

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 663**

51 Int. Cl.:

A23K 20/189 (2006.01)

A23K 50/30 (2006.01)

A23K 50/75 (2006.01)

A23K 50/60 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.02.2013 PCT/US2013/025006**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013 WO13122799**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2013 E 13706128 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 2814331**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para reducir el impacto ambiental de residuos animales**

30 Prioridad:

16.02.2012 US 201261599729 P

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

26.04.2019

73 Titular/es:

**ELANCO US INC (100.0%)
2500 Innovation Way
Greenfield, IN 46140, US**

72 Inventor/es:

**ANDERSON, DAVID M.;
PODKOVYROV, SERGEY;
HUANG, YUEFANG;
SCHUSTER, KURT y
FERREL, JON EDWARD**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 710 663 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

Procedimientos y composiciones para reducir el impacto ambiental de residuos animales

5 La presente invención proporciona procedimientos para reducir el impacto ambiental de los residuos animales. En particular, la invención proporciona procedimientos que comprenden administrar a un animal una enzima que es eficaz para reducir la cantidad de un compuesto perjudicial presente o liberado de los residuos animales, y composiciones adecuadas para su uso en dichos procedimientos. También se proporciona un procedimiento para aumentar la digestión de fósforo en un animal.

10 Los residuos animales pueden contener o liberar uno o más compuestos que tienen un efecto perjudicial, tal como un efecto perjudicial en el animal, en otros animales, en los seres humanos o en el medio ambiente. Uno de dichos compuestos es el amoníaco (NH₃). Otro de dichos compuestos es el fósforo (P).

15 El amoníaco atmosférico puede tener efectos adversos en el medio ambiente, así como en el rendimiento de la producción animal, la salud y el bienestar. La generación y emisión de amoníaco en, por ejemplo, la cría de aves de corral, se debe principalmente a la descomposición microbiológica de los residuos de aves de corral. Los niveles de amoníaco tan bajos como 50 ppm pueden ser perjudiciales para las aves de corral, y esos niveles bajos pueden pasar desapercibidos. La exposición al amoníaco a 50 ppm puede contribuir a que el 5-10 % de las aves sean enanas, y puede asociarse con una pérdida de 227 gramos de carne por ave y/o una pérdida de 8 puntos de conversión de pienso.

20 Por lo tanto, existe la necesidad de procedimientos para reducir la cantidad de un compuesto perjudicial presente o liberado de los residuos animales, tal como la reducción del contenido de amoníaco y/o fósforo de los residuos animales.

25 De acuerdo con algunas realizaciones, se proporcionan procedimientos para reducir el impacto ambiental de los residuos animales, que comprenden administrar a un animal una cantidad eficaz de una enzima que reduce la cantidad de un compuesto perjudicial presente o liberado de los residuos animales. De acuerdo con algunas realizaciones, se proporcionan procedimientos para reducir la cantidad de amoníaco en los residuos animales, que comprenden administrar a un animal una cantidad eficaz de una enzima que reduce la cantidad de amoníaco presente o liberado de los residuos animales. De acuerdo con algunas realizaciones, se proporcionan procedimientos para reducir la cantidad de fósforo en los residuos animales, que comprenden administrar a un animal una cantidad eficaz de una enzima que reduce la cantidad de fósforo presente o liberado de los residuos animales. También se proporciona un procedimiento para aumentar la digestión de fósforo en un animal, que comprende administrar una cantidad eficaz de fosfatasa alcalina al animal.

De acuerdo con cualquiera de estos procedimientos, la enzima se puede administrar por vía oral.

De acuerdo con cualquiera de estos procedimientos, la enzima se puede ser fosfatasa alcalina.

De acuerdo con cualquiera de estos procedimientos, el animal puede ser un animal avícola o porcino.

35 De acuerdo con cualquiera de estos procedimientos, la enzima se puede administrar durante una o más de la fase de iniciación, la fase de crecimiento y/o la fase de finalización.

De acuerdo con cualquiera de estos procedimientos, la enzima puede formularse en piensos para animales, tal como un pienso de iniciación, un pienso de crecimiento o un pienso de finalización.

De acuerdo con cualquiera de estos procedimientos, la enzima puede formularse en un aditivo de pienso para animales.

40 De acuerdo con algunas realizaciones, se proporcionan composiciones adecuadas para la administración oral a un animal, que comprenden una cantidad eficaz de una enzima que reduce la cantidad de un compuesto perjudicial presente o liberado de los residuos animales. De acuerdo con algunas realizaciones, se proporcionan composiciones adecuadas para la administración oral a un animal, que comprenden una cantidad eficaz de una enzima que reduce la cantidad de amoníaco presente o liberado de los residuos animales. De acuerdo con algunas realizaciones, se proporcionan composiciones adecuadas para la administración oral a un animal, que comprenden una cantidad eficaz de una enzima que reduce la cantidad de fósforo presente o liberado de los residuos animales.

45 De acuerdo con cualquiera de estas composiciones, la composición puede comprender un portador aceptable por vía oral para la enzima.

De acuerdo con cualquiera de estas composiciones, la enzima se puede ser fosfatasa alcalina.

50 Cualquiera de estas composiciones puede ser adecuada para la administración a aves de corral o cerdos.

Cualquiera de estas composiciones puede ser un pienso para animales, tal como una dieta de iniciación, una dieta de crecimiento o una dieta de finalización, o puede ser un aditivo de piensos para animales.

Como se usa en el siguiente análisis, los términos "un" o "uno" deben entenderse que abarcan uno o más, a menos que se especifique lo contrario.

Como se usa en el presente documento, el término "animal" se refiere a cualquier animal, incluidos los seres humanos y otros animales, incluidos los animales de compañía tales como perros y gatos, ganado, tales como vacas y otros rumiantes, búfalos, caballos, ganado porcino (p. ej., cerdos o chanchos), ovejas, aves o aves de corral (p. ej., pollos, patos, pavos y gansos) y animales de acuicultura (p. ej., peces, camarones y anguilas). Un animal joven es un animal que pertenece a la categoría de iniciación (o preiniciación) o crecimiento. Preferentemente, el animal joven pertenece a la categoría de iniciación (o preiniciación). Para los cerdos, un animal de menos de 25 kilogramos también se considera un animal joven.

En el presente documento se describen procedimientos que comprenden administrar a un animal una enzima que es eficaz para reducir la cantidad de un compuesto perjudicial presente o liberado de los residuos animales, tal como el amoníaco (NH₃) o el fósforo (P), y composiciones adecuadas para su uso en dichos procedimientos. Los procedimientos ofrecen un número de ventajas en el contexto de la producción animal, incluida la producción avícola y porcina. Por ejemplo, los procedimientos pueden ofrecer ventajas tales como la reducción de la entrada de fosfato en un sistema de producción animal, la disminución de amoníaco en el estiércol animal, la reducción de los requisitos de aire de ventilación para diluir la concentración de amoníaco en interiores en el alojamiento de los animales (y los ahorros de energía asociados), y la menor necesidad de tratar más gases de escape.

Aunque sin desear quedar ligado a teoría alguna, los resultados que se presentan a continuación indican que los procedimientos descritos en el presente documento pueden ayudar a los animales (como los pollos de engorde jóvenes) a utilizar y digerir el fósforo que está presente en sus dietas, lo que a su vez puede conducir a una mejor tasa de crecimiento y menos pérdida de nutrientes por excreción. Además, o como alternativa, los procedimientos descritos en el presente documento pueden disminuir la emisión de NH₃ debido a que los tratamientos con enzimas pueden aumentar el metabolismo y el crecimiento de poblaciones bacterianas favorables en el intestino, de modo que una mayor cantidad del exceso de nitrógeno en la dieta permanece en el estiércol como proteína bacteriana en lugar de ácido úrico, que típicamente se degrada y se emite como NH₃. Además, tanto el pH más bajo y el menor contenido de nitrógeno en el estiércol de los animales tratados pueden disuadir y evitar la formación de NH₃ gaseoso en el estiércol y reducir la emisión del NH₃. La relación entre el pH y la degradación de ácido úrico (la principal fuente de nitrógeno en el estiércol de aves de corral) se ha presentado de tal manera que un aumento brusco del pH puede estar asociado con una disminución en el contenido de ácido úrico del estiércol de aves de corral. Elliot y Collins, 1982, Transactions of ASAE 25: 413-24, indicaron que un pH alto en el estiércol almacenado daría como resultado la mayoría de la pérdida de nitrógeno como NH₃. Además, la reducción del contenido de fósforo de los residuos animales puede afectar otras propiedades del estiércol, tal como la flora bacteriana.

En realizaciones específicas, la enzima es fosfatasa alcalina (FA) (EC 3.1.3.1). Las fosfatasas alcalinas se producen en organismos procarióticos y eucarióticos, incluidos los mamíferos (incluyendo los seres humanos). Por ejemplo, la fosfatasa alcalina está presente de forma natural en la leche materna y en los intestinos, y desempeña un papel clave en la digestión y la regulación de la digestión. La fosfatasa alcalina se ha estudiado para su uso en contextos terapéuticos (p. ej., el tratamiento del cáncer, la diabetes y la pérdida de peso). La comparación de las estructuras primarias de diversas fosfatasas alcalinas mostró un alto grado de homología (25-30 % de homología entre *E. coli* y mamíferos). Millan, 1988 Anticancer Res. 8, 995-1004; Harris, 1989 Clin. Chim. Acta 186, 133-150. La familia de la fosfatasa alcalina incluye las FA específicas de tejido (FA placentaria (FAPL), FA de células germinales (FACG) y FA intestinal (FAI) » y las FA no específicas de tejido (FAnT) que se encuentran principalmente en el hígado, riñón y huesos. La patente de los EE.UU. n.º 6.884.602 indica la expresión de fosfatasa alcalina en levaduras. Cientos de fosfatasas alcalinas microbianas han sido descritas. Véase, por ejemplo, BRENDA: The Comprehensive Enzyme Information System, http://www.brenda-enzymes.org/lp/result_flat.php4?ecno=3.1.3.1. Además, los organismos pueden diseñarse por ingeniería para producir enzimas con propiedades deseadas, tales como el aumento de la actividad. Véase, *por ejemplo*, Du y col. J. Mol. Biol. 316: 941-53 (2002); Dealwis y col., Biochem. 34: 13967-73 (1995); Koutsioulis y col., Protein Eng'g Design & Selection 21: 319-27 (2008).

La invención también proporciona una fosfatasa alcalina de la SEQ ID NO: 1, o una fosfatasa alcalina que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. La siguiente es la SEQ ID NO: 1:

VNKLKGLAIGGIVLAVVSAGTLAVAKENASRAESSNGQSKNLVIGDGMGPAQVSAARYFQQHKNNINSLNLDPPYVVG
 QATTYADRGEDGGHIVSGIVTSSASAGTAFATGNKTYNAAISVSNEDVSRPFASVLEAAELSGKSTGLVTTARITHATPA
 VYASHVRSRDNENAIQYLDSDIGDVLGGGESFFVTKEEKGRNDKNLLPEFEAKGYKVVKTGQSLKSLSAKDAKVLGL
 FGGSHIAYVDRSDETPSLAEMTSKALEILSTNENGFAIMIEGGRIDHAGHANDFPTMVQEALDFDEAFKVAIDFAKKG
 NTSVVVTADHETGGLSLSRDNIYELNVDLWLNKQKNSSELSVLSALNEAKTIADVKKIVSDNTWITDLTNEEAQYILDGDGS
 SYKREGGYNVAVISKRLLVGWSGHGSAVDVGVWAYGPIADKVKQIDNTRIATASAEVLGVDLKKATADLQSKYLYPKFK
 INRNKEVLPFAKPLAEALGGKYQAANGTATISGMSGTITVDLNAKKAKLSGNSSSITIDVDNDVLYLPLTAFSQITGQTL
 KWDALSERIMLK

La invención también proporciona fosfatasa alcalinas que tienen al menos 96, 97, 98 o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. La invención también proporciona composiciones que contienen al menos una de las fosfatasa alcalinas anteriores, así como procedimientos de uso de dicha fosfatasa alcalina para reducir la cantidad de uno o más compuestos perjudiciales presentes o liberados de los residuos animales, aumentar la tasa de conversión de pienso para animales, aumentar la eficiencia de pienso para animales, y/o aumentar la tasa de crecimiento animal.

La identidad de secuencia se refiere a una secuencia que tiene un porcentaje específico de restos de aminoácidos que son iguales (es decir, comparten al menos 70 % de identidad, por ejemplo), cuando se comparan y alinean para obtener una correspondencia máxima en una ventana de comparación, o región designada medida usando algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineación manual e inspección visual.

En realizaciones específicas, los procedimientos comprenden administrar a un animal una cantidad de una enzima, tal como fosfatasa alcalina, eficaz para reducir la cantidad de amoníaco (NH₃) o fósforo presente o liberado de los residuos del animal. La cantidad puede variar dependiendo del animal, la dieta del animal y otros factores, y los expertos en la técnica pueden determinarla fácilmente usando procedimientos conocidos en la técnica e ilustrados en los ejemplos. Por ejemplo, la cantidad de amoníaco (NH₃) y/o fósforo presente o liberado de los residuos animales cuando los animales dados se desarrollan en condiciones dadas puede medirse y compararse con el presente o liberado de los residuos animales de animales desarrollados en condiciones comparables, pero también administrarse una cantidad de la enzima, tal como la fosfatasa alcalina. (En este sentido, puede ser ventajoso comparar animales tratados y de control de la misma edad, ya que las propiedades del estiércol pueden cambiar con la edad, como se analiza en los ejemplos a continuación). Una disminución en el amoníaco de estiércol (NH₃) y/o el contenido o liberación de fósforo asociada con la administración de la enzima indica que se administró una cantidad efectiva de enzima.

La enzima típicamente se administra por vía oral. Sin embargo, la invención también abarca realizaciones en las que la enzima se administra por otras vías a los intestinos o tracto digestivo, de acuerdo con prácticas conocidas, tales como a través de supositorios.

La enzima puede proporcionarse en cualquier forma adecuada para la administración oral, tal como líquido, sólido, polvo, gel, etc. La enzima puede administrarse sola o puede formularse en cualquier composición adecuada para la administración oral. En algunas realizaciones, la composición que es adecuada para la administración oral se reconoce generalmente como segura para la administración oral a un animal. Por ejemplo, una composición que es adecuada para la administración oral puede contener solo ingredientes, y cantidades de dichos ingredientes, que generalmente se reconocen como seguros para la administración oral a un animal, y no contiene ningún ingrediente o cantidad de dichos ingredientes, que generalmente no se reconocen como seguros para la administración oral a un animal. Además, o como alternativa, una composición que es adecuada para la administración oral solo contiene ingredientes y cantidades de dichos ingredientes, que están permitidos, o que no están prohibidos, para la administración oral a un animal, y no contiene ningún ingrediente, o cantidades de dichos ingredientes, que no están permitidos, o que están prohibidos, para la administración oral a un animal.

En algunas realizaciones, la composición comprende un portador aceptable por vía oral para la enzima. Como se usa en el presente documento, "portador aceptable por vía oral" incluye cualquier portador fisiológicamente aceptable adecuado para la administración oral. Los portadores aceptables por vía oral incluyen, sin limitación, composiciones de pienso para animales, composiciones acuosas y composiciones líquidas y sólidas adecuadas para su uso en productos de pienso para animales y/o para la administración oral a un animal, incluyendo aditivos de piensos para animales líquidos y sólidos. Los portadores adecuados son conocidos en la técnica, e incluyen los descritos en la patente de los EE.UU. n.º 6.780.628.

En algunas realizaciones, la composición es un pienso para animales. Como se usa en el presente documento, la expresión "pienso para animales" tiene su significado convencional en el campo de la cría de animales. Por ejemplo, el pienso para animales incluye materiales comestibles que el ganado consume por su valor nutricional. El pienso para animales incluye raciones de pienso, *por ejemplo*, composiciones que cumplen con los requisitos nutricionales de un animal, y también incluyen composiciones que no cumplen con los requisitos nutricionales de un animal. En algunas realizaciones, el pienso para animales es un pienso de iniciación, formulado para su uso durante el período de iniciación. En otras realizaciones, el pienso para animales es un pienso de crecimiento, formulado para su uso durante el período de crecimiento. En otras realizaciones, el pienso para animales es un pienso de finalización usado en el período de finalización.

En ejemplos específicos de una realización de pienso para animales, la cantidad de enzima (tal como la fosfatasa alcalina) es de al menos aproximadamente 10.000 unidades internacionales (UI) por tonelada de pienso de EE. UU., Al menos aproximadamente 15.000 unidades internacionales (UI) por tonelada de pienso de EE. UU., al menos aproximadamente 20.000 unidades internacionales (UI) por tonelada de pienso de EE. UU., al menos aproximadamente 25.000 unidades internacionales (UI) por tonelada de pienso de EE. UU., al menos aproximadamente 30.000 unidades internacionales (UI) por tonelada de pienso de EE. UU., al menos aproximadamente 35.000 unidades internacionales (UI) por tonelada de pienso de EE. UU., al menos aproximadamente 40.000 unidades internacionales (UI) por tonelada de pienso de EE. UU., al menos

aproximadamente 45.000 unidades internacionales (UI) por tonelada de pienso de EE. UU., al menos aproximadamente 50.000 unidades internacionales (UI) por tonelada de pienso de EE. UU., al menos aproximadamente 60.000 UI por tonelada de pienso, al menos aproximadamente 70.000 UI por tonelada de pienso, al menos aproximadamente 80.000 UI por tonelada de pienso, al menos aproximadamente 90.000 UI por tonelada de pienso, al menos aproximadamente 100.000 UI por tonelada de pienso, al menos aproximadamente 200.000 UI por tonelada de pienso, al menos aproximadamente 500.000 UI por tonelada de pienso, o al menos aproximadamente 3.000.000 UI por tonelada de pienso o superior.

En algunas realizaciones, la cantidad de enzima está en el intervalo de aproximadamente 25 a aproximadamente 75 MU/tonelada (MU = 124.000 UI). En algunas realizaciones, la cantidad de enzima es de al menos aproximadamente 2 MU/tonelada (240.000 UI /tonelada o 264 UI/kg).

En otros ejemplos específicos de realizaciones de piensos para animales, la cantidad de enzima (tal como la fosfatasa alcalina) es de al menos aproximadamente 10 UI/kg de pienso al menos aproximadamente 15 UI/kg de pienso, al menos aproximadamente 20 UI/kg de pienso, tal como al menos 20 UI/kg de pienso, al menos de 25 UI/kg de pienso, al menos 30 UI/kg de pienso, al menos 35 UI/kg de pienso, al menos de 40 UI/kg de pienso, al menos de 45 UI/kg de pienso, al menos 50 UI/kg de pienso, al menos 550 UI/kg o más.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, la invención proporciona un pienso para animales que comprende una cantidad de una enzima, tal como fosfatasa alcalina, que es eficaz para reducir la cantidad de un compuesto perjudicial, tal como amoníaco (NH₃) y/o fósforo, presente o liberado de los residuos animales, y/o para aumentar la digestión de fósforo.

La composición del pienso puede prepararse por procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la enzima se puede añadir a los otros ingredientes del pienso en cualquier etapa durante el procedimiento de fabricación, según lo consideren apropiados los expertos en la técnica. En una realización, la enzima se proporciona como una solución, tal como un concentrado de enzima líquido que se añade a otros ingredientes del pienso durante el procedimiento de fabricación. Como alternativa, una solución que contiene enzima se pulveriza sobre una forma sustancialmente final del pienso animal. En otra realización, la enzima se proporciona como una composición sólida (como un polvo), tal como una composición sólida que se añade a otros ingredientes del pienso durante el procedimiento de fabricación. Los procedimientos ejemplares para la fabricación de piensos que contienen enzimas se describen en el documento WO 97/41739.

En algunas realizaciones, la composición es distinta de un pienso para animales. Por ejemplo, la composición puede ser una composición líquida distinta de un pienso para animales o una composición sólida distinta de un pienso para animales. Dichas composiciones pueden ser adecuadas para la administración directa a un animal o pueden usarse como aditivos para piensos (p. ej., añadidos a los piensos antes de la alimentación) o un suplemento alimenticio (incluidos los suplementos que se diluyen con otros componentes de los piensos antes de la alimentación y los suplementos que se ofrecen a un animal en una elección libre, por separado). Ejemplos de una composición líquida distinta de un pienso para animales incluyen concentrados de enzimas líquidas, que incluyen concentrados de enzimas líquidas que típicamente se diluyen o combinan con otros ingredientes antes de la administración oral a un animal.

En realizaciones en las que la composición es una composición líquida distinta de un pienso para animales, tal como una solución enzimática, la composición o solución líquida puede comprender una enzima (tal como la fosfatasa alcalina) en una cantidad que sea de al menos aproximadamente 40.000 unidades internacionales (UI) por litro de solución, tal como de al menos 40.000 UI/l, al menos 50.000 UI/l, al menos 60.000 UI/l, al menos 70.000 UI/l, al menos 80.000 UI/l, al menos 90.000 UI/l, al menos 100.000 UI/l, al menos aproximadamente 500.000 UI/l, al menos aproximadamente 600.000 UI/l, al menos aproximadamente 700.000 UI/l, al menos aproximadamente 800.000 UI/l, al menos aproximadamente 900.000 UI/l, al menos aproximadamente 1.000.000 UI/l, al menos aproximadamente 2.000.000 UI/l, al menos aproximadamente 5.000.000 UI/l, o al menos aproximadamente 200.000.000 UI/l.

En algunas realizaciones, una cantidad de composición líquida distinta de un pienso para animales, tal como aproximadamente 500 ml o 1000 ml de solución, se aplica o se combina con una cantidad de pienso, tal como a una tonelada de pienso, para llegar a las formulaciones de piensos con los niveles de enzimas descritos anteriormente. En otras realizaciones, una cantidad de composición líquida distinta de un pienso para animales se aplica o se combina con una cantidad de pienso para preparar un pienso para animales con una cantidad de enzima eficaz para reducir la cantidad de un compuesto perjudicial, tal como amoníaco (NH₃) y/o fósforo, presente o liberado de los residuos animales, y/o para aumentar la digestión de fósforo.

En realizaciones en las que la composición es una composición sólida distinta de un pienso para animales, la composición puede comprender una enzima (tal como la fosfatasa alcalina) en una cantidad que sea de al menos aproximadamente 40.000 UI/kg, tal como de al menos 40.000 UI/kg, al menos 50.000 UI/kg, al menos 60.000 UI/kg, al menos 70.000 UI/kg, al menos 80.000 UI/kg, al menos 90.000 UI/kg, al menos 100.000 UI/kg, al menos 120.000 UI/kg, al menos 140.000 UI/kg, al menos 160.000 UI/kg, al menos 180.000 UI/kg, al menos 200.000 UI/kg, o al menos 60.000.000 UI/kg o más.

En algunas realizaciones, una cantidad de una composición sólida distinta de un pienso para animales se aplica o se combina con una cantidad de pienso para llegar a formulaciones de piensos con niveles de enzimas descritos anteriormente. En otras realizaciones, una cantidad de composición sólida distinta de un pienso para animales se combina con una cantidad de pienso para preparar un pienso para animales con una cantidad de enzima eficaz para reducir la cantidad de un compuesto perjudicial, tal como amoníaco (NH₃) y/o fósforo, presente o liberado de los residuos animales, y/o para aumentar la digestión de fósforo.

En otras realizaciones, la enzima se proporciona en forma de cápsula o comprimido para la ingestión oral.

Como es convencional en la técnica, el término "UI" o "unidad internacional" se refiere a una cantidad de enzima que catalizará la transformación de 1 micromol del sustrato por minuto en condiciones que sean óptimas para la enzima. Como se usa en el presente documento, "MU" (millones de unidades de ChemGen) = 120.000 UI. Los equivalentes en peso (1 UI = 8,33 U ChemGen) para muchas enzimas son conocidos en la técnica y se pueden determinar usando ensayos convencionales. Como se conoce en la técnica, la selección de tampones y/o sustratos puede afectar las unidades medidas. Los ensayos convencionales para la actividad de la fosfatasa alcalina son conocidos en la técnica. Véase, *por ejemplo*, Davidson, *Enzyme Microb. Technol.* 1: 9-14 (1979); Gonzalez-Gil y col., *Marine Ecol. Prog. Ser.* 164: 21-35 (1998); Sekiguchi y col., *Enzyme Microb. Technol.* 49: 171-76 (2011); Simpson y col., *Promega Notes* 74: 7-9.

En una realización de la invención, una composición seca de la invención está presente en una cantidad de más de 100 g por tonelada métrica de alimentación completa. En una realización de la invención, una composición seca de la invención está presente en una cantidad de más de 500 g por tonelada métrica de alimentación completa.

En una realización de la invención, una composición seca de la invención está presente en una cantidad de entre 10 g y 30 g por tonelada métrica de premezcla concentrada. En una realización de la invención, una composición seca de la invención está presente en una cantidad de aproximadamente 20 g por tonelada métrica de premezcla concentrada.

En una realización de la invención, una composición líquida de la invención está presente en una cantidad inferior a 100 ml por tonelada métrica de alimentación completa (líquida). En una realización de la invención, una composición líquida de la invención está presente en una cantidad de 50-100 ml por tonelada métrica de alimentación completa (líquida).

Para su uso en cualquier realización de los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento, la enzima, tal como fosfatasa alcalina, puede obtenerse de una fuente comercial. Como alternativa, la enzima (incluida la fosfatasa alcalina) se puede obtener a partir de microorganismos que producen enzimas, tales como bacterias, hongos y levaduras.

Además, la enzima se puede obtener usando procedimientos de tecnología recombinante conocidos en la técnica, mediante, por ejemplo, la obtención por ingeniería genética de una célula huésped para producir una enzima, por ejemplo, causando la transcripción y las traducciones de un gen que codifica la enzima. Usando secuencias de aminoácidos conocidas o secuencias de nucleótidos conocidas que codifican esas secuencias, los expertos en la técnica pueden diseñar genes adecuados para la expresión recombinante de la enzima. Además, o como alternativa, se puede usar una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima conocida, tal como la fosfatasa alcalina, para sondear una biblioteca de ADN para identificar otras secuencias de nucleótidos que codifican enzimas adecuadas para su uso en los procedimientos descritos en el presente documento. Como se conoce en la técnica, dicha biblioteca de ADN puede proceder de un organismo o población de organismos definidos, o puede obtenerse de fuentes naturales y por lo tanto representa el ADN de microorganismos que son difíciles de cultivar.

En cualquier realización de los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento, la enzima, tal como fosfatasa alcalina, puede expresarse por una planta que se usa en piensos para animales. Por ejemplo, el maíz podría modificarse por ingeniería genética para expresar fosfatasa alcalina y el producto de maíz resultante modificado por ingeniería genética podría usarse en la alimentación. La producción también puede efectuarse con otros sistemas modificados por ingeniería genética o modificados clásicamente, tales como bacterias, *por ejemplo*, *E. coli*, *Bacillus sp.*, *Lactobacillus*; levadura, *por ejemplo*, *Pichia*, *Yarrow*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces (p. ej., Schizosaccharomyces pombe)*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Candida*) y otros hongos, tales como *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Penicillium*, *Penicillium* y *Humicola*. En realizaciones específicas, la enzima, tal como fosfatasa alcalina, se obtiene de *Bacillus lentus*.

En realizaciones en las que una composición comprende una combinación de enzimas, las enzimas pueden producirse individualmente, por organismos separados, o dos o más de las enzimas pueden producirse por un solo organismo. Por ejemplo, un solo organismo puede ser diseñado por ingeniería de manera recombinante para producir dos o más enzimas por procedimientos conocidos en la técnica.

Como se indicó anteriormente, la invención incluye procedimientos para reducir el impacto ambiental de los residuos animales, que comprenden administrar a un animal una cantidad eficaz de una enzima que reduce la cantidad de un compuesto perjudicial presente o liberado de los residuos animales. La invención también incluye procedimientos para reducir la cantidad de amoníaco en los residuos animales, que comprenden administrar a un animal una

cantidad eficaz de una enzima que reduce la cantidad de amoníaco presente o liberado de los residuos animales. La invención también incluye procedimientos para reducir la cantidad de fósforo presente o liberado de los residuos animales, que comprenden administrar a un animal una cantidad eficaz de una enzima que reduce la cantidad de fósforo presente en los residuos animales. La enzima se puede administrar sola o en cualquier composición descrita anteriormente, incluida una composición oral, tal como pienso para animales, una composición líquida distinta de un pienso para animales, o una composición sólida distinta de un pienso para animales. El animal puede ser cualquier animal, incluido un ser humano o un animal productor de carne, y puede ser un animal sano o un animal que padece una infección u otra enfermedad o afección.

En cualquiera de estos procedimientos, la enzima puede administrarse por vía oral y puede ser fosfatasa alcalina.

10 En cualquiera de estos procedimientos, el animal puede ser un animal avícola, tales como pollos, patos, pavos o gansos, o un animal porcino, tal como cerdos o chanchos. En cualquiera de estos procedimientos, la enzima se puede administrar durante una o más de la fase de iniciación, la fase de crecimiento y/o la fase de finalización, o en cualquiera o todas las etapas.

15 En cualquiera de estos procedimientos, la enzima puede formularse en piensos para animales, incluidos en un pienso de iniciación, un pienso de crecimiento o un pienso de finalización. Como alternativa, en cualquiera de estos procedimientos, la enzima puede formularse en un aditivo de pienso para animales.

20 Como se indicó anteriormente, la invención también incluye composiciones adecuadas para la administración oral a un animal, que comprenden una cantidad eficaz de una enzima que reduce la cantidad de un compuesto perjudicial presente o liberado de los residuos animales. La invención también incluye composiciones adecuadas para la administración oral a un animal, que comprenden una cantidad eficaz de una enzima que reduce la cantidad de amoníaco presente o liberado de los residuos animales. La invención también incluye composiciones adecuadas para la administración oral a un animal, que comprenden una cantidad eficaz de una enzima que reduce la cantidad de fósforo presente o liberado de los residuos animales. En cualquiera de estas composiciones, la composición puede comprender un portador aceptable por vía oral para la enzima. Como se indicó anteriormente, la cantidad eficaz de enzima puede variar de un animal a otro, y de una enzima a otra, pero puede determinarse fácilmente por los expertos en la técnica, como se describió anteriormente y se ilustra en el ejemplo 3.

En cualquiera de estas composiciones, la enzima se puede ser fosfatasa alcalina.

En cualquiera de estas composiciones, la composición puede ser adecuada para la administración a aves de corral, tales como pollos, patos, pavos o gansos, o a ganado porcino, tal como cerdos o chanchos.

30 En cualquiera de estas composiciones, la composición puede ser un pienso para animales, tal como una dieta de piensos de iniciación o una dieta de piensos de crecimiento. Como alternativa, en cualquiera de estas composiciones, la composición puede ser un aditivo de pienso para animales.

35 En cualquier realización de la invención, se pueden emplear uno o más principios activos adicionales. Un ejemplo de un principio activo adicional es otra enzima, que puede tener las mismas o diferentes propiedades de las enzimas de la invención.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención, pero la invención no se limita a las realizaciones ejemplificadas específicamente.

EJEMPLO 1

40 Las emisiones de amoníaco (NH₃) de las muestras de estiércol de pollos de engorde de dos tratamientos con aditivos (mananasa HT- "HT" y fosfatasa alcalina "FA") se evaluaron durante un período de crecimiento de 6 semanas. La mananasa HT se añadió a 60 MU/tonelada (240.000 UI/tonelada) y la FA se añadió a un promedio de 141 MU/tonelada. Se midió e indicó el consumo de pienso y agua, la producción de estiércol y la conversión de piensos de los pollos de engorde de tres tratamientos (incluido el control). Se analizó el contenido de nitrógeno, el contenido de humedad y el pH de las muestras de estiércol fresco. El experimento se realizó en vasos de emisión con temperatura del aire y tasa de ventilación controladas.

Se demostró que los aditivos de alimentación para aves de engorde tienen el siguiente impacto en las emisiones gaseosas y el rendimiento de la producción:

50 (a) No hubo diferencia significativa en el consumo de pienso, la conversión de pienso, el contenido de humedad del estiércol y el pH observado para los pollos de engorde alimentados con HT o FA en comparación con las aves alimentadas con la dieta de control, aunque el estiércol de la dieta FA mostró un pH más bajo que el estiércol del grupo de control.

(b) No hubo diferencia en la tasa de emisión (ER) de NH₃ y en la emisión acumulada entre HT y los grupos de control.

55 (c) Los pollos de engorde alimentados con la dieta FA tendieron a tener menos emisiones de NH₃ que los pollos de engorde alimentados con las dietas de control y HT.

(d) La ER NH₃ cambió radicalmente y aumentó exponencialmente de 28 y 42 días.

(e) La eficacia de ER NH₃ en la dieta FA tendía a ser dependiente de la edad durante los tres períodos de prueba.

5 (t) Las tasas globales de ER NH₃ para los períodos de almacenamiento de 5 días fueron del -7,4 % de las aves de 35 días y del 42,2 % de las aves de 28 días en el grupo FA.

Materiales y procedimientos

10 Ciento diecisiete pollos Ross 708 hembras de 1 día de edad se distribuyeron por igual en tres criaderos de pollos (2,2 m x 2,2 m, A x L). Las aves en cada criadero de pollos con un solo corral se vacunaron con la vacuna viva *Coccidia* a la edad de 4 días y tuvieron acceso a agua y a una de las tres dietas experimentales (dieta de iniciación con HT, MT o control). Los criaderos de pollos tenían la misma configuración de temperatura y programa de iluminación. Después de la edad de 20 días, 96 aves se transfirieron a jaulas de crecimiento en un galpón avícola ventilado (2,7 m x 2,7 m, A x L) y se alojaron en grupos de ocho por jaula (0,76 m X 1,5 m, A. X L).

15 Tres dietas de crecimiento fueron alimentadas continuamente a las aves para el crecimiento. Las ocho aves en cada jaula fueron todas de uno de tres tratamientos. Después de la edad de 35 días, se dejaron seis aves en cada jaula para cumplir con las normas de bienestar animal. Un total de doce jaulas fueron asignadas al azar a tres dietas para minimizar el efecto de ubicación. El estiércol fresco de las aves en cada jaula se recolectó con recipientes de estiércol para evaluar y analizar las emisiones de NH₃ durante cinco días en los días 23, 28, 35 y 42.

20 Se usaron doce vasos de emisión (VE) de 19 litros para llevar a cabo la evaluación. Se recogieron doce muestras de estiércol de cada lote y las muestras de estiércol de 1 kg se colocaron al azar en los doce VE con un área de superficie de 324 cm² de cada muestra y se midieron para determinar las emisiones gaseosas durante un período de 5 días con una temperatura del aire a 20 °C y un caudal de aire de 3 l/min. Tanto la entrada como la salida de aire estaban ubicadas en la tapa hermética. Se usaron tubos de teflón (2,9 m o 0,635 cm de diámetro) en el sistema de vasos de emisión. Los vasos fueron operados bajo presión positiva. Se usó una bomba de diafragma (modelo DDL-80, Gast Inc., Benton Harbor, MI) para suministrar aire fresco a los vasos de emisión. El caudal del aire de suministro fresco se controló y se midió con un controlador de flujo de masa de aire (0 a 100 LPM, con partes húmedas de acero inoxidable, Aalborg, Orangeburg, NY). El suministro de aire se conectó a un colector de distribución en el que el aire se dividió a través de doce medidores de flujo idénticos (0,2 a 5 LPM, válvula de acero inoxidable, Dwyer Instruments, Inc., Michigan City, IN). Cada vaso estaba equipado con un pequeño ventilador de agitación (12VDC) ubicado a 5 cm debajo de la tapa de 1,5 para una mezcla uniforme del espacio de cabeza. El gas agotado de los vasos se conectó a una tubería de PVC común de 3,75 cm que se dirigía a la salida de ventilación del edificio. Las muestras del gas de escape de cada uno de los doce vasos y el aire de suministro se tomaron y analizaron secuencialmente a intervalos de 5 minutos, con los primeros 3 minutos para la estabilización y los últimos 2 minutos para la medición. Esto produjo un ciclo de medición de 65 minutos para cada vaso. El muestreo secuencial se logró mediante el funcionamiento controlado de doce válvulas solenoides (tipo 6014, 24 V, cuerpo de válvula de acero inoxidable, Burkert, Irvine, CA). La concentración de NH₃ se midió con un analizador de gases múltiples fotoacústico (INNOVA 1412, INNOVA, Dinamarca) que se desafió semanalmente y se calibró según sea necesario con cero, y gases de calibración de NH₃. La temperatura del aire se midió con termopares de tipo T (resolución de 0,25 °C). Se tomaron muestras de las salidas analógicas del termopar, del analizador de gases múltiples y del medidor de flujo másico en intervalos de 1 segundo y se registraron a intervalos de 1 minuto en una unidad de control y medición (USC-2416, Measurement Computing Corp., Norton, MA).

40 Se usaron siete semanas para completar las mediciones de emisión. Se enviaron muestras de estiércol congelado (0,11 kg/muestra) a un laboratorio de análisis de suelos y agua en la Universidad de Delaware para el análisis de nutrientes y propiedades del estiércol, que incluye nitrógeno total de Kjeldahl (TKN), nitrógeno amoniacal, humedad y pH. El análisis estadístico se realizó usando JMP 9.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC). El efecto dietético se consideró significativo a un valor de P ≤ 0,05.

Rendimientos de producción y propiedades del estiércol

Los rendimientos de producción y las propiedades de estiércol fresco de los pollos de engorde de las tres dietas se muestran en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Propiedades del estiércol (media y error estándar) de los pollos de engorde con tres dietas de mananasa HT, B: fosfatasa alcalina (FA) y Ctrl: Control (n=4).

Edad de las aves	Trt#		CH*, %	NH ₄ ⁺ -N, % (MS)	NO ₃ ⁻ -N (MS)	TKN, % (MS)	pH
23 d	A	Media	75,5	0,30	0,07	5,41	5,16
		EE	1,1	0,06	0,01	0,35	0,07
	B	Media	75,6	0,30	0,07	5,20	5,25

ES 2 710 663 T3

(continuación)

Edad de las aves	Trt#		CH*, %	NH ₄ ⁺ -N, % (MS)	NO ₃ ⁻ -N (MS)	TKN, % (MS)	pH	
28 d	Ctrl	EE	0,7	0,04	0,02	0,28	0,05	
		Media	74,1	0,33	0,07	5,38	5,46	
		EE	0,4	0,02	0,03	0,16	0,26	
	A	Media	73,2	0,33	0,08	6,31	5,35	
		EE	2,2	0,03	0,03	0,30	0,11	
	B	Media	73,6	0,35	0,04	5,52	5,31	
		EE	2,8	0,03	0,02	0,44	0,10	
	Ctrl	Media	72,9	0,42	0,12	5,77	5,40	
		EE	3,0	0,09	0,10	0,21	0,12	
	35 d	A	Media	73,9	0,73	0,12	6,99	5,69
			EE	1,0	0,10	0,05	0,29	0,07
		B	Media	76,3	0,82	0,09	7,29	5,57
EE			0,9	0,08	0,03	0,23	0,17	
Ctrl		Media	76,7	0,91	0,07	7,06	5,90	
		EE	0,9	0,09	0,01	0,36	0,10	
42 d	A	Media	79,1	1,18	0,09	8,68	6,37	
		EE	0,7	0,16	0,04	0,26	0,13	
	B	Media	79,5	1,61	0,03	8,41	6,38	
		EE	0,5	0,41	0,01	0,30	0,14	
	Ctrl	Media	78,5	1,44	0,07	7,66	6,55	
		EE	1,8	0,50	0,03	0,80	0,17	

#A: Mananasa HT; B: Fosfatasa alcalina (FA); Ctrl:Control.

*CH: contenido de humedad del estiércol; MS: base de materia seca; TKN: nitrógeno kjedahl total; pH: pH de estiércol fresco.

Tabla 2. Rendimientos de producción (media y error estándar) de pollos de engorde alimentados con tres dietas de A: Mananasa HT, B: fosfatasa alcalina (FA) y Ctrl: Control (n=4).

Edad de las aves	Trt#		Estiércol*, g ave ⁻¹ d ⁻¹	pienso acum.* , kg ave ⁻¹	FCR*	Cuerpo*, kg ave ⁻¹
23 d	A	Media	66,0	1,07	1,44	0,74
		EE	2,0	0,00	0,03	0,02
	B	Media	65,9	1,12	1,45	0,77
		EE	3,6	0,00	0,03	0,02
	Ctrl	Media	64,9	1,10	1,38	0,80
		EE	4,5	0,00	0,03	0,02
28 d	A	Media	147,0	1,87	1,53	1,23
		EE	5,5	0,01	0,05	0,04
	B	Media	145,6	1,93	1,59	1,22
		EE	11,0	0,02	0,01	0,02
	Ctrl	Media	135,3	1,88	1,56	1,21

(continuación)

Edad de las aves	Trt#		Estiércol*, g ave ⁻¹ d ⁻¹	alimento acum.*, kg ave ⁻¹	FCR*	Cuerpo*, kg ave ⁻¹
		EE	8,3	0,02	0,03	0,04
35 d	A	Media	154,2	2,80	1,68	1,67
		EE	12,8	0,02	0,03	0,02
	B	Media	178,4	2,88	1,68	1,72
		EE	10,9	0,02	0,02	0,03
	Ctrl	Media	179,8	2,80	1,65	1,70
		EE	14,5	0,03	0,01	0,03
42 d	A	Media	208,8	3,71	1,63	2,27
		EE	7,0	0,02	0,01	0,01
	B	Media	234,2	3,79	1,67	2,27
		EE	20,7	0,02	0,01	0,01
	Ctrl	Media	216,4	3,72	1,64	2,28
		EE	12,9	0,03	0,03	0,06

#A: Mananasa HT; B: Fosfatasa alcalina (FA); Ctrl:Control.

*CH: contenido de humedad del estiércol; Estiércol: tasa de producción de estiércol fresco; pienso acum.: consumo acumulado de pienso;

FCR: relación de conversión de pienso; Cuerpo: peso corporal del ave.

No hubo diferencias significativas entre las tres dietas para los rendimientos de producción y las propiedades del estiércol (P a 0,05). Los contenidos de nitrógeno (nitrógeno amoniacal: NH₄⁺-N y nitrógeno Kjeldahl total: TKN) de las tres dietas se encontraron en niveles similares (P>0,28). Hubo una tendencia a que las dietas HT y FA tuvieran un pH de estiércol ligeramente más bajo durante el crecimiento. El estiércol fresco de las aves más jóvenes era más ácido que el de las aves más viejas.

Emisión y reducción de amoníaco

La ER diaria de NH₃ y las emisiones acumuladas durante un período de almacenamiento de 5 días para las tres dietas se resumen y muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Media (error estándar) de la tasa diaria de amoníaco (mg ave⁻¹ d⁻¹) y las emisiones acumuladas (mg ave⁻¹) del estiércol de pollos de engorde durante un período de almacenamiento de 5 días (n=4) con 10 cambios de aire por hora (CAH) a 20 °C.

Edad	Trt		ER diaria, mg ave ⁻¹ d ⁻¹					Emisión acumulada, mg ave ⁻¹				
			Tiempo de almacenamiento, día									
			1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
23 d	A	Media	0,07	0,53	3,16	6,72	8,50	0,07	0,61	3,77	10,5	19,0
		EE	0,01	0,21	0,91	1,06	0,76	0,01	0,24	1,14	2,17	2,85
	B	Media	0,06	0,26	1,29	3,20	5,25	0,06	0,32*	1,61*	4,81	10,1
		EE	0,00	0,07	0,41	1,07	1,40	0,00	0,07	0,48	1,57	3,00
	Ctrl	Media	0,13	0,53	3,13	5,42	7,11	0,13	0,67	3,80	9,22	16,3
		EE	0,02	0,13	0,83	0,95	0,88	0,00	0,07	0,47	1,55	2,98
28 d	A	Media	0,26	1,23	5,10	10,9	17,4	0,26	1,49	6,60	17,5	34,9
		EE	0,02	0,24	1,28	2,32	2,92	0,02	0,31	1,65	4,04	7,04
	B	Media	0,27	1,01	2,60	4,97*	10,2*	0,27	1,29	3,88	8,86	19,0

(continuación)

Edad	Trt	ER diaria, mg ave ⁻¹ d ⁻¹					Emisión acumulada, mg ave ⁻¹						
		Tiempo de almacenamiento, día											
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	
35 d	Ctrl	EE	0,04	0,22	1,27	2,58	3,10	0,03	0,29	1,61	4,29	7,42	
		Media	0,27	1,53	4,10	8,37	18,6	0,27	1,79	5,90	14,3	32,9	
		EE	0,03	0,58	2,25	2,98	2,44	0,03	0,66	2,64	5,22	6,73	
	A	Media	3,27	21,4	36,0	48,2	62,7	3,27	24,7	60,7	108,9	171,6	
		EE	1,30	5,91	7,85	9,68	13,7	1,21	7,47	15,2	25,1	38,9	
		Media	2,70	18,2	36,2	52,0	68,7	2,70	20,9	57,1	109,1	177,9	
	B	EE	0,79	3,59	7,64	14,5	22,8	0,75	4,66	12,7	28,2	51,2	
		Media	9,82	33,9	37,6	39,3	44,8	9,82	43,7	81,4	120,7	165,6	
		EE	3,31	4,08	1,92	1,91	2,18	3,35	7,29	8,91	9,9	10,7	
	42 d	A	Media	13,8	46,9	66,9	77,1	81,4	13,8	60,7	127,6	204,7	286,1
			EE	3,62	6,80	6,61	6,61	10,8	2,04	3,66	10,7	25,4	40,3
		B	Media	15,1	43,8	47,9	57,3	62,3	15,1	58,9	106,8	164,1	226,4
EE			4,50	7,82	6,66	8,81	11,4	4,57	9,91	22,1	41,1	62,3	
Ctrl		Media	23,0	48,2	60,9	63,3	63,7	23,0	71,2	132,1	195,4	259,1	
		EE	9,84	11,0	9,51	9,67	11,5	10,1	20,8	30,0	38,2	47,1	

Las ER NH₃ eran las más bajas durante el período de almacenamiento de 5 días para la dieta de FA en los 23 y 28 días. No hubo diferencia en la ER NH₃ y en la emisión acumulada entre HT y las dietas de control. Hubo algunas diferencias significativas entre las dietas de control y FA (P<0,05). Por ejemplo, las ER NH₃ en el 4º y 5º día de las aves de 28 días fueron significativamente inferiores (P=0,02). La ER NH₃ cambió radicalmente y aumentó exponencialmente en los 28 y 42 días. Por ejemplo, la ER de las aves de 35 días en el 2º día del almacenamiento de 5 días fue de 18,2 mg/ave/día, que fue mucho más alta que la ER (1,01 mg/ave/día) de las aves de 28 días. Este cambio podría estar relacionado con la tendencia creciente del pH del estiércol de menos de 5,5 a 6,5. El N amoniacal se encuentra en forma de NH₄⁺, que no es volátil con un pH bajo.

La eficacia de la reducción de la emisión de NH₃ por la dieta FA tendía a ser dependiente de la edad durante el período de prueba. La eficacia de la reducción de la emisión de NH₃ por la dieta FA disminuyó con el aumento de la edad de las aves (Tabla 4).

Tabla 4. Tasa de reducción (porcentaje) de las emisiones acumuladas de amoníaco durante un período de almacenamiento de 5 días (n=4)

Tratamiento	Edad de las aves	Tiempo de almacenamiento, día				
		1	2	3	4	5
A	23 d	46,8	9,4	0,9	-13,8	-16,3
	28 d	1,7	16,8	-11,9	-22,7	-6,0
	35 d	66,7	43,5	25,4	9,8	-3,6
	42 d	39,8	14,7	3,4	-4,8	-10,4
B	23 d	56,8	52,9	57,7	47,9	38,4
	28 d	-2,1	28,2	34,1	37,9	42,2
	35 d	72,6	52,2	29,8	9,6	-7,4
	42 d	34,2	17,2	19,1	16,0	12,6

En comparación, la reducción de ER NH₃ varió de 57,7 % en las aves de 23 días, a 19,1 % en las aves de 42 días para la dieta FA después del tiempo de almacenamiento. Las tasas globales de reducción de emisiones de NH₃ para el período de 5 días fueron del -7,4 % en las aves de 35 días y del 42,2 % en las aves de 28 días para los regímenes FA.

5 El resultado de la eficacia dietética variable podría deberse a cambios en las propiedades del estiércol, especialmente el contenido de humedad y el pH, ya que las actividades microbianas variaron considerablemente. Bajo la condición de producción, los criaderos de pollos de engorde con aves jóvenes tienden a tener una mayor concentración de NH₃ a nivel de las aves debido a la ventilación limitada, conservando la energía de calefacción y disminuyendo el uso del gas. La reducción de las emisiones de NH₃ de los criaderos de pollos de engorde con aves jóvenes ayudará a establecer bandadas saludables y reducirá el riesgo de brotes de enfermedades relacionadas con la alta concentración de NH₃.

EJEMPLO 2

15 En este estudio, se evaluaron las emisiones de amoníaco (NH₃) de los pollos de engorde alimentados con un aditivo alimentario enzimático (fosfatasa alcalina-FA) durante un período de crecimiento de 30 días. Los pollos de engorde se criaron sobre virutas de madera hasta los 12 días de edad y se trasladaron a las jaulas para el resto del crecimiento. El estiércol fresco se recolectó los días 14, 22 y 30 y se analizó la emisión de NH₃ en vasos de emisión con temperatura de aire y tasa de ventilación controladas. Se midió e indicó el consumo de pienso y agua, la producción de estiércol y la conversión de piensos de los pollos de engorde. Se analizó el contenido de nutrientes, la humedad y el pH de las muestras de estiércol fresco. Se demostró que la alimentación de aditivos enzimáticos a 20 aves de engorde tiene el siguiente impacto en las emisiones gaseosas y el rendimiento de la producción:

- (a) La dieta FA mejoró el crecimiento de pollos de engorde y la relación de conversión de pienso a las edades de 22 y 30 días.
 - (b) La dieta FA redujo el pH del estiércol a los 22 días y redujo el fósforo en 6 y 7 % a los 14 y 22 días
 - (c) La emisión de NH₃ se redujo significativamente en un 23,8 % durante un período de 4 días a los 14 días.
- 25 Las tasas globales de reducción de emisiones de NH₃ para el período de 4 días fueron del 5,9 % en las aves de 30 días y del 30,7 % en las aves de 22 días.

Materiales y procedimientos

30 Se usaron cuatro galpones de temperatura controlada (2,2 m x 2,2 m, A x L) con virutas de madera nuevas para la crianza. Cada criadero de pollos estaba equipado con un calentador de espacio de 1,5 kw y una lámpara de calor de 150 W con un bebedor de cubeta (0,3 m de diámetro) y un alimentador (0,3 m de diámetro). Se recolectaron dos grupos (con 3 días de diferencia) de pollitos hembra Ross 708 hembra de 148 días de una misma bandada reproductora y se distribuyeron por igual en los dos criaderos de pollos (74 aves por galpón). Las aves en cada criadero de pollos con un solo corral fueron vacunadas con la vacuna viva *Coccidia* y tuvieron acceso a agua y dos dietas experimentales (FA y control) con la FA añadida a 60 MU/tonelada tanto a las dietas de iniciación como a las 35 de crecimiento. Los criaderos de pollos tenían idénticos programas de temperatura e iluminación. Las aves fueron alimentadas a discreción con dos dietas: control y FA. Después de 12 días, los grupos de 12 aves por jaula se transfirieron a jaulas de crecimiento (0,76 m X 0,76 m A X L), en dos galpones idénticos (2,7 m x 2,7 m, A X L), 12 jaulas por galpón. Cada jaula tenía dos bebederos de boquilla, un bebedero de canal (0,063 m x 0,76 m, A x L) y un alimentador de canal (0,13 m x 0,76 m, A x L). El número de aves se redujo a 8 aves por jaula en la edad de 22 días. 40 Se asignaron un total de 24 jaulas a los dos galpones mediante un diseño de bloques al azar para minimizar el efecto del galpón. Las aves en el mismo galpón eran de la misma edad. El programa de iluminación fue de 23:1 hora (claro: oscuro) para el período de crianza y de 24 horas para el resto del crecimiento. La temperatura de cada galpón se midió y registró mediante un registrador de temperatura (HOBO U23, Onset Comp., Pocasset, MA) con intervalos de 5 minutos. Las aves se pesaron los días 0, 12, 14, 22 y 30. El uso de pienso se registró diariamente y se calculó 45 la relación de conversión de pienso (FCR). La dieta de iniciación fue la siguiente:

INGREDIENTE	CANTIDAD
Maíz de EE.UU. n.º 2	1000
Harina de soja Hi Pro 48 % CP	513
Carne ML 55/mezcla 52	110
DDGS	160
Dex panadería	60
colza ML	50
SUB-TOTAL	1893

ES 2 710 663 T3

(continuación)

INGREDIENTE	CANTIDAD
Maíz microlavado	18,05
Caliza	13,00
Fosfato dicálcico 18,5 % P	11,00
Biolis 50 %	7,90
DL-metionina	5,54
S-Carb-30	3,00
Sal	1,20
HyD 83,3	0,60
Cloruro de colina 60 %	1,52
Tmin + EDDI	1,25
Vitaminas 2 veces	0,60
Fitasa cuántica 2500 D	0,44
Mintrex-Cu	0,40
Grasa de aves de corral para mascotas de calidad alimentaria	42,50
PESO TOTAL DEL LOTE	2000,00

La dieta de crecimiento fue la siguiente:

INGREDIENTE	CANTIDAD
Maíz de EE.UU. n.º 2	1000
Harina de soja Hi Pro 48 % CP	513
Carne ML 55/mezcla 52	110
DDGS	160
Dex panadería	60
colza ML	50
SUB-TOTAL	1893
Maíz microlavado	18,05
Caliza	13,00
Fosfato dicálcico 18,5 % P	11,00
Biolis 50 %	7,90
DL-metionina	5,54
S-Carb-30	3,00
Sal	1,20
HyD 83,3	0,60
Cloruro de colina 60 %	1,52
Tmin + EDDI	1,25

(continuación)

INGREDIENTE	CANTIDAD
Vitaminas 2 veces	0,60
Fitasa cuántica 2500 D	0,44
Mintrex-Cu	0,40
Grasa de aves de corral para mascotas de calidad alimentaria	42,50
PESO TOTAL DEL LOTE	2000,00

Se usaron recipientes de estiercol de acero inoxidable para recolectar el estiercol fresco de las jaulas en el bloque 1 en los días 12, 20 y 28, y de las jaulas en el bloque 2 en los días 13, 21 y 29, durante un período de 2 días. Se tomó 1 kg de muestras de estiercol para la prueba de emisión de NH₃ en los días 14, 22 y 30 para el bloque 1 y los días 15, 23 y 31 para el bloque 2, respectivamente. Se almacenaron muestras adicionales de 0,23 kg en un congelador a -20 °C y se enviaron a un laboratorio certificado (Midwest Laboratories, Omaha, NE) para el análisis de nutrientes y propiedades, que incluía nitrógeno total de Kjeldahl (TKN), nitrógeno amoniacal (NH₃-N), fósforo (indicado como P₂O₅), potasio (K₂O), azufre (S), humedad y pH.

Se usaron doce vasos de emisión (VE) de 19 litros para llevar a cabo la evaluación de la emisión de NH₃. Se recogieron doce muestras de estiercol de cada bloque y las muestras de estiercol de 1 kg se colocaron al azar en los doce VE con un área de superficie de 324 cm² de cada muestra y se midieron para determinar las emisiones gaseosas durante un período de 4 días con una temperatura del aire a 24 °C y un caudal de aire de 3 l/min. Tanto la entrada como la salida de aire estaban ubicadas en la tapa hermética. Se usaron tubos de teflón (0,635 cm de diámetro) en el sistema de vasos de emisión. Los vasos fueron operados bajo presión positiva. Se usó una bomba de diafragma (modelo DDL-80, Gast Inc., Benton Harbor, MI) para suministrar aire fresco a los vasos de emisión. El caudal del aire de suministro fresco se controló y se midió con un controlador de flujo de masa de aire (0 a 100 LPM, con partes húmedas de acero inoxidable, Aalborg, Orangeburg, NY). El suministro de aire se conectó a un colector de distribución en el que el aire se dividió a través de doce medidores de flujo idénticos (0,2 a 5 LPM, válvula de acero inoxidable, Dwyer Instruments, Inc., Michigan City, IN). Cada vaso estaba equipado con un pequeño ventilador de agitación (12VDC) ubicado a 5 cm debajo de la tapa para una mezcla uniforme del espacio de cabeza. El gas agotado de los vasos se conectó a una tubería de PVC común de 3,75 cm que se dirigía a la salida de ventilación del edificio. Las muestras del gas de escape de cada uno de los doce vasos, el aire de suministro y el aire ambiente se tomaron y analizaron secuencialmente a intervalos de 5 minutos, con los primeros 3 minutos para la estabilización y los últimos 2 minutos para la medición. Esto produjo un ciclo de medición de 65 minutos para cada vaso. El muestreo secuencial se logró mediante el funcionamiento controlado de doce válvulas solenoides (tipo 6014, 24 V, cuerpo de válvula de acero inoxidable, Burkert, Irvine, CA). La concentración de NH₃ se midió con un analizador de gases múltiples fotoacústico (INNOVA 1412, INNOVA, Dinamarca) que se desafió semanalmente y se calibró según sea necesario con cero, y gases de calibración de NH₃. La temperatura del aire se midió con termopares de tipo T (resolución de 0,25 °C). Se tomaron muestras de las salidas analógicas del termopar, del analizador de gases múltiples y del medidor de flujo másico en intervalos de 1 segundo y se registraron a intervalos de 1 minuto en una unidad de control y medición (USB-2416, Measurement Computing Corp., Norton, MA).

Los datos de los dos bloques a edades similares se agruparon y analizaron para determinar el efecto de la dieta y la edad. Por lo tanto, se usaron tres grupos de edad a los 14, 22 y 30 días para representar de 14 a 15 días, de 22 a 23 días y de 30 a 31 días, respectivamente. El análisis estadístico se realizó usando JMP 9.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC). El efecto dietético se consideró significativo a un valor de P ≤ 0,05.

Rendimientos de producción y propiedades del estiercol

Los rendimientos de producción de los pollos de engorde de las dos dietas se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Rendimientos de producción y propiedades del estiercol (media y error estándar) de pollos de engorde alimentados con dos dietas de Ctrl: Control y Trt: Fosfatasa alcalina (FA) (n=12).

Edad de las aves	Trt#		CH*, %	MS, g ave ⁻¹ d ⁻¹	Estiercol*, g ave ⁻¹ d ⁻¹	pienso acum.*, kg ave ⁻¹	FCR*	Cuerpo*, kg ave ⁻¹
14 d	Ctrl	Media	72,0	16,82	60,2	0,58	1,35	0,43

(continuación)

Edad de las aves	Trt [#]		CH*, %	MS, g ave ⁻¹ d ⁻¹	Estiércol*, g ave ⁻¹ d ⁻¹	pienso acum.*, kg ave ⁻¹	FCR*	Cuerpo*, kg ave ⁻¹
22 d	Trt	EE	0,93	0,78	2,40	0,02	0,05	0,01
		Media	73,0	17,49	65,7	0,60	1,35	0,44
		EE	0,95	0,55	3,15	0,01	0,01	0,00
	Ctrl	Media	73,3	24,5	92,5	1,24	1,42	0,86
		EE	1,14	0,94	3,74	0,03	0,04	0,01
		Media	72,6	24,2	88,9	1,27	1,45	0,88
30 d	Trt	EE	0,95	0,67	2,79	0,02	0,02	0,01
		Media	77,6	33,1	149,8	2,02	1,36	1,48
		EE	0,73	0,71	6,43	0,01	0,01	0,01
	Ctrl	Media	77,5	34,1	153,5	2,01	1,31	1,54
		EE	0,86	0,73	6,10	0,01	0,02	0,02

#Ctrl: Control; Trt: Fosfatasa alcalina (FA).

***CH: contenido de humedad; MS: tasa de producción de estiércol seco: tasa de producción de estiércol fresco; pienso acum.: consumo acumulado de pienso; FCR: relación de conversión de pienso; Cuerpo: peso corporal del ave.**

No hubo diferencias significativas con la dieta FA en la velocidad de producción de estiércol a ninguna edad. Las aves con dieta FA tuvieron una mejor tasa de crecimiento a las edades de 22 y 30 días (P = 0,037 y 0,006). A la edad de 30 días, el grupo FA tuvo mejor FCR (1,31 vs. 1,36) que el grupo de control (P = 0,03).

Las propiedades del estiércol de las dos dietas se presentan en la tabla 6

5 **Tabla 6. Contenido de nutrientes (porcentaje de base de materia seca) y pH (media y error estándar) de estiércol fresco de dos dietas del Ctrl: Control y Trt: Fosfatasa alcalina (FA) (n=12).**

Edad de las aves	Trt [#]		pH	NH ₃ -N*, %	TKN*, %	P ₂ O ₅ *, %	K ₂ O*, %	S*, %
14 d	Ctrl	Media	5,77	0,25	5,29	2,36	2,91	0,62
		EE	0,05	0,01	0,32	0,06	0,06	0,02
	Trt	Media	5,73	0,22	5,09	2,22 ^a	2,89	0,62
		EE	0,13	0,01	0,22	0,04	0,04	0,01
22 d	Ctrl	Media	6,37	0,37	5,46	2,27	2,84	0,61
		EE	0,13	0,03	0,24	0,05	0,05	0,01
	Trt	Media	5,98 ^a	0,30	5,34	2,12 ^a	2,91	0,60
		EE	0,08	0,02	0,15	0,04	0,04	0,01
30 d	Ctrl	Media	6,25	0,75	5,50	2,20	2,81	0,60
		EE	0,15	0,07	0,23	0,05	0,08	0,01
	Trt	Media	6,44	0,69	5,61	2,17	2,74	0,59
		EE	0,17	0,07	0,19	0,06	0,07	0,01

#Ctrl: Control; Trt: Fosfatasa alcalina (FA).

***NH₃-N: nitrógeno amoniacal; TKN: nitrógeno kjedahl total; S: azufre.**

Esto demuestra que la dieta FA redujo el pH del estiércol a los 22 d (P = 0,05) y redujo el fósforo (2,22 vs. 2,36 % y 2,12 vs. 2,27 %) a los 14 días (P = 0,05) y a los 22 días (P = 0,02). Además, existe la tendencia de que la dieta FA podría causar menos NH₃-N y TKN en el estiércol.

10 Estos resultados indican que la dieta FA podría ayudar a los pollos de engorde jóvenes a utilizar y digerir el nitrógeno y el fósforo, lo que conduce a una mejor tasa de crecimiento y menos pérdida de nutrientes por excreción. Tanto el

pH más bajo como el contenido de nitrógeno en el estiércol podrían impedir y evitar la formación de NH₃ gaseoso en el estiércol y reducir la emisión de NH₃.

Emisiones de amoníaco

5 La tasa diaria de emisión (ER) de NH₃ y las emisiones acumuladas durante un período de 4 días para las dos dietas se resumen y muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Media (error estándar) de la tasa diaria de emisión de amoníaco (mg ave⁻¹ d⁻¹) y las emisiones acumuladas (mg ave⁻¹) del estiércol de pollos de engorde durante un período de almacenamiento de 4 días (n=12) con 10 cambios de aire por hora (CAH) a 24 °C.

Edad	Trt		ER diaria, mg ave ⁻¹ d ⁻¹				Emisión acumulada, mg ave ⁻¹			
			Tiempo de almacenamiento, día							
			1	2	3	4	1	2	3	4
14 d	Ctrl	Media	0,82	3,30	5,21	5,99	0,51	3,71	9,64	13,6
		EE	0,24	0,30	0,55	0,59	0,06	0,36	0,92	1,33
	Trt	Media	0,67	2,59*	3,88*	4,48*	0,45	2,95*	7,43*	10,4**
		EE	0,18	0,17	0,36	0,47	0,05	0,32	0,59	0,86
22 d	Ctrl	Media	10,7	17,1	20,8	21,5	6,17	23,3	51,7	68,2
		EE	1,98	3,93	4,26	3,70	2,13	4,73	10,2	13,2
	Trt	Media	6,88	11,8	15,0	15,7	3,84	15,4	35,4	47,3
		EE	1,96	2,26	2,19	1,97	1,23	3,68	6,99	8,59
30 d	Ctrl	Media	19,2	21,5	22,2	22,4	19,6	47,8	79,3	95,2
		EE	3,30	1,53	2,18	2,52	5,47	8,33	8,86	8,83
	Trt	Media	17,6	19,5	21,7	22,3	18,9	44,4	74,0	89,6
		EE	4,98	2,90	1,75	2,24	7,41	12,6	14,0	13,4

10 Las ER NH₃ y las emisiones acumuladas se redujeron significativamente durante el período de almacenamiento de 4 días para la dieta de FA a los 14 días (p ≤0,04). La emisión acumulada de NH₃ del estiércol de pollos de engorde disminuyó un 23,8 % después de un almacenamiento de 4 días por la dieta FA. La tasa de emisión diaria tuvo la misma tendencia decreciente. No hubo diferencias en la ER NH₃ y la emisión acumulada entre las dos dietas a los 22 y 30 días debido a las grandes variaciones. Sin embargo, hay una tendencia a que la dieta FA todavía reduzca la ER y la emisión acumulada a los 22 días (P = 0,1).

15 La tasa de reducción de las emisiones acumuladas con la dieta FA varió de 31 a 38 % a los 22 d (Tabla 8).

Tabla 8. Tasa de reducción (porcentaje) de las emisiones acumuladas de amoníaco durante un período de almacenamiento de 4 días (n=12)

Edad de las aves	Tiempo de almacenamiento, día			
	1	2	3	4
14 d	13,3	20,6	23,0	23,8
22 d	37,8	33,9	31,7	30,7
30 d	3,95	7,24	6,73	5,89

20 La eficacia de la reducción de la emisión de NH₃ por la dieta FA fue dependiente de la edad durante el período de prueba. La edad de las aves afecta significativamente a la emisión de NH₃ debido a un menor contenido de nitrógeno y pH en el estiércol de las aves más jóvenes (P<0,01). Este cambio podría estar relacionado con la tendencia creciente del pH del estiércol de 5,73 a 6,44. El N amoniacal se encuentra en forma de NH₄⁺, que no es volátil con un pH bajo. La temperatura también desempeña un papel importante en la emisión de NH₃ ya que la temperatura repercute directamente en la actividad microbiana y la volatilización de NH₃. El resultado de la eficacia dietética variable podría deberse a cambios en las propiedades del estiércol, especialmente el contenido y el pH, ya que las actividades microbianas variaron considerablemente.

En condiciones de producción, los criaderos de pollos de engorde con aves jóvenes tienden a tener una mayor concentración de NH₃ a nivel de las aves debido a la ventilación limitada. La reducción de las emisiones de NH₃ de los criaderos de pollos de engorde con aves jóvenes ayudará a establecer bandadas saludables y reducirá el riesgo de brotes de enfermedades relacionadas con un alto NH₃.

5 Ejemplo 3

Este estudio se realiza para demostrar que las dietas que contienen fosfatasa alcalina añadida a 36 MU/tonelada en el grupo tratado pueden reducir las emisiones de NH₃ en condiciones comerciales en relación con un control no tratado con FA, verificando la eficacia del aditivo seleccionado del ejemplo 2.

10 Esta prueba de verificación de campo se realizó usando un galpón que mide 48 m x 13,5 m, que se divide en 16 particiones, 6 m x 6 m cada una. Las 6 salas usadas en este estudio se manejaron por separado, pero comparten la misma genética de las aves y la misma etapa de producción, permitiendo una mejor comparación de las seis bandadas de aves con dos dietas diferentes. Tres salas tenían bandadas firmadas al azar con dieta de control, mientras que las otras contenían aves con dieta FA. Los pollos de engorde durante un período de crecimiento de 38 d se criaron en el galpón con el control o tratamiento asignado al azar al galpón. Cada sala tenía una colocación inicial de 530 aves de carrera recta (sexo mixto, Cobb x Cobb) con virutas de madera nuevas. Las salas de producción tienen techos aislados, entradas de aire de caja a lo largo del callejón central, un calentador de incubación (8,8 kw/h), un ventilador centrífugo de 0,3 m y un ventilador de 0,6 m de diámetro ubicado en la pared lateral del galpón. Los controladores ambientales independientes coordinan el control de la temperatura del aire, el funcionamiento del ventilador de ventilación y del calentador, y los programas de iluminación. La temperatura del aire se monitorizó mediante un sensor de temperatura y un registrador (TMC6 y U12, Onset, Pocasset, MA).

20 Se recopilaron los datos de rendimiento de producción para las salas de control y tratamiento, incluido el consumo de pienso peso corporal, la eficiencia del pienso y la mortalidad de las aves. El peso vivo de las aves de cada sala se midió y registró mediante una escala de aves. Las aves fueron alimentadas y la mortalidad fue registrada diariamente. Se usó una estrategia de alimentación de tres fases: de iniciación desde el día cero hasta los 13 d, de crecimiento desde los 14 hasta los 31 d y de finalización desde los 32 hasta los 38 d. La alimentación añadida en cada sala se pesó y se registró. Al final del ensayo, las aves se pesaron de nuevo y se calculó la relación de conversión de pienso (FCR).

25 Se usó un muestreo de aire multipunto (Pak III, CAI, Orange, CA) y un sistema de adquisición de datos (SCADA3000, Sensaphone, Aston, PA) para monitorear las salas de control (Ctrl) y tratamiento (Trt) con un intervalo de 5 segundos. El estado encendido/apagado de cada ventilador fue monitoreado por un relé AC-DC. La presión estática de la sala se midió con un sensor de presión diferencial (T-VER-PXU-L, Onset, Pocasset, MA). Se usó un analizador fotoacústico de múltiples gases (Innova Model 1412, CAI, Orange, CA) para medir las concentraciones de NH₃, el CO₂ y la temperatura del punto de rocío del gas de escape. El analizador Innova 1412 ha demostrado ser altamente preciso, estable y sensible. Las muestras de gas de escape de los ventiladores en cada galpón se tomaron y analizaron para garantizar una buena representación del aire del galpón que se está expulsando a la atmósfera. El puerto de muestreo se colocó entre los dos ventiladores, 1,8 m sobre el piso y 0,6 m separados de la pared. El intervalo de muestreo de aire se estableció en 140 segundos por sala (5 muestras/sala x 28 segundos/muestra). Además de las concentraciones gaseosas, la tasa de ventilación del edificio correspondiente se medirá mediante la calibración *in-situ* de los ventiladores de escape con una unidad FANS y el monitoreo continuo del estado operativo de los ventiladores y la presión estática de la sala (Ecuación 1).

$$VR = a + b \times SP \quad [1]$$

en la que VR = tasa de ventilación del ventilador, m³/h;
a, b = coeficientes de curva del ventilador; y
PE = presión estática, Pa.

45 Se tomaron tres muestras de basura de cada habitación para el análisis químico y de nutrientes, incluido nitrógeno amoniacal (NH₃-N), nitrógeno kjedahl total (TKN), contenido de humedad y pH. La tasa de emisión de NH₃ se calculó con la concentración y la tasa de ventilación [Ecuación 2].

$$ER = VR/n \times (C_e - C_i) \times (17.031 \text{ g/mol}) / (22.414 \text{ L/mol}) \quad [2]$$

50 en la que ER= tasa de emisión, mg/ave-h;
VR= tasa de ventilación, m³/h;
C_e = concentración de NH₃ de escape, ppmv;
C_i = concentración de NH₃ de entrada, ppmv; y n = número de aves por sala.

55 La tasa diaria de emisiones (ER) de NH₃ y las emisiones acumuladas durante el período de crecimiento de 38 d para las dos dietas se calcularon y usaron para el análisis de datos. Los datos de cada dieta se agruparon y analizaron para determinar el efecto de la dieta y la edad. El análisis estadístico se realizó usando JMP 9.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC). La importancia del efecto de la dieta se indicó como ** con valor P ≤ 0,05 y * con valor P ≤ 0,1.

ES 2 710 663 T3

Rendimientos de producción y propiedades del estiércol

Los rendimientos de producción de los pollos de engorde de las dos dietas se muestran en la tabla 9.

Tabla 9

	PC,g/ave	FCR	Habitabilidad, %	NH ₃ -N, %	TKN, %	CH, %	pH
Ctrl	2400	1,70	92,4	1,05	3,62	31,6	7,1
Trt	2421	1,72	91,4	1,13	3,29	33,2	7,3

* PC: peso corporal comercializado del ave; FCR: relación de conversión de pienso; CH: contenido de humedad; TKN: nitrógeno kjedahl total.

5 No hubo diferencias significativas entre las dos dietas sobre el aumento de peso corporal y la habitabilidad. Las aves con dieta FA tuvieron una mejor tasa de crecimiento a las edades de 32 d ($P = 0,08$). Sin embargo, las aves de control tuvieron una FCR más baja que el grupo de tratamiento ($P = 0,002$). Hubo una clara tendencia a que la curva de crecimiento del tratamiento disminuyera, lo que podría deberse al cambio de pienso después de los 31 d de edad. Esto demuestra que no hay diferencia entre las dos dietas en el NH₃-N, TKN, pH y contenido de humedad al final del monitoreo de 38 d.

10 *Emisiones de amoníaco*

La tasa diaria de emisiones (ER) de NH₃ y las emisiones acumuladas durante el período de crecimiento de 38 d para las dos dietas se resumen y muestran en la tabla 10.

Tabla 10

Edad de las aves	ER mg/ave-d				Emisión acumulada, g/ave			
	Media		ee		Media		ee	
	Ctrl	Trt	Ctrl	Trt	Ctrl	Trt	Ctrl	Trt
7	8,71	5,40	1,2	1,2	0,067	0,038	0,01	0,01
8	11,2	6,59	1,6	1,0	0,079	0,045	0,01	0,01
9	9,03	5,01	1,2	0,7	0,089	0,050	0,01	0,01
10	7,30	3,91	1,3	0,4	0,10	0,054	0,01	0,01
11	11,0	7,29	1,1	0,8	0,11	0,062	0,01	0,01
12	10,9	8,81	1,3	1,3	0,12**	0,072	0,01	0,01
13	12,7	9,10	1,7	0,5	0,13**	0,081	0,02	0,01
14	16,7	11,8	3,2	0,5	0,15**	0,094	0,02	0,01
15	17,1*	11,3	2,3	0,8	0,17**	0,11	0,02	0,01
16	20,1	17,1	1,8	1,8	0,19**	0,12	0,02	0,01
17	15,5*	9,07	2,5	1,0	0,21**	0,13	0,02	0,01
18	22,5	14,9	3,8	0,9	0,23**	0,15	0,03	0,01
19	20,2	17,4	3,1	7,0	0,25**	0,17	0,03	0,02
20	45,0	39,4	5,8	0,2	0,30**	0,21	0,03	0,02
21	52,8	34,1	8,9	2,2	0,36**	0,25	0,04	0,02
22	152	148	9,3	2,7	0,52**	0,40	0,04	0,02
23	201	156	19,4	11,1	0,73**	0,57	0,06	0,03
24	272	215	39,7	16,9	1,01**	0,79	0,10	0,03
25	395	327	49,2	35,3	1,42**	1,14	0,14	0,05
26	227	179	21,4	21,3	1,66**	1,32	0,16	0,06
27	292	263	20,1	39,3	1,96**	1,59	0,18	0,10

ES 2 710 663 T3

(continuación)

Edad de las aves	<u>ER mg/ave-d</u>				<u>Emisión acumulada, g/ave</u>			
	Media		ee		Media		ee	
	Ctrl	Trt	Ctrl	Trt	Ctrl	Trt	Ctrl	Trt
28	391	405	6,2	35,4	2,36*	2,01	0,18	0,12
29	384	340	25,9	49,6	2,76*	2,36	0,20	0,17
30	500	514	31,1	62,9	3,27*	2,89	0,22	0,23
31	529	525	36,6	46,7	3,81	3,43	0,25	0,27
32	543	571	27,4	54,5	4,36	4,01	0,27	0,32
33	528	573	37,6	37,1	4,89	4,59	0,28	0,36
34	602	659	11,0	31,5	5,50	5,26	0,29	0,39
35	616	638	20,2	27,4	6,12	5,90	0,31	0,40
36	621	518	59,1	8,0	6,75	6,42	0,35	0,41
37	622	574	11,5	16,4	7,37	7,00	0,36	0,40
38	343	354	20,1	57,7	7,72	7,35	0,37	0,38

*P≤ 0,1; **P≤ 0,05.

Las emisiones de NH₃ de la dieta FA fueron significativamente más bajas que la dieta de control hasta 28 d a un nivel de P≤0,05 y 31 d a un nivel de P≤0,1. La tasa de reducción de emisiones de NH₃ disminuyó del 40 % a los 12 d de edad al 19 % a los 27 d de edad y al 10 % a los 31 d de edad. La tasa de emisión diaria tuvo la misma tendencia decreciente. La prueba de campo muestra los resultados similares de que la eficacia de la reducción de la emisión de NH₃ por la dieta FA fue dependiente de la edad en el estudio de laboratorio anterior (Li, 2011). La edad de las aves afectó significativamente a la emisión de NH₃ debido a un menor contenido de nitrógeno y pH en el estiércol de las aves más jóvenes. Bajo la condición de producción, la basura se reutilizará en los criaderos de pollos de engorde con aves jóvenes que tienden a tener una concentración de NH₃ más alta a nivel de las aves debido a la ventilación limitada. La reducción de las emisiones de NH₃ de los criaderos de pollos de engorde con aves jóvenes reducirá la concentración de NH₃ a nivel de las aves y reducirá el riesgo de brotes de enfermedades relacionadas con la mala calidad del aire con una elevada concentración de NH₃.

Basándose en los ejemplos 2 y 3, se demostró que los aditivos de alimentación FA para aves de engorde tienen el siguiente impacto en las emisiones de NH₃ y el rendimiento de la producción:

- 1) No se observó una diferencia significativa en el peso corporal de las aves, la habitabilidad y las propiedades de la basura de la dieta FA durante el crecimiento de 38 d. Las aves con dieta FA tuvieron mejor tasa de crecimiento. Sin embargo, el grupo de control tenía una mejor relación de conversión de alimentación.
- 2) La dieta FA redujo el pH del estiércol (P=0,05) a los 22 d y redujo el fósforo en 6 y 7 % a los 14 y 22 d (P=0,02). Hubo una tendencia a que la dieta FA pudiera reducir el NH₃-N y TKN en el estiércol.
- 3) La emisión de NH₃ del estiércol fresco se redujo significativamente en un 23,8 % durante un período de 4 d con una dieta FA a los 14 d. La eficacia de la reducción de la emisión de NH₃ por la dieta FA fue dependiente de la edad durante los tres períodos de prueba. Las tasas globales de reducción de emisiones de NH₃ para el período de 4 d fueron del 5,9 % en las aves de 30 d y del 30,7 % en las aves de 22 d.
- 4) La eficacia de la reducción de la emisión de NH₃ en la condición de campo fue dependiente de la edad durante el período de crecimiento de 38 d. La emisión de NH₃ se redujo significativamente en un 19 % a los 27 d de edad y en un 10 % a los 31 d de edad. Las tasas globales de reducción de emisiones de NH₃ para el período de 38 d fueron del 4,7 %.
- 5) Estos resultados indican que la dieta FA podría ayudar a los pollos de engorde jóvenes a utilizar y digerir el nitrógeno y el fósforo, lo que conduce a una mejor tasa de crecimiento y menos pérdida de nutrientes por excreción. Tanto el pH más bajo como el contenido de nitrógeno en el estiércol podrían impedir y evitar la formación de NH₃ gaseoso en el estiércol y reducir la emisión de NH₃.

EJEMPLO 4

Se realizó un ensayo con aumento escalonado de la dosis en pavos. El experimento se diseñó como un diseño de bloques al azar, con cuatro tratamientos dietéticos (control y tres niveles diferentes de fosfatasa alcalina) asignados al azar entre 4 bloques de 12 jaulas de baterías (corrales) cada uno. Los pavos fueron alimentados con estas dietas a discreción hasta 4 semanas. En el día 24 de edad de las aves, se recolectó el estiércol. El estiércol se analizó

ES 2 710 663 T3

como se describe en los ejemplos 1 y 2 anteriores.

Las dietas de prueba incluyeron fosfatasa alcalina en cuatro niveles diferentes: A: 0 (control); B: 22 MU/tonelada de alimentación; C: 49 MU/tonelada de alimentación; y D: 74 MU/tonelada de alimentación (1 MU = 120.000 UI). La dieta fue una típica dieta de iniciación complementada con nutrientes, tal como se muestra a continuación.

Descripción	Dieta de iniciación
Ingredientes	Porcentaje
CARGILSBM	42,414
MAÍZ 2010	34,741
DDGS	6,000
HARINA DE AVES DE CORRAL	5,000
GRASA DE AVES DE CORRAL	3,990
DICALP 18.5	2,959
Celita	2,000
CALIZA	1,200
ALIMET	0,403
MICRO SAL	0,322
LISINA	0,316
CLORURO DE COLINA 60 %	0,192
PREMEZCLA DE MINERALES TRAZA DE NCSU ²	0,200
PREMEZCLA DE VITAMINAS DE NCSU ²	0,150
PREMEZCLA DE SELENITO DE SODIO ¹	0,050
L-TREONINA	0,063
Total %	100,00

¹ La premezcla NaSeO₃ proporcionó 0,3 mg Se/kg de alimentación completa

² Cada kilogramo de premezcla de minerales (inclusión del , 1 %) suministró lo siguiente por kg de alimentación completa: 60 mg Zn como ZnSO₄H₂O; 60 mg Mn como MnSO₄H₂O; 40 mg Fe como FeSO₄H₂O; 5 mg Cu como CuSO₄; 1,25 mg I como Ca(IO₃)₂; 1 mg Co como CoSO₄.

³ Cada kilogramo de premezcla de vitaminas (inclusión del , 1 %) suministró lo siguiente por kg de alimentación completa: vitamina A, 13.200 UI; colecalciferol, 4.000 UI; alfa-tocoferol, 66 UI; niacina, 110 mg; ácido pantoténico, 22 mg; riboflavina, 13,2 mg; piridoxina, 8 mg; menadiona, 4 mg; ácido fólico, 2,2 mg; tiamina, 4 mg; biotina, 0,253 mg; vitamina B12, 0,04 mg; etoxiquina, 100 mg.

5

Nutrientes	Unidad	
Peso	KG	1,0000
MATERIA SECA, %	PCT	90,6418
HARINA DE AVES DE CORRAL, KCAL/KG	KCAL/KG	2950
PROTEÍNA BRUTA, %	PCT	28,50
HUMEDAD, %	PCT	9,36
GRASA BRUTA, %	PCT	6,88
FIBRA BRUTA, % %	PCT	2,59
CALCIO, %	PCT	1,45
FÓSFORO TOTAL, %	PCT	1,062

(continuación)

Nutrientes	Unidad	
FÓSFORO DISPON. DE AVE DE CORRAL	PCT	0,800
SODIO, %	PCT	0,180
POTASIO, %	PCT	1,290
CLORURO, %	PCT	0,324
Na+K-Cl, MEQ/KG	MEQ/KG	317,23
ARGININA, %	PCT	1,9236
ARG DIG. DE PAVO, %	PCT	1,8287
LISINA, %	PCT	1,8500
LIS. DIG. DE PAVO, %	PCT	1,6924
METIONINA, %	PCT	0,8165
MET. DIG. DE PAVO, %	PCT	0,7390
MET+CIS, %	PCT	1,2500
TSAA DIG. DE PAVO, %	PCT	0,9767
TREONINA %	PCT	1,1500
THR DIG. DE PAVO, %	PCT	0,9487
TRIPTÓFANO, %	PCT	0,3244
TRP DE DIG. DE PAVO, %	PCT	0,2820
COLINA, MG/KG	MG/KG	2720,0000

Los datos muestran una relación dosis-respuesta a través de las dietas A, B y D. Los resultados obtenidos con la dieta C no se ajustaron a la relación dosis-respuesta, pero aún demostraron una reducción de ER NH₃ en comparación con el control.

Propiedades del estiércol

- 5 No hubo una diferencia significativa entre las tres dietas FA para las propiedades del estiércol (P a 0,05). Sin embargo, hubo una tendencia a que las dietas B, C y D con FA tuvieran un pH y TKN de estiércol más bajos, lo que podría cambiar el metabolismo y el crecimiento de las poblaciones bacterianas y causar menos formación y volatilización de NH₃. El estiércol fresco de la dieta D tuvo el pH más bajo de 5,83 en comparación con 6,37, 6,15 y 6,38 de las dietas A, B y C, respectivamente. Los TKN de B, C y D fueron 2,45, 2,38 y 2,57 %, que fueron más bajos que el 3,61 % de la dieta A.

Emisión y reducción de amoníaco

- 15 Las ER NH₃ de la dieta D fueron las más bajas durante el período de almacenamiento de 7 d. No hubo diferencia en la ER NH₃ y la emisión acumulada entre las cuatro dietas (P>0,05) debido a la gran variación. La gran variación de las emisiones de NH₃ podrían deberse al contenido de humedad de las muestras de estiércol. El contenido de humedad del estiércol de las 48 muestras varió de 54 a 83 %. Aunque el efecto de la dieta no es significativo, los resultados aún ponen de manifiesto que la emisión de NH₃ podría reducirse mientras se comparaban los valores medios de emisión. La reducción global de ER NH₃ varió de 6,5 a 40 % para las dietas B (20,6 %), C (6,5 %) y D (40 %) en comparación con la dieta A después del tiempo de almacenamiento de 7 d. El resultado de la eficacia dietética variable podría deberse a cambios en las propiedades del estiércol, especialmente el contenido de humedad y el pH, ya que las actividades microbianas variaron considerablemente. Bajo la condición de producción comercial, la gran variación de la emisión de NH₃ entre el estiércol con diferente nivel de humedad podría ser cancelada. Se sugirió que las muestras de estiércol deberían ser más uniformes y la recolección de las muestras de estiércol debería realizarse con más cuidado.

- 25 En resumen, se demostró que los aditivos de alimentación para pavos tienen el siguiente impacto en las emisiones de amoníaco y en las propiedades del estiércol:

- 1) El estiércol en las dietas B, C y D (con FA) mostró un pH y un contenido de nitrógeno total más bajos que la dieta A (control).
- 2) No hubo diferencia significativa en la ER NH₃ y la emisión acumulada entre las cuatro dietas debido a la gran variación causada por el gran intervalo de contenido de humedad de estiércol. Los pavos con dietas B, C y D (FA) tendieron a tener menos emisiones de NH₃ que la dieta A (control).
- 3) Las tasas globales de reducción de emisiones de NH₃ para el período de 7 d fueron del -6,5 % en la dieta C y del 40 % para la dieta D.

Ejemplo 5

La transición de un cerdo lactante al pienso seco al destete es un momento muy estresante en la vida del cerdo. Además de adaptarse a un nuevo régimen dietético, el cerdo debe adaptarse a una nueva estructura de alimentación grupal y al potencial desafío de la enfermedad para su sistema inmunológico.

Otro desafío para el productor de carne de cerdo son las regulaciones ambientales que se centran actualmente en el balance de nutrientes de toda la granja, especialmente en los nutrientes que pueden tener un impacto en la calidad del agua. El fósforo, en particular, es un nutriente que se excreta en el estiércol en cantidades excesivas y se ha convertido en el nutriente limitante que determina la cantidad de estiércol que se puede aplicar a las tierras de cultivo. El maíz normal contiene P, pero solo aproximadamente el 15 % del P es digerible cuando se alimenta al cerdo. Por lo tanto, se debe añadir P inorgánico a la dieta para cumplir con los requisitos de P para el cerdo, y el P no digerible en la dieta se excreta.

Es necesario evaluar el valor de la fosfatasa alcalina en las dietas de cerdos lactantes basándose en el crecimiento de los cerdos, el consumo de piensos, la eficiencia de los piensos y la salud. Además, la disponibilidad de fósforo en las dietas de cerdos lactantes y la cantidad de P excretada deben determinarse a medida que el intestino del cerdo se desarrolla después del destete y las dietas continúan cambiando. El objeto de este estudio es determinar el valor nutricional y ambiental de la fosfatasa alcalina en las dietas de cerdos lactantes sobre la base de la digestibilidad y excreción de nutrientes

Se realiza una prueba de metabolismo para evaluar la digestibilidad y excreción de nutrientes de cerdos lactantes alimentados con dietas complementadas con fosfatasa alcalina. Doce carretillas se usan con seis carretillas por tratamiento dietético. Los cerdos se alimentan con una dieta a base de maíz-soja-suero convencional de pellets de fase 1 durante los 7 días posteriores al destete. Luego, los cerdos se bloquean por peso y ascendencia a uno de dos tratamientos dietéticos.

Los cerdos se alojan en parejas en los corrales de metabolismo durante los primeros 6 días del período de metabolismo, ajustándose a las dietas experimentales de la fase 2 que se alimentan dos veces al día cerca de a discreción antes de ser divididos en cajones de metabolismo individuales y alimentados con un consumo restringido durante 4 días antes del inicio de una recolección de orina y heces total de 3 días. Durante la recolección los cerdos se alojan en cajones individuales de metabolismo de acero inoxidable (0,71 m x 0,86 m) equipados con bebederos de boquilla. Las pantallas y los recipientes de recolección se colocan debajo de los cajones para permitir la recolección total y separada de orina y heces. Los cubos de recolección de orina se acidifican con 100 ml de HCl al 10 % para evitar la volatilización del amoníaco.

Los 4 días anteriores y durante el período de recolección de 3 días, los cerdos se alimentan dos veces al día a las 07:30 y a las 17:00 a una tasa del 9 % de PC⁷⁵. Cada mañana de la recolección, se recolectan, miden y congelan el forraje total, la orina y las heces a -20 °C para su posterior análisis. Las muestras diarias de cada cerdo se agrupan para su posterior análisis. Las heces se descongelan y se mezclan con agua desionizada para fabricar una suspensión de 50:50 en peso que se mezcla y luego se toma una muestra secundaria con 1 muestra mantenida como una suspensión fecal para los ensayos de nitrógeno y una muestra que se liofiliza y se usa para todos los demás ensayos de nutrientes

Las dietas se muelen a través de una pantalla de 1 mm en un molino Wiley (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ) antes del análisis. La materia seca se determina después de un período de secado de 16 h a 100 °C. El total de N (Nelson y Sommers, 1972) y AmmN (Bremner y Keeney, 1965) se determinan mediante procedimientos de micro-Kjeldahl. El P total se determina colormétricamente (Murphy y Riley, 1962) usando un espectrofotómetro Beckman Du-6 (Beckman Coulter, Irvine, CA). La dieta, las energías de heces y orina están determinadas por el calorímetro de la bomba. La energía de la orina se determina secando 4 ml de orina en sulka foc en la cápsula de energía y luego quemando el sulka foc y la orina en el calorímetro de la bomba y luego determinando la energía urinaria por diferencia del sulka foc tratado con agua desionizada.

El cerdo era la unidad experimental. El procedimiento GLM de SAS se usa para determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos. Los significados estadísticos se indican con una P <0,05, mientras que las tendencias estadísticas se indican con una P <0,10. Se usaron dos dietas experimentales durante el estudio de metabolismo: 1) Control y 2) Control + 60 MU FA. Estas dietas permitieron una comparación entre las dietas convencionales y las suplementadas con FA, y se detallan a continuación.

Fase 2 Dietas del metabolismo

ES 2 710 663 T3

Ingrediente, %	Control	Control+60 MU FA
Maíz	40,485	40,485
SBM, 48 % CP	22,330	22,330
Grasa porcina	1,000	1,000
Caliza	0,420	0,420
Fosfato monocálcico	0,300	0,300
Premezcla de vitaminas	0,250	0,250
Premezcla de minerales traza	0,150	0,150
Premezcla de selenio	0,050	0,050
Sal	0,300	0,300
Proteína plasma	2,500	2,500
Harina de sangre SD	2,000	2,000
Harina de pescado	4,000	4,000
Harina de aves de corral-NRC	4,000	4,000
Suero seco	20,000	20,000
Lisina-HCl	0,100	0,100
DL-metionina	0,170	0,170
L-treonina	0,070	0,070
Carbadox -2.5	1,000	1,000
óxido crómico	0,375	0,375
Premezcla TRT de maíz	0,500	0,500
Total	100,000	100,000
Nutrientes calculados		
ME, kcal/kg	3295,10	3295,10
CP, %	25,48	25,48
Lisina total, %	1,680	1,680
Lisina digerible, %	1,427	1,427
Lisina SID, %	1,500	1,500
Metionina dig, %	0,504	0,504
Met+Cys dig, %	0,835	0,835
Treonina dig, %	0,894	0,894
Triptófano dig, %	0,247	0,247
Isoleucina dig, %	0,821	0,821
Valina dig, %	1,038	1,038
Ca, %	0,850	0,850
P, %	0,743	0,743
P disponible, %	0,500	0,500
Composición analizada		
CP, %	23,5	23,7
P, %	0,57	0,61
Energía total, kcal/kg	3975	3987
Materia seca, %	88,54	88,47

Los resultados se proporcionan en la tabla 11, titulada *Efecto de la enzima fosfatasa alcalina (FA) durante el período de cría temprano en la digestibilidad y excreción de materia seca (MS), energía, nitrógeno (N) y fósforo (P)*.

Tabla 11

FA, MU/ton	0	60	ET	Probabilidad, P<
PC inicial, kg	16,38	16,37	0,343	0,97
PC día 6, kg	19,57	19,63	0,484	0,92
PC final, kg	24,05	24,53	0,522	0,53
ADG d 0-6, kg/d	0,531	0,544	0,054	0,86
ADG d 6-13 kg/d	0,640	0,700	0,025	0,12
ADG d 0-13 kg/d	0,590	0,628	0,029	0,38
Recolección total d 10-13				
MS ofrecida, g/d	413,8	413,5	7,50	0,98
Consumo de MS, g/d	372,4	398,9	12,91	0,18
MS en heces, g/d	54,8	58,0	4,16	0,60

(continuación)

FA, MU/ton	0	60	ET	Probabilidad, P<
Orina, ml/d	551,4	631,9	83,46	0,51
MS dig., %	85,4	85,5	0,87	0,94
Consumo de energía, kcal/d	1480,3	1590,9	51,30	0,16
Energía de heces, kcal/d	259,6	275,3	20,00	0,59
Energía de orina, kcal/d	139,6	157,5	21,49	0,57
Energía digerida, %	82,57	82,68	1,033	0,94
Energía conservada, %	72,73	72,77	1,426	0,99
<i>N total</i>				
Consumo, g/d	14,0	15,2	0,49	0,13
Heces, g/d	2,95	3,05	0,205	0,74
Orina, g/d	1,51	1,97	0,272	0,26
N digerido, %	79,10	79,91	1,007	0,58
N conservado, % de consumo NH_4-N	68,33	66,84	2,140	0,63
Heces, g/d P	0,48	0,44	0,036	0,37
Consumo, g/d	2,13	2,45	0,075	0,01
Heces, g/d	1,05	1,05	0,051	0,98
Orina, g/d	0,024	0,010	0,0122	0,42
P digerido, %	50,53	57,14	1,805	0,03
Conservado, % de consumo	49,23	56,75	1,900	0,02

La dieta no afectó la tasa de crecimiento de los cerdos durante la primera semana de alimentación Sin embargo, durante la segunda semana (d 6-13), los cerdos alimentados con fosfatasa alcalina tendieron ($P < 0,12$) a crecer un poco más rápido (9,4 %) que los cerdos no complementados (Tabla 11).

5 La fosfatasa alcalina no afectó la digestibilidad o la excreción de MS, la energía o el nitrógeno ($P > 0,26$). Sin embargo, debido al consumo ligeramente mayor de pienso y al fósforo dietético analizado, los cerdos alimentados con la dieta FA tuvieron un mayor consumo de fósforo ($P < 0,01$), pero una excreción fecal y urinaria similar de fósforo. Esto hizo que los cerdos alimentados con FA tuvieran una mayor digestibilidad del fósforo ($P < 0,03$) y retención ($P < 0,02$) que los cerdos alimentados con la dieta de control.

10 Si bien no está limitado a teoría alguna, puede haber una oportunidad para que la enzima FA mejore la fisiología intestinal del cerdo destetado y esto puede llevar a una utilización más eficiente del fósforo.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Eli Lilly and Company

<120> PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES PARA REDUCIR EL IMPACTO AMBIENTAL DE RESIDUOS ANIMALES

15 <130> X19640

<150> 61/599729

<151> 16/02/2012

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1

<211> 572

<212> PRT

<213> Bacillus lentus

<400> 1

ES 2 710 663 T3

Val Asn Lys Leu Leu Lys Gly Leu Ala Ile Gly Gly Ile Val Leu Ala
 1 5 10 15

Val Val Ser Ala Gly Thr Leu Ala Val Ala Lys Glu Asn Ala Ser Arg
 20 25 30

Ala Glu Ser Ser Asn Gly Gln Ser Lys Asn Leu Ile Val Leu Ile Gly
 35 40 45

Asp Gly Met Gly Pro Ala Gln Val Ser Ala Ala Arg Tyr Phe Gln Gln
 50 55 60

His Lys Asn Asn Ile Asn Ser Leu Asn Leu Asp Pro Tyr Tyr Val Gly
 65 70 75 80

Gln Ala Thr Thr Tyr Ala Asp Arg Gly Glu Asp Gly Gly His Ile Val
 85 90 95

Ser Gly Ile Val Thr Ser Ser Ala Ser Ala Gly Thr Ala Phe Ala Thr
 100 105 110

Gly Asn Lys Thr Tyr Asn Ala Ala Ile Ser Val Ser Asn Glu Asp Val
 115 120 125

Ser Arg Pro Phe Ala Ser Val Leu Glu Ala Ala Glu Leu Ser Gly Lys
 130 135 140

Ser Thr Gly Leu Val Thr Thr Ala Arg Ile Thr His Ala Thr Pro Ala
 145 150 155 160

ES 2 710 663 T3

Val Tyr Ala Ser His Val Arg Ser Arg Asp Asn Glu Asn Ala Ile Ala
165 170 175

Phe Gln Tyr Leu Asp Ser Gly Ile Asp Val Leu Leu Gly Gly Gly Glu
180 185 190

Ser Phe Phe Val Thr Lys Glu Glu Lys Gly Lys Arg Asn Asp Lys Asn
195 200 205

Leu Leu Pro Glu Phe Glu Ala Lys Gly Tyr Lys Val Val Lys Thr Gly
210 215 220

Gln Ser Leu Lys Ser Leu Ser Ala Lys Asp Ala Lys Val Leu Gly Leu
225 230 235 240

Phe Gly Gly Ser His Ile Ala Tyr Val Pro Asp Arg Ser Asp Glu Thr
245 250 255

Pro Ser Leu Ala Glu Met Thr Ser Lys Ala Leu Glu Ile Leu Ser Thr
260 265 270

Asn Glu Asn Gly Phe Ala Ile Met Ile Glu Gly Gly Arg Ile Asp His
275 280 285

Ala Gly His Ala Asn Asp Phe Pro Thr Met Val Gln Glu Ala Leu Asp
290 295 300

Phe Asp Glu Ala Phe Lys Val Ala Ile Asp Phe Ala Lys Lys Asp Gly
305 310 315 320

Asn Thr Ser Val Val Val Thr Ala Asp His Glu Thr Gly Gly Leu Ser
325 330 335

Leu Ser Arg Asp Asn Ile Tyr Glu Leu Asn Val Asp Leu Trp Asn Lys
340 345 350

Gln Lys Asn Ser Ser Glu Ser Leu Val Ser Ala Leu Asn Glu Ala Lys
355 360 365

Thr Ile Ala Asp Val Lys Lys Ile Val Ser Asp Asn Thr Trp Ile Thr
370 375 380

Asp Leu Thr Asn Glu Glu Ala Gln Tyr Ile Leu Asp Gly Asp Gly Ser
385 390 395 400

Ser Tyr Lys Arg Glu Gly Gly Tyr Asn Ala Val Ile Ser Lys Arg Leu
405 410 415

ES 2 710 663 T3

Leu Val Gly Trp Ser Gly His Gly His Ser Ala Val Asp Val Gly Val
 420 425 430

Trp Ala Tyr Gly Pro Ile Ala Asp Lys Val Lys Gly Gln Ile Asp Asn
 435 440 445

Thr Arg Ile Ala Thr Ala Ser Ala Glu Val Leu Gly Val Asp Leu Lys
 450 455 460

Lys Ala Thr Ala Asp Leu Gln Ser Lys Tyr Leu Tyr Pro Lys Phe Lys
 465 470 475 480

Ile Asn Arg Asn Lys Glu Val Leu Phe Pro Ala Lys Pro Leu Ala Glu
 485 490 495

Ala Leu Gly Gly Lys Tyr Gln Ala Ala Asn Gly Thr Ala Thr Ile Ser
 500 505 510

Gly Met Ser Gly Thr Ile Thr Val Asp Leu Asn Ala Lys Lys Ala Lys
 515 520 525

Leu Ser Gly Asn Ser Ser Ser Ile Thr Ile Asp Val Asp Asn Asp Val
 530 535 540

Leu Tyr Leu Pro Leu Thr Ala Phe Ser Gln Ile Thr Gly Gln Thr Leu
 545 550 555 560

Lys Trp Asp Ala Leu Ser Glu Arg Ile Met Leu Lys
 565 570

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición adecuada para la administración oral a un animal que comprende una cantidad eficaz de una fosfatasa alcalina que reduce la cantidad de uno o más compuestos perjudiciales presentes en, o liberados de, los residuos animales, y uno o más portadores aceptables por vía oral, en la que dicha fosfatasa alcalina es fosfatasa alcalina de SEQ ID NO: 1, o una fosfatasa alcalina que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1:

VNKKLLKGLAIGGIVLAVVSAGTLAVAKENASRAESSNGQSKNLVIGDGMGPAQVSAARYFQQHKNNINSLNLDPPYVVG
 QATTYADRGEDGGHIVSGIVTSSASAGTAFATGNKTYNAAISVSNEDVSRPFASVLEAAELSGKSTGLVTTARITHATPA
 VYASHVRSRDNENAIQFYLDGIDVLLGGGESFFVTKEEKGRNDKNLLPEFEAKGYKVVKTGQSLKLSAKDAKVLGL
 FGGSHIAYVPDRSDETPSLAEMTSKALEILSTNENGFAIMIEGGRIDHAGHANDFPTMVQEALDFDEAFKVAIDFAKKDG
 NTSVVVTADHETGGLSLSRDNIYELNVDLWKNQKNSSESLVSALNEAKTIADVKKIVSDNTWITDLTNEEAQYILDGDGS
 SYKREGGYNAVISKRLLVGWSGHGHSADVGVWAYGPIADKVKQIDNTRIATASAEVLGVDLKKATADLQSKYLYPKFK
 INRNKEVLFPAKPLAEALGGKYQAANGTATISGMSGTITVDLNAKKAKLSGNSSSITIDVDNDVLYLPLTAFSQITGQTL
 KWDALSERIMLK.

2. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho compuesto perjudicial es amoníaco o fósforo.
- 10 3. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicho animal es un animal joven seleccionado de entre pollo, pavo, cerdo y vaca.
4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la administración a dicho animal durante una o más de la fase de iniciación, la fase de crecimiento y la fase de finalización.
5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha enzima se formula en un pienso para animales o en un aditivo de pienso para animales.
- 15 6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha composición comprende uno o más principios activos adicionales.
7. Una composición que comprende fosfatasa alcalina para su uso en el aumento de la digestión de fósforo en un animal en la que dicha fosfatasa alcalina es fosfatasa alcalina de SEQ ID NO: 1, o una fosfatasa alcalina que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1:

VNKKLLKGLAIGGIVLAVVSAGTLAVAKENASRAESSNGQSKNLVIGDGMGPAQVSAARYFQQHKNNINSLNLDPPYVVG
 QATTYADRGEDGGHIVSGIVTSSASAGTAFATGNKTYNAAISVSNEDVSRPFASVLEAAELSGKSTGLVTTARITHATPA
 VYASHVRSRDNENAIQFYLDGIDVLLGGGESFFVTKEEKGRNDKNLLPEFEAKGYKVVKTGQSLKLSAKDAKVLGL
 FGGSHIAYVPDRSDETPSLAEMTSKALEILSTNENGFAIMIEGGRIDHAGHANDFPTMVQEALDFDEAFKVAIDFAKKDG
 NTSVVVTADHETGGLSLSRDNIYELNVDLWKNQKNSSESLVSALNEAKTIADVKKIVSDNTWITDLTNEEAQYILDGDGS
 SYKREGGYNAVISKRLLVGWSGHGHSADVGVWAYGPIADKVKQIDNTRIATASAEVLGVDLKKATADLQSKYLYPKFK
 INRNKEVLFPAKPLAEALGGKYQAANGTATISGMSGTITVDLNAKKAKLSGNSSSITIDVDNDVLYLPLTAFSQITGQTL
 20 KWDALSERIMLK.

8. La composición para su uso según la reivindicación 7, en la que dicha fosfatasa alcalina se administra por vía oral.
9. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8, en la que dicho animal es un animal joven seleccionado de entre pollo, pavo, cerdo y vaca.

10. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, para la administración a dicho animal durante una o más de la fase de iniciación, la fase de crecimiento y la fase de finalización.
11. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, formulada en un pienso para animales o en un aditivo de pienso para animales.
- 5 12. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en la que dicha composición comprende uno o más principios activos adicionales.
- 10 13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en la reducción de la cantidad de uno o más compuestos perjudiciales presentes en, o liberados de, los residuos animales, el aumento de la tasa de conversión de pienso para animales, el aumento de la eficiencia de pienso para animales, y/o el aumento de la tasa de crecimiento animal.