describe en la patente WO2004/085638, *Citrobacter braakii* ATCC 51113 según se describe en la patente WO2006/037328, así como sus variantes p. ej. según se describe en la patente WO2007/112739 y WO2011/117396, *Citrobacter amalonaticus*, preferentemente *Citrobacter amalonaticus* ATCC 25405 o *Citrobacter amalonaticus* ATCC 25407 según se describe en la patente WO2006037327, *Citrobacter gillenii*, preferentemente *Citrobacter gillenii* DSM 13694 según se describe en la patente WO2006037327 o *Citrobacter intermedius*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter murlinae*, *Citrobacter rodentium*, *Citrobacter sedlakii*, *Citrobacter werkmanii*, *Citrobacter youngae*, polipéptidos de especies de *Citrobacter* o sus variantes.

En una realización la fitasa puede ser una fitasa de *Citrobacter*, p. ej. de *Citrobacter freundii*, tal como la enzima(s) de fitasa mostrada en WO2006/038128.

- 25 En realizaciones preferentes, la fitasa es preferentemente fitasa de *E. coli* comercializada bajo el nombre Phyzyme XP™ de Danisco A/S.

Alternativamente la fitasa puede ser un fitasa de *Buttiauxella*, p. ej. una fitasa de *Buttiauxella agrestis*, por ejemplo, las enzimas fitasa mostradas en las patentes WO 2006/043178, WO 2008/097619, WO 2009/129489, WO 2008/092901, PCT/US2009/41011 o PCT/IB2010/051804.

En una realización la fitasa puede ser una fitasa de *Hafnia*, p. ej., de *Hafnia alvei*, tal como las enzimas de fitasa mostradas en la patente de EEUU 2008263688.

En una realización la fitasa puede ser una fitasa de *Aspergillus*, p. ej. de *Aspergillus oryzae*.

En una realización la fitasa puede ser una fitasa de *Penicillium*, p. ej. de *Penicillium funiculosum*.

5 Preferentemente, la fitasa está presente en el producto alimentario en el intervalo de aproximadamente 200 FTU/kg a aproximadamente 1.000 FTU/kg de alimento, más preferentemente de aproximadamente 300 FTU/kg de alimento a aproximadamente 750 FTU/kg de alimento, más preferentemente de aproximadamente 400 FTU/kg de alimento a aproximadamente 500 FTU/kg de alimento.

10 La fitasa puede estar presente en el producto alimentario en más de aproximadamente 200 FTU/kg de alimento, apropiadamente más de aproximadamente 300 FTU/kg de alimento, apropiadamente más de aproximadamente 400 FTU/kg de alimento.

La fitasa puede estar presente en el producto alimentario en menos de aproximadamente 1.000 FTU/kg de alimento, apropiadamente menos de aproximadamente 750 FTU/kg de alimento.

15 La fitasa puede estar presente en la composición de aditivo alimentario en el intervalo de aproximadamente 40 FTU/g a aproximadamente 40.000 FTU/g de composición, más preferentemente de aproximadamente 80 FTU/g de composición a aproximadamente 20.000 FTU/g de composición, e incluso más preferentemente de aproximadamente 100 FTU/g de composición a aproximadamente 10.000 FTU/g de composición, e incluso más preferentemente de aproximadamente 200 FTU/g de composición a aproximadamente 10.000 FTU/g de composición.

20 La fitasa puede estar presente en la composición de aditivo alimentario en más de aproximadamente 40 FTU/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente 60 FTU/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente 100 FTU/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente 150 FTU/g de composición, apropiadamente más de aproximadamente 200 FTU/g de composición.

25 La fitasa puede estar presente en la composición de aditivo alimentario en menos de aproximadamente 40.000 FTU/g de composición, apropiadamente menos de aproximadamente 20.000 FTU/g de composición, apropiadamente menos de aproximadamente 15.000 FTU/g de composición, apropiadamente menos de aproximadamente 10.000 FTU/g de composición.

30 Se entenderá que según se usa en la presente memoria 1 FTU (unidad de fitasa) se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 1  $\mu$ mol de ortofosfato inorgánico a partir de un sustrato en un minuto bajo las condiciones de reacción definidas en la prueba de fitasa ISO 2009 – Una prueba estándar para determinar la actividad fitasa y 1 FTU se puede encontrar en *International Standard ISO/DIS 30024: 1-17, 2009*.

En una realización apropiada la enzima se clasifica usando la clasificación E.C. anterior, y la clasificación E.C. señala una enzima que tiene esa actividad cuando se prueba en el ensayo mostrado en la presente memoria para determinar 1 FTU.

35 Ventajas

La interacción de DFMs con enzimas es complicada y sin desear ser limitante de la teoría, es muy sorprendente que se puede ver una mejora de la resistencia del sujeto a enteritis necrótica, p. ej. que se puede ver una reducción de los puntos de lesión por ejemplo. Antes de la presente invención la combinación de DFMs y enzimas (p. ej., según se muestra en la presente memoria) no se ha mostrado para este propósito específico.

40 Una ventaja de la presente invención es que la composición de aditivo alimentario según la presente invención puede evitar los efectos negativos de enteritis necrótica o se puede usar para mejorar la resistencia del sujeto a enteritis necrótica.

45 Sin desear ser limitante de la teoría, la fitasa cataliza la hidrólisis secuencial de fitato, una reserva principal de fósforo en cereales y legumbres, a derivados de mio-inositol menos fosforilados con liberación concomitante de fosfato inorgánico. La hidrólisis de fitato causa una reducción de pérdidas endógenas de aminoácidos en el lumen intestinal. Una reducción de pérdidas endógenas de aminoácidos en el intestino reduce la disponibilidad de nitrógeno para crecimiento bacteriano, lo que ayuda a DFMs en la inhibición de *C. prefringens* y otras bacterias patógenas.

50 Sin desear ser limitante de la teoría las proteasas causan hidrólisis no específica de proteína dietética dando una variedad de polipéptidos en el lumen intestinal. Los animales concluyen la hidrólisis de proteína y absorben tales aminoácidos. Sin embargo, en el caso de retar patógenos entéricos, la bacteria patógena puede tener ventaja de las más alta disponibilidad de péptidos en el lumen del yeyuno e íleon. DFMs inhibe el crecimiento de entero patógenos mediante por ejemplo la competición por las fuentes de N, así como por inhibición directa.

En combinación estas enzimas y DFMs proporcionan sorprendentemente una mejora significativa sobre reducción del patógeno y/o resistencia a la enteritis necrótica en comparación con otras combinaciones de DFM y enzima y/o DFMs solo y/o enzima(s) por sí sola.

Formulación del DFM con las enzimas

- 5 El DFM y las enzimas se pueden formular de cualquier manera apropiada para asegurar que la formulación comprende DFMs viables y enzimas activas.

En una realización el DFM y enzimas se pueden formular como un líquido, un polvo seco o un gránulo.

- 10 El polvo seco o gránulos se pueden preparar por medios conocidos por los expertos en la técnica, tal como, revestimiento en lecho fluidizado, revestimiento Wurster o por granulado en tambor (p. ej. granulado de alto cizallamiento), extrusión, revestimiento en bandeja o una mezcladora de microingredientes.

- 15 Para algunas realizaciones el DFM y/ la enzima(s) se pueden revestir, por ejemplo encapsular. Apropiadamente el DFM y enzimas se pueden formular con el mismo revestimiento o encapsulado en la misma cápsula. Alternativamente una o dos o tres o cuatro de las enzimas se pueden formular con el mismo revestimiento o encapsulado en la misma cápsula y el DFM se podría formular en un revestimiento separado de una o más o todas las enzimas. En algunas realizaciones, tal como cuando el DFM es capaz de producir endosporas, el DFM se puede proporcionar sin ningún revestimiento. En tales circunstancias, las endosporas de DFM simplemente se pueden mezclar con una o dos o tres o cuatro enzimas. En el último caso, las enzimas se pueden revestir, p. ej. encapsular, por ejemplo una o más o todas las enzimas se pueden revestir, p. ej. encapsular. Las enzimas se pueden encapsular como mezclas (es decir comprende una o más, dos o más, tres o más o todas) de las enzimas o se pueden encapsular por separado, p. ej. como enzimas solas. En una realización preferente las cuatro enzimas se pueden revestir, p. ej. encapsular, juntas.

- 20 En una realización el revestimiento protege las enzimas del calor y se puede considerar un termoprotector.

- 25 En una realización la composición de aditivo alimentario se formula como un polvo seco o gránulos según se describe en la patente WO2007/044968 (referido como gránulos TPT) o la patente WO1997/016076 o la patente WO1992/012645.

- 30 En una realización la composición de aditivo alimentario se puede formular como un gránulo para composiciones alimentarias que comprenden: un centro; un agente activo; y al menos un revestimiento, el agente activo del gránulo retiene al menos 50% de actividad, al menos 60% de actividad, al menos 70% de actividad, al menos 80% de actividad después de las condiciones seleccionadas de una o más de a) un proceso de peletizar alimento, b) un proceso de pretratamiento del alimento con vapor caliente, c) almacenamiento, d) almacenamiento como un ingrediente en una mezcla sin peletizar, y e) almacenamiento como un ingrediente en una mezcla base de alimento o un premezcla de alimento que comprende al menos un compuesto seleccionado de trazas de minerales, ácidos orgánicos, azúcares reducidos, vitaminas, cloruro de colina, y compuestos que dan como resultado una mezcla base de alimento o un premezcla de alimento ácido o básico.

- 35 En relación al gránulo al menos un revestimiento puede comprender un material hidratante húmedo que constituya al menos 55% p/p del gránulo; y/o al menos un revestimiento puede comprender dos revestimientos. Los dos revestimientos pueden ser un revestimiento hidratante húmedo y un revestimiento barrera a humedad. En algunas realizaciones el revestimiento hidratante húmedo puede estar entre 25% y 60% p/p del gránulo y el revestimiento barrera a humedad puede estar entre 2% y 15% p/p del gránulo. El revestimiento hidratante húmedo se puede seleccionar a partir de sales inorgánicas, sacarosa, almidón, y maltodextrina y el revestimiento barrera a humedad se puede seleccionar a partir de polímeros, gomas, suero y almidón.

- 40 El gránulo se puede producir usando un proceso de peletizar alimentos y el proceso de pretratamiento del alimento se puede llevar a cabo entre 70°C y 95°C durante varios minutos, tal como entre 85°C y 95°C.

- 45 En una realización la composición de aditivo alimentario se puede formular como un gránulo para alimentación animal que comprende: un centro; un agente activo, el agente activo del gránulo retiene al menos 80% de actividad después de almacenamiento y después del proceso de peletizar con vapor caliente donde el gránulo es un ingrediente; un revestimiento de barrera a humedad; un revestimiento hidratante húmedo que es al menos 25% p/p del gránulo, el gránulo tiene una actividad del agua de menos de 0,5 antes del proceso de peletizar con vapor caliente.

- 50 El gránulo puede tener un revestimiento de barrera a humedad seleccionado de polímeros y gomas y el material hidratante húmedo puede ser una sal inorgánica. El revestimiento hidratante húmedo puede estar entre 25% y 45% p/p del gránulo y el revestimiento de barrera húmeda puede estar entre 2% y 10% p/p del gránulo.

El gránulo se puede producir usando un proceso de peletizar con vapor caliente que se puede llevar a cabo entre 85°C y 95°C durante varios minutos.

En algunas realizaciones el DFM (p. ej. endosporas de DFM por ejemplo) se pueden diluir usando un diluyente, tal como polvo de almidón, piedra caliza o similar.

En una realización, la composición es una formulación líquida adecuada para consumo preferentemente tal líquido para consumo contiene uno o más de los siguientes: un tampón, sal, sorbitol y/o glicerol.

- 5 En otra realización la composición aditiva alimentaria se puede formular aplicando, p. ej. pulverizando, la enzima(s) sobre un sustrato vehículo, tal como trigo molido por ejemplo.

En una realización la composición de aditivo alimentario según la presente invención se puede formular como una premezcla. A modo sólo de ejemplo la premezcla puede comprender uno o más componentes alimentarios, tal como uno o más minerales y/o uno o más vitaminas.

- 10 En una realización el DFM y/o enzimas para usar en la presente invención se formulan con al menos un vehículo fisiológicamente aceptable seleccionado a partir de al menos uno de maltodextrina, piedra caliza (carbonato cálcico), ciclodextrina, trigo o un componente de trigo, sacarosa, almidón, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Talco, PVA, sorbitol, benzoato, sorbiato, glicerol, sacarosa, propilén glicol, 1,3-propano diol, glucosa, parabenos, cloruro sódico, citrato, acetato, fosfato, calcio, metabisulfito, formato y sus mezclas.

- 15 Envasado

En una realización la composición de aditivo alimentario y/o premezcla y/o alimento o producto alimentario según la presente invención se envasa.

En una realización preferente la composición de aditivo alimentario y/o premezcla y/o alimento o producto alimentario se envasa en una bolsa, tal como una bolsa de papel.

- 20 En una realización alternativa la composición de aditivo alimentario y/o premezcla y/o alimento o producto alimentario se puede sellar en un recipiente. Se puede usar cualquier recipiente adecuado.

Alimento

La composición de aditivo alimentario de la presente invención se puede usar como – o en la preparación de – un alimento.

- 25 El término “alimento” se usa en la presente memoria como sinónimo de “producto alimentario”.

El alimento puede estar en la forma de una disolución o como un sólido – dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

- 30 Cuando se usa como – o en la preparación de – un alimento – tal como alimento funcional – la composición de la presente invención se puede usar en conjunción con uno o más de: un vehículo nutricionalmente aceptable, un diluyente nutricionalmente aceptable, un excipiente nutricionalmente aceptable, un adyuvante nutricionalmente aceptable, un ingrediente nutricionalmente activo.

En una realización preferente la composición de aditivo alimentario de la presente invención se mezcla con un componente alimentario para formar un producto alimentario.

- 35 El término “componente alimentario” como se usa en la presente memoria significa todo o parte de un producto alimentario. Parte del producto alimentario puede significar un constituyente del producto alimentario, p. ej. 2, o 3 o 4. En una realización el término “componente alimentario” engloba una premezcla o constituyentes de premezcla.

- 40 Preferentemente el alimento puede ser un forraje o una premezcla del mismo, un compuesto alimentario, o una premezcla del mismo. En una realización la composición de aditivo alimentario según la presente invención se puede mezclar con un componente alimentario, un componente de compuesto alimentario o una premezcla de un componente alimentario o un forraje, un componente de forraje, o una premezcla de un forraje.

El término forraje como se usa en la presente memoria significa cualquier alimento que se proporciona a un animal (antes de que el animal lo tenga que buscar por sí mismo). El forraje engloba plantas que se han cortado.

El término forraje incluye heno, paja, ensilado, alimentos comprimidos y peletizados, aceites y raciones mezcladas, y también granos germinados y legumbres.

- 45 El forraje se puede obtener de una o más de las plantas seleccionadas de: alfalfa (lucerne), cebada, trébol zapaticos, brasicas, Chau moellier, berza, semilla de colza (canola), nabo sueco (swede), nabo, trébol, trébol Alsike, trébol rojo, trébol subterráneo, trébol blanco, hierba, hierba avena falsa, festuca, hierba Bermuda, bromo, dantonía, poa (de mezclas naturales de céspedes), dactilis, lolium, phleum pratense, maíz (maize), avenas, sorgo, soja, árboles (cortes de poda para henificar), trigo, y legumbres.

El término “alimento compuesto” significa un alimento comercial en la forma de una harina, un pelet, nuez, pastel o un crujiente. Los alimentos compuestos se pueden combinar a partir de varias materias primas y aditivos. Estas formulaciones se combinan según los requerimientos específicos del animal objetivo.

5 Los alimentos compuestos pueden ser alimentos completos que proporcionan todos los nutrientes requeridos diariamente, concentrados que proporcionan una parte de la ración (proteína, energía) o complementos que solo proporcionan micronutrientes adicionales, tales como minerales y vitaminas.

Los ingredientes principales usados en alimentos compuestos son los granos de alimentos, que incluyen maíz, soja, sorgo, avenas, almidón y cebada.

10 Adecuadamente una premezcla según se refiere en la presente memoria puede ser una composición compuesta de microingredientes tales como vitaminas, conservantes químicos, antibióticos, productos de fermentación, y otros ingredientes esenciales. Las premezclas usualmente son composiciones adecuadas para combinaciones en raciones comerciales.

15 Cualquier producto alimentario de la presente invención puede comprender uno o más materiales alimentarios seleccionados del grupo que comprende a) cereales, tales como granos pequeños (p. ej. trigo, cebada, arroz, avenas y sus combinaciones) y/o cereales grandes tales como maíz o sorgo; b) subproductos de cereales, tal como harina de gluten de maíz, granos y solubles de maíz (DDGS), salvado de trigo, harinillas de trigo, restos de trigo, salvado de arroz, cáscaras de arroz, cáscaras de avena, nuez de palmera, y pulpa de cítrico; c) proteína obtenida de  
20 de fuentes tales como soja, girasol, cacahuete, altramuz, guisantes, habas, algodón, colza, harina de pescado, proteína de plasma seco, harina de carne y hueso, proteína de patata, suero, copra, sésamo; d) aceites y grasas obtenidas de fuentes animales y vegetales; e) minerales y vitaminas.

Un producto alimentario de la presente invención puede contener al menos 30%, al menos 40%, al menos 50% o al menos 60% en peso de harina de maíz y soja o maíz y grasa de soja, o harina de trigo o harina de girasol.

25 Además o de modo alternativo, un producto alimentario de la presente invención puede comprender al menos un material alimentario rico en fibra y/o al menos un subproducto del al menos un material rico en fibra para proporcionar un producto alimentario rico en fibra. Ejemplos de materiales alimentarios ricos en fibra incluyen: trigo, cebada, arroz, avenas, subproductos de cereales, tales como harina de gluten de maíz, granos y solubles de maíz (DDGS), salvado de trigo, harinillas de trigo, restos de trigo, salvado de arroz, cáscaras de arroz, cáscaras de avena, nuez de palmera, y pulpa de cítrico. Algunas fuentes de proteína también se pueden considerar ricos en fibra: proteína obtenida de fuentes tales como girasol, altramuz, habas y algodón.

30 En la presente invención el alimento puede ser uno o más de los siguientes: un alimento compuesto y premezcla, que incluye pellets, nueces o alimento (para ganado); un cultivo o residuo de cultivo: maíz, soja, sorgo, avenas, cebada, rastrojo de maíz, copra, paja, cáscaras, desechos de remolacha azucarera; harina de pescado; hierba recién cortada y otras plantas forrajeras; harina de carne y hueso; melazas; pastel oleoso y pastel prensado; oligosacáridos; plantas forrajeras conservadas: heno y silo; algas; semillas y granos, o bien enteros o preparados  
35 por triturado, molido, etc.: granos germinados y legumbres; extracto de levadura.

El término alimento en la presente invención también engloba algunas realizaciones de alimento para mascotas. Un alimento para mascotas es un material de planta o animal destinado a consumo por mascotas, tal como alimento para perros o alimento para gatos. El alimento para mascotas, tal como alimento para perros y alimento para gatos, puede estar o bien en una forma seca, tal como pienso para perros, o en forma húmeda enlatada. El alimento para  
40 mascotas puede contener el aminoácido taurina.

El término alimento en la presente invención también engloba en algunas realizaciones alimento para peces. Un alimento para peces normalmente contiene macro nutrientes, elementos en traza y vitaminas necesarias para mantener los peces en cautividad con buena salud. El alimento para peces puede estar en la forma de un copo, pelet o tableta. Las formas peletizadas, algunas de las cuales se hunden rápidamente, a menudo se usan para peces más grandes o especies que se alimentan del fondo. Algunos alimentos para peces también contienen aditivos, tales como beta caroteno o hormonas sexuales, para mejorar artificialmente el color de los peces ornamentales.

El término alimento en la presente invención también engloba algunas realizaciones de alimento para pájaros. El alimento para pájaros incluye alimento que se usa tanto en comederos para pájaros como para alimentar pájaros mascota. Típicamente el alimento para pájaros comprende una variedad de semillas, pero también puede englobar sebo (grasa de ternera o cordero).

Como se usa en la presente memoria el término “en contacto” se refiere a la aplicación indirecta o directa de la composición de la presente invención al producto (p. ej. al alimento). Ejemplos de métodos de aplicación que se pueden usar, incluyen, pero no son limitantes, tratar el producto en un material que comprende la composición de aditivo alimentario, aplicación directa por mezclado de la composición de aditivo alimentario con el producto, pulverizar la composición de aditivo alimentario sobre la superficie del producto o empapar el producto en una preparación de la composición de aditivo alimentario.

En una realización la composición de aditivo alimentario de la presente invención preferentemente se mezcla con el producto (p. ej. producto alimentario). Alternativamente, la composición de aditivo alimentario se puede incluir en la emulsión o ingredientes crudos de un producto alimentario.

5 Para algunas aplicaciones, es importante que la composición esté disponible sobre o en la superficie de un producto que se va a afectar/tratar. Esto permite a la composición impartir una o más de las siguientes características favorables: beneficios de rendimiento.

Las composiciones de aditivo alimentario de la presente invención se pueden aplicar para entremezclar, cubrir y/o impregnar un producto (p. ej. producto alimentario o ingredientes crudos de un producto alimentario) con una cantidad controlada de DFM y enzimas.

10 El DFM y enzimas se pueden usar simultáneamente (p. ej. cuando están mezclados juntos o incluso cuando se suministran por diferentes rutas) o secuencialmente (p. ej. cuando se pueden suministrar por diferentes rutas). En una realización preferentemente el DFM y enzimas se aplican simultáneamente. Preferentemente el DFM y enzimas se mezclan antes de suministrarse a un producto alimentario o a un ingrediente crudo de un producto alimentario.

15 El DFM en composiciones de aditivo alimentario según la presente invención – se puede añadir en concentraciones adecuadas – tal como por ejemplo en concentraciones en el producto alimentario final que ofrecen una dosis diaria entre aproximadamente  $2 \times 10^5$  UFC a aproximadamente  $2 \times 10^{11}$  UFC, adecuadamente entre aproximadamente  $2 \times 10^6$  a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$ , adecuadamente entre aproximadamente  $3,75 \times 10^7$  UFC a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  UFC.

20 Preferentemente, la composición de aditivo alimentario de la presente invención será estable térmicamente a tratamiento térmico de hasta aproximadamente 70°C; hasta aproximadamente 85°C; o hasta aproximadamente 95°C. El tratamiento térmico se puede llevar a cabo durante hasta aproximadamente 1 minuto; hasta aproximadamente 5 minutos; hasta aproximadamente 10 minutos; hasta aproximadamente 30 minutos; hasta aproximadamente 60 minutos. El término estable térmicamente significa que al menos aproximadamente 75% de los componentes de enzima y/o DFM que estaban presentes/activos en el aditivo antes de calentar a la temperatura especificada aún están presentes/activos después de que se enfríe a temperatura ambiente. Preferentemente, al menos aproximadamente 80% de los componentes de enzima y/o DFM que estaban presentes y activos en el aditivo antes de calentar a la temperatura especificada están aún presentes y activos después de que se enfríe a temperatura ambiente.

30 En una realización particularmente preferente la composición de aditivo alimentario se homogeniza para producir un polvo.

En una realización preferente alternativa, la composición de aditivo alimentario se formula en gránulos según se describe en la patente WO2007/044968 (referidos como gránulos TPT).

35 En otra realización preferente cuando la composición de aditivo alimentario se fórmula en gránulos los gránulos comprenden una sal de barrera hidratada que cubre el centro de proteína. La ventaja de tal recubrimiento de sal es mejorar la termotolerancia, mejorar la estabilidad a almacenamiento y proteger frente a otros aditivos alimentarios que de otro modo tienen efecto adverso sobre la enzima y/o DFM.

Preferentemente, la sal usada para el recubrimiento de sal tiene una actividad del agua mayor de 0,25 o humedad constante mayos de 60% a 20°C.

Preferentemente, el recubrimiento de sal comprende  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

40 El método para preparar una composición de aditivo alimentario también puede comprender el paso posterior de peletizar el polvo. El polvo se puede mezclar con otros componentes conocidos en la técnica. El polvo, o mezcla que comprende el polvo, se puede forzar a través de un troquel y las tiras que resultan se cortan en pelets apropiados de longitud variable.

45 Opcionalmente, la etapa de peletizar puede incluir un tratamiento con vapor, o etapa de acondicionado, antes de la formación de los pelets. La mezcla que comprende el polvo se puede colocar en un acondicionador, p. ej. una mezcladora con inyección de vapor. La mezcla se calienta en el acondicionador hasta una temperatura especificada, tal como de 60-100°C, temperatura típicas serían de 70°C, 80°C, 85°C, 90°C o 95°C. El tiempo de residencia puede variar de segundos a minutos e incluso horas. Tal como 5 segundos, 10 segundos, 15 segundos, 30 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos y 1 hora.

50 Se entenderá que la composición de aditivo alimentario de la presente invención es adecuada para adicionar a cualquier material alimentario adecuado.

Como se usa en la presente memoria, el término material alimentario se refiere a material alimentario básico a consumir por un animal. Se entenderá también que esto puede comprender, por ejemplo, al menos uno o más granos sin procesar, y/o plantas procesadas y/o material animal tal como harina de soja o harina de hueso.

Como se usa en la presente memoria, el término “producto alimentario” se refiere a un material alimentario al que se han añadido una o más composiciones de aditivo alimentario.

5 La persona experta comprenderá que animales diferentes requieren productos alimentarios diferentes, e incluso el mismo animal puede requerir productos alimentarios diferentes, dependiendo del propósito para el que se cría el animal.

10 Preferentemente, el producto alimentario puede comprender materiales alimentarios que comprenden maiz o maíz, trigo, cebada, triticale, centeno, arroz, tapioca, sorgo, y/o cualquiera de los subproductos, así como componentes ricos en proteína como harina de soja, harina de semilla de colza, harina de canola, harina de semilla de algodón, harina de semilla de girasol, harinas de subproductos animales y sus mezclas. Más preferentemente, el producto alimentario puede comprender grasas animales y/o aceites vegetales.

Opcionalmente, el producto alimentario también puede contener minerales adicionales tal como, por ejemplo, calcio y/o vitaminas adicionales.

Preferentemente, el producto alimentario es una mezcla de harina de maíz soja.

En una realización, preferentemente el alimento no es alimento de mascotas.

15 En otro aspecto se proporciona un método para producir un producto alimentario. El producto alimentario típicamente se produce en molinos de alimentos en los que las materias primas primero se granulan hasta un tamaño de partícula adecuado y después se mezclan con aditivos apropiados. El producto alimentario después se puede producir como una masa o pelets; lo último típicamente implica un método por el que la temperatura se eleva a un nivel objetivo y después el alimento pasa a través de un troquel para producir pelets de un tamaño particular.  
20 Los pelets se dejan enfriar. Posteriormente se pueden añadir aditivos líquidos tal como grasa y enzima. La producción de producto alimentario también puede implicar una etapa adicional que incluye extrusión o expansión antes de peletizar – en particular por técnicas adecuadas que pueden incluir al menos el uso de vapor.

25 El producto alimentario según la presente invención es para un animal monogástrico, tal como aves (por ejemplo, broiler, ponedora, criadores de broiler, pavo, pato, ganso, pato de agua), porcino (todas las categorías de edad), una mascota (por ejemplo, perros, gatos), o peces, preferentemente el producto alimentario es para aves.

En una realización el producto alimentario no es para ponedoras.

Por medio solo de ejemplo un producto alimentario para pollos, p. ej. pollos broiler puede estar comprendido por uno o más de los ingredientes listados en la siguiente tabla, por ejemplo en los porcentajes que se dan en la tabla siguiente:

Ingredientes	Inicial (%)	Final (%)
Maíz	46,2	46,7
Harinillas de trigo	6,7	10,0
Maíz DDGS	7,0	7,0
Harina de soja 48%CP	32,8	26,2
Combinación de grasa an/veg	3,0	5,8
L-lisina HCl	0,3	0,3
DL-metionina	0,3	0,3
L-treonina	0,1	0,1
Sal	0,3	0,4
Piedra caliza	1,1	1,1
Fosfato dicálcico	1,2	1,2
Vitaminas y microminerales de aves	0,3	0,3

30 A modo sólo de ejemplo la especificación de dieta para pollos, tal como pollos broiler, puede ser como se describe en la siguiente tabla:

Especificación de dieta		
Proteína cruda (%)	23,00	20,40

## ES 2 657 543 T3

Especificación de dieta		
Energía metabolizable de ave (kcal/kg)	2.950	3.100
Calcio (%)	0,85	0,85
Fósforo disponible (%)	0,38	0,38
Sodio (%)	0,18	0,19
Lisina dig (%)	1,21	1,07
Metionina dig (%)	0,62	0,57
Metionina + cisteína dig (%)	0,86	0,78
Treonina dig (%)	0,76	0,68

A modo sólo de ejemplo un producto alimentario para gallinas ponedoras puede comprender uno o más de los ingredientes listados en la siguiente tabla, por ejemplo en los porcentajes que se dan en la tabla siguiente:

Ingrediente	Fase de puesta (%)
Maíz	10,0
Trigo	53,6
Maíz DDGS	5,0
Harina de soja 48%CP	14,9
Harinillas de trigo	3,0
Aceite de soja	1,8
L-lisina HCl	0,2
DL-metionina	0,2
L-treonina	0,1
Sal	0,3
Fosfato dicálcico	1,6
Piedra caliza	8,9
Vitaminas y microminerales de aves	0,6

A modo sólo de ejemplo la especificación de dieta para gallinas ponedoras puede ser como se describe en la siguiente tabla:

Especificación de dieta	
Proteína cruda (%)	16,10
Energía metabolizable de ave (kcal/kg)	2.700
Lisina (%)	0,85
Metionina (%)	0,42
Metionina + cisteína (%)	0,71
Treonina (%)	0,60
Calcio (%)	3,85
Fósforo disponible (%)	0,42
Sodio (%)	0,16

- 5 A modo sólo de ejemplo un producto alimentario para pavos puede comprender uno o más de los ingredientes listados en la siguiente tabla, por ejemplo en los porcentajes que se dan en la tabla siguiente:

## ES 2 657 543 T3

Ingredientes	Fase 1 (%)	Fase 2 (%)	Fase 3 (%)	Fase 4 (%)
Trigo	33,6	42,3	52,4	61,6
Maíz DDGS	7,0	7,0	7,0	7,0
Harina de soja 48%CP	44,6	36,6	27,2	19,2
Harina de semilla de colza	4,0	4,0	4,0	4,0
Aceite de soja	4,4	4,2	3,9	3,6
L-lisina HCl	0,5	0,5	0,4	0,4
DL-metionina	0,4	0,4	0,3	0,2
L-treonina	0,2	0,2	0,1	0,1
Sal	0,3	0,3	0,3	0,3
Piedra caliza	1,0	1,1	1,1	1,0
Fosfato dicálcico	3,5	3,0	2,7	2,0
Vitaminas y microminerales de aves	0,4	0,4	0,4	0,4

A modo sólo de ejemplo la especificación de dieta para pavos puede ser como se describe en la siguiente tabla:

Especificación de dieta				
Proteína cruda (%)	29,35	26,37	22,93	20,00
Energía metabolizable de ave (kcal/kg)	2.850	2.900	2.950	3.001
Calcio (%)	1,43	1,33	1,22	1,02
Fósforo disponible (%)	0,80	0,71	0,65	0,53
Sodio (%)	0,16	0,17	0,17	0,17
Lisina dig (%)	1,77	1,53	1,27	1,04
Metionina dig (%)	0,79	0,71	0,62	0,48
Metionina + cisteína dig (%)	1,12	1,02	0,90	0,74
Treonina dig (%)	1,03	0,89	0,73	0,59

A modo sólo de ejemplo un producto alimentario para cochinitos puede comprender uno o más de los ingredientes listados en la siguiente tabla, por ejemplo en los porcentajes que se dan en la tabla siguiente:

Ingrediente	Fase 1 (%)	Fase 2 (%)
Maíz	20,0	7,0
Trigo	25,9	46,6
Centeno	4,0	10,0
Harinillas de trigo	4,0	4,0
Maíz DDGS	6,0	8,0
Harina de soja 48%CP	25,7	19,9
Suero seco	10,0	0,0
Aceite de soja	1,0	0,7
L-lisina HCl	0,4	0,5
DL-metionina	0,2	0,2
L-treonina	0,1	0,2
L-triptófano	0,03	0,04

## ES 2 657 543 T3

Ingrediente	Fase 1 (%)	Fase 2 (%)
Piedra caliza	0,6	0,7
Fosfato dicálcico	1,6	1,6
Vitaminas y microminerales de porcino	0,2	0,2
Sal	0,2	0,4

A modo sólo de ejemplo la especificación de dieta para cochinitos puede ser como se describe en la siguiente tabla:

Especificación de dieta		
Proteína cruda (%)	21,50	20,00
Energía digestible de porcino (kcal/kg)	3.380	3.320
Energía neta de porcino (kcal/kg)	2.270	2.230
Calcio (%)	0,80	0,75
Fósforo disponible (%)	0,40	0,35
Sodio (%)	0,20	0,20
Lisina dig (%)	1,23	1,14
Metionina dig (%)	0,49	0,44
Metionina + cisteína dig (%)	0,74	0,68
Treonina dig (%)	0,80	0,74

A modo sólo de ejemplo un producto alimentario para cerdos cebados/terminados puede comprender uno o más de los ingredientes listados en la siguiente tabla, por ejemplo en los porcentajes que se dan en la tabla siguiente:

Ingrediente	Cebado/terminado (%)
Maíz	27,5
Harina de soja 48%CP	15,4
Maíz DDGS	20,0
Salvado de trigo	11,1
Salvado de arroz	12,0
Harina de semilla de canola	10,0
Piedra caliza	1,6
Fosfato dicálcico	0,01
Sal	0,4
Vitaminas y microminerales de porcino	0,3
L-lisina HCl	0,2
Aceite vegetal	0,5

5 A modo sólo de ejemplo la especificación de dieta para cerdos cebados/terminados puede ser como se describe en la siguiente tabla:

Especificación de dieta	
Proteína cruda (%)	22,60
Energía metabolizable de porcino (kcal/kg)	3.030
Calcio (%)	0,75
Fósforo disponible (%)	0,29

Especificación de dieta	
Lisina digestible (%)	1,01
Metionina + cisteína dig (%)	0,73
Treonina dig (%)	0,66

Formas

La composición de aditivo alimentario de la presente invención y otros componentes y/o producto alimentario que lo comprende se pueden usar en cualquier forma adecuada.

5 La composición de aditivo alimentario de la presente invención se puede usar en la forma de preparaciones sólidas o líquidas o sus alternativas. Ejemplos de preparaciones sólidas incluyen polvos, pastas, bolos, cápsulas, pelets, tabletas, polvillo, y gránulos que se puede humedecer, secar por pulverizado o liofilizar. Ejemplos de preparaciones líquidas incluyen, pero no son limitantes, disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas, orgánicas o acuoso-orgánicas.

10 En algunas aplicaciones, DFM o composiciones de aditivo alimentario se pueden mezclar con alimento o administrar en el agua de beber. En una realización el intervalo de dosis para incluir en el agua es aproximadamente  $1 \times 10^3$  UFC/animal/día a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  UFC/animal/día, y más preferentemente aproximadamente  $1 \times 10^7$  UFC/animal/día.

15 Ejemplos de formas adecuados incluyen uno o más de: polvos, pastas, bolos, pelets, tabletas, píldoras, cápsulas, óvulos, disoluciones o suspensiones, que pueden contener agentes saborizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación instantánea, retrasada, modificada, sostenida, pulsada o controlada.

20 A modo de ejemplo, si la composición de la presente invención se usa en un sólido, p. ej. forma peletizada, también puede contener uno o más de: excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato dibásico de calcio y glicina; desintegrantes tales como almidón (preferentemente almidón de maíz, patata o tapioca), almidón glicolato de sodio, croscarmelosa sódica y ciertos complejos de silicato; ligantes de granulación tales como polivinil pirrolidona, hidroxí propil metil celulosa (HPMC), hidroxí propil celulosa (HPC), sacarosa, gelatina y acacia; se pueden incluir agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato gliceril y talco.

25 Ejemplos de vehículos nutricionalmente aceptables para usar en preparar las formas incluyen, por ejemplo, agua, disoluciones salinas, alcohol, silicona, ceras, vaselina, aceites vegetales, glicoles de polietileno, propilén glicol, liposomas, azúcares, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, tensioactivos, ácido silíceo, parafina viscosa, aceite perfumado, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácido graso de petroetral, hidroxí matil celulosa, polivinil pirrolidona, y similares.

Excipientes preferentes para las formas incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de leche o polietilén glicoles de alto peso molecular.

30 Para suspensiones acuosas y/o elixires, la composición de la presente invención se puede combinar con diversos edulcorantes o agentes saborizantes, materia colorante o tintes, con emulsionantes y/o agentes de suspensión y con diluyentes tales como agua, propilén glicol y glicerina, y sus combinaciones.

A menudo se usa suero no higroscópico como un vehículo para DFMs (particularmente DFM bacteriano) y es un buen medio para iniciar el crecimiento.

35 DFM bacteriano contiene pastas que se pueden formular con aceite vegetal e ingredientes de gelatina inertes.

Se pueden formular productos fúngicos con subproductos de grano como vehículos.

En una realización preferentemente la composición de aditivo alimentario según la presente invención no está en la forma de un sistema de micropartículas, tal como el sistema de micropartículas mostrado en la patente WO2005/123034.

40 Dosificación

El DFM y/o composición de aditivo alimentario según la presente invención se puede diseñar para dosis de una toma o se puede diseñar para alimentación diaria.

45 La cantidad óptima de la composición (y de cada uno de sus componentes) para usar en la combinación de la presente invención dependerá del producto a tratar y/o el método de poner en contacto el producto con la composición y/o el uso que se pretende de la misma.

La cantidad de DFM y enzimas usadas en las composiciones debería ser una cantidad suficiente para ser eficaz y para permanecer suficientemente eficaz en la mejora del rendimiento de los productos alimentarios para alimentar al animal que contienen dicha composición. Esta cantidad del tiempo de eficacia debería extenderse hasta al menos el tiempo de utilización del producto (p. ej. composición de aditivo alimentario o alimento que lo contiene).

5 La proporción de DFM de cada enzima en el alimento puede estar en los intervalos que se dan a continuación:

DFM: fitasa (UFC/FTU): en el intervalo de  $5,0 \times 10^2$  UFC DFM: 1 FTU, enzima a  $5,0 \times 10^9$  UFC: 1 FTU enzima; preferentemente en el intervalo de  $7,5 \times 10^4$  UFC DFM: 1 FTU enzima hasta  $2,5 \times 10^7$  UFC: 1 FTU enzima.

DFM: proteasa (UFC/FTU): en el intervalo de  $5,0 \times 10^1$  UFC DFM: 1 PU, enzima a  $1,0 \times 10^9$  UFC: 1 PU enzima; preferentemente en el intervalo de  $1,25 \times 10^4$  UFC DFM: 1 PU enzima hasta  $5,0 \times 10^6$  UFC: 1 PU enzima.

10 En una realización preferentemente el producto alimentario comprende el siguiente:

una proteasa a al menos 4.000 PU/kg de alimento;

una fitasa a al menos 500 FTU/kg de alimento; y

Envivo Pro® (DFM) a 75.000 UFC/g hasta 150.000 UFC/g de alimento.

En una realización preferentemente el producto alimentario comprende el siguiente:

15 una proteasa a 4.000 PU/kg de alimento;

una fitasa a 500 FTU/kg de alimento; y

Envivo Pro® (DFM) a 75.000 UFC/g hasta 150.000 UFC/g de alimento.

En una realización preferentemente el producto alimentario comprende el siguiente:

una proteasa a 5.000 PU/kg de alimento;

20 una fitasa a 625 FTU/kg de alimento; y

Envivo Pro® (DFM) a 75.000 UFC/g hasta 150.000 UFC/g de alimento.

En otra realización el producto alimentario comprende lo siguiente:

una proteasa a 2.000 PU/kg de alimento;

una fitasa a 500 FTU/kg de alimento; y

25 Envivo Pro® (DFM) a 37.500 UFC/g hasta 75.000 UFC/g de alimento.

En una realización preferentemente la composición de aditivo alimentario comprende enzima y DFM suficientes para dosificar el producto alimentario como sigue:

una proteasa a 4.000 PU/kg de alimento;

una fitasa a 500 FTU/kg de alimento; y

30 Envivo Pro® (DFM) a 75.000 UFC/g hasta 150.000 UFC/g de alimento.

En una realización preferentemente la composición de aditivo alimentario comprende enzima y DFM suficientes para dosificar el producto alimentario como sigue:

una proteasa a 2.000 PU/kg de alimento;

una fitasa a 500 FTU/kg de alimento; y

35 Envivo Pro® (DFM) a 37.500 UFC/g hasta 75.000 UFC/g de alimento.

Combinación con otros componentes

El DFM y enzimas para usar en la presente invención se puede usar en combinación con otros componentes. Así, la presente invención también se refiere a combinaciones. El DFM en combinación con una subtilisina y una 6-fitasa se puede referir en la presente memoria como "la composición de aditivo alimentario de la presente invención".

La combinación de la presente invención comprende la composición de aditivo alimentario de la presente invención (o uno o más de sus constituyentes) y otro componente que es adecuado para consumo animal y es capaz de proporcionar un beneficio médico o fisiológico al consumidor.

En una realización preferentemente el "otro componente" no es otra enzima u otro DFM.

5 Los componentes pueden ser prebióticos. Los prebióticos típicamente son hidratos de carbono no digestibles (oligo o poligosacáridos) o un azúcar alcohol que no se degrada o se absorbe en el tracto digestivo superior. Los prebióticos conocidos usados en productos comerciales y útiles según la presente invención incluyen inulina (fructo oligosacárido, o FOS) y transgalacto oligosacáridos (GOS o TOS). Prebióticos adecuados incluyen palatino oligosacárido, soja oligosacárido, alginato, xantana, pectina, goma garrofin (LBG), inulina, goma guar, galacto oligosacárido (GOS), fructo oligosacárido (FOS), almidón no degradable, lactosacarosa, lactulosa, lactilol, maltitol, maltodextrina, polidextrosa (esto es, Litesse®), lactilol, lactosacarosa, soja oligosacáridos, palatinosa, isomalto oligosacáridos, gluco oligosacáridos y xilo oligosacáridos, fragmentos de pectina, fibras alimentarias, manan oligosacáridos.

10 Fibras alimentarias pueden incluir polisacáridos no de almidón, tales como arabiloxilanos, celulosa y muchos otros componentes de plantas, tales como dextrinas resistentes, inulina, lignina, ceras, quitinas, pectinas, beta glucanos y oligosacáridos.

Se describe la combinación de la composición de aditivo alimentario según la presente invención (o uno o más de sus constituyentes) con un prebiótico. También se describe una composición de aditivo alimentario que comprende (o esencialmente consiste o consiste en) un DFM en combinación con una fitasa, una proteasa y un prebiótico.

20 El prebiótico se puede administrar simultáneamente (p. ej. mezclar juntos o suministrar simultáneamente por la misma o diferente ruta) o secuencialmente (p. ej. la misma o diferente ruta) con la composición de aditivo alimentario (o sus constituyentes) según la presente invención.

25 Otros componentes de las combinaciones de la presente invención incluyen polidextrosa, tal como Litesse®, y/o una maltodextrina y/o lactilol. Estos otros componentes opcionalmente se pueden añadir a la composición de aditivo alimentario para asistir en el proceso de secado y ayudar a la supervivencia de DFM.

30 Otros ejemplos de otros componentes adecuados incluyen uno o más de: espesantes, agentes gelificantes, emulsionantes, ligantes, modificantes de cristal, edulcorantes (que incluyen edulcorantes artificiales), modificadores reológicos, estabilizantes, antioxidantes, tintes, enzimas, transportes, vehículos, excipientes, diluyentes, agentes lubricantes, agentes saborizantes, materia colorante, agentes de suspensión, desintegrantes, ligantes de granulado, etc. Estos otros componentes pueden ser naturales. Estos otros componentes se pueden preparar usando técnicas químicas y/o enzimáticas.

En una realización el DFM y/o enzima se puede encapsular. En una realización la composición de aditivo alimentario y/o DFM y/o enzimas se formula(n) como un polvo seco o granulado según se describe en la patente WO2007/044968 (referidos como gránulos TPT).

35 En una realización preferente el DFM y/o enzima para usar en la presente invención se pueden usar en combinación con uno o más lípidos.

Por ejemplo, el DFM y/o enzimas para usar en la presente invención se puede usar en combinación con uno o más micelas de lípidos. La micela de lípido puede ser una micela simple o un complejo de micelas de lípidos.

40 La micela de lípidos puede ser un agregado de moléculas orientadas de sustancias anfipáticas, tal como un lípido y/o un aceite.

45 Como se usa en la presente memoria el término "espesante o agente gelificante" se refiere a un producto que evita la separación decelerando o evitando el movimiento de partículas, o bien gotas de líquidos inmiscibles, aire o sólidos insolubles. El espesamiento se da cuando moléculas individuales hidratadas causan un incremento de la viscosidad, haciendo más lenta la separación. Le gelificación se da cuando las moléculas hidratadas se unen para formar una red tridimensional que atrapa las partículas, que las inmoviliza.

El término "estabilizante" como se usa en la presente memoria se define como un ingrediente o combinación de ingredientes que evita que un producto (p. ej. un producto alimentario) cambie con el tiempo.

50 El término "emulsionante" como se usa en la presente memoria se refiere a un ingrediente (p. ej. un producto alimentario) que evita la separación de emulsiones. Las emulsiones son dos sustancias inmiscibles, una presente en forma de gotas, contenida en la otra. Las emulsiones pueden consistir en aceite en agua, donde la gota o fase dispersa es aceite y la fase continua es agua; o agua en aceite, donde el agua es la fase dispersa y la fase continua es aceite. Las espumas, que son gas en líquido, y suspensiones, que son sólido el líquido, también se pueden estabilizar por el uso de emulsionantes.

- 5 Como se usa en la presente memoria el término "ligante" se refiere a un ingrediente (p. ej. un ingrediente alimentario) que liga el producto junto a través de una reacción física o química. Durante "gelificación" por ejemplo, se absorbe agua, proporcionando un efecto ligante. Sin embargo, los ligantes pueden absorber otros líquidos, tal como aceites, manteniéndolos con el producto. En el contexto de la presente invención los ligantes típicamente se deberían usar en productos sólidos o de baja humedad por ejemplo productos de panadería; pastas, donuts, pan u otros.
- 10 "Transportes" o "vehículos" significa materiales adecuados para la administración de DFM y/o enzimas e incluyen cualquier material conocido en la técnica tal como, por ejemplo, cualquier líquido, gel, disolvente, diluyente líquido, solubilizante, o similar, que es no tóxico y que no interactúa con cualquier componente de la composición de una manera nociva.
- 15 Se describe un método para preparar una composición de aditivo alimentario que comprende mezclar un DFM, una fitasa y una proteasa con al menos un vehículo fisiológicamente aceptable seleccionado de al menos uno de maltodextrina, piedra caliza (carbonato cálcico), ciclodextrina, trigo o un componente de trigo, sacarosa, almidón, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Talco, PVA, sorbitol, benzoato, sorbiato, glicerol, sacarosa, propilén glicol, 1,3-propano diol, glucosa, parabenos, cloruro sódico, citrato, acetato, fosfato, calcio, metabisulfito, formato y sus mezclas.
- Ejemplos de excipientes incluyen uno o más de: celulosa microcristalina y otras celulosas, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato dibásico de calcio, glicina, almidón, azúcar de leche y polietilén glicol de alto peso molecular.
- 20 Ejemplos de desintegrantes incluyen uno o más de; almidón (preferentemente almidón de maíz, patata o tapioca), almidón glicolato de sodio, croscarmelosa sódica y ciertos complejos de silicato.
- Ejemplos de ligantes de granulación incluyen uno o más de: polivinil pirrolidona, hidroxil propil metil celulosa (HPMC), hidroxil propil celulosa (HPC), sacarosa, maltosa, gelatina y acacia.
- Ejemplos de agentes lubricantes incluyen uno o más de: estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato gliceril y talco.
- 25 Ejemplos de diluyentes incluyen uno o más de: agua, etanol, propilén glicol y glicerina, y sus combinaciones.
- Los otros componentes se pueden usar simultáneamente (p. ej. cuando se mezclan juntos o incluso cuando se suministran por diferentes rutas) o secuencialmente (p. ej. se pueden suministrar por diferentes rutas).
- Preferentemente, cuando la composición de aditivo alimentario de la presente invención se mezcla con otro componente(s), el DFM permanece viable.
- 30 En una realización preferentemente la composición de aditivo alimentario según la presente invención no comprende cromo o cromo orgánico.
- En una realización preferentemente la composición de aditivo alimentario según la presente invención no contiene glucanasa.
- 35 En una realización preferentemente la composición de aditivo alimentario según la presente invención no contiene ácido sórbico.
- Concentrados
- Los DFMs para usar en la presente invención pueden estar en la forma de concentrados. Típicamente estos concentrados comprenden una concentración significativamente alta de un DFM.
- 40 Las composiciones de aditivo alimentario según la presente invención pueden tener un contenido de células viables (unidades formadoras de colonias, UFCs) que está en el intervalo de al menos 10<sup>4</sup> UFC/g (adecuadamente que incluye al menos 10<sup>5</sup> UFC/g, tal como al menos 10<sup>6</sup> UFC/g, p. ej. al menos 10<sup>7</sup> UFC/g, al menos 10<sup>8</sup> UFC/g) a aproximadamente 10<sup>10</sup> UFC/g (o incluso aproximadamente 10<sup>11</sup> UFC/g o aproximadamente 10<sup>12</sup> UFC/g).
- 45 Cuando el DFM está en la forma de un concentrado las composiciones de aditivo alimentario según la presente invención pueden tener un contenido de células viables en el intervalo de al menos 10<sup>9</sup> UFC/g a aproximadamente 10<sup>12</sup> UFC/g, preferentemente al menos 10<sup>10</sup> UFC/g a aproximadamente 10<sup>12</sup> UFC/g.
- Composiciones en polvo, gránulo y líquido en la forma de concentrados se pueden diluir con agua o resuspender en agua u otros diluyentes adecuados, por ejemplo, un medio de crecimiento adecuado tal como leche o aceites minerales o vegetales, para dar composiciones listas para usar.
- 50 El DFM o composición de aditivo alimentario de la presente invención o las combinaciones de la presente invención en la forma de concentrados se pueden preparar según los métodos conocidos en la técnica.

Las enzimas o alimento se pueden poner en contacto por una composición en una forma de concentrado.

Las composiciones de la presente invención pueden ser secadas por espray o liofilizadas según métodos conocidos en la técnica.

5 Procesos típicos para fabricar partículas usando un proceso de secado por espray implican un material sólido que se disuelve en un disolvente apropiado (p. ej. un cultivo de un DFM en un medio de fermentación). Alternativamente, el material se puede suspender o emulsionar en un no disolvente para formar una suspensión o emulsión. Otros ingredientes (como se discutió anteriormente) o componentes tales como agentes antimicrobianos, agentes estabilizantes, tintes y agentes de asistencia al proceso de secado se pueden añadir opcionalmente en esta etapa.

10 Después la disolución se atomiza para formar una fina niebla de gotas. Las gotas inmediatamente entran en una cámara de secado donde entran en contacto con un gas de secado. El disolvente se evapora de las gotas y pasa al gas de secado para solidificar las gotas que están en contacto con el gas de secado. El disolvente se evapora a partir de las gotas al gas de secado para solidificar las gotas, formando así partículas. Las partículas después se separan del gas de secado y se recogen.

Sujeto

15 El término "sujeto", como se usa en la presente memoria, significa un animal al que se va a administrar o se ha administrado una composición de aditivo alimentario según la presente invención o un producto alimentario que comprende dicha composición de aditivo alimentario según la presente invención.

El término "sujeto", como se usa en la presente memoria, significa un animal. Preferentemente, el sujeto es un mamífero, ave, pez o crustáceo que incluye por ejemplo ganadería o un animal doméstico (p. ej. una mascota).

20 En una realización el "sujeto" es ganadería.

El término "ganadería" como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier animal de granja. Preferentemente, ganadería es uno o más de vacas o toros (incluyendo terneras), cerdos (incluyendo cochinitos), aves (incluyendo broilers, pollos y pavos), pájaros, peces (incluyendo peces de agua dulce, tal como salmón, bacalao, trucha y carpa, p. ej. carpa de estanque, y pescado marino, tal como lubina), crustáceos (tal como gambas, mejillones y vieiras), caballos (incluyendo caballos de carreras), ovejas (incluyendo corderos).

25 En una realización el término ganadería y/o aves y/o pollos no incluye ponedoras.

En otra realización el "sujeto" es un animal doméstico o mascota o un animal mantenido en un zoológico.

30 El término "animal domesticado o mascota o un animal mantenido en un zoológico" como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier animal relevante que incluye caninos (p. ej. perros), felinos (p. ej. gatos), roedores (p. ej. cerdos de guinea, ratas, ratones), pájaros, peces (incluyendo peces de agua dulce y peces marino), y caballos.

Según la presente invención, el sujeto es un sujeto de aves de corral.

En una realización el sujeto se puede someter a desafío con patógenos entéricos.

35 A modo de ejemplo un sujeto puede tener uno o más patógenos entéricos presentes en la tripa o tracto digestivo. Por ejemplo un sujeto puede tener uno o más patógenos entéricos presentes en la tripa o tracto digestivo a un nivel que:

i) da como resultado pérdida de rendimiento del animal y/o

ii) está a niveles clínicamente relevantes; o

iii) está a niveles subclínicos.

El patógeno entérico puede ser *Clostridium perfringens* por ejemplo.

40 Rendimiento

45 Como se usa en la presente memoria "rendimiento animal" se puede determinar mediante la eficacia del alimento y/o ganancia de peso del animal y/o mediante el índice de conversión del alimento y/o la digestibilidad de un nutriente en un alimento (p. ej. digestibilidad de aminoácidos) y/o energía digestible o energía metabolizable en un alimento y/o mediante retención de nitrógeno y/o mediante la capacidad de los animales de evitar los efectos negativos de enteritis necrótica y/o la respuesta inmune del sujeto.

Preferentemente "rendimiento animal" se determina mediante eficacia del alimento y/o ganancia de peso del animal y/o mediante el índice de conversión del alimento.

5 Por “rendimiento animal mejorado” se indica que hay eficacia del alimento incrementada, y/o ganancia de peso incrementada y/o índice de conversión del alimento reducida y/o digestibilidad de nutrientes o energía en un alimento mejorada y/o retención de nitrógeno mejorada y/o capacidad mejorada de evitar los efectos negativos de enteritis necrótica y/o mediante respuesta inmune del sujeto mejorada que resulta del uso de una composición de aditivo alimentario de la presente invención en alimento en comparación con el alimento que no comprende dicha composición de aditivo alimentario.

Preferentemente, mediante “rendimiento animal mejorado” se indica que hay eficacia del alimento incrementada, y/o ganancia de peso incrementada y/o índice de conversión del alimento reducida.

10 Como se usa en la presente memoria, el término “eficacia alimentaria” se refiere a la cantidad de ganancia de peso en un animal que se da cuando el animal se alimenta ad-libitum o con una cantidad específica de alimento durante un periodo de tiempo.

Mediante “eficacia del alimento incrementada” se indica que el uso de una composición de aditivo alimentario según la presente invención da como resultado una ganancia de peso incrementada por unidad de ingesta de alimento comparado con un animal alimentado sin que esté presente dicha composición de aditivo.

15 Índice de conversión del alimento (ICA)

Como se usa en la presente memoria el término “índice de conversión del alimento” se refiere a una cantidad de alimento que se alimenta a un animal para incrementar el peso del animal en una cantidad específica.

Un índice de conversión de alimento mejorado significa un índice de conversión de alimento más bajo.

20 Por “índice de conversión de alimento más bajo” o “índice de conversión de alimento mejorado” significa que el uso de una composición de aditivo alimentario en alimentos da como resultado una cantidad más baja de alimento que se requiere para incrementar el peso del animal en una cantidad específica comparado con la cantidad de alimento requerida para incrementar el peso del animal en la misma cantidad cuando el alimento no comprende dicha composición de aditivo alimentario.

Digestibilidad de nutriente

25 Digestibilidad de nutriente como se usa en la presente memoria significa la fracción de un nutriente que desaparece del tracto gastrointestinal o de un segmento específico del tracto gastrointestinal, p. ej. el intestino delgado. La digestibilidad de nutriente se puede medir como la diferencia entre lo que se administra al sujeto y lo que se sale en las heces del sujeto, o entre lo que se administra al sujeto y lo que queda en la digestión de un segmento específico del tracto intestinal, p. ej. el íleon.

30 Digestibilidad de nutriente como se usa en la presente memoria se puede medir por la diferencia entre la ingesta de un nutriente y la excreción del nutriente por medio de la total recolección de la excreta durante un periodo de tiempo; o con el uso de un marcador inerte que no es absorbido por el animal, y permite al investigador calcular la cantidad de nutriente que desaparece en el tracto gastrointestinal entero o en un segmento del tracto gastrointestinal. Tal marcador inerte puede ser dióxido de titanio, óxido de cromo o cenizas ácidas insolubles. La digestibilidad se puede expresar mediante un porcentaje de un nutriente en el alimento, o como unidades de masa de nutriente digestible por unidades de masa de nutriente en el alimento.

35 Digestibilidad de nutriente como se usa en la presente memoria engloba digestibilidad de almidón, digestibilidad de grasa, digestibilidad de proteína, y digestibilidad de aminoácidos.

40 La digestibilidad de energía como se usa en la presente memoria significa la energía bruta del alimento consumido menos la energía bruta de las heces o la energía bruta del alimento consumido menos la energía bruta de la digestión que queda en un segmento específico del tracto gastrointestinal del animal, p. ej. el íleon. La energía metabolizable como se usa en la presente memoria se refiere a la energía metabolizable aparente y significa la energía bruta del alimento consumido menos la energía bruta contenida en las heces, orina, y productos gaseosos de la digestión. La energía digestible y energía metabolizable se puede medir como la diferencia entre la ingesta de energía bruta y la energía bruta excretada en las heces o presente en la digestión en un segmento específico del tracto gastrointestinal usando los mismos métodos de medir la digestibilidad de nutrientes, con correcciones apropiadas para excreción de nitrógeno para calcular la energía metabolizable del alimento.

Retención de nitrógeno

50 La retención de nitrógeno como se usa en la presente memoria significa la capacidad de un sujeto para retener nitrógeno de la dieta como masa corporal. Un equilibrio negativo de nitrógeno se da cuando la excreción de nitrógeno excede la ingesta diaria y a menudo se ve cuando el músculo se ha perdido. Un equilibrio de nitrógeno positivo a menudo se asocia con crecimiento muscular, particularmente en animales en crecimiento.

La retención de nitrógeno se puede medir como la diferencia entre la ingesta de nitrógeno y el nitrógeno excretado por medio de la recolección total de excreta y orina durante un periodo de tiempo. Se entiende que la excreta de

nitrógeno incluye proteína sin digerir del alimento, secreciones proteaginosas endógenas, proteína microbiana, y nitrógeno de la orina.

Supervivencia

5 El término supervivencia como se usa en la presente memoria significa el número de sujetos que permanecen vivos. El término “supervivencia mejorada” puede ser otra manera de decir “mortalidad reducida”.

Rendimiento de carcasa y rendimiento de carne

10 El término rendimiento de carcasa como se usa en la presente memoria significa la cantidad de carcasa como una proporción del peso del cuerpo vivo, después de un proceso de matanza comercial o experimental. El término carcasa significa el cuerpo de un animal que se ha sacrificado para alimentación, con eliminación de la cabeza, vísceras, parte de las patas, y plumas o piel. El término rendimiento de carne como se usa en la presente memoria significa la cantidad de carne comestible como una proporción del peso del cuerpo vivo, o la cantidad de un corte de carne específico como una proporción del cuerpo de peso vivo.

Ganancia de peso

15 La presente invención además proporciona un método de incrementar ganancia de peso en un sujeto, p. ej. ave o porcino, que comprende alimentar a dicho sujeto con un producto alimentario que comprende una composición de aditivo alimentario según la presente invención.

Una “ganancia de peso incrementada” se refiere a un animal que tiene incremento del peso corporal al ser alimentado con el alimento que comprende una composición de producto alimentario comparado con un animal que se alimenta con un alimento sin que esté presente dicha composición de aditivo alimentario.

20 Enteritis necrótica

25 Enteritis necrótica es una entero toxemia aguda o crónica vista en pollos, pavos y patos de todo el mundo, causada por *Clostridium perfringens*. Enteritis necrótica a menudo se caracteriza por una enteritis fibrino necrótica, usualmente en el intestino delgado medio. La mortalidad puede ser del 5-50%, normalmente alrededor de 10%. Las infecciones se dan por transmisiones fecales orales. Las esporas del organismo causante son muy resistentes. Los factores de predisposición incluyen coccidiosis/coccidiasis, dieta (rica en proteína), en patos posiblemente cepas fuertes, dietas de alta viscosidad (a menudo asociadas con dietas ricas en inclusiones de cebada y trigo), alimento y/o agua contaminados, otras enfermedades debilitantes.

La presente invención se refiere a incremento de la resistencia del sujeto a enteritis necrótica. En otras palabras, la presente invención se refiere a evitar o reducir el efecto negativo de enteritis necrótica.

30 El término “resistencia a” como se usa en la presente memoria puede englobar el término “tolerancia a”. Por tanto en una realización el sujeto puede no ser resistente a enteritis necrótica pero el sujeto puede ser capaz de tolerar la enteritis necrótica, es decir, sin efectos negativos sobre el rendimiento del sujeto.

35 En una realización la presente invención se refiere a una composición de aditivo alimentario según la presente invención para tratar o prevenir enteritis necrótica en un sujeto. Típicamente el sujeto será uno que se ha desafiado o se va a desafiar a *Clostridium perfringens* y/o especies de *Eimeria*. Tal desafío puede venir del medio ambiente o la aplicación de microorganismos vivos en el alimento o agua de beber, p. ej., cuando se usan vacunas vivas de coccidia.

Se describe una composición de aditivo alimentario para prevenir y/o tratar coccidiosis en un sujeto.

40 Se describe un método para prevenir y/o tratar enteritis necrótica y/o coccidiosis en la que se administra a un sujeto una cantidad eficaz de composición de aditivo alimentario según la presente invención.

Respuesta inmune

45 Respuesta inmune como se usa en la presente memoria significa una de las múltiples maneras en las que DFM modula el sistema inmune de los animales, incluyendo incremento de la producción de anticuerpos, regulación creciente de inmunidad mediada por células, regulación creciente de citoquinas proinflamatorias, y señal de receptores tipo Toll aumentada. Se entiende que la inmunoestimulación del tracto gastrointestinal por DFM puede ser ventajoso para proteger al huésped frente a enfermedades, y que la inmunosupresión del tracto gastrointestinal puede ser ventajoso para el huésped porque se usan menos nutrientes y energía para realizar la función inmune.

Preferentemente la respuesta inmune es una respuesta inmune celular.

Preferentemente la respuesta inmune se mide mirando los marcadores inmunes.

50

Bacteria patógena

El término bacteria patógena como se usa en la presente memoria significa por ejemplo especies de clostridia toxigénica, p. ej., *Clostridium perfringens* y/o *E. coli* y/o *Salmonella* spp y/o *Campylobacter* spp. En una realización la bacteria patógena puede ser especies de *E. coli* Avian patógena.

- 5 La presente invención puede reducir poblaciones de bacteria patógena en el tracto gastrointestinal de un sujeto.

Excreción de nutrientes

En una realización la presente invención se refiere a reducir la excreción de nutrientes en el estiércol. Esto tiene efectos positivos en reducción de daños medioambientales. Por ejemplo, en una realización preferente la presente invención se refiere al contenido de nitrógeno reducido y/o fósforo en el estiércol del sujeto. Así, por tanto, se reduce la cantidad de nitrógeno y/o fósforo en el ambiente, que puede ser beneficioso.

10

Probiótico

Para algunas aplicaciones, se cree que DFM en la composición de la presente invención puede ejercer un efecto de cultivo probiótico. También está en el ámbito de la presente invención añadir a la composición de la presente invención más probióticos y/o prebióticos.

- 15 Aquí, un prebiótico es:

*“un ingrediente alimentario no digestible que afecta beneficiosamente al huésped por estimulación selectiva del crecimiento y/o la actividad de una o un número limitado de bacterias beneficiosas”.*

El término “cultivo probiótico” como se usa en la presente memoria define organismos vivos (que incluyen bacterias o levaduras por ejemplo) que, cuando por ejemplo se ingiere o se aplica localmente en número suficiente, afecta beneficiosamente al organismo huésped, es decir, le confiere uno o más beneficios de salud demostrables sobre el organismo huésped. Los probióticos pueden mejorar el equilibrio microbiano en una o más superficies mucosas. Por ejemplo, la superficie mucosa puede ser el intestino, el tracto urinario, el tracto respiratorio o la piel. El término “probiótico” como se usa en la presente memoria también engloba microorganismos vivos que pueden estimular las ramas beneficiosas del sistema inmune y al mismo tiempo disminuye las reacciones inflamatorias en una superficie mucosa, por ejemplo la tripa.

20

25

Mientras que no hay límites inferiores o superiores para la ingesta de probióticos, se ha sugerido que al menos  $10^6$ - $10^{12}$ , preferentemente al menos  $10^6$ - $10^{10}$ , preferentemente  $10^8$ - $10^9$  UFC como dosis diaria será eficaz para lograr los efectos beneficiosos para la salud del sujeto.

Aislado

En un aspecto, adecuadamente la enzima o DFM usada en la presente invención puede estar en una forma aislada. El término “aislado” significa que la enzima o DFM está al menos significativamente libre de al menos uno u otro componente con el que la enzima o DFM se asocia naturalmente en la naturaleza y según se encuentra en la naturaleza. La enzima o DFM de la presente invención se puede proporcionar en una forma que está significativamente libre de uno o más contaminantes con los que la sustancia se puede asociar. Así, por ejemplo, puede estar significativamente libre de uno o más polipéptidos y/o moléculas de ácido nucleico potencialmente contaminantes.

35

Purificado

En un aspecto, preferentemente la enzima y/o DFM según la presente invención está en una forma purificada. El término “purificado” significa que la enzima y/o DFM está presente en un nivel alto. La enzima y/o DFM deseablemente es el componente predominante en la presente composición. Preferentemente, está presente en un nivel de al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95% o al menos aproximadamente 98%, estando determinado dicho nivel en base a peso seco/peso seco con respecto a la composición total considerada.

40

**Ejemplos**

Ejemplo 1

- 45 Materiales y métodos

Se compraron tres mil seiscientos pollitos macho Cobb de un día de edad de un criadero comercial. Al comienzo del estudio, se colocan cincuenta machos en cada corral de tratamiento en bloques. El estudio consiste en los siguientes tratamientos (tabla 1):

Tabla 1. Diseño experimental del ejemplo 1

Tratamiento	Desafiado a <i>Clostridium perfringens</i>	Fitasa <sup>1</sup>	Enzima adicional <sup>2</sup>	DFM <sup>3</sup>
1	No	500 FTU/kg	Ninguna	Ninguno
2	Si	500 FTU/kg	Ninguna	Ninguno
3	Si	500 FTU/kg	Proteasa (5.000 u/kg)	Ninguno
4	Si	500 FTU/kg	Ninguna	Enviva Pro (7,5 x 10 <sup>4</sup> CFU/g)
5	Si	500 FTU/kg	Proteasa (5.000 u/kg)	Enviva Pro (7,5 x 10 <sup>4</sup> CFU/g)

<sup>1</sup> Fitasa de *E. coli*.  
<sup>2</sup> Proteasa de *Bacillus subtilis*.  
<sup>3</sup> Enviva Pro® es combinación de cepas Bs2084, LSSAO1 y 15AP4 de *Bacillus subtilis* proporcionado por Danisco A/S.

5

Se toman los pesos de las aves por corral al inicio del estudio, día 23, día 35, y al final (día 42). El corral es la unidad de medida. Las raciones de los broiler se dan como migas (inicio) o pelets (crecimiento y finalización). Las raciones cumplen o exceden los estándares NRC (tabla 2). La mezcladora se descarga para evitar contaminación cruzada de las raciones. Todos los alimentos de los tratamientos se mezclan usando mezcladora Davis S-20 y se forman pelets usando California Pellet Mill (temperatura fría de pelet 65-70 C). Las muestras se recogen de cada ración de tratamiento desde el comienzo, mitad, y fin de cada lote y se combinan para confirmar actividad de enzimas y presencia de Enviva Pro en el alimento.

Tabla 2. Composición de la ración experimental del ejemplo 1.

Ingrediente (%)	Inicio	Crecimiento	Finalización
Maíz	53,62	57,87	59,82
Maíz DDGS	10,00	10,00	10,00
Harina de soja 49% CP	26,93	23,97	21,36
Ampro 55	5,00	5,00	5,00
Aceite de soja	2,07	0,91	1,74
Lisina	0,24	0,24	0,24
DL-metionina	0,21	0,19	0,18
L-treonina	0,01	0,01	0,01
Sal	0,30	0,34	0,35
Piedra caliza	1,04	1,07	0,94
Fosfato dicálcico	0,26	0,11	0,02
Premezcla de vitaminas y trazas de minerales	0,33	0,33	0,33
Composición de nutrientes calculada (%)			
CP	22,60	21,50	20,39
Energía, kcal/kg	3.060	3.025	3.100
Lisina digestible	1,36	1,26	1,21
Metionina digestible	0,58	0,61	0,53
Treonina digestible	0,83	0,83	0,80

10 Las aves reciben alimento *ad-libitum* adecuado al tratamiento desde el día 0 al 42. Enzimas y Enviva Pro se suministran por Danisco en las mezclas y niveles adecuados para todos los tratamientos experimentales. Todas las raciones contenían 500 FTU de fitasa *E. coli* en la base. Los corrales se colocan en las instalaciones para no tener

5 contacto directo para evitar contaminación. En el día 21 ocurrió un cambio desde el inicio al crecimiento. La ración de crecimiento se sustituye por la ración de terminación en día 35. En cada cambio de ración, los comederos se quitan de los corrales en bloque, se pesan, se vacían, y se rellenan con la ración de tratamiento adecuada. El último día del estudio se pesa el alimento. En los corrales se comprueban diariamente la mortalidad. Cuando un ave se sacrifica o se encuentra muerto, se anota el día y el peso (kg) al eliminarlo. Se lleva a cabo una necropsia macroscópica sobre todas las aves muertas o sacrificadas para determinar el sexo y causa probable de muerte. Se anotan signos de enteritis necrótica.

Todos los corrales tienen aproximadamente 10,16 cm (4 pulgadas) de basura acumulada con una cubierta de viruta fresca de pino.

10 Todas las aves se vacunan por pulverizado antes de colocarlas en los corrales con una vacuna de coccidiosis comercial (Coccivac-B). Los días 18, 19 y 20 todas las aves, excepto las del tratamiento 1, se dosifican con un caldo de cultivo de *C. perfringens*. Un campo aislado de *C. perfringens* que se sabe que causa NE y que se origina de una operación de broiler comercial se utiliza como el organismo objetivo. Cada día se usan inóculos frescos. Los niveles de titulación son aproximadamente  $1,0 \times 10^{8-9}$ . Cada corral recibe la misma cantidad de inóculo. El inóculo se administra mezclándolo con el alimento que se encuentra en la base del comedero de tubo. El día 21, se seleccionan cinco aves de cada corral, se sacrifican, se pesan en grupo, se examina el grado de presencia de lesiones de enteritis necrótica. La puntuación se basa en una puntuación de 0 a 3, siendo 0 normal y siendo 3 el más agudo (0 = nada, 1 = medio, 2 = moderado, 3 = marcado/agudo; Hofacre et al., 2003 J. Appl. Poult. Res. 12: 60-64). No se usa terapia con medicamentos concomitante durante el estudio.

20 Las medias se separan usando prueba t emparejado. Se consideraron diferencias significativas a  $P < 0,05$ . Los corrales se usaron como la unidad experimental.

#### Resultados

La figura 1 muestra puntos de lesión de enteritis necrótica en pollos broiler en un modelo objetivo de enteritis necrótica, en base a un sistema de puntuación de 0 a 3. EEM combinado = 0,15.

25 Como se esperaba, el tratamiento control objetivo incrementó lo puntos de lesión comparado con el tratamiento control no objetivo. La adición de DFMs con una combinación de una proteasa y fitasa redujo puntos de lesión comparado con todos los otros tratamientos.

La figura 2 muestra el porcentaje de la mortalidad relacionado con lesiones de enteritis necrótica (EN) de 20 a 42 días de edad.

30 El tratamiento control objetivo aumentó de la mortalidad relacionada con EN en comparación con el tratamiento de control no objetivo. La adición de DFMs redujo la mortalidad por EN en comparación con el control objetivo, con y sin proteasa + fitasa.

La figura 3 muestra la ganancia de peso corporal de pollos broiler de 0 a 23 d en un modelo objetivo de enteritis necrótica. EEM combinado = 28,6.

35 La figura 3 muestra que una combinación del DFM (Enviva Pro®) con una combinación de una proteasa y una fitasa mejora significativamente la ganancia de peso corporal (ganancia PC) en pollos broiler desafiado a *Clostridium perfringens* comparado con el control objetivo. Los datos muestran que el DFM en combinación con la proteasa y fitasa sorprendentemente mejoraron ganancia de PC al nivel del control no objetivo + fitasa.

40 La figura 4 muestra la ganancia de peso corporal de pollos broiler de 0 a 12 días en desafío a un modelo de enteritis necrótica. EEM combinado = 4,86.

La Figura 5 muestra la relación de conversión del alimento de pollos broiler de 0-12 d en desafío a un modelo de enteritis necrótica. EEM combinado = 0,026.

45 La combinación de Enviva Pro (DFM) con una proteasa y fitasa mejoró significativamente (redujo) ICA (g ganancia de peso/g consumo de alimento) de pollos broiler de 0 a 12 d en comparación con el control objetivo, y las enzimas por sí mismos y los otros tratamientos.

La Figura 6 muestra el índice de conversión del alimento de pollos broiler (0-23 d) en desafío a un modelo de enteritis necrótica. EEM combinado = 0,022.

50 La combinación de Enviva Pro (DFM) con una proteasa y fitasa mejoró significativamente (redujo) ICA (g ganancia de peso/g consumo de alimento) de pollos broiler 0 a 23 días en comparación con el control objetivo, y las enzimas por sí mismos y los otros tratamientos.

## Ejemplo 2

## Materiales y métodos

5 Se llevó a cabo un ensayo de digestibilidad con pollos broiler para determinar los efectos de la proteasa y tratamientos DFMs además de fitasa sobre utilización de nutrientes. Las jaulas se metieron en habitaciones con ambiente controlado. Las aves recibieron 20 horas de iluminación fluorescente y, se les permitió acceso libre a las raciones y agua. En el día 1, se vacunó de coccidiosis vivo de broiler a todos los pollos oralmente. El estudio consistía en los siguientes tratamientos (tabla 3).

Tabla 3. Diseño experimental del ejemplo 2.

Tratamiento	Fitasa <sup>1</sup>	Protesa	DFM <sup>2</sup>
1	500 FTU/kg	Ninguna	Ninguno
2	500 FTU/kg	Proteasa 1 <sup>3</sup> (5.000 u/kg)	Ninguno
3	500 FTU/kg	Proteasa 1 <sup>3</sup> (5.000 u/kg)	Ninguno
4	500 FTU/kg	Proteasa 2 <sup>4</sup> (15.000 u/kg)	Ninguno
5	500 FTU/kg	Ninguna	Enviva Pro (1,5 x 10 <sup>5</sup> CFU/g)
6	500 FTU/kg	Proteasa 1 <sup>3</sup> (5.000 u/kg)	Enviva Pro (1,5 x 10 <sup>5</sup> CFU/g)
7	500 FTU/kg	Proteasa 1 <sup>3</sup> (5.000 u/kg)	Enviva Pro (1,5 x 10 <sup>5</sup> CFU/g)
8	500 FTU/kg	Proteasa 2 <sup>4</sup> (15.000 u/kg)	Enviva Pro (1,5 x 10 <sup>5</sup> CFU/g)

<sup>1</sup> Fitasa de *E. coli* proporcionado por Danisco A/S.  
<sup>2</sup> Enviva Pro® es combinación de cepas Bs2084, LSSAO1 y 15AP4 de *Bacillus subtilis* proporcionado por Danisco A/S.  
<sup>3</sup> Proteasa de *Bacillus subtilis* proporcionado por Danisco A/S.  
<sup>4</sup> Proteasa de *Bacillus licheniformis*.

10 Un total de 512 aves se pesaron individualmente y se asignaron en base al peso corporal a 64 jaulas (8 aves/jaula). Las 8 raciones de tratamiento se asignaron al azar a 8 jaulas cada una. Las aves recibieron alimento de iniciación ad-libitum adecuada al tratamiento del día 0 al 21. Enzimas y Enviva Pro se proporcionaron por Danisco en las mezclas y niveles adecuados para todos los tratamientos experimentales. Todas las raciones contenían 500 FTU de fitasa de *E. coli* en el fondo. Los corrales se colocan en las instalaciones para no tener contacto directo para evitar contaminación. Las aves se alimentaron con raciones de inicio (tabla 4) en forma de masa a lo largo del experimento.

15

Tabla 4. Composición de la ración experimental del ejemplo 2.

Ingrediente (%)	Inicio
Maíz	50,11
Maíz DDGS	10,00
Harina de soja 48% CP	28,83
Harina de colza	5,00
Combinado de grasa an/veg	2,16
L-lisina. HCl	0,33
DL-metionina	0,28
L-treonina	0,12
Marcador interno (TiO <sub>2</sub> )	0,30
Sal	0,33
Piedra caliza	1,09
Fosfato de dicalcio	1,15
Vitaminas y micro minerales de ave	0,30

Ingrediente (%)	Inicio
Composición de nutriente calculada (%)	
CP	23,00
EM, kcal/kg	2.950
Calcio	0,85
Fósforo disponible	0,38
Sodio	0,18
Lisina digestible	1,21
Metionina digestible	0,62
TSAA digestible	0,86
Treonina digestible	0,76

En el día 21, se sacrificaron 8 pájaros por dislocación cervical y el contenido del íleon inferior se expresó descargando suavemente con agua destilada. La digesta de las aves en una jaula se acumuló dando como resultado 8 muestras por ración de tratamiento. Las muestras de digesta se congelaron inmediatamente después de recoger, se liofilizaron y procesaron. Las muestras de digesta y dietas se analizaron para Ti, DM, GE, almidón, grasa, N, aminoácidos, excluyendo triptófano, y polisacáridos no almidonados solubles e insolubles (NSPs) según procedimientos estándar. El cálculo de los coeficientes de digestibilidad del íleon se llevó a cabo según indica Ravindran et al. (2005), basado en la concentración de Ti indigestible.

Las muestras representativas de excretas por jaula se recogen durante cuatro días consecutivos (desde el día 17 a 20) para la determinación de la energía metabolizable aparente de corregida en nitrógeno (EMAn) y la retención de nitrógeno, basado en la concentración de Ti en las muestras de alimento y excrementos. Se agruparon recolecciones de excretas diarios dentro de una jaula, mezclado en un mezclador y se volvió a tomar muestra. Cada sub muestra se liofilizó, se molió a través de un tamiz de 0,5 mm y se almacena en contenedores de plástico hermético a -4°C pendiente de análisis. Las muestras procesadas se analizan para Ti, DM, GE, N, y NSPs soluble e insoluble como por procedimientos estándar.

Las medias se separan usando prueba t emparejado. Se consideraron diferencias significativas a  $P < 0,05$ . Los corrales se usaron como la unidad experimental.

#### Resultados

Los resultados preliminares muestran que la combinación de proteasa, fitasa y DFMs exhibe una mayor digestibilidad en el íleon de la energía, N, aminoácidos, almidón, grasa, y/o NSP soluble e insoluble en comparación con el tratamiento control negativo + fitasa y proteasa + fitasa y/o DFMs + fitasa. La combinación de proteasa y DFMs además de fitasa exhibe una mayor AME, retención de nitrógeno, y desaparición del tracto total de NSP soluble e insoluble en comparación con el tratamiento de control negativo + fitasa y proteasa + fitasa y/o DFMs + fitasa. La respuesta a la dosis de proteasa para estos parámetros exhibe una mayor pendiente en los tratamientos que contienen DFMs en comparación con tratamientos sin DFMs.

#### Ejemplo 3

Se llevó a cabo un ensayo de digestibilidad con pollos broiler para determinar los efectos de fitasa + proteasa y tratamientos DFMs sobre utilización de nutrientes. Las jaulas se metieron en habitaciones con ambiente controlado. Las aves recibieron 20 horas de iluminación fluorescente y, se les permitió acceso libre a las raciones y agua. En el día 1, se vacunó de coccidiosis vivo de broiler a todos los pollos oralmente. El estudio consistía en los siguientes tratamientos (tabla 5).

Tabla 5. Diseño experimental del ejemplo 3.

Tratamiento	Fitasa <sup>1</sup>	Protesa <sup>2</sup>	DFM
1	Ninguna	Ninguna	
2	500 FTU/kg	5.000 u/kg	
3	Ninguna	Ninguna	Enviva Pro <sup>3</sup> (1,5 x 10 <sup>5</sup> CFU/g)
4	500 FTU/kg	5.000 u/kg	Enviva Pro <sup>3</sup> (1,5 x 10 <sup>5</sup> CFU/g)
5	Ninguna	Ninguna	Calsporin <sup>4</sup> (5,0 x 10 <sup>6</sup> CFU/g)

Tratamiento	Fitasa <sup>1</sup>	Protesa <sup>2</sup>	DFM
6	500 FTU/kg	5.000 u/kg	Calsporin <sup>4</sup> (5,0 x 10 <sup>6</sup> CFU/g)
7	Ninguna	Ninguna	Gallipro Tect <sup>5</sup> (8,0 x 10 <sup>5</sup> CFU/g)
8	500 FTU/kg	5.000 u/kg	Gallipro Tect <sup>5</sup> (8,0 x 10 <sup>5</sup> CFU/g)

<sup>1</sup> Fitasa de *E. coli*.  
<sup>2</sup> Proteasa de *Bacillus subtilis* proporcionado por Danisco A/S.  
<sup>3</sup> Enviva Pro® es combinación de cepas Bs2084, LSSAO1 y 15AP4 de *Bacillus subtilis* proporcionado por Danisco A/S.  
<sup>4</sup> Calsporin es un producto DFM que contiene cepa C3102 de *Bacillus subtilis*.  
<sup>5</sup> Gallipro Tect es un producto DFM que contiene *Bacillus licheniformis* DSM17236.

5 Un total de 384 aves se pesaron individualmente y se asignaron en base al peso corporal a 64 jaulas (6 aves/jaula). Las 8 raciones de tratamiento se asignaron al azar a 8 jaulas cada una. Las aves recibieron alimento de iniciación ad-libitum adecuada al tratamiento del día 0 al 21. Enzimas y Enviva Pro se proporcionaron por Danisco en las mezclas y niveles adecuados para todos los tratamientos experimentales. Los corrales se colocan en las instalaciones para no tener contacto directo para evitar contaminación. Las aves se alimentaron con raciones de inicio (tabla 6) en forma de masa a lo largo del experimento.

Tabla 6. Composición de la ración experimental del ejemplo 3.

Ingrediente (%)	Inicio
Maíz	50,11
Maíz DDGS	10,00
Harina de soja 48% CP	28,83
Harina de colza	5,00
Combinado de grasa an/veg	2,16
L-lisina. HCl	0,33
DL-metionina	0,28
L-treonina	0,12
Marcador interno (TiO <sub>2</sub> )	0,30
Sal	0,33
Piedra caliza	1,09
Fosfato de dicalcio	1,15
Vitaminas y micro minerales de ave	0,30
Composición de nutriente calculada (%)	
CP	23,00
EM, kcal/kg	2.950
Calcio	0,85
Fósforo disponible	0,38
Sodio	0,18
Lisina digestible	1,21
Metionina digestible	0,62
TSAA digestible	0,86
Treonina digestible	0,76

10 En el día 21, se sacrificaron 6 pájaros por asfixia con CO<sub>2</sub> y el contenido del íleon inferior se expresó descargando suavemente con agua destilada. La digesta de las aves en una jaula se acumuló dando como resultado 8 muestras por ración de tratamiento. Las muestras de digesta se congelaron inmediatamente después de recoger, se

lío filizaron y procesaron. Las muestras de digesta y dietas se analizaron para Ti, DM, GE, almidón, grasa, N, aminoácidos, excluyendo triptófano, y polisacáridos no almidonados solubles e insolubles (NSPs) según procedimientos estándar. El cálculo de los coeficientes de digestibilidad del íleon se llevó a cabo según indica Ravindran et al. (2005), basado en la concentración de Ti indigestible.

- 5 La ingesta de alimento y excretas total se miden cuantitativamente por caja a lo largo de cuatro días consecutivos (desde el día 17 a 20) para la determinación de la energía metabolizable aparente de corregida en nitrógeno (EMAn) y la retención de nitrógeno. Se agruparon recolecciones de excretas diarios dentro de una jaula, mezclado en un mezclador y se volvió a tomar muestra. Cada sub muestra se liofilizó, se molió a través de un tamiz de 0,5 mm y se almacena en contenedores de plástico hermético a -4°C pendiente de análisis. Las muestras procesadas se analizan para Ti, DM, GE, N, y NSPs soluble e insoluble como por procedimientos estándar.

Las medias se separan usando prueba t emparejado. Se consideraron diferencias significativas a  $P < 0,05$ . Los corrales se usaron como la unidad experimental.

#### Resultados

- 15 Los resultados preliminares indican que la combinación de proteasa + fitasa y cada uno de los DFMs ensayados exhibe una mayor digestibilidad en el íleon de la energía, N, almidón, grasa, y/o NSP soluble e insoluble en comparación con el tratamiento control negativo y proteasa + fitasa y/o cada uno de DFMs por sí mismo. La combinación de proteasa + fitasa y cada uno de DFMs ensayado exhibe una mayor AME, retención de nitrógeno, y desaparición del tracto total de NSP soluble e insoluble en comparación con el tratamiento de control negativo y proteasa + fitasa y/o cada uno de DFMs por sí mismo.

#### 20 Ejemplo 4

##### Materiales y métodos

- 25 Se tomaron muestras de tejido de pollitos broiler del ensayo presentado en el ejemplo 1 a 23 días de edad. Las especificaciones del tratamiento se presentan en la tabla 1. Se quitaron el yeyuno, páncreas e hígado de 2 aves de cada corral y la mucosa junta resultó en ocho muestras por tratamiento. Las muestras se enjuagaron en disolución tampón (PBS) sumergido en un reactivo de almacenar tejidos (último ARN) según el protocolo del fabricante y se almacenó a -80°C. Se aisló el ARN total de cada muestra de tejido usando un método de extracción de única etapa de extracción en fenol-cloroformo según escribe Chomczynski y Saachi (1987; Anal. Biochem. 162: 156-9). Se determinó la concentración de ARN midiendo la absorbancia a 260 nm (Nanodrop) y se monitorizó la integridad mediante electroforesis en gel sobre 1,2% geles de agarosa. Solo era considerado para usar ARN de pureza suficiente y que tenga un radio de absorción a 260 nm vs 280 nm mayor de 1,87.

- 35 Se fabricaron micromatrices usando 70 pares de bases de oligonucleótidos (Opereon Biotechnologies Inc) según el protocolo descrito por Druyan et al. (2008; Poult. Sci. 87:2418-29). El diseño experimental de la matriz era un círculo completo entretelado según describe Garosi et al. (2005; Br. J. Nutr. 93: 425-32) que cada muestra se compara directamente con las otras en una manera de emparejado múltiple permitiendo comparar todos los tratamientos. Las muestras se etiquetaron según el método descrito por Druyan et al. (2008; Poult. Sci. 87:2418-29) en el que la mitad de las muestras se deberían etiquetar con Cy3 y la mitad con Cy5 que son tintes fluorescentes de cianina. Se llevó a cabo hibridación usando el kit de hibridación de micromatrices Pronto Plus! antes de la adición de sondas de ADN etiquetadas con Cy3 y Cy5 y cubiertas con un cobertor de vidrio limpio (Lifterslip) y dejado hibridar durante 16 horas. Después las micromatrices se escanearon sobre un escáner de micromatrices Scan Array GX. PLUS ajustado a un poder de láser de 65% para adquirir imágenes.

El ARN total de las muestras individuales se hizo transcripción inversa para producir ADNc que después se usó como muestra para amplificaciones PCRq según describe Druyan et al (2008; Poult. Sci. 87: 2418-29). Se optimizaron los parámetros de termociclado para cada gen y cada gen se amplificó independientemente por duplicado en una vez en un único instrumento.

- 45 Se generaron archivos de datos de las imágenes escaneadas de las micromatrices pero extrayendo la intensidad de datos iniciales para cada placa y combinación de tintes usando software ScanAlyze. Después se analizó la intensidad de los archivos usando JMP Genomics incluyendo transformación  $\log_2$  inicial. Se llevó a cabo normalización de datos usando regresión con pesado local y suavizado primero en la matriz y a lo largo de todas las matrices. Las intensidades  $\log_2$  normalizadas que resultan se analizaron usando un modelo mezclado ANOVA.

- 50 Se compararon intensidades medias usando un umbral de significancia en base a la corrección de Bongerroni de  $P = 0,05$  (Hochberg 1998). Para la matriz completa, incluyendo todos los replicados, se calculó una media por intensidad de cuadrícula para cada gen usando las tres sondas una al lado de otra, dando como resultado un total de cuatro medias replicadas, una por cada cuadrícula, por gen. Los datos para la media Ct de las muestras duplicadas (muestra de gen Ct: muestra GAPDH Ct) dependiendo del tratamiento se sometieron a ANOVA de una vía.

55

Resultados

5 Se tomaron los datos de expresión usando la plataforma de micromatriz y un “mapa de calor” producido para visualizar los datos del yeyuno (figura 7) y páncreas (figura 8) en el día 23 de edad. Los niveles de expresión relativa de seis genes de interés se convirtieron en señales visuales en base a la escala vista en la figura 7. Los genes débilmente expresados se marcan con un signo menos (“-“), y los genes fuertemente expresados se marcan con un signo más (“+”); mientras que una intensidad de cuadrícula más grande representa una diferencia mayor del nivel de expresión media de los tratamientos. Los genes que se midieron y sus funciones pretendidas se ven en la tabla 7. Se usó PCR a tiempo real para validar la expresión del gen mostrada en el mapa de calor para sacarosa-isomaltasa (SI) y ácido graso sintasa (FASN) y estaban muy correlacionados con los datos de la matriz.

10 Tabla 7. Función pretendida de genes medidos.

Gen	Identidad	Función
ACACA	Acetil-Co A carboxilasa A	Biosíntesis de ácidos grasos
GCK	Glucoquinasa	Etapa inicial de metabolismo de glucosa
SI	Sacarosa isomaltasa	Metabolismo de glucosa
PEPT1	Oligo-péptido transportador 1	Transporte de oligo péptido
ZO1	Proteína 1 unión estrecha	Formación de unión estrecha, integridad intestinal
CD3d	Antígeno CD3 célula T	Marcador célula T
FASN	Ácido graso sintasa	Biosíntesis de ácidos grasos

La figura 7 muestra un mapa de calor de perfiles de expresión de genes de interés para todos los tratamientos para yeyuno a los 23 días de edad.

La figura 8 muestra un mapa de calor de perfil de expresión de genes de interés para todos los tratamientos para hígado a los 23 días de edad.

15 En las figuras 7 y 8 la clave es la siguiente:

Control no objetivo = control no objetivo + fitasa

CO = control objetivo + fitasa

CO + proteasa = control objetivo + fitasa + amilasa

CO + EP = control objetivo + fitasa + Envivo Pro

20 CO + EP + Proteasa = control objetivo + fitasa + proteasa + Envivo Pro

La expresión de acetil CoA carboxilasa A (ACACA) disminuyó en el control objetivo pero la combinación de proteasa + fitasa y Enviva Pro la incrementó a un nivel comparable con el tratamiento de control no objetivo. Enviva Pro solo con fitasa o una proteasa + fitasa sin Enviva Pro no tenían un efecto reseñable como la combinación. ACACA está implicada en la producción de ácidos grasos a partir de acetil CoA y se usa como un marcador de lipogénesis.

25 La expresión de glucoquinasa (GCK) disminuyó mediante el control objetivo pero la combinación de proteasa + fitasa con Enviva Pro produjo un aumento similar al control no objetivo. El grado de aumento fue mayor que cuando se usó proteasa + fitasa sin DFM. Se vio un diseño similar con sacarosa isomaltasa (SI) donde la combinación de Enviva Pro con proteasa + fitasa incrementó la expresión comparado con ambos controles el objetivo y el no objetivo. GCK es una enzima clave en el metabolismo de glucosa y SI es responsable de la hidrólisis de sacarosa e isomaltosa, y por tanto juega un papel importante en la digestión y absorción de hidratos de carbono en animales.

30 La expresión del transportador 1 de oligopéptido (PEPT1) incrementó por proteasa + fitasa solas y cuando estaba en combinación con Enviva Pro. PEPT1 es parte de un sistema de transporte de péptido y es responsable de la ingesta de un amplio intervalo de di- y tripéptidos.

35 La proteína 1 de unión estrecha (ZO1) era la más fuertemente expresada en el control objetivo. Se vio una reducción con proteasa + fitasa pero se vio una mayor disminución en la expresión con proteasa + fitasa en combinación con Enviva Pro que produjo un nivel similar de reducción que el control no objetivo. ZO1 es una proteína que está sobre el lado citoplásmico de las uniones estrechas, hay varias funciones para esta proteína que van desde transducción de señal para ensamblaje de uniones estrechas hasta estabilidad de las propias uniones estrechas.

El antígeno CD3 célula T (CD3D) se expresó fuertemente en el control objetivo. El tratamiento de proteasa + fitasa tuvo algún efecto en reducir la expresión de este gen, pero se vio un efecto mayor cuando proteasa + fitasa se usó en combinación con Enviva Pro. Se vieron los mismos resultados en el yeyuno e hígado para CD3D que fortaleció los resultados. CD3D es una molécula de superficie encontrada en células T y juega un papel importante en la transducción de señal durante la unión al receptor célula T y es parte del complejo célula T/CD3.

La ácido graso sintasa (FASN) se redujo en el control objetivo, donde proteasa + fitasa, y Enviva Pro aumentaron este gen. La combinación en Enviva Pro y proteasa + fitasa lo aumentaron incluso más. FASN es una enzima clave para la síntesis de ácidos grasos y está implicada en catalizar la producción de ácidos grasos saturados de cadena larga.

#### Discusión

El incremento en la expresión acetil CoA carboxilasa debido a la adición de Enviva Pro y proteasa + fitasa en comparación con el control objetivo sugiere que incrementó la lipogénesis. Esto ocurriría si la disponibilidad y digestión de hidratos de carbono es más alta lo que significa que hay energía incrementada que se dirige al transporte y almacenamiento de grasa. El incremento en la expresión de glucoquinasa y sacarosa isomerasa con la combinación de proteasa + fitasa, y Enviva Pro sugiere que había absorción de glucosa incrementada, y disponibilidad incrementada de sacarosa e isomaltosa en el borde en cepillo, que indica una interacción positiva entre la enzima y DFMs para incrementar la absorción de hidratos de carbono en el intestino delgado y por tanto incrementa la disponibilidad de energía de la ración. Además, la disminución de la expresión de glucoquinasa para el control objetivo sugiere que el *Clostridium perfringens* objetivo causa daño a la mucosa y que la adición de Enviva Pro y proteasa + fitasa han actuado para remediarlo. El aumento en la expresión del transportador de péptido transportador oligopéptido 1 (PEPT1) cuando proteasa + fitasa sola y en combinación con Enviva Pro sugiere una mayor disponibilidad de péptidos y por tanto un aumento de las necesidades de transporte, lo que indica un efecto de las enzimas y DFMs para aumentar la disponibilidad de los péptidos para el animal que permite mayor crecimiento.

El aumento de la expresión de ácido graso sintasa (FASN) en el hígado y el aumento de la acetil CoA carboxilasa A en el yeyuno sugieren el aumento de la síntesis de ácidos grasos debido a la mayor disponibilidad de hidratos de carbono. Enzimas y Enviva Pro actúan juntas para producir más energía disponible para el animal lo que dio lugar a un mayor crecimiento.

El efecto de Enviva Pro de reducir la expresión de proteína 1 unión estrecha indica requerimiento menor de recambio proteico en el intestino, que puede estar relacionado con alta integridad intestinal. La expresión incrementada en el control objetivo, sin embargo, sugiere que el recambio/requerimiento de la proteína era alta debido al fallo de la integridad intestinal debido posiblemente a infecciones de coccidia y *Clostridium perfringens*. El efecto de una combinación de proteasa + fitasa (sin Enviva Pro) o el efecto de Enviva Pro con fitasa sola en disminuir la regulación de ZO1 no es tan evidente como la combinación de proteasa + fitasa + Enviva Pro. Esto indica que Enviva Pro y proteasa + fitasa en combinación actúan para aumentar la integridad intestinal y por lo tanto benefician la salud intestinal del animal. El aumento de la integridad intestinal, y por tanto la capacidad de absorción, puede ser uno de los mecanismos mediante el que se incrementa la eficacia de las enzimas exógenas cuando está presente un DFM.

La expresión incrementada de antígeno CD3 d célula T en el control objetivo indica incremento de la respuesta inmune mediada por células debido al objetivo. En estas condiciones, las aves sufrirán rendimiento por debajo del óptimo porque la respuesta inmune demandará energía que se podría usar para el crecimiento, y porque algunas aves experimentarán una respuesta de enfermedad sistémica. La expresión incrementada de este marcador inmunológico es marcadamente reversible cuando se usa Enviva Pro con fitasa sólo o en combinación con proteasa + fitasa. La disminución de la respuesta inmune en el intestino puede ser uno de los mecanismos mediante el que se incrementa la eficacia de las enzimas exógenas en la absorción de nutrientes y el rendimiento cuando está presente un DFM.

El efecto neto de una disminución de la respuesta inmune e integridad intestinal más alta, y una mejor digestión de nutrientes y absorción con la combinación de enzimas y DFMs, determina claramente rendimiento de producción mejorada de pollos broiler.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición de aditivo alimentario que comprende un microorganismo de alimentación directa (DFM) en combinación con una subtilisina y una 6-fitasa, en el que el microorganismo de alimentación directa es un microorganismo de alimentación directa antipatógeno, en el que el microorganismo de alimentación directa es un antipatógeno cuando produce una densidad óptica reducida (DO) comparado con un control en el siguiente ensayo DFM:
- 5 i) se siembran tubos con un agente patógeno representativo de un grupo representativo;
- ii) se agrega sobrenadante de un DFM potencial cultivado aeróbicamente o anaeróbicamente a los tubos sembrados y se incuba; y
- 10 iii) después de la incubación, se mide la DO de los tubos tratados con control y sobrenadante para cada patógeno, además en el que el DFM está presente en una dosis entre  $3,75 \times 10^7$  UFC/g de composición de aditivo alimentario y  $1 \times 10^{11}$  UFC/g de composición de aditivo alimentario, la subtilisina está presente en una dosis entre 1.000 UP/g de composición de aditivo alimentario y 60.000 UP/g de composición de aditivo alimentario, y la 6-fitasa está presente en una dosis entre 200 FTU/g de composición de aditivo alimentario y 40.000 FTU/g de composición de aditivo alimentario, y
- 15 en el que DFM comprende una bacteria de una o más de las siguientes especies: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y sus combinaciones.
2. Una composición de aditivo alimentario según la reivindicación 1, en el que el microorganismo de alimentación directa es una bacteria viable.
- 20 3. Una composición de aditivo alimentario según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el microorganismo de alimentación directa es uno o más de las siguientes cepas: *Bacillus subtilis* cepas 3A-P4 (PTA-6506); 15A-P4 (PTA-6507); 22C-P1 (PTA-6508); 2084 (NRRL B-500130); LSSA01 (NRRL-B-50104); BS27 (NRRL B-50105); BS 18 (NRRL B-50633); y BS 278 (NRRL B-50634).
4. Una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el microorganismo de alimentación directa está en la forma de una endospora.
- 25 5. Una composición de aditivo alimentario según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la fitasa es una fitasa de *E. coli* o una fitasa de *Buttiauxella* o fitasa de *Hafnia* o fitasa de *Citrobacter* o una fitasa de *Aspergillus* o una fitasa de *Penicillium* o una fitasa de *Trichoderma* o una fitasa de *Hansenula*.
6. Una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso en la mejora de la resistencia del sujeto de las aves de corral a enteritis necrótica o para su uso en la mejora del índice de conversión del alimento (ICA) en un sujeto de aves de corral o para su uso en la mejora de la ganancia de peso en un sujeto aves de corral o para su uso en la mejora de la eficacia alimentaria en un sujeto aves de corral.
- 30 7. Un kit que comprende una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, e instrucciones para la administración.
8. Un método de preparación de una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende mezclar un microorganismo de alimentación directa con una subtilisina y una 6-fitasa y (opcionalmente) envasar.
- 35 9. Un alimento que comprende una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la 6-fitasa está presente a una dosis de entre 400 FTU/kg de alimentación y 1.000 FTU/kg de alimento, la subtilisina está presente a una dosis de entre 2.000 PU/kg de pienso y 6.000 PU/kg de alimento y el DFM está presente a una dosis de  $7,5 \times 10^4$  UFC/g alimento y  $1 \times 10^7$  UFC/g alimento.
- 40 10. Un método de preparación de un alimento que comprende mezclar un componente de alimento con una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
11. Una premezcla que comprende una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
- 45 12. Una premezcla según la reivindicación 11, que comprende al menos un mineral y/o al menos una vitamina.
13. Una composición de aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso en la prevención y/o tratamiento de enteritis necrótica en un sujeto aves de corral.

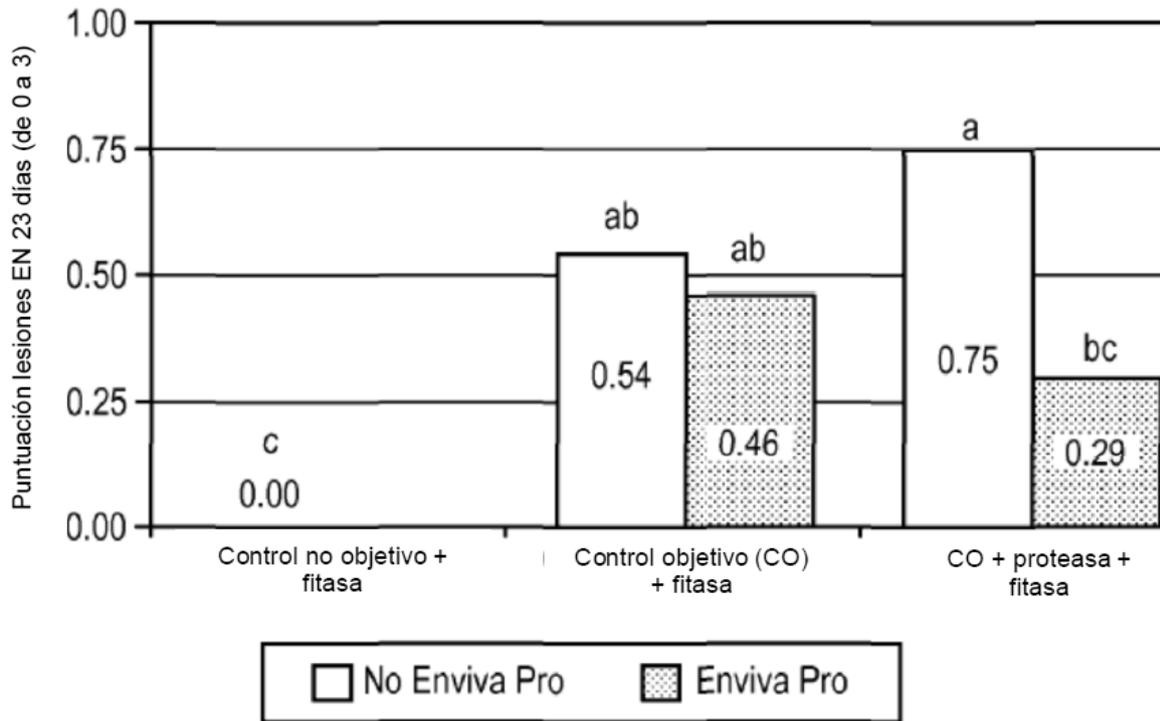


FIG. 1

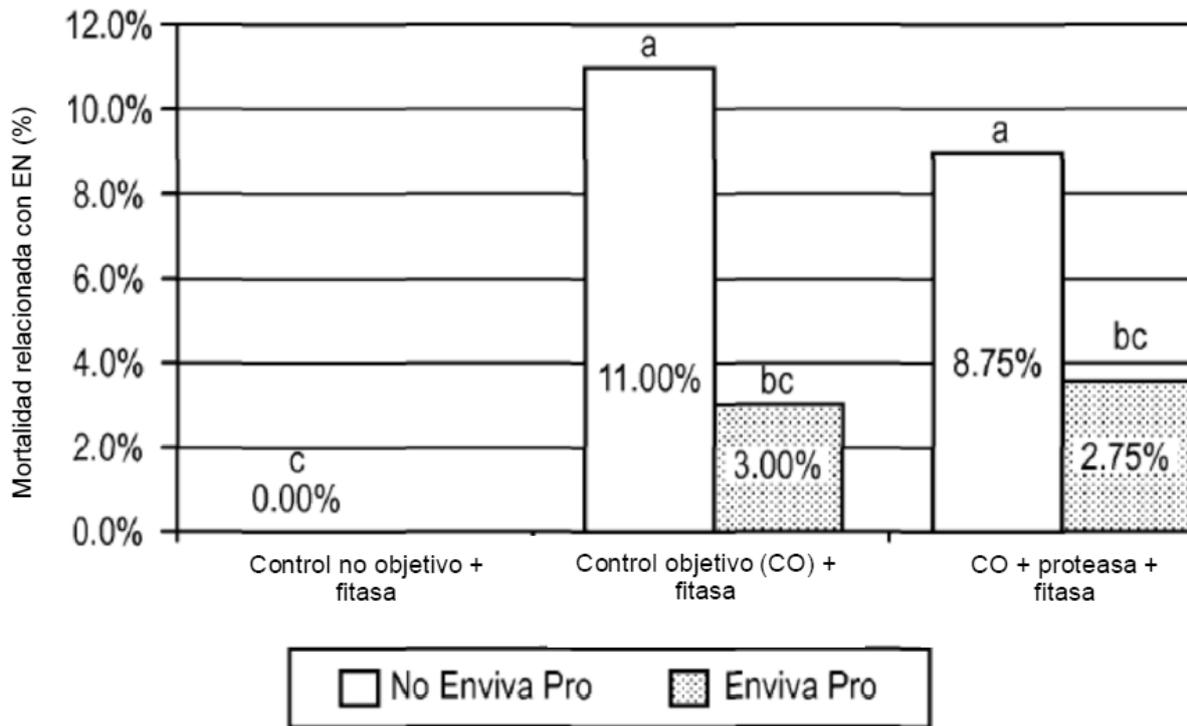


FIG. 2

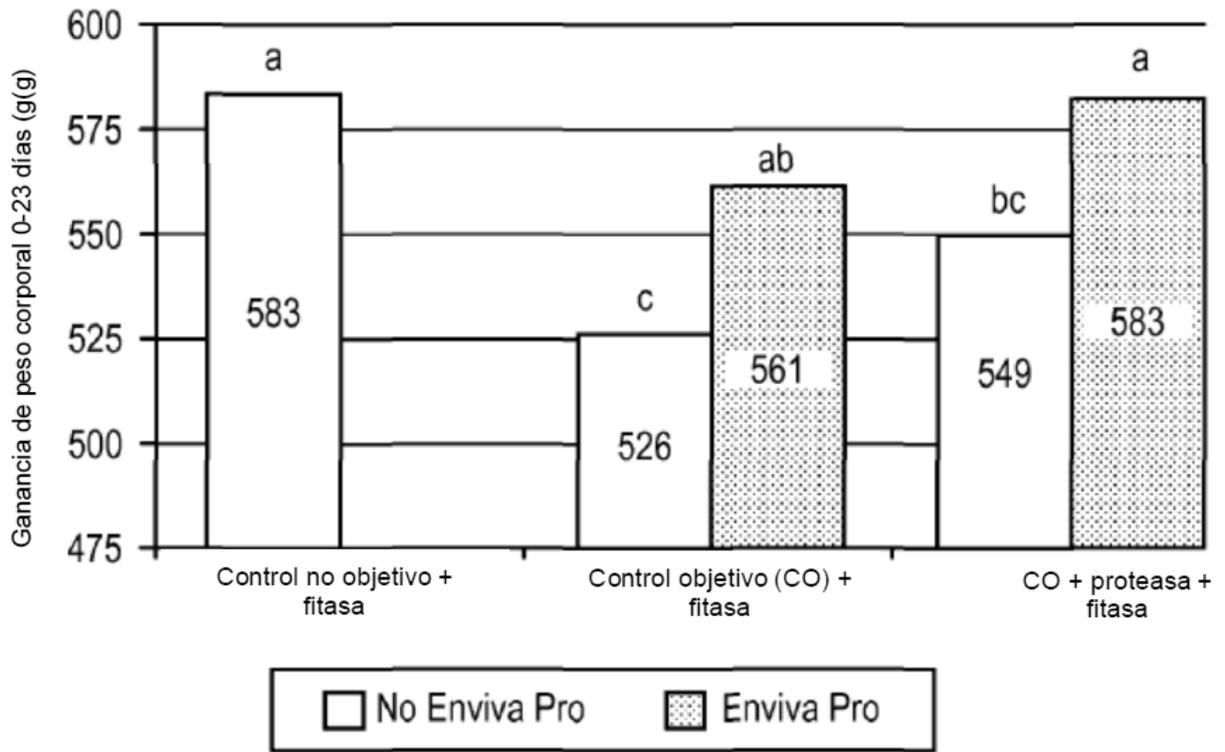


FIG. 3

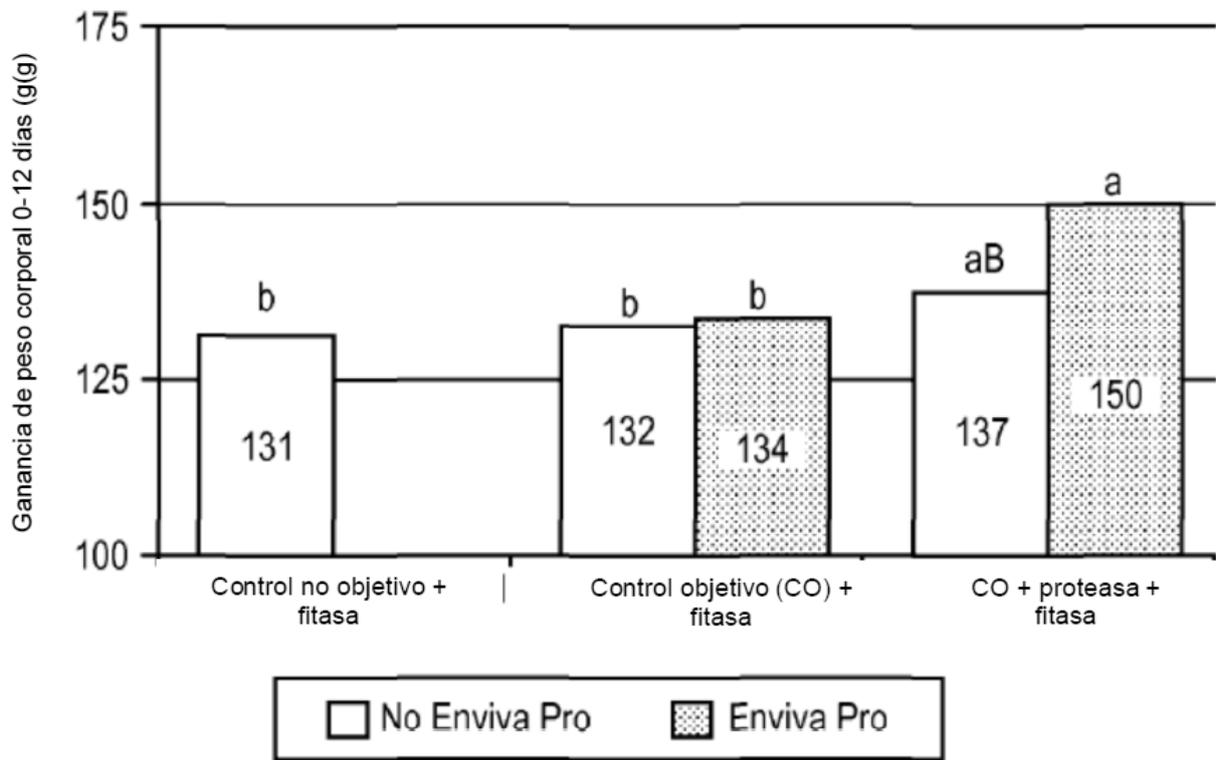


FIG. 4

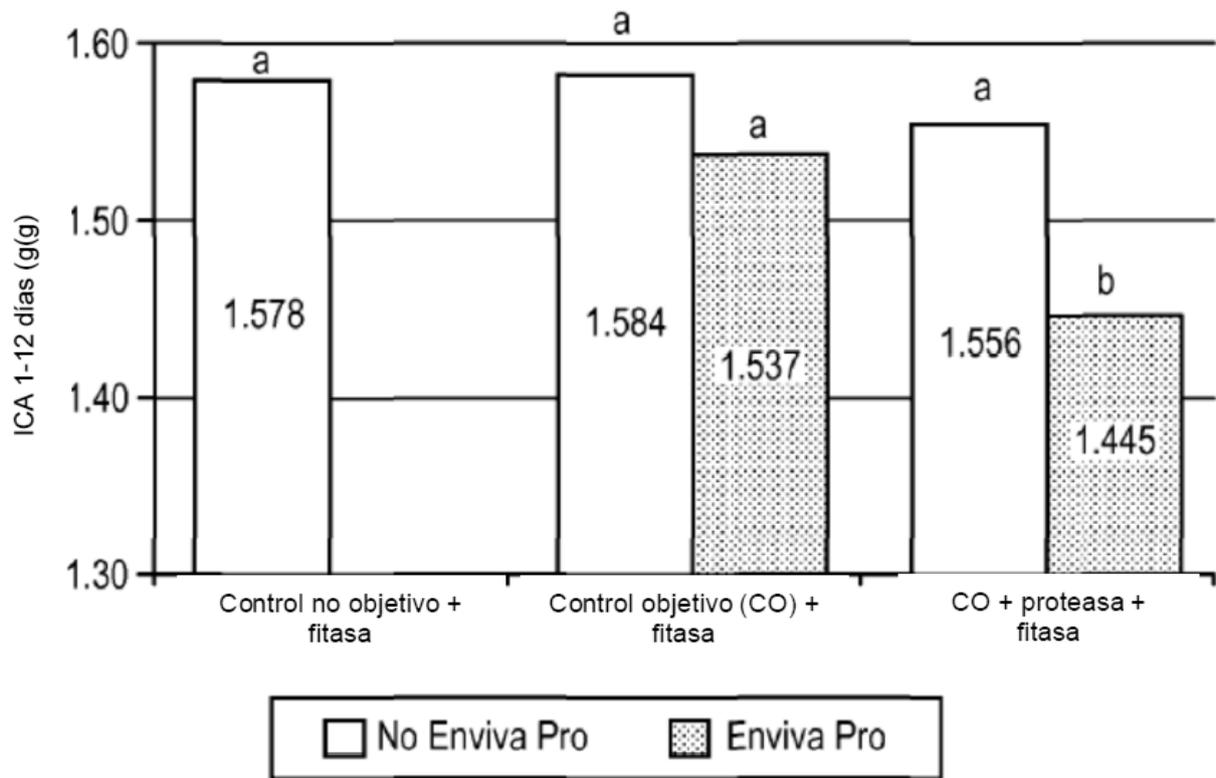


FIG. 5

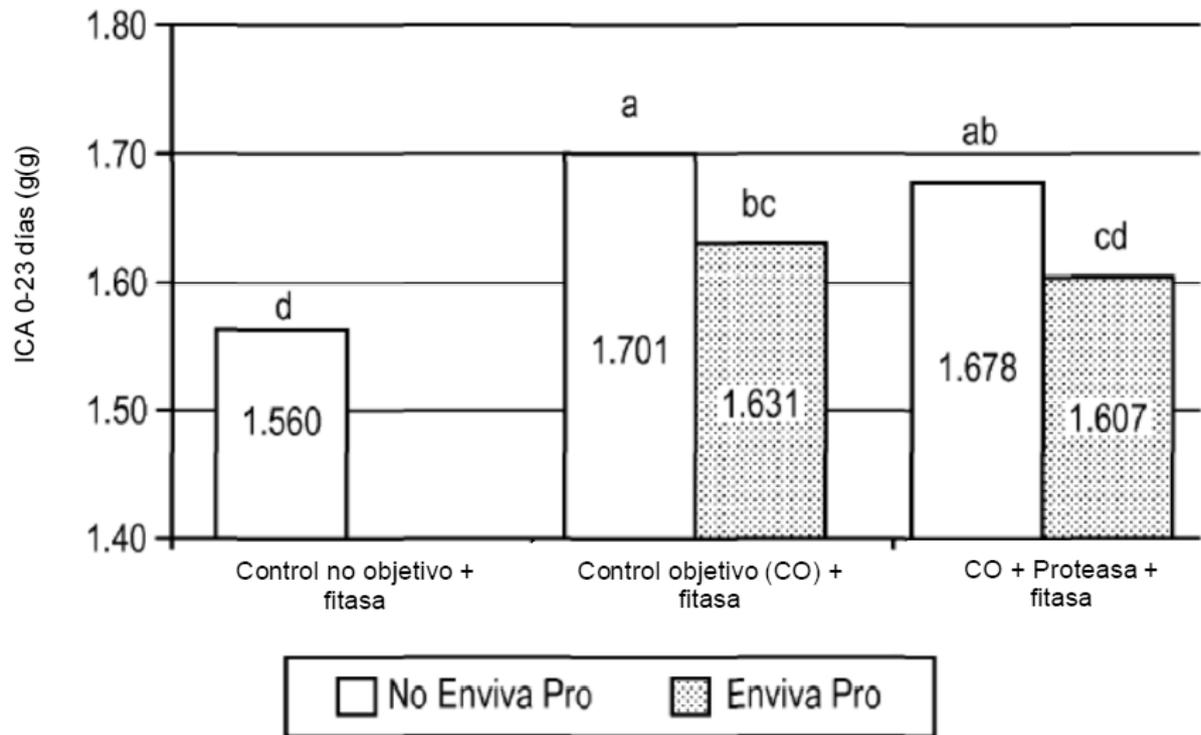


FIG. 6

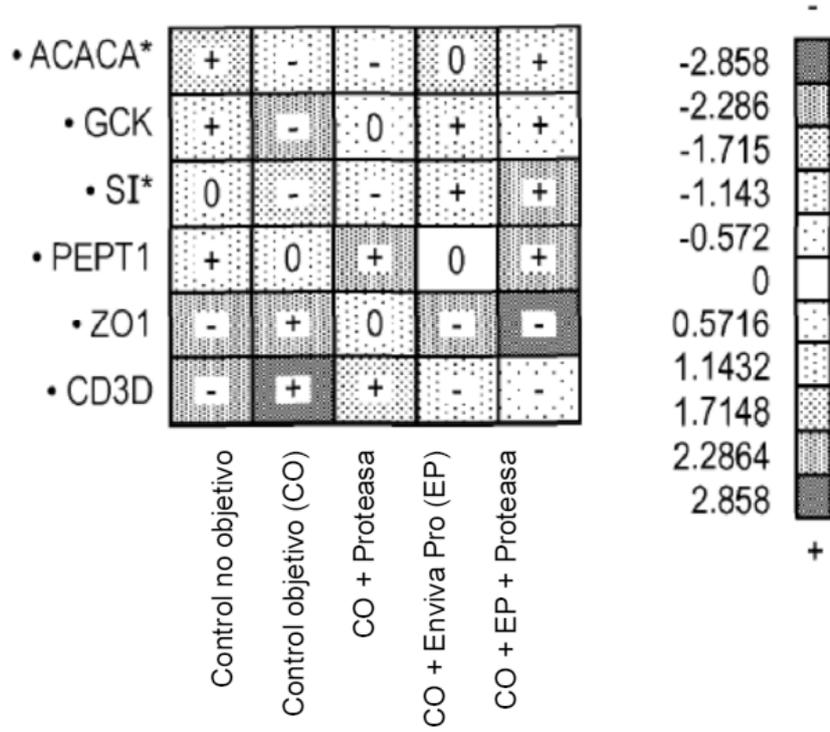


FIG. 7

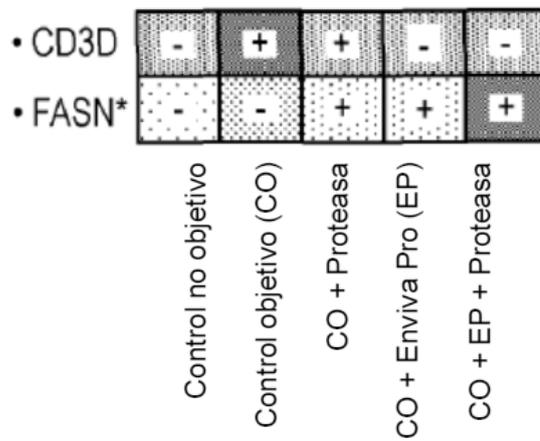


FIG. 8