

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 887**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 31/07</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/201</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/575</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/59</b>	(2006.01)
<b>A61K 36/07</b>	(2006.01)
<b>A23K 10/12</b>	(2006.01)
<b>A23K 10/30</b>	(2006.01)
<b>A23K 20/174</b>	(2006.01)
<b>A23K 20/163</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: **14.05.2013 PCT/EP2013/059903**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2013 WO13171194**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2013 E 13723469 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 2849576**

54 Título: **Material para pienso que comprende grano y extracto de Agaricus blazei y uso de los mismos en pienso para gallinas ponedoras**

30 Prioridad:

**14.05.2012 NL 2008812**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.05.2018**

73 Titular/es:

**SSIPFEED B.V. (100.0%)  
Heymansstraat 35  
5927 NP Venlo, NL**

72 Inventor/es:

**VAN DEN ELSHOUT, WILHELMUS, HUBERTUS,  
HENRICUS, AN y  
GRAMMARE, PIERRE, MICHEL**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 668 887 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

Material para pienso que comprende grano y extracto de *Agaricus blazei* y uso de los mismos en pienso para gallinas ponedoras

5

Esta invención se refiere a material para pienso para pollo y otros forrajes, y más en particular al uso de este material para pienso para mejorar la calidad de la cáscara del huevo a largo plazo, y para aumentar el período de puesta del huevo de las gallinas ponedoras.

- 10 El pollo y los huevos son ampliamente utilizados como alimento para el consumo humano. Se crían grandes cantidades de pollo para la producción de huevos. En general, las hembras (gallinas ponedoras) se crían durante 17 semanas, después de lo cual pueden usarse para la producción de huevos. El crecimiento y mantenimiento de las gallinas ponedoras está altamente optimizado, y actualmente, las gallinas producen huevos durante aproximadamente 60 semanas. Inicialmente, el porcentaje de puesta alcanza aproximadamente el 95% (>93%)
- 15 después de aproximadamente 10 semanas, durante un período de aproximadamente 10 semanas, pero a partir de entonces el porcentaje de puesta disminuye. Además, la calidad de las cáscaras de huevo se deteriora en promedio.

Es un objeto de la invención proporcionar un pienso, o material para pienso, que permita una mejora en la calidad de la cáscara del huevo y/o en el período de puesta del huevo para las gallinas ponedoras.

20

El objeto de la invención se consigue proporcionando a los pollos un pienso o material para pienso que comprende *Agaricus Blazei*, en donde la especie *Agaricus* se fermenta en grano, el grano fermentado se seca, y opcionalmente se pulveriza, y se usa como un material para pienso. Por lo tanto, la presente invención se refiere a un material para pienso que comprende grano y *Agaricus Blazei*, que comprende la especie *Agaricus* en una cantidad entre el 10 y el

25 50% en peso sobre materia seca, y el material para pienso que tiene un contenido de humedad inferior al 10% (con respecto a la materia seca), para su administración al pollo para la mejora de la puesta de huevos, preferiblemente para mejorar la calidad de la cáscara del huevo y/o para extender el período de puesta del huevo.

- La especie del champiñón de acuerdo con la invención es un *Agaricus Blazei*, preferiblemente *Agaricus Blazei Murill* (también denominada *A. Blazei Brasiliensis*, o *Agaricus subrufescens*, o *Agaricus rufotegulis*). En la actualidad, se cree que *Agaricus subrufescens* es el nombre correcto; sin embargo, en esta solicitud, se usará el *Agaricus Blazei Murill* más común. A continuación en el presente documento, se usa indistintamente la abreviatura ABM para *Agaricus Blazei murill*. La especie de *Agaricus* preferida es *Agaricus Blazei Murill*.

- 35 El uso de extractos de *Agaricus Blazei* para su administración a gallinas ponedoras, por ejemplo, un extracto en agua, como una solución o absorbida sobre zeolitas, se describe en el documento JP2004/321033. Se observa cierta mejora en el fortalecimiento del sistema inmunitario de acuerdo con esta referencia. Sin embargo, el documento JP2004/321033 no sugiere las mejoras de la presente invención. Además, Ikeya et al. (Bulletin of the Shizuoka swine and poultry experiment station, the agriculture, forestry and fishery research information technology
- 40 center - Affrit, Japón, n.º 14, 1 de enero de 2003 págs. 29-32 (XP008159889, ISSN 0914-6520)) describe el uso de *Agaricus blazei murill* del suelo para gallinas ponedoras. Sin embargo, las mejoras encontradas en la presente invención no se describen ni se sugieren en los mismos.

- La fermentación de la especie *Agaricus Blazei* sobre el grano se conoce como tal, también para aplicaciones de
- 45 pienso en general, como por ejemplo se describe en el documento CN101371683. Sin embargo, las mejoras encontradas en la presente invención no se describen ni se sugieren en los mismos. El documento US2008/187574 describe la fermentación de múltiples microorganismos en el grano. Sin embargo, las mejoras encontradas en la presente invención no se describen ni se sugieren en los mismos.

- 50 La especie de champiñón de acuerdo con la invención, que da muy buenos resultados, es *Agaricus Blazei*, preferiblemente *Agaricus Blazei Murill* (también llamado *A. Blazei Brasiliensis*). A continuación en el presente documento, se usará indistintamente la abreviatura ABM para *Agaricus Blazei murill*.

- El hongo *Agaricus Blazei* se cultiva como micelio en una fuente de grano y se cosecha como tal. Por lo tanto, no es
- 55 necesario ejecutar el crecimiento del micelio hasta que emerjan los cuerpos de fruta, ni es necesario separar el medio de crecimiento del micelio. De ese modo, la presente invención permite una forma económicamente eficaz de proporcionar pienso útil para pollos, dando como resultado un aumento en la producción de huevos. La mejora se observa durante el período normal de puesta de huevos, pero también es evidente a partir de una cáscara de huevo mejorada y un mayor período de puesta.

Como fuente de grano, son útiles varios tipos de granos comúnmente conocidos, tales como, por ejemplo, maíz, salvado de trigo, avena, sorgo, cebada, trigo integral, centeno, soja, maíz y similares. También se pueden usar mezclas. Además, la adición de fuente de carbono, fuente de amoníaco, o similares, puede ser útil para aumentar el crecimiento del micelio. Se pueden añadir compuestos de calcio como tiza. El centeno o la avena son particularmente preferidos porque ABM crece particularmente bien en estos sustratos.

Con el fin de obtener un ABM fermentado adecuado, se prefiere que la fuente de grano comprenda un contenido de humedad suficientemente alto. Un contenido de humedad adecuado está entre aproximadamente el 10-80% de humedad (medido como el peso del producto húmedo menos un producto seco, dividido por el peso del producto húmedo). Un contenido de humedad preferido está entre aproximadamente el 30 y el 70%, como por ejemplo aproximadamente el 50%.

La fuente de grano se esteriliza antes de la inoculación con el micelio ABM. La inoculación y la preparación del inóculo siguen técnicas estándar, como por ejemplo, la descrita en el documento US4204364.

La fermentación generalmente tiene lugar en recipientes de 20 a 50 litros de tamaño, como en bolsas o bandejas, como por ejemplo bolsas de 25 o 30 litros. La fermentación preferiblemente tiene lugar en un ambiente acondicionado. En general, el tiempo de fermentación será entre 15 y 75 días, como entre 15 y 55 días, preferiblemente entre 20 y 45 días. Un periodo demasiado corto causará un contenido relativamente bajo de micelio; un periodo demasiado largo es económicamente menos interesante. La temperatura durante la fermentación preferiblemente está entre 20 y 35 °C, y más preferiblemente entre 28 y 30 °C. La humedad preferiblemente está entre el 40% y el 90% de HR, tal como, por ejemplo, al 50 o 60% de HR.

Después de un periodo adecuado de fermentación, la cantidad de micelio está entre aproximadamente el 10 y el 50% (en peso seco de la mezcla de grano y micelio), preferiblemente entre el 20 y el 30%. La cantidad de micelio puede medirse indirectamente, por ejemplo, en base al contenido de ergosterol, como se aclarará adicionalmente en los ejemplos. Se puede usar cualquier método adecuado para determinar el contenido de micelio. Por ejemplo, también es posible medir el contenido de micelio en función de la cantidad de quitina.

Después de la fermentación, el grano fermentado se seca. El contenido de humedad del grano fermentado seco está entre el 2 y el 10% en peso. Como tal, un pienso con un contenido de humedad muy bajo no tiene desventajas desde el punto de vista técnico, pero es más costoso de producir.

Cualquier técnica de secado puede ser adecuada. Un aparato adecuado incluye un secador de correa, secador de bulbo, secador de tambor o secador de lecho fluido. Preferiblemente, el aparato es tal que puede realizar el secado a presión reducida. En general, se prefiere que la temperatura permanezca por debajo de 100 °C. Preferiblemente, el grano fermentado se seca por secado al aire a entre 5 y 100 °C, preferiblemente entre 25 y 90 °C, más preferiblemente por debajo de 63 °C, e incluso más preferiblemente por debajo de 50 °C. El secado a una temperatura inferior a aproximadamente 50 °C tiene la ventaja de que las enzimas extracelulares, como las celulasas, mantienen su actividad. En caso de que las enzimas que son de interés se hayan modificado para que sean resistentes a temperaturas más altas, se prefiere una temperatura más alta para el secado ya que se aumenta la velocidad de secado. Si se elige una temperatura por debajo de 63 °C, 45 °C, o en particular a aproximadamente 35 °C o menos, se prefiere aplicar presión reducida. La baja temperatura aplicada durante la etapa de secado tiene la ventaja adicional de que los compuestos sensibles al calor producidos durante la fermentación permanecen en una forma activa en el pienso.

El grano fermentado seco es estable al almacenamiento durante varios meses hasta al menos un año (por ejemplo, durante dos años), con una pequeña reducción del valor nutritivo del material para pienso.

El grano seco fermentado (material para pienso) se puede usar tal cual, como o en pienso para pollos. Para mejorar las características de mezcla con materia prima común, y permitir la administración reproducible a las gallinas ponedoras, se requiere aplastar o moler el grano seco fermentado a un tamaño de partícula ( $d_{50}$ ) entre 0,01 y 10 mm, preferiblemente inferior a 5 mm, e incluso más preferiblemente entre 0,1 y 3 mm. El intervalo de tamaño de partícula está preferiblemente entre 0,1 y 2,0 mm para aproximadamente el 90% o más del material para pienso, preferiblemente de aproximadamente el 95% o más del material para pienso, y más preferiblemente de aproximadamente el 98% o más del material para pienso. Como pienso para pollos, los tamaños de grano de partícula adecuados ( $d_{50}$ ) son, por ejemplo, aproximadamente 1,0 mm, aproximadamente 1,2 o aproximadamente 1,4 mm. Preferiblemente, el tamaño de grano (absoluto) es menor de 10 mm. En una realización, el tamaño de grano es preferiblemente menor de 5 mm, particularmente para pollos adultos, y aún más preferiblemente menor de 3 mm, ya que es aproximadamente el tamaño máximo para gallinas ponedoras principiantes. El material para pienso

producido de esta manera es muy adecuado como material para pienso para pollos y otros forrajes con un cultivo. Debido a la baja temperatura preferida durante el secado, las enzimas extracelulares como celulasas y amilasas, permanecen activas. La ingesta de enzimas activas por parte del pollo ayuda a la conversión alimenticia en el cultivo.

5 El grano fermentado, seco y opcionalmente fermentado molido (el material para pienso) se puede usar tal cual como pienso, como una fuente de alimentación separada, o se puede mezclar con otra materia prima común para pollos. Preferiblemente, el material para pienso se mezcla con la materia prima general, ya que permite una mejor estandarización y/o reproducibilidad.

10 El material para pienso contiene entre el 15 y el 50% en peso de micelio (basado en peso seco), preferiblemente entre el 20 y el 30% en peso. La cantidad de micelio puede medirse en función del contenido de ergosterol.

La fermentación provocará la presencia de varios compuestos útiles en los granos fermentados. La especie *Agaricus*  
15 *Blazei* produce, por ejemplo, ergosterol, enzimas extracelulares como celulasas y amilasas, y 1,3- y 1,6- $\beta$ -glucanos.

El ergosterol es un esteroide del cual la vitamina D es producida por el pollo. Por lo tanto, se cree que el ergosterol, aunque la vitamina D es importante para la reabsorción de calcio en el intestino, es fundamental para mejorar la calidad de la cáscara del huevo. La cantidad de ergosterol en el material para pienso es de 100-600 miligramos por  
20 kg de material para pienso. Preferiblemente, la extracción cuantitativa se realiza en grano fermentado seco pulverizado, lo que se puede hacer con etanol caliente al 80%.

Las enzimas extracelulares, que permanecen activas con el proceso de secado actual preferido, pueden ayudar en una conversión de pienso mejorada. El material para pienso de acuerdo con la presente invención preferiblemente  
25 comprende celulasas extracelulares activas. La presencia de celulasas extracelulares puede determinarse de acuerdo con los métodos descritos en *Mycobiology* 39(2): 103-108 (2011). En una realización preferida, la actividad de celulasas está entre 0,1 y 0,8 unidades/ml cuando se extraen 10 gramos de material con 20 ml de agua. En esta extracción, 10 g de material para pienso seco se empapan con 20 ml de agua a 20 °C durante dos horas, y posteriormente el agua se extrae de la mezcla en una prensa, y se mide la actividad enzimática en el agua extraída.

30 Se sabe que los 1,3- y 1,6- $\beta$ -glucanos mejoran el sistema inmune. Los glucanos son solubles en agua. La cantidad de estos glucanos está entre 3 y 100 gramos, preferiblemente entre 6 y 60 gramos, y mucho más preferiblemente entre 10 y 40 gramos por kg del material para pienso (es decir, el grano fermentado).

35 La cantidad de 1,3- y 1,6- $\beta$ -glucanos en el pienso total para pollo estará entre 20 y 200 mg/kg de pienso, preferiblemente entre 50 y 100 mg/kg de pienso. Los 1,3- y 1,6- $\beta$ -glucanos se pueden medir con kits estándar. Sin embargo, pareció que la medición en el grano fermentado dio como resultado resultados poco fiables. Por lo tanto, la cantidad de 1,3- y 1,6- $\beta$ -glucanos en los granos fermentados se puede determinar indirectamente, determinando estos compuestos en ABM puro fermentado, y calculando a partir del % de conversión (medido a través de la  
40 cantidad de ergosterol) la cantidad de 1,3- y 1,6- $\beta$ -glucanos.

Algunos análisis en el grano fermentado son complicados debido a los componentes del grano. Puede ser útil determinar la producción de componentes útiles en el micelio puro. Esto se puede hacer cultivando los micelios en un fermentador en condiciones no limitantes, eliminando el medio y midiendo los componentes del micelio.  
45 Obviamente, solo los componentes intracelulares se miden de esta manera. El ABM usando por los presentes inventores produjo aproximadamente 10,7 g/kg de liberación de GlcNac, según la medición para la quitina, aproximadamente 0,65 g/kg de micelio de ergosterol, aproximadamente 120 g/kg de micelio de 1,3- $\beta$ -glucanos y 1,6- $\beta$ -glucanos.

50 La cantidad de micelio puede medirse en función del contenido de quitina, pero también, por ejemplo, en función de la cantidad de ergosterol. Se prefiere la determinación mientras se usa quitina, ya que es un compuesto estable (mientras que el ergosterol es sensible a los rayos UV). Cuando se hace correctamente, ambos métodos deberían dar aproximadamente los mismos resultados.

55 El método usado para la determinación de la conversión mediante la evaluación de la cantidad de quitina se describe en *Nature protocols* (2007) 1: 2995-3000. En resumen, la quitina se libera primero de las paredes celulares, y mientras se usa quitinasa, la quitina se hidroliza y se forma N-acetilglucosamina, que se puede determinar cuantitativamente con tetraborato y reactivo Reissig. La cantidad encontrada en el grano fermentado se debe comparar con una línea de calibración hecha de micelio puro.

La cantidad de micelio (como materia seca pura) administrada a las gallinas ponedoras por día, generalmente estará entre 0,1 y 1,0 kg por tonelada de pienso, preferiblemente entre 0,2 y 0,8 kg por tonelada de pienso. La cantidad de material para pienso que se añadirá a la materia prima normal se puede ajustar después de evaluar la cantidad de micelio. La cantidad de material para pienso generalmente será de aproximadamente 0,2 kg por tonelada o más, preferiblemente de aproximadamente 0,5 kg o más, y más preferiblemente de aproximadamente 1 kg por tonelada de pienso o más. Generalmente, la cantidad será de aproximadamente 10 kg por tonelada de pienso o menos, preferiblemente de aproximadamente 5 kg por tonelada de pienso o menos. Los ejemplos adecuados incluyen 2, 3 o 5 kg por tonelada de pienso.

Una gallina consume inicialmente aproximadamente 70 gramos o más de pienso al día por kg de peso corporal, y después de unas pocas semanas aproximadamente de 100 a 125 gramos de pienso al día.

La cantidad de material para pienso (25% de conversión en centeno) de acuerdo con la invención dada por gallina ponedora está entre aproximadamente 20 y 500 miligramos por kg de peso corporal del pollo al día, preferiblemente entre 50 y 300 miligramos por kg de peso corporal del pollo al día, como por ejemplo, aproximadamente 100, aproximadamente 150 o aproximadamente 200 miligramos/peso corporal del pollo/día.

A la vista de las pequeñas cantidades, el material para pienso de acuerdo con la presente invención preferiblemente se mezcla con otros componentes de pienso. La materia prima común para el pollo son granos, harina de soja, harina de sésamo, harina de pescado, harina de semilla de algodón y similares. Preferiblemente, la materia prima comprende más del 15% en peso, como por ejemplo entre el 15 y el 23% en peso de proteína y una cantidad de energía suficiente. Además, preferiblemente la materia prima comprende calcio, en una cantidad de aproximadamente el 2% en peso o más, preferiblemente aproximadamente el 3% en peso o más, y más preferiblemente aproximadamente el 4% en peso o más. La materia prima preferiblemente también comprende aproximadamente el 1-2% en peso de ácido linoleico (preferiblemente como éster de glicerol). Además, el pienso comprende preferiblemente vitaminas como la vitamina A (preferiblemente más de 10000 UI), vitamina D (preferiblemente más de 2000 UI) y una cantidad suficiente de biotina, colina, antioxidantes, manganeso, cinc y materiales traza. Si se usa el material para pienso de acuerdo con la presente invención, la cantidad de vitamina D puede ser menor. En general, el pienso para pollos varía durante el período de puesta. El pienso contiene generalmente preferiblemente más del 15% en peso de proteína, más del 2% en peso de calcio y más del 1% en peso de ácido linoleico.

No es necesario usar el material para pienso de la presente invención todos los días. La administración intermitente, como por ejemplo cada dos días, una vez cada tres días o una vez a la semana también puede ser adecuada. Se cree que todos los días o cada dos días es más eficaz.

En una realización de la invención, el material para pienso se usa durante todo el período de crecimiento y puesta de huevos. El uso del material para pienso durante todo el período tiene la ventaja de que la mortalidad en la fase inicial del crecimiento se reduce, lo que conduce a un aumento en la producción de huevos para un grupo determinado de gallinas.

En otra realización, el material para pienso se usa solo durante la segunda mitad del período de puesta de las gallinas ponedoras. En esta realización, el material para pienso se usa solamente (o solo predominantemente; el uso indirecto antes de ese período es por supuesto inmaterial) desde aproximadamente la semana 30 en adelante del período de puesta de huevos o posterior, y preferiblemente desde aproximadamente la semana 40 en adelante, y mucho más preferiblemente desde semana 45 en adelante del período de puesta de huevos. Sin embargo, el material para pienso debe usarse al menos desde aproximadamente la semana 50 en adelante, de lo contrario se observará una mejora reducida. Esta realización tiene la ventaja de un uso reducido del material para pienso, mientras que se observa un aumento muy eficaz del período de puesta de huevos con una buena calidad de la cáscara del huevo.

La presente invención se dilucidará con los siguientes ejemplos, sin limitarse a los mismos.

#### 55 Ejemplos.

##### *Material para pienso*

El material para pienso se produjo como se indica a continuación. Se inocularon bolsas de 15 l con 3 kg de centeno

húmedo (50% de humedad) con aproximadamente 80 mg de micelio de ABM y se cultivaron durante 42 días a 28 °C con una humedad del 50%. El producto se secó (hasta un contenido de humedad de menos del 5%) con un tambor de vapor giratorio al vacío a 35 °C a una presión de 20 mmHg. El material seco se molió de forma gruesa a d50 1000 micrómetros (1 mm).

5

La bioconversión se midió indirectamente a través de la cantidad de ergosterol. El método fue el siguiente: Las muestras se liofilizaron durante 48 horas antes de la extracción. El ergosterol se extrajo en la oscuridad a partir de 100 mg de material biológico (champiñón o matriz vegetal) en 15 ml de KOH/MeOH (1:10, p/v) durante 1 h a 80 °C y luego se enfrió rápidamente en hielo. Se añaden 30 µg de estándar interno (colesterol: 1 mg/l en hexano) antes de la extracción. Después de añadir 2 ml de agua, se realiza una extracción dos veces con 4 ml de hexano. Las capas orgánicas se recogieron y se evaporaron bajo flujo de nitrógeno. El ergosterol se analizó por cromatografía de gases (detector FID, columna DB-5). La cantidad de ergosterol en ABM al 100% es para esta cepa de 0,65 g/kg.

10

El contenido de ergosterol y glucano del material para pienso se informa en la Tabla 1; las cantidades son valores del material para pienso (el grano fermentado y seco). La cantidad de glucanos se midió en ABM fermentado sumergido, y se midió de acuerdo con el método 32-23 de AACC (método de McCleary), como se describe, por ejemplo, por Megazyme (Wicklow, Irlanda). La cantidad en el material para pienso se calculó basándose en la conversión determinada a través del contenido de ergosterol.

15

20 TABLA 1

Ejecución	% de fermentación (bioconversión)	Ergosterol	1,3- 1,6-β-glucano
1 (avena)	25% en 42 días	0,16 g/kg	30,2 g/kg
2 (avena)	18% en 35 días	0,12 g/kg	21,8 g/kg
3 (centeno)	35% en 35 días	0,23 g/kg	42,4 g/kg

*Estudio con gallinas ponedoras*

Se estableció un estudio a gran escala, con dos grupos de gallinas ponedoras (Lohmann Bruin Lite) de 17 semanas de edad exactamente en los mismos edificios. Los grupos consistían en 10000 y 11000 gallinas ponedoras respectivamente. El grupo de 11000 gallinas se trató mientras que el otro grupo se usó como control. La gestión de los dos grupos fue la misma (temperatura, agua, pienso, tratamiento del aire, etc.). Para el grupo tratado, se añadieron 3 kg de avena fermentada (20% de bioconversión, es decir, 20% en peso de micelio) por tonelada de pienso mediante una unidad de dosificación automática (WAM Holland). Todo el pienso para el grupo tratado se enriqueció con el material para pienso de ABM. El pienso estándar consistió en pienso estándar optimizado para gallinas ponedoras. Este tipo de pienso se adapta para las gallinas ponedoras durante el período de producción de huevos.

25

30

*Resultados*

35

Aunque se observaron algunas variaciones durante el estudio con respecto al rendimiento de puesta de huevos, el grupo tratado en general produjo aproximadamente un 3% más de huevos en la misma cantidad de pienso (en g/huevo). El período máximo de puesta de huevos (>93%) fue de aproximadamente 12 semanas en el control. En el grupo tratado, se consiguió >93% de los huevos de buena calidad desde la semana 31 hasta al menos 60 semanas; así que durante más de 30 semanas.

40

El parámetro de rendimiento del 75% (donde 75 de cada 100 pollos ponen en promedio 1 huevo al día) se alcanzó después de 60 semanas de puesta de huevos (77 semanas de ciclo de vida total) para el grupo de control. La cifra del 75% para el grupo tratado fue a las 67 semanas (84 semanas de ciclo de vida total). Así, junto con el aumento del 3% durante el período "normal", las gallinas ponedoras tratadas produjeron 350.000 huevos más en las 7 semanas adicionales antes del sacrificio (es decir, más de 30 huevos adicionales por gallina, lo que conduce a un aumento promedio de aproximadamente el 20% en el número huevos producidos por gallina). La mortalidad global fue aproximadamente 1/4 menor en el grupo tratado que en los grupos de control.

45

El material para pienso de ABM se añadió durante el período completo, es decir, 165 gramos de material para pienso de ABM para el grupo tratado en 67 semanas.

50

La producción total de huevos durante el período de puesta de huevos de 60 semanas se da en la tabla 2:

55

TABLA 2

Estable	Pájaros de inicio	Pájaros promedio	Huevos	Número promedio de huevos por pájaro
1 (control)	10000 pájaros	9800 pájaros	3498600	357
2 (tratados)	11000 pájaros	10835 pájaros	4225650	390

La calidad y el peso promedio de los huevos fueron esencialmente los mismos para los dos grupos a lo largo de una gran parte del estudio. Las cáscaras de huevo en el grupo tratado parecen ser más gruesas al final del período de puesta. La calidad de los huevos en el grupo tratado permite la producción de huevos hasta 67 semanas, también debido a que la cáscara de huevo es de suficiente calidad.

*Material para pienso adicional*

10 Se produjo material para pienso adicional de una manera comparable. La bioconversión se midió indirectamente a través de la cantidad de quitina como se describe en Nature protocols 1, 2995-3000, 2007. El grano usado no comprende quitina, por lo que toda la quitina medida se origina en el micelio. La conversión puede calcularse a través de la cantidad de GlcNac formado y su absorbancia a 585 nm. Por mg de masa fúngica seca, la cantidad de GlcNac es del 1,06% (desviación estándar, 0,2%). Por lo tanto, la DO medida para una cantidad de GlcNac obtenida de 10 mg de micelio seco puro es 0,93. Por lo tanto, para una DO medida (DOm), dividir la DOm por 0,093, da la cantidad de micelio. Esta cantidad, multiplicada por 100, y dividida por la cantidad inicial de micelio para una muestra dada da el porcentaje de bioconversión. El material para pienso, producido en centeno, mostró una bioconversión del 26% en 70 días. La cantidad de ergosterol fue de 0,17 g/kg y la cantidad de  $\beta$ -glucanos fue de 31 g/kg.

20 *Estudio con gallinas ponedoras durante parte del período de puesta de huevos*

En una prueba adicional, el material para pienso se usó solamente a partir de la semana 41 en adelante, por lo tanto, durante las últimas 20 semanas del período de puesta de huevos de gallinas no tratadas. La cantidad usada fue dos veces la cantidad dada en el estudio anterior (por lo tanto, 5 kg del producto con un 26% de bioconversión) mezclada con el pienso normal para gallinas ponedoras como se ha descrito en el ejemplo anterior. El período de puesta de huevos se extendió con 5 semanas hasta que se alcanzó el valor umbral del 75%, con huevos con una calidad de cáscara de huevo suficiente.

**REIVINDICACIONES**

1. Proceso para producir material para pienso, que comprende
  - 5 a) fermentar *Agaricus Blazei* en grano con un contenido de humedad entre el 10 y el 90% hasta el 15-50% de contenido de micelio,
  - b) secar el grano fermentado a un contenido de humedad de entre el 2 y el 10% en peso (con respecto al material seco) a una temperatura inferior a 50 °C,
  - 10 c) y moler el material fermentado y secado así obtenido a un tamaño de partícula con un d50 entre 0,01 y 10 mm,en el que el material para pienso comprende ergosterol en una cantidad de 100-600 miligramos por kg de material para pienso, y 1,3- y 1,6-β-glucanos en una cantidad de entre 3 y 100 gramos, por kg de material para pienso.
- 15 2. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el grano es centeno o avena.
3. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el grano fermentado se seca a una temperatura entre 20 y 45 °C mientras se aplica presión reducida.
- 20 4. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el contenido de micelio está entre el 20-30%.
5. Material para pienso que se puede obtener mediante un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 25 6. Material para pienso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el material para pienso tiene un tamaño de partícula (d50) entre 0,01 y 3 mm.
7. Material para pienso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-6, en el que el material para pienso comprende celulasas activas que tienen una actividad entre 0,1 a 0,8 unidades/ml en un extracto que se obtiene si se extraen 10 g de material para pienso con 20 ml de agua.
- 30 8. Material para pienso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en el que el material para pienso comprende 1,3- y 1,6-β-glucanos en una cantidad de entre 6 y 60 gramos por kg del material para pienso.
- 35 9. Pienso para gallinas ponedoras, que comprende más del 15% en peso de proteína, más del 2% en peso de calcio y más del 1% en peso de ácido linoleico, que comprende además el material para pienso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en una cantidad de entre 0,5 y 5 kg/ton.
- 40 10. Pienso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el pienso contiene calcio, en una cantidad de aproximadamente el 3% en peso o más, y más preferiblemente aproximadamente el 4% en peso o más.
11. Pienso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-10, en el que el pienso contiene 45 vitamina A en una cantidad de más de 10000 UI y vitamina D en una cantidad de más de 2000 UI.
12. Pienso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, para administración a pollo para mejorar la puesta de huevos en gallinas ponedoras en el que la mejora se refiere a la calidad de la cáscara del huevo y/o para extender el período de puesta del huevo.
- 50 13. Uso de un material para pienso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, para mejorar la puesta de huevos en gallinas ponedoras en el que la mejora se refiere a la calidad de la cáscara del huevo y/o para extender el período de puesta del huevo.
- 55 14. Pienso o uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-13, en el que el material para pienso se administra a las gallinas ponedoras desde la semana 30 en adelante, o más tarde.
15. Pienso o uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en el que la mejora se refiere a extender el período de puesta del huevo.