

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 449**

51 Int. Cl.:

G01N 33/02 (2006.01)
A23K 10/00 (2006.01)
A23K 40/00 (2006.01)
A23K 30/00 (2006.01)
G06K 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2018 E 18156218 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 3361248**

54 Título: **Método para la determinación de influencias del procesamiento sobre el valor nutricional de materias primas para piensos**

30 Prioridad:

13.02.2017 US 201715431597
13.02.2017 EP 17155896

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.07.2020

73 Titular/es:

EVONIK OPERATIONS GMBH (100.0%)
Rellinghauser Straße 1-11
45128 Essen, DE

72 Inventor/es:

WILTAFSKY, MARKUS;
REIMANN, INGOLF;
FICKLER, JOHANN y
RADEMACHER-HEILSHORN, MEIKE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 773 449 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

Método para la determinación de influencias del procesamiento sobre el valor nutricional de materias primas para piensos

- 5 La presente invención se refiere a un método para la determinación de influencias del procesamiento sobre el valor nutricional de materias primas para piensos y/o piensos, un procedimiento para la optimización de piensos considerando las influencias del procesamiento determinadas y los piensos así obtenidos y/u obtenibles.

10 Debido a muchas razones, los piensos pueden tener influencias negativas sobre los animales y los respectivos productos animales como carne y leche y en el peor de los casos sobre los seres humanos como sus consumidores. Ejemplos de esto son una mala selección de los piensos y la selección de las raciones y así la nutrición y el suministro de energía resultantes, una contaminación de los piensos, una biocarga y/o carga de toxinas (micotoxina) en piensos en mal estado y los llamados factores antinutricionales en piensos a base de plantas.

15 Los factores antinutricionales resultan del metabolismo secundario de plantas y se presentan solamente en especies de plantas particulares. Realizan funciones no esenciales en el metabolismo primario. Más bien, su función es la defensa de alimañas y plagas, la regulación y la función como colorantes y fragancias. Los efectos negativos de los factores antinutricionales sobre el animal consisten en la captación del pienso, un rendimiento reducido del animal, un cambio en la digeribilidad de los nutrientes, trastornos metabólicos y su toxicidad.

20 Los factores antinutricionales se pueden agrupar en los grupos de sustancias de carbohidratos, proteínas, fenoles y derivados fenólicos, glucósidos y glicósidos, quelantes y glucosinolatos así como goitrógenos, con lo que los compuestos singulares se pueden agrupar en más de una clase de sustancias.

25 Ejemplos de factores antinutricionales procedentes del grupo de sustancias de carbohidratos son:

- Los polisacáridos no amiláceos, que están presentes como parte de las paredes celulares, tales como los pentosanos, que están presentes en altramuces, cebada, maíz y centeno, los beta-glucanos, que están presentes en cebada y centeno, y las pectinas, que están presentes en girasoles. Debido a su capacidad para hincharse, estos carbohidratos conducen a la incorporación de agua en animales, en particular en aves de corral jóvenes, un incremento en la viscosidad del quimo, una disminución de la densidad energética en el pienso, una disminución en la digeribilidad y una disminución en el crecimiento y el rendimiento; y
- oligosacáridos indigeribles, para alfa-galactósidos, tales como la rafinosa, estaquiosa, verbascosa y ajugosa, que están presentes en altramuces, habas de soja y colza y que rápidamente son convertidos microbianamente en el ciego/colon, lo que conduce a flatulencias y diarrea.

35 Ejemplos de factores antinutricionales procedentes del grupo de sustancias de proteínas son:

- Inhibidores de proteinasa, encontrados en habas, guisantes, altramuces, habas de soja, guar y arroz (usados para pollos, lechones y carnívoros (jóvenes)), que inhiben la capacidad de la tripsina y la quimotripsina y así disminuyen la digeribilidad de proteínas; y
- las lectinas (hemaglutininas) encontradas en especies de *phaesolus* (habas, guisantes, habas de soja y altramuces (usados para animales monogástricos) y que se unen a los receptores de la mucosa intestinal, lo que conduce a trastornos de reabsorción e in vitro a una aglutinación de los glóbulos rojos.

45 El documento WO 2011/109624 A1 divulga habas de soja que poseen un alelo genético para la producción de un contenido reducido de inhibidores de tripsina en semillas. Este documento también divulga que plantas de soja descendientes de las habas de soja con inhibidores de tripsina ultrabajos, donde la descendencia comprende una combinación de al menos dos plantas de soja de los rasgos del documento WO 2011/109624 A1, de modo que dicha planta de soja descendiente no es significativamente diferente para dichos rasgos de las plantas de soja del documento WO 2011/109624 A1 según se determina al nivel de significación de 5% cuando crecen en las mismas condiciones ambientales.

50 Ejemplos de factores antinutricionales procedentes del grupo de sustancias de fenoles y derivados fenólicos son:

- Taninos (derivado fenólico), encontrados en habas y guisantes (usados para aves de corral, cerdos y caballos), que disminuyen el consumo de pienso, inhiben enzimas proteolíticas y disminuyen la digeribilidad de proteínas, lo que da como resultado estreñimientos;

ES 2 773 449 T3

- alquilresorcinoles, encontrados en cebada, a menudo en triticale y muy a menudo en trigo, (usados para animales monogástricos), que conducen a una reducción en el consumo de pienso y el crecimiento; y
- gosipol, encontrado en semillas de algodón (usadas para todos los tipos de animales), que tiene un efecto hemolítico debido a que se une a hierro y conduce a una decoloración de la yema, trastornos del metabolismo proteínico y la espermatogénesis así como daños hepáticos y renales.

Ejemplos de factores antinutricionales procedentes del grupo de sustancias de glucósidos y glicósidos son:

- Pirimidinoglucósidos (vicina, convicina, etc.), encontrados en habas y arvejas (usadas para gallinas ponedoras y cerdas), que conducen a trastornos del metabolismo de las grasas, un rendimiento de puesta y eclosionabilidad reducidos y trastornos de la fertilidad y la lactancia;
- alfa-galactósidos, encontrados en altramuces, habas y guisantes;
- glucósidos cianogénicos, encontrados en especies de phaesolus (arvejas, semillas de lino, tapioca y altramuces) (usadas para caballos y todos los tipos de ganado), que conducen a síntomas de intoxicación debido a la liberación de ácido prúsico (veneno respiratorio); y
- saponinas, encontradas en habas, guisantes y altramuces (usados para: pollos (jóvenes)), que dan un sabor amargo, lo que conduce a una reducción en el consumo de pienso, y tienen un efecto hemolítico y también son un antagonista de vitamina D.

Ejemplos de factores antinutricionales procedentes del grupo de sustancias de alcaloides son:

- Los alcaloides esparteína, lupinina, hidroxilupanina, angustifolina, solanina, encontrados en altramuces y en particular en tomates y patatas (usados para: animales monogástricos, cerdos y ganado vacuno), alcaloides del cornezuelo del centeno, encontrados en particular en centeno, que dan un sabor amargo, lo que conduce a una reducción en el consumo de pienso, pero lo más notablemente los alcaloides son tóxicos, los alcaloides del cornezuelo del centeno pueden conducir a abortos,
- paralizaciones y calambres, en el campo del ganado vacuno, por lo tanto, los alcaloides conducen a una reducción en la producción de leche; y
- sinapina, encontrada en colza (usada para: gallinas ponedoras, en particular ponedoras de huevos pardos), que las bacterias intestinales convierten en trimetilamina (TMA), que está enriquecida en el hígado cuando la actividad de TMA oxidasa en el hígado no es suficientemente alta y da a los huevos olor a pescado.

Ejemplos de factores antinutricionales procedentes del grupo de sustancias de quelantes son:

- Ácido fítico, encontrado, por ejemplo, en maíz, maíz-legumbres y hebras de extracciones (usados para: animales monogástricos, cerdos y aves de corral), que disminuyen la disponibilidad de iones de doble carga tales como Ca^{2+} , Zn^{2+} y Fe^{2+} en el organismo al quelar estos iones; y
- gosipol, encontrado en semillas de algodón (usadas para todos los tipos de animales), que tiene un efecto hemolítico debido a que se une a hierro y conduce a una decoloración de la yema, trastornos del metabolismo proteínico y la espermatogénesis así como daños hepáticos y renales.

Ejemplos de factores antinutricionales procedentes de los grupos de sustancias de glucosinolatos son:

- Glucobrasicina, gluconapina, glucobrasiconapina y progoitrina, todas encontradas en colza (usada para: animales de cría, en particular cerdos, aves de corral y terneros, vacas lecheras), se escinden enzimáticamente bajo liberación de compuestos tóxicos de isotiocianato, tiocianato y nitrilo tóxicos; además glucosinolatos y sus productos de escisión conducen a una reducción en el consumo de pienso, interfieren en la eficacia de fertilidad y la producción de hormonas tiroideas, promueven la formación de bocio y provocan la transición de goitrógenos en la leche.

Además, los goitrógenos (encontrados en habas de soja, semillas de lino y col) conducen a una dilatación de la glándula tiroidea (= bocio).

La lista no limitativa anterior de factores antinutricionales y sus efectos negativos sobre los animales ilustra que los factores antinutricionales tienen un gran impacto sobre las costumbres alimentarias. Así, a fin de evitar los efectos negativos de factores antinutricionales sobre el animal, los factores antinutricionales se deben retirar de las materias primas usadas para preparar piensos. En caso de que no sea posible retirar completamente los factores antinutricionales de las materias primas para piensos, el suministro de factores antinutricionales a los animales se debe limitar, a fin de evitar efectos perjudiciales sobre los animales.

Para la retirada de factores antinutricionales de las materias primas para piensos o la reducción de su presencia en las materias primas para piensos, las materias primas usadas para preparar piensos se someten a un procesamiento en el que se someten a tratamiento térmico tal como cocción o tostado que conduce a una retirada de, entre otros, inhibidores de proteinasa y lectinas, o un tratamiento con álcali, que, por ejemplo, conduce a una retirada de sinapina. Por lo tanto, muchas materias primas para piensos se someten a un tratamiento térmico. Además, los productos alimenticios también se someten a un tratamiento térmico a fin de retirar humedad. Por ejemplo, el artículo "Feed extrusion process description" de Galen J. Rokey y cols. (Revista Brasileira de Zootecnia, vol. 39, pp. 510-518, 2010) divulga que la cocción con extrusión para la producción de muchos productos ha evolucionado en las últimas tres décadas y proporciona una herramienta muy útil y económica para procesar dietas de animales. Este procedimiento permite una mejor utilización de granos de cereales y proteínas vegetales y animales disponibles para permitir dietas económicas y nutricionalmente razonables con características alimentarias mejoradas y únicas. Los artículos divulgan además que se pueden fabricar rentablemente piensos sabrosos, funcionales y específicos de formulación de materias primas, configuración del sistema y condiciones de procesamiento.

Sin embargo, este tratamiento térmico puede conducir a un daño de los aminoácidos presentes en las materias primas para piensos. Por ejemplo, los compuestos con un grupo amino tales como aminoácidos y proteínas se someten a la reacción de Maillard en presencia de compuestos reductores, en particular de azúcares reductores. En particular, este es el caso para lisina con un grupo amino en ϵ , que puede reaccionar con una multitud de ingredientes en las materias primas para piensos. Los compuestos resultantes de estas reacciones pueden ser parcialmente absorbidos en el intestino del animal, pero no tienen ningún valor nutricional. Por ejemplo, el grupo amino en ϵ libre de moléculas de lisina o proteínas que contienen lisina puede reaccionar con el grupo carbonilo de azúcares reductores, en particular de hexosas como glucosa, en una reacción de condensación reversible que da inicialmente una base de Schiff que posteriormente se hace reaccionar en una transposición de Amadori irreversible bajo la formación de ϵ -N-desoxicetosil-lisina que a veces se denomina producto de Amadori o producto de Maillard inicial. La ϵ -N-desoxicetil-lisina puede reaccionar además bajo la formación de pigmentos pardos o melanoidinas, que son compuestos orgánicos que contienen nitrógeno de color de pardo amarillento a casi negro. Las bases de Schiff, al menos las formadas por aldehídos alifáticos y azúcares reductores, pueden ser absorbidas casi completamente en el intestino de mamíferos. En comparación, el metabolismo del producto de Amadori ϵ -N-desoxicetosilo es insignificante. Las condiciones empleadas en el procesamiento de materias primas para piensos, en particular altas temperaturas en la cocción o el tostado, valores de pH extremos y altas concentraciones de reaccionantes, favorecen la reacción de Maillard. Sin embargo, una parte del derivado de lisina que ha reaccionado es lábil a los ácidos y puede revertir a lisina durante la etapa de hidrólisis ácida del análisis químico de aminoácidos en húmedo. Sin embargo, esto no ocurre en el tracto digestivo. Por consiguiente, las concentraciones de aminoácidos en los piensos, determinadas mediante análisis de aminoácidos convencional, serán erróneas y sobreestimarán el contenido de aminoácidos y la disponibilidad reales en los piensos dañados térmicamente.

La reacción de Maillard se considera la principal razón para la degradación de aminoácidos y proteínas que contienen aminoácidos en materias primas para piensos, en particular de lisina o proteínas que contienen lisina. Sin embargo, aparte de la reacción de Maillard, existen reacciones adicionales que conducen a la degradación de aminoácidos y proteínas que contienen aminoácidos. Por ejemplo, el fuerte calentamiento de proteínas en ausencia de grasas o azúcares (reductores) conduce a la reacción de las moléculas de lisina con la cadena lateral amínica de aminoácidos tales como asparagina y glutamina bajo la formación de enlaces peptídicos internos, llamados isopéptidos. Además de las reacciones que dan isopéptidos, también se producen otras reacciones, tales como la formación de lisinoalanina, la reacción de moléculas de lisina con polifenos oxidados, la acilación de aminoácidos y la racemización de aminoácidos. Además de la modificación de las moléculas de lisina, el procesamiento de materias primas para piensos también conduce a la desnaturalización de proteínas y la formación de reticulación de proteínas extensiva, intra- así como intermolecular, y también con otros aminoácidos distintos de lisina. Las susodichas reacciones incluyendo la reacción de Maillard pueden conducir a una pérdida general de aminoácidos y una reducción de la digeribilidad de los aminoácidos y las proteínas en las materias primas para piensos y así a una reducción de la captación de aminoácidos, en particular lisina, y proteínas.

Un procesamiento adicional de piensos también puede conducir a una disminución en la disponibilidad o la solubilidad de proteínas. Por ejemplo, el documento US 5.783.238 divulga una fuente combinada de nitrógeno orgánico e inorgánico de solubilidades variables en la forma de nitrógeno no proteínico, péptidos, aminoácidos y proteína intacta derivados en la realización preferida del aditivo para piensos del documento US 5.783.238 de materiales solubles de fermentación de ácido glutámico y/o materiales solubles de fermentación de maíz a los que se pueden añadir un vehículo, aminoácidos adicionales y enzimas y que es superior a las composiciones de la técnica anterior. Este documento divulga además que un análisis químico normal de las dietas basadas en aditivos

para piensos refleja un valor de solubilidad que se obtendría con materiales no procesados debido a que el análisis químico normal de ingredientes de piensos es incapaz de distinguir modificaciones en los grados de solubilidad. Químicamente, la modificación en la solubilidad de nitrógeno que se produce en el aditivo para piensos del documento US 5.783.238 como resultado del procesamiento se puede medir al medir el cloro libre. Este análisis indicaba que solo 33% de los componentes nitrogenados no proteínicos de la combinación del documento US 5.783.238 era fácilmente soluble.

Los documentos WO 97/02489 A1 y NZ 312221 A divulgan un método para determinar el coeficiente de digeribilidad de lisina reactiva de un producto alimenticio. Este método comprende las etapas de a) introducir un marcador en el producto alimenticio que se va a analizar, b) alimentar con el producto alimenticio a un sujeto no humano durante un período de tiempo predeterminado, c) obtener una muestra del digerido de producto alimenticio procedente del sujeto, d) determinar el contenido de lisina reactiva digerible del producto alimenticio al: i) introducir un agente de derivación de lisina en el producto alimenticio y ii) determinar el contenido de lisina reactiva digerible del producto alimenticio al medir el contenido de lisina derivada equivalente del producto alimenticio, e) determinar el contenido de lisina reactiva digerible en los digeridos de producto alimenticio al i) introducir un agente de derivación de lisina para el grupo amino en épsilon de la lisina, en los digeridos de producto alimenticio y ii) determinar el contenido de lisina reactiva digerible de los digeridos de producto alimenticio al medir el contenido de lisina derivada equivalente en los digeridos de producto alimenticio, f) medir la concentración de marcador tanto en el producto alimenticio como en los digeridos de producto alimenticio, g) expresar el contenido de lisina reactiva tanto del producto alimenticio como de los digeridos del producto alimenticio por gramo del marcador, y h) calcular el coeficiente de digeribilidad de la lisina reactiva.

La exposición a calor también tiene una influencia significativa sobre el contenido de aminoácidos de otros piensos, que se obtienen a partir de procedimientos con exposición a mucho calor, tales como el llamado DDGS (granos secos de destilería con materiales solubles). Típicamente, los DDGS se obtienen en plantas para la preparación de bioetanol basándose en cereales que contienen almidón tales como maíz, trigo, cebada y sorgo después de la destilación del etanol y el secado de los sedimentos obtenidos como subproducto restantes. Las proteínas, las fibras y los aceites contenidos en los sedimentos son nutrientes, que definen su uso como pienso. Sin embargo, solamente el subproducto secado es almacenable y también se puede dar como alimento a otras especies de rumiantes. Típicamente, el subproducto secado se noduliza después del secado y así el pienso obtenido se denomina típicamente DDGS. Aproximadamente un tercio de los cereales usados para la producción de bioetanol da como resultado DDGS. Cada fanega de los cereales usados en la producción de bioetanol (una fanega de EE. UU. de cereales es igual a 35,2391 litros) da aproximadamente 2,7 galones de etanol (1 galón es igual a 4,54609 litros), 18 libras de DDGS (1 libra es igual a 453,59237 g) y 18 libras de dióxido de carbono. Los DDGS tienen un alto contenido de residuos de cereal y residuos de proteínas de levadura, minerales y vitaminas y, así, un alto valor energético residual. Debido a su alto contenido de proteínas de alrededor de 30% y su valor energético adicional, los DDGS son una fuente de proteínas y energía que puede ser digerida fácilmente por ganado vacuno y vacas lecheras. Además, los DDGS se pueden usar para la alimentación de aves de corral y cerdos. El uso de DDGS para la alimentación de rumiantes es particularmente común y está bien documentado en los EE. UU. de A. En Norteamérica, alrededor de 80% del volumen de DDGS se usa para alimentar ganado vacuno. Sin embargo, la exposición al calor en la destilación del etanol formado durante la fermentación y en el secado del subproducto restante conduce a un fuerte estrés térmico sobre los aminoácidos del subproducto, que puede conducir a la reacción de Maillard de aminoácidos y proteínas, la formación de isopéptidos y lisinoalaninas, la reacción de aminoácidos con polifenoles oxidados, la acilación de aminoácidos, la racemización de aminoácidos, la desnaturalización de proteínas y la formación de reticulación de proteínas extensiva.

Típicamente, las cantidades de aminoácidos en una materia prima de pienso bien se determinan mediante el uso de métodos estándar de análisis de aminoácidos o bien se evalúan mediante el uso de espectroscopía de infrarrojo cercano. Los métodos estándar para el análisis de aminoácidos son métodos químicos en húmedo, en los que los aminoácidos presentes en las materias primas para piensos bien se hierven en primer lugar en ácido clorhídrico para liberar los aminoácidos de las proteínas a las que están principalmente unidos, seguido por la separación cromatográfica del hidrolizado, o bien se oxidan en primer lugar, seguido por la hidrólisis y finalmente el hidrolizado se somete a una separación cromatográfica. La primera alternativa es aplicable a todos los aminoácidos con la excepción del triptófano, que se destruye en la hidrólisis, y metionina y cistina, que se degradan parcialmente mediante hidrólisis. Sin embargo, los aminoácidos que contienen azufre metionina, cistina y cisteína se pueden determinar cuantitativamente si se oxidan a 0°C con ácido per fórmico hasta metioninosulfona y ácido cisteico antes de la hidrólisis y si estos derivados se analizan después de la hidrólisis. La cistina y la cisteína se determinan ambas como ácido cisteico en los hidrolizados de una muestra oxidada. Durante la hidrólisis, los aminoácidos asparagina y glutamina se convierten completamente en ácido aspártico y glutámico y se pueden determinar como estos. Por lo tanto, la glutamina y la asparagina siempre se determinan junto con el ácido glutámico y el ácido aspártico presentes en la naturaleza. Según esto, los valores determinados para ácido glutámico y ácido aspártico son parámetros aditivos. La segunda alternativa es aplicable a todos los aminoácidos con la excepción de tirosina, que sin embargo se degrada en la etapa de oxidación. Ambas alternativas permiten una determinación precisa del contenido de aminoácidos. Sin embargo, una gran desventaja es que ambas alternativas consumen mucho tiempo y trabajo. Por lo tanto, estos métodos no son adecuados para análisis rápidos, en particular no como métodos sistemáticos. En comparación, la espectroscopía de infrarrojo cercano no es adecuada para una determinación precisa, o incluso muy

precisa, del contenido de aminoácidos en una muestra. Más bien, este método solo permite evaluar o predecir el contenido de aminoácidos en una muestra – esto, sin embargo, muy fácilmente y muy rápidamente.

5 Evonik produce aminoácidos para piensos y tiene más de 50 años de experiencia en el análisis de aminoácidos. En 2012, probaron alrededor de 15.000 muestras al año a través de química en húmedo (véase el artículo "Evonik's Amino NIR - NIR for the feed industry" de Richard Mills (<http://nirperformance.com/2012/10/24/evoniks-amino-nir/>). Aunque los métodos de referencia de química en húmedo siguen siendo el método destacado para analizar aminoácidos, sin embargo las pruebas rápidas con NIR son cada vez más importantes para desarrollar resultados oportunos para los clientes para ayudar en la creación de las mejores dietas posibles. Los instrumentos de NIR
10 están conectados a un red, con el laboratorio Evonik en el centro. Esta red está creciendo constantemente y ahora incluye alrededor de 870 instrumentos de NIR situados en fábricas de pienso y laboratorios analíticos en todo el mundo.

15 Los documentos WO 01/15548 A1 y EP 1145645 A1 divulgan un método para analizar, seleccionar y mejorar materias primas para el uso en productos de pienso para animales de un modo que elimine la sobreformulación sistemática, mientras que garantiza un nivel deseado de nutriente en el producto complementado. En detalle, estos documentos divulgan un método que comprende las etapas de analizar la composición nutricional de partidas de materia prima para el uso en un producto de pienso para animales, que comprende medir la cantidad de al menos aminoácidos en la materia prima mediante espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano, comparar la
20 composición nutricional con una composición nutricional predeterminada, calcular la cantidad de nutrientes complementarios necesaria para llevar la composición de la partida hasta la composición nutricional predeterminada, determinar un valor liminar para el que existen aglomerados de la materia prima que son tanto económicamente como nutricionalmente favorables, seleccionar las partidas para rechazar aquellas para las cuales la cantidad de nutrientes complementarios necesaria es mayor que un valor liminar y para aceptar aquellas para las que la cantidad de nutrientes complementarios necesaria es menor que un valor liminar, y complementar solamente las partidas de
25 materias primas aceptadas con la cantidad calculada de nutrientes complementarios.

Se conoce una multitud de parámetros para la caracterización de influencias del procesamiento sobre materias primas para piensos, pero los experimentos han mostrado que ninguno de los parámetros conocidos en la
30 bibliografía es adecuado para la caracterización adecuada de influencias del procesamiento importantes alimentariamente sobre las materias primas del producto alimenticio. Entre otras cosas, esto se debe al hecho de que los parámetros individuales conducen a diferentes afirmaciones. Por ejemplo, la determinación de la actividad de ureasa es la prueba más común para evaluar la calidad de procesamiento de la soja. Sin embargo, esta prueba solo permite detectar un subprocesamiento de la materia prima para piensos pero no es adecuada para detectar un sobreprocesamiento de las materias primas para piensos. En comparación, la solubilidad de las proteínas de una muestra en álcali en principio permite distinguir productos sobreprocesados de productos adecuadamente
35 procesados. Sin embargo, esta distinción requiere realizar suposiciones con respecto al grado de daño térmico a valores específicos para la solubilidad de proteínas en álcali. De ahí que las suposiciones ya tengan una gran influencia sobre la clasificación de una materia prima para piensos y/o un pienso. Por otra parte, este método solo también conduce a afirmaciones contradictorias con respecto a la calidad de una materia prima para piensos y/o un
40 pienso.

Por lo tanto, no es sorprendente que ni parámetros conocidos individuales ni una combinación específica de parámetros hayan sido aceptados todavía en la industria de los piensos como suficientes o incluso como obligatorios para la caracterización de propiedades alimentariamente importantes.
45

Así, existía una necesidad de un método que permitiera la caracterización de influencias del procesamiento sobre el valor nutricional de materias primas para piensos a escala global e independientemente de la significación específica y, en particular, las fortalezas y debilidades de los métodos individuales.
50

Según la presente invención, este problema se resuelve al obtener un conjunto de parámetros que son complementarios en su significación y así son combinables. Estos parámetros son entre otros la actividad inhibidora de tripsina, la actividad de ureasa, la solubilidad de proteínas en álcali, el índice de dispersabilidad de proteínas y/o la relación de la cantidad reactiva de lisina a la cantidad total de lisina. Un parámetro adicional es al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en metionina, cisteína, cistina, treonina, leucina, arginina, isoleucina, valina, histidina, fenilalanina, tirosina, triptófano, glicina, serina, prolina, alanina, ácido aspártico y ácido glutámico. Estos parámetros se obtienen mediante el análisis cuantitativo de una serie de muestras de una materia prima para piensos procedente de diferentes momentos del procesamiento de la materia prima para piensos específica. Para cada uno de los parámetros determinados, se determina el llamado indicador de las condiciones de procesamiento (PCI), que describe todas las condiciones de procesamiento concebibles de una materia prima para piensos, es decir, subprocesamiento, procesamiento adecuado o sobreprocesamiento. A continuación, el indicador de las condiciones de procesamiento así obtenido se representa en una escala, para facilitar la clasificación de una materia prima para piensos como subprocesada, procesada adecuadamente o sobreprocesada.
55
60

Este procedimiento no se limita a ninguna materia prima para piensos particular y así también se puede usar para la determinación de influencias del procesamiento sobre piensos, tales como granos desecados de destilería con materias solubles (DDGS).

5 Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es un método para la determinación de las influencias del procesamiento sobre el valor nutricional de una materia prima para piensos y/o un pienso, que comprende las etapas de

a) someter a una muestra de una materia prima para piensos y/o un pienso procesado a

10 a1) un análisis cuantitativo de al menos un parámetro seleccionado del grupo que consiste en actividad inhibidora de tripsina, actividad de ureasa, solubilidad de proteínas en álcali e índice de dispersabilidad de proteínas;

a2) una determinación de la relación de la cantidad reactiva de lisina a la cantidad total de lisina que comprende un análisis cuantitativo de la cantidad reactiva de lisina y la cantidad total de lisina, seguido por la formación de la relación de la cantidad reactiva de lisina a la cantidad total de lisina; y

15 a3) un análisis cuantitativo de la cantidad de al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en metionina, cisteína, cistina, treonina, leucina, arginina, isoleucina, valina, histidina, fenilalanina, tirosina, triptófano, glicina, serina, prolina, alanina, ácido aspártico y ácido glutámico;

b) representar los parámetros obtenidos en las etapas a1) a a3) como una función de los momentos de procesamiento de la muestra en la etapa a);

20 c) determinar la superficie en la gráfica de la etapa b), donde el valor de la actividad inhibidora de tripsina, expresado como mg de tripsina por g de muestra, es mayor de 4, el incremento en el valor del pH en la determinación de la actividad de ureasa es mayor de 0,35, el valor de la solubilidad de proteínas en álcali, expresado como el porcentaje de proteína en la muestra que es soluble en una solución alcalina, es mayor de 85%, y/o el valor del índice de dispersabilidad de proteínas, expresado como el porcentaje del contenido de nitrógeno original de la muestra, es mayor de 40%, y señalar la superficie así obtenida como subprocesada;

25 d) determinar la superficie en la gráfica de la etapa b), donde el valor de la relación de la cantidad reactiva de lisina a la cantidad total de lisina es menor de 90%, el valor del índice de dispersabilidad de proteínas, expresado como el porcentaje del contenido de nitrógeno original de la muestra, es menor de 15%, y/o el valor de la solubilidad de proteínas en álcali, expresado como el porcentaje de proteína en la muestra que es soluble en una solución alcalina, es menor de 73%, y señalar la superficie así obtenida como sobreprocesada;

30 e) determinar la superficie en la gráfica de la etapa b), donde el valor de la actividad inhibidora de tripsina, expresado como mg de tripsina por g de muestra, es menor de 4, el valor de la solubilidad de proteínas en álcali, expresado como el porcentaje de proteína en la muestra que es soluble en una solución alcalina, está entre 73 y 85%, el valor del índice de dispersabilidad de proteínas, expresado como el porcentaje del contenido de nitrógeno original de la muestra, está entre 15 y 40%, y/o el valor de la relación de la cantidad reactiva de lisina a la cantidad total de lisina es al menos 90%, y señalar la superficie así obtenida como adecuadamente procesada;

y/o

sustraer las superficies determinadas en las etapas c) y d) de la gráfica de b) y señalar la superficie así obtenida como adecuadamente procesada;

40 f) generar una escala de procesamiento al estandarizar las superficies obtenidas en las etapas c) a e) hasta un tamaño igual, clasificarlas de sobreprocesamiento a subprocesamiento o viceversa y asignar una escala continua a las superficies estandarizadas y clasificadas;

45 g) insertar los valores de los parámetros obtenidos en las etapas a1) a a3) en una serie de potencia, y formar la media de los valores obtenidos de cada serie de potencia, en donde dicha media se designa como el indicador de las condiciones de procesamiento (PCI),

y

h) representar el indicador de las condiciones de procesamiento obtenido en la etapa g) en la escala de procesamiento obtenida en la etapa f) para indicar si una materia prima para piensos y/o un pienso está sobreprocesado, adecuadamente procesado o subprocesado.

En el contexto de la presente invención, el término la cantidad reactiva de lisina se usa para indicar la cantidad de lisina que está disponible realmente para el animal, en particular para la digestión en el animal. En comparación, el término la cantidad total de lisina se usa en el contexto de la presente invención para la suma de la cantidad de lisina que está disponible realmente para el animal, en particular para la digestión en el animal, y de la cantidad de lisina que no está disponible para el animal, en particular no para la digestión en el animal. La última cantidad se debe típicamente a reacciones de degradación de lisina, tales como la ya mencionada reacción de Maillard.

En el contexto de la presente invención, un procesamiento que conduce a daños sobre materias primas para piensos y/o piensos y en particular a cantidades reducidas de aminoácidos se denomina sobreprocesamiento. En comparación, un procesamiento que no dé una retirada completa o al menos aceptable de factores antinutricionales de materias primas para piensos y/o un pienso se denomina subprocesamiento. Finalmente, un procesamiento que conduzca a una destrucción completa o al menos aceptable de factores antinutricionales sin una destrucción de aminoácidos y/o proteínas se denomina procesar adecuadamente o procesamiento adecuado.

El análisis cuantitativo de la actividad inhibidora de tripsina se basa en la capacidad de los inhibidores para formar un complejo con la enzima tripsina y reducir así su actividad. La tripsina cataliza la hidrólisis de los sustratos sintéticos *N*-alfa-benzoil-D,L-arginino-*p*-nitroanilida (DL-BAPNA, nombre IUPAC *N*-[5-(diaminometilidenamino)-1-(4-nitroanilino)-1-oxopentan-2-il]bencilamida) y *N*-alfa-benzoil-L-arginino-*p*-nitroanilida (L-BAPNA, nombre IUPAC *N*-[5-(diaminometilidenamino)-1-(4-nitroanilino)-1-oxopentan-2-il]bencilamida). Esta hidrólisis catalizada libera el producto de color amarillo *p*-nitroanilina libre y así conduce a un cambio en la absorbancia. La actividad de tripsina es proporcional al color amarillo. La concentración de la *p*-nitroanilina se puede determinar por medio de espectroscopía a una longitud de onda de 410 nm. La L-BAPNA se usa típicamente en el método ISO 14902 (2001) y la DL-BAPNA se usa típicamente en el método AACC 22.40-01 (una modificación del método inventado originalmente por Hamerstrand en 1981).

En el método ISO 14902, en primer lugar la muestra se tritura finamente con un tamiz de 0,50 mm. Durante la trituración, se debe evitar cualquier desprendimiento de calor. La muestra triturada se mezcla con una solución acuosa alcalina, p. ej. 1 g de muestra en 50 ml de solución de hidróxido sódico (0,01 N), y la solución, suspensión, dispersión o emulsión así obtenida se almacena a continuación durante un período de hasta alrededor de 24 horas a una temperatura de 4°C como mucho. La mezcla así obtenida tiene un pH de 9 a 10, especialmente de 9,4 a 9,6. La solución resultante se diluye con agua y se deja reposar. Una muestra de esta solución, p. ej. 1 ml, se toma y se diluye según se indica por su contenido de actividad inhibidora de tripsina supuesto o previamente aproximado de modo que 1 ml de solución diluida provoque una inhibición de 40 a 60% de la reacción enzimática. Se añade solución de trabajo de tripsina, p. ej. 1 ml, a una mezcla de L-BAPNA, agua y la solución de extracto de muestra diluida, p. ej. 5 ml de L-BAPNA, 2 ml de agua (destilada) y 1 ml de la solución de extracto de muestra apropiadamente diluida. A continuación, las muestras se incuban exactamente durante 10 minutos a 37°C. La reacción se detiene mediante la adición de 1 ml de ácido acético (30%). Se prepara una muestra en blanco como anteriormente, pero la tripsina se añade después del ácido acético. Después de la centrifugación a 2,5 g, se mide la absorbancia a una longitud de onda de 410 nm.

En el método AACC 22-40.01, en primer lugar la muestra se tritura finamente con un tamiz de 0,15 mm. Durante la trituración se debe evitar cualquier desprendimiento de calor. La muestra triturada se mezcla con solución acuosa alcalina, p. ej. 1 g de muestra en 50 ml de solución de hidróxido sódico (0,01 N), y se agita lentamente durante 3 horas a 20°C. El pH de la solución, suspensión, dispersión o emulsión así obtenida debe estar entre 8 y 11, preferiblemente entre 8,4 y 10. La solución, suspensión, dispersión o emulsión resultante se diluye con agua, se remueve y se deja reposar. Una muestra de esta solución, p. ej. 1 ml, se toma y se diluye según se indica por su contenido de actividad inhibidora de tripsina supuesto o previamente aproximado de modo que 1 ml de solución diluida provoque una inhibición de 40 a 60% de la reacción enzimática. Se añade solución de trabajo de tripsina, p. ej. 2 ml, a una mezcla de D,L-BAPNA, agua y la solución de extracto de muestra diluida, p. ej. 5 ml de D,L-BAPNA, 1 ml de agua (destilada) y 1 ml de la solución de extracto de muestra apropiadamente diluida. A continuación, las muestras se incuban exactamente durante 10 minutos a 37°C. La reacción se detiene mediante la adición de 1 ml de ácido acético (30%). Se prepara una muestra en blanco como anteriormente, pero la tripsina se añade después del ácido acético. Después de la centrifugación a 2,5 g, se mide la absorbancia a una longitud de onda de 410 nm.

Independientemente del método usado, la actividad inhibidora de tripsina se calcula como mg de inhibidor de tripsina por g de tripsina, con la siguiente fórmula:

$$i = \frac{(Ar - Abr) - (As - Abs)}{(Ar - Abr)}$$

i = porcentaje de inhibición (%);

- Ar = absorbancia de la solución con patrón;
 5 Abr = absorbancia del blanco con patrón;
 As = absorbancia de la solución con muestra;
 Abs = absorbancia del blanco con muestra;

$$TIA = \frac{i}{100\%} \times \frac{m1 \times f1 \times f2}{m0}$$

- 10 TIA = actividad inhibidora de tripsina (mg/g);
 15 i = porcentaje de inhibición (%);
 m0 = masa de la muestra de prueba (g);
 m1 = masa de tripsina (g);
 20 f1 = factor de dilución del extracto de muestra; y
 f2 = factor de conversión basado en la pureza de la tripsina.

25 Una unidad de tripsina se define como la cantidad de enzima que incrementará la absorbancia a 410 nm en 0,01 unidades después de 10 minutos de reacción para cada 1 ml de volumen de reacción. La actividad inhibidora de tripsina se define como el número de unidades de tripsina inhibidas (TIU). Las TIU por ml se calculan usando la fórmula

$$TUI [ml] = \frac{A_{blanco} - A_{muestra}}{0,01 \times V_{muest. dil.}}$$

- 30 donde
 A_{blanco} = absorbancia del blanco
 35 A_{muestra} = absorbancia de la muestra
 V_{muest. dil.} = volumen de la solución de muestra diluida en ml.

40 Las TUI así obtenidas se representan frente a los volúmenes de la solución de muestra diluida, donde el valor extrapolado del volumen de inhibidor hasta 0 ml da las TUI finales [ml]. Finalmente, las TUI por g de muestra se calculan con la fórmula

$$TUI [g] = TUI [ml^{-1}] \times d \times 50$$

- 45 donde d = factor de dilución (volumen final dividido por la cantidad tomada).

Los resultados de este método analítico no deben superar 10% del valor promedio para muestras repetidas.

Por lo tanto, el análisis cuantitativo de la actividad de inhibidores de tripsina comprende preferiblemente las etapas

- 50 i) disolver una muestra de un pienso y/o una materia prima para piensos en una solución alcalina;
 ii) diluir una parte alícuota de la solución obtenida en la etapa i) para proporcionar una mezcla en la que la concentración de inhibidor de tripsina es suficiente para una inhibición de tripsina de aproximadamente 40 a 60%;
 iii) añadir un volumen específico de una solución de tripsina a la mezcla obtenida en la etapa ii);
 55 iv) añadir BAPNA a la mezcla obtenida en la etapa iii) para comenzar la reacción de hidrólisis de BAPNA con tripsina;
 v) detener la reacción de hidrólisis;

vi) medir la absorbancia para la mezcla obtenida en la etapa v) a una longitud de onda de 410 nm y calcular el número de unidades de tripsina inhibidas (TUI) con la fórmula

$$TUI [ml] = \frac{A_{blanco} - A_{muestra}}{0,01 \times V_{muest. dil.}}$$

5 donde

A_{blanco} = absorbancia del blanco

$A_{muestra}$ = absorbancia de la muestra

10

$V_{muest. dil.}$ = volumen de la solución de muestra diluida en ml;

y

15 representar las TUI obtenidas en la etapa viii) frente a los volúmenes de la solución de muestra diluida, donde el valor extrapolado del volumen del inhibidor hasta 0 ml da las TUI finales [ml]; y/o

vii) las TUI por g de muestra según la fórmula

$$TUI [g] = TUI [ml^{-1}] \times d \times 50$$

donde d = factor de dilución (volumen final dividido por la cantidad tomada).

20 La enzima ureasa cataliza la degradación de urea en amoníaco y dióxido de carbono. Puesto que la ureasa está presente naturalmente en habas de soja, el análisis cuantitativo de esta enzima es la prueba más común para evaluar la cantidad de habas de soja procesadas. Preferiblemente, el análisis cuantitativo de ureasa se realiza según el método de ISO 5506 (1988) o AOCs Ba 9-58. El método de AOCs Ba 9-58 determina la actividad residual de ureasa como un indicador indirecto para evaluar si los inhibidores de proteasa han sido destruidos en el procesamiento de una materia prima para piensos y/o un pienso. Dicha actividad residual de ureasa se mide como un incremento en el valor del pH en la prueba como consecuencia de la liberación al medio del compuesto alcalino amoníaco. El nivel recomendado para dicho incremento del valor del pH es de un aumento de 0,01 a 0,35 unidades (NOPA, 1997). Un análisis cuantitativo típico de la actividad de ureasa de una materia prima para piensos y/o un pienso se realiza de este modo: En primer lugar, se prepara una solución de urea en un tampón que comprende NaH_2PO_4 y KH_2PO_4 , p. ej. 30 g de urea se añade a 1 l de una solución tamponadora compuesta por 4,45 g de Na_2HPO_4 y 3,4 g de KH_2PO_4 y se mide el valor del pH de lo así obtenido. Posteriormente, se añade a esta solución una muestra de una materia prima para piensos y/o un pienso, p. ej. 0,2 g de una muestra de habas de soja. Un tubo de ensayo o vaso de precipitados con la solución, suspensión, dispersión o emulsión así obtenida se introduce en un baño de agua, p. ej. a una temperatura de 30 +/- 5°C, preferiblemente 30°C, durante de 20 a 40 minutos, preferiblemente 30 minutos. Finalmente, se mide el valor del pH de esta solución, suspensión, dispersión o emulsión, se compara con el valor del pH de la solución de urea original, y la diferencia se da como un incremento en el pH.

Por lo tanto, el análisis cuantitativo de la actividad de ureasa comprende preferiblemente las etapas de

- 40 i) preparar una solución de urea en un tampón que comprende Na_2HPO_4 y KH_2PO_4 ;
- ii) medir el valor del pH de la solución de la etapa i);
- iii) añadir una muestra de una materia prima para piensos y/o un pienso a la solución que comprende urea;
- iv) mantener la solución, suspensión, dispersión o emulsión así obtenida a una temperatura constante durante un cierto período, seguido por la medida del valor del pH de la solución, suspensión, dispersión o emulsión; y
- 45 v) expresar la diferencia entre los valores del pH medidos en las etapas ii) y iv) como un incremento en el pH.

La solubilidad de proteínas en álcali, también denominada en lo sucesivo la solubilidad de proteínas en una solución alcalina o la solubilidad alcalina de proteínas, es un método eficaz para distinguir productos sobreprocesados de productos correctamente procesados, p. ej. según DIN EN ISO 14244.

La solubilidad de proteínas en álcali o la solubilidad alcalina de proteínas comprende la determinación del porcentaje de proteína que se solubiliza en una solución alcalina. Antes de la solubilización de la muestra de un peso conocido de la materia prima para piensos y/o el pienso, se determina el contenido de nitrógeno de una muestra con un peso específico usando un método estándar para la determinación de nitrógeno, tal como el método de Kjeldahl o Dumas.

5 El contenido de nitrógeno así determinado se denomina contenido de nitrógeno en total. Posteriormente, una muestra del mismo peso y de la misma fuente se suspende en una solución alcalina de una concentración definida, preferiblemente en una solución de hidróxido alcalino, en particular en una solución de hidróxido potásico. Una parte alícuota de la suspensión así obtenida se toma y se centrifuga. De nuevo, se toma una parte alícuota de la suspensión así obtenida. El contenido de nitrógeno en esta fracción líquida se determina usando un método
10 estándar para la determinación de nitrógeno, tal como el método de Kjeldahl o Dumas. El contenido de nitrógeno así determinado se compara con el contenido de nitrógeno en total y se expresa como el porcentaje del contenido de nitrógeno original de la muestra.

El análisis cuantitativo de la solubilidad alcalina de proteínas comprende preferiblemente las etapas de

15 i) determinar el contenido de nitrógeno de una muestra de una materia prima para piensos y/o un pienso, preferiblemente mediante un método tal como el de Kjeldahl o Dumas;

ii) poner una parte alícuota de la muestra de la etapa i) en una solución alcalina, preferiblemente una solución de hidróxido sódico o hidróxido potásico, seguido por agitación;

iii) centrifugar la suspensión, solución, dispersión o emulsión obtenida en la etapa ii);

20 iv) determinar el contenido de nitrógeno en una parte alícuota de la solución o del sobrenadante de la suspensión, solución, dispersión o emulsión obtenida de la etapa iii) preferiblemente mediante un método tal como el de Kjeldahl o Dumas; y

v) calcular la solubilidad alcalina de proteínas como la relación del contenido de nitrógeno determinado en la etapa iv) al contenido de nitrógeno determinado en la etapa i).

25 Preferiblemente, la solución alcalina usada en la etapa ii) tiene un valor del pH de 11 a 14, en particular de 12 a 13, por ejemplo 12,5. La cantidad de álcali, tal como hidróxido sódico o hidróxido potásico, usada para la preparación de la solución alcalina, depende del volumen de la solución que se vaya a preparar.

30 Una solución alcalina típica para la determinación de la solubilidad alcalina de proteínas tiene un valor del pH de 12,5, por ejemplo, y una solución de hidróxido potásico con una concentración de 0,036 mol/l o 0,2% en peso. En la etapa ii) 1,5 g de una muestra de habas de soja se pone, por ejemplo, en 75 ml de una solución de hidróxido potásico, seguido por agitación a 8500 rpm (revoluciones por minuto) durante 20 minutos a 20°C. Posteriormente, una parte alícuota, por ejemplo alrededor de 50 ml, de la suspensión, solución, dispersión o emulsión así obtenida se toma e inmediatamente se centrifuga a 2500 g durante 15 min. Posteriormente, una parte alícuota, por ejemplo
35 10 ml, del sobrenadante de la suspensión, solución, dispersión o emulsión así obtenida se toma y se determina el contenido de nitrógeno en dicha parte alícuota por medio de métodos estándar para la determinación de nitrógeno, tales como el método de Kjeldahl o Dumas. Finalmente, los resultados se expresan como el porcentaje del contenido de nitrógeno de la muestra.

40 La determinación del índice de dispersabilidad de proteínas (PDI) mide la solubilidad de proteínas en agua después de combinar una muestra con agua. Este método también implica la determinación del contenido de nitrógeno en una muestra de un peso conocido, que típicamente se realiza según el mismo procedimiento que en el análisis químico en húmedo de proteínas. El contenido de nitrógeno así obtenido también se denomina el contenido de nitrógeno total. Además, el método también comprende la preparación de una suspensión de una muestra del mismo peso que en la determinación del contenido de nitrógeno se suspende en agua, lo que típicamente se realiza usando un mezclador de alta cizalladura. El contenido de nitrógeno en el sobrenadante así obtenido se determina al usar de nuevo un método estándar para la determinación, tal como el método de Kjeldahl o Dumas, descrito anteriormente. El contenido de nitrógeno así obtenido también se denomina el contenido de nitrógeno en solución. El índice de dispersabilidad de proteínas se calcula finalmente como la relación del contenido de nitrógeno en solución al contenido de nitrógeno total y se expresa como el porcentaje del contenido de nitrógeno original de la muestra.
50

El análisis cuantitativo del índice de dispersabilidad de proteínas comprende preferiblemente las etapas de

i) determinar el contenido de nitrógeno de una muestra de una materia prima para piensos y/o un pienso, preferiblemente mediante un método tal como el de Kjeldahl o Dumas;

55 ii) poner una parte alícuota de la muestra de la etapa i) en agua;

iii) determinar el contenido de nitrógeno en la dispersión obtenida en la etapa ii) preferiblemente mediante un método tal como el de Kjeldahl o Dumas; y

iv) calcular el índice de dispersabilidad de proteínas como la relación del contenido de nitrógeno determinado en la etapa iii) al contenido de nitrógeno determinado en la etapa i).

5 Puesto que los valores para el índice de dispersabilidad de proteínas se incrementan con el tamaño de partícula decreciente, los resultados obtenidos en la determinación del índice de dispersabilidad de proteínas dependen del tamaño de partícula de la muestra. Por lo tanto, se prefiere triturar la muestra que se va a someter a la determinación del índice de dispersabilidad de proteínas, en particular con un tamaño de malla de 1 mm.

10 El procedimiento descrito anteriormente está de acuerdo con el Método Oficial Ba 10-65 de the American Oil Chemists' Society (A.O.C.S.), según el cual se realiza preferiblemente la determinación del índice de dispersabilidad de proteínas. El contenido de nitrógeno de, por ejemplo, una muestra de soja se determina por medio de métodos estándar para la determinación de nitrógeno, tales como el método de Kjeldahl o Dumas. Una parte alícuota, por ejemplo 20 g, de la muestra de soja se pone en un mezclador, y se añade agua (desionizada), por ejemplo 300 ml, a
15 25°C, seguido por agitación, por ejemplo a 8500 rpm durante 10 minutos. La suspensión, solución, dispersión o emulsión así obtenida se filtra y la solución, dispersión o emulsión así obtenida se centrifuga, p. ej. a 1000 g durante 10 minutos. Finalmente, el contenido de nitrógeno en el sobrenadante se determina por medio de métodos estándar para la determinación de nitrógeno, tales como el método de Kjeldahl o Dumas.

20 Muchos piensos se procesan, lo que conduce a posibles daños en los aminoácidos. Esto puede hacer que algunos de los aminoácidos no estén disponibles para su uso en nutrición. Este es el caso particularmente para la lisina, que tiene un grupo amino en ϵ que puede reaccionar con el grupo carbonilo de otros compuestos, p. ej. azúcares reductores, presentes en la dieta para dar compuestos que pueden ser absorbidos parcialmente del intestino pero que no tienen ningún valor nutricional para el animal. La reacción del grupo amino en ϵ de lisina libre y/o unida a
25 proteína con azúcares reductores durante el tratamiento térmico se conoce como la reacción de Maillard. Esta reacción da productos de Maillard tanto iniciales como tardíos. Los productos de Maillard iniciales son derivados de lisina estructuralmente alterados que se denominan compuestos de Amadori, mientras que los productos de Maillard tardíos se denominan melanoidinas. Las melanoidinas no interfieren con el análisis normal para la lisina y no tienen influencia sobre los valores de digeribilidad que se calculan. Solo dan como resultado concentraciones inferiores de
30 lisina que se absorbe. Por lo tanto, las melanoidinas típicamente no se identifican en el análisis regular de aminoácido. En comparación, los compuestos de Amadori sí interfieren con el análisis de aminoácidos y dan concentraciones de lisina inexactas para la muestra que se analiza. La lisina que se une a estos compuestos se denomina "lisina bloqueada" y está biológicamente indisponible debido a que es resistente a cualquier degradación enzimática gastrointestinal.

35 El contenido de lisina reactiva en una muestra se puede determinar usando el reactivo de Sanger, es decir 1-fluoro-2,4-dinitrobenzoceno (FNDB). Por lo tanto, la lisina determinada por medio de este método también se denomina FDNB-lisina. El reactivo de Sanger convierte la lisina en la dinitrofenil (DNP)-lisina amarilla, que se puede extraer y medir espectrofotométricamente a una longitud de onda de 435 nm o mediante cromatografía de líquidos de alta
40 resolución.

Alternativamente, el contenido de lisina reactiva en una muestra también se puede determinar con la reacción de guanidación usando el reactivo suave O-metilisourea. En este método, la O-metilisourea solo reacciona con el grupo amino en ϵ de la lisina, pero no reacciona con el grupo amino en α de la lisina. Por lo tanto, la reacción de
45 guanidación se puede usar para determinar lisina libre y lisina unida a péptido. Por lo tanto, se da preferencia para la reacción de guanidación para la determinación de la lisina reactiva. La reacción de guanidación de la lisina da una homoarginina, que se deriva adicionalmente con ninhidrina, y el cambio resultante en la absorción se puede medir a una longitud de onda de 570 nm. Posteriormente, la muestra derivada se hidroliza para dar de nuevo la homoarginina. La determinación de lisina reactiva también se puede realizar por medio de la reacción de
50 guanidación de la lisina unida a proteína no dañada en un medio alcalino para dar homoarginina. En este tipo de reacción, la guanidación se efectúa típicamente a través de la acción de O-metilisourea (OMIU).

Puesto que es un método más fácil de usar, se da preferencia al uso de la reacción de guanidación para la determinación de lisina reactiva. La reacción de guanidación implica la incubación de una muestra de una materia
55 prima para piensos y/o un pienso en O-metilisourea. Preferiblemente, la relación de O-metilisourea a lisina es mayor de 1000. La muestra así tratada obtenida a partir de la etapa i) se seca y se analiza con respecto a la homoarginina, preferiblemente al usar cromatografía de líquidos de alta resolución de intercambio iónico. Posteriormente, dicha muestra se deriva con ninhidrina y la absorbancia de la muestra derivada se mide a una longitud de onda de 570 nm. Posteriormente, dicha muestra se somete a una hidrólisis, seguida por la retirada del disolvente hasta sequedad de la muestra. Se determinan el peso y la cantidad molar de homoarginina en la muestra. Finalmente, se calcula la
60 cantidad de lisina reactiva a partir de la cantidad molar de homoarginina.

Por lo tanto, la reacción de guanidación para la determinación de lisina reactiva comprende preferiblemente las etapas de

- i) incubar una muestra de una materia prima para piensos y/o un pienso en O-metilisourea;
 - ii) analizar la muestra obtenida de la etapa i) con respecto a la homoarginina;
 - 5 iii) derivar la muestra obtenida de la etapa ii) con ninhidrina;
 - iv) medir la absorbancia de la muestra obtenida de la etapa iii) a una longitud de onda de 570 nm;
 - v) someter a la muestra procedente de la etapa iv) a una hidrólisis;
 - vi) determinar el peso y la cantidad molar de homoarginina en la muestra hidrolizada; y
 - vii) determinar la cantidad de lisina reactiva a partir de la cantidad molar de homoarginina obtenida en la etapa vi).
- 10 Sin embargo, no solo la lisina está sometida a daños térmicos en el procesamiento de materias primas para piensos y/o piensos sino también otros aminoácidos. Según el método de la presente invención, los aminoácidos metionina, cisteína, cistina, treonina, leucina, arginina, isoleucina, valina, histidina, fenilalanina, tirosina, triptófano, glicina, serina, prolina, alanina, ácido aspártico y ácido glutámico se analizan cuantitativamente en una muestra de una
- 15 materia prima para piensos y/o un pienso. Hasta un cierto grado, los aminoácidos no solo están presentes como compuestos simples sino también como oligopéptidos, p. ej. dipéptidos, tripéptidos o péptidos superiores, formados en una reacción de equilibrio de dos, tres o incluso más aminoácidos. Habitualmente, el grupo amino de un aminoácido es demasiado débil como un nucleófilo para reaccionar directamente con el grupo carboxilo de otro aminoácido o está presente en forma protonada ($-\text{NH}_3^+$). Por lo tanto, el equilibrio de esta reacción está habitualmente a la izquierda bajo condiciones estándar. No obstante, dependiendo de los aminoácidos individuales y
- 20 la condición de una solución de muestra, algunos de los aminoácidos que se van a determinar pueden no estar presentes como compuestos individuales sino hasta un cierto grado como oligopéptidos, p. ej. un dipéptido, tripéptido o péptido superior, formado por dos, tres o incluso más aminoácidos. Por lo tanto, la muestra de una materia prima para piensos y/o un pienso se debe someter a un tratamiento de hidrólisis, preferiblemente una hidrólisis ácida o básica, usando por ejemplo ácido clorhídrico o hidróxido de bario. A fin de facilitar la separación de
- 25 los aminoácidos libres y/o la identificación y determinación de los aminoácidos, los aminoácidos libres se derivan con un reactivo cromogénico, si es necesario. Reactivos cromogénicos adecuados son conocidos por el experto en la técnica. Posteriormente, los aminoácidos libres o los aminoácidos libres derivados se someten a una separación cromatográfica, en la que los diferentes aminoácidos se separan entre sí debido a los diferentes tiempos de retención debidos a los diferentes grupos funcionales de los aminoácidos individuales. Columnas cromatográficas
- 30 adecuadas, por ejemplo columnas en fase inversa, y un disolvente eluyente adecuado para la separación cromatográfica de aminoácidos son conocidos para el experto en la técnica. Los aminoácidos separados se determinan finalmente en los eluidos procedentes de la etapa cromatográfica mediante comparación con un patrón calibrado, preparado para el análisis. Típicamente, los aminoácidos, que se eluyen de la columna cromatográfica, son detectados con un detector adecuado, por ejemplo con un detector de la conductividad, un detector específico
- 35 para masa o un detector de fluorescencia o un detector UV/VIS dependiendo de cuándo se deriven los aminoácidos con un reactivo cromogénico. Esto da un cromatograma con superficies de picos y alturas de picos para los aminoácidos individuales. La determinación de los aminoácidos individuales se realiza al comparar las superficies de los picos y las alturas de los picos con un patrón calibrado o una curva de calibración para cada aminoácido. Puesto que la cistina ($\text{HO}_2\text{C}(-\text{H}_2\text{N})\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}_2\text{H}$) y la cisteína ($\text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}_2\text{H}$) se determinan
- 40 ambas como ácido cisteico ($\text{HO}_3\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}_2\text{H}$), el análisis cuantitativo no hace ninguna distinción entre los dos aminoácidos. Sin embargo, esto no parece tener ninguna influencia sobre la precisión del análisis cuantitativo debido a que típicamente la cisteína es muy propensa a oxidaciones y por lo tanto habitualmente está presente como cistina.
- 45 El análisis cuantitativo de al menos un aminoácido distinto de lisina reactiva comprende preferiblemente las etapas de:
- i) poner una muestra de una materia prima para piensos y/o un pienso en una solución acuosa ácida;
 - ii) hidrolizar los aminoácidos contenidos en dicha muestra a fin de liberarlos;
 - iii) opcionalmente, derivar los aminoácidos libres obtenidos en la etapa ii) con un reactivo cromogénico que mejora la
 - 50 separación y las propiedades espectrales de los aminoácidos;

iv) separar los aminoácidos libres obtenidos en la etapa ii) y/o iii) usando cromatografía en columna; y

v) determinar las cantidades de los aminoácidos separados en los eluidos obtenidos de la etapa iv).

5 El procedimiento descrito anteriormente se usa en general para el análisis cuantitativo de la cantidad total de lisina, que se requiere para la determinación de la relación de la cantidad reactiva de lisina a la cantidad total de lisina, y para el análisis cuantitativo de al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en metionina, cisteína, cistina, treonina, leucina, arginina, isoleucina, valina, histidina, fenilalanina, tirosina, triptófano, glicina, serina, prolina, alanina, ácido aspártico y ácido glutámico.

10 El punto más crítico en el análisis cuantitativo de aminoácidos es la preparación de muestras, que difiere con respecto al tipo de ingredientes y los aminoácidos de mayor interés. La mayoría de los aminoácidos se pueden hidrolizar mediante una hidrólisis en ácido clorhídrico (6 mol/l) durante un período de hasta 24 horas. Para los aminoácidos que contienen azufre metionina, cisteína y cistina, la hidrólisis está precedida por una oxidación con ácido per fórmico. Para el análisis cuantitativo de triptófano, la hidrólisis se realiza con hidróxido de bario (1,5 mol/l) durante 20 horas.

15 Antes del análisis cuantitativo de los aminoácidos, la muestra de la materia prima para piensos y/o el pienso preferiblemente se tritura finamente. Durante dicha trituración de la materia prima para piensos y/o el pienso, se debe evitar cualquier desprendimiento de calor a fin de evitar cualquier influencia adicional del calor sobre el contenido de la materia prima para piensos y/o el pienso, en particular con respecto al parámetro que está sometido al análisis cuantitativo de la etapa a) del método según la presente invención.

20 Los valores obtenidos para los parámetros del análisis cuantitativo realizado en las etapas a1) a a3) según la presente invención se representan en la etapa b) del método según la presente invención como una función del tiempo de procesamiento de las muestras que se someten al análisis cuantitativo.

25 En lo siguiente, en la etapa c) del método según la presente invención, se determina la superficie en la gráfica de la etapa b), donde

- el valor de la actividad inhibidora de tripsina, expresado como mg de tripsina por g de muestra, es mayor de 4,
- 30 - el incremento en el valor del pH es mayor de 0,35,
- el valor de la solubilidad de proteínas en álcali, expresado como el porcentaje de proteína en la muestra que es soluble en una solución alcalina, es mayor de 85%, y/o
- el valor del índice de dispersabilidad de proteínas, expresado como el porcentaje del contenido original de nitrógeno en la muestra, es mayor de 40%,

35 y las superficies en la gráfica de la etapa b), cuando se da al menos una de estas condiciones, son señaladas como subprocesadas.

Posteriormente, en la etapa d) del método según la presente invención, se determina la superficie en la gráfica de la etapa b), donde

- 40 - el valor de la relación de la cantidad reactiva de lisina a la cantidad total de lisina es menor de 90%,
- el valor del índice de dispersabilidad de proteínas, expresado como el porcentaje del contenido de nitrógeno original de la muestra, es menor de 15%, y/o
- el valor de la solubilidad de proteínas en álcali, expresado como el porcentaje de proteína en la muestra que es soluble en una solución alcalina, es menor de 73%,

45 y las superficies en la gráfica de la etapa b), cuando se da al menos una de estas condiciones, son señaladas como sobreprocesadas.

Finalmente, en la etapa e) del método según la presente invención, se determina la superficie en la gráfica de la etapa b), donde

- el valor de la actividad inhibidora de tripsina, expresado como mg de tripsina por g de muestra, es menor de 4,
 - el valor de la solubilidad de proteínas en álcali, expresado como el porcentaje de proteína en la muestra que es soluble en una solución alcalina, está entre 73 y 85%,
- 5
- el valor del índice de dispersabilidad de proteínas, expresado como el porcentaje del contenido de nitrógeno de la muestra, está entre 15 y 40%, y
 - el valor de la relación de la cantidad reactiva de lisina a la cantidad total de lisina es al menos 90%,

y las superficies en la gráfica de la etapa b), cuando se da al menos una de estas condiciones, son señaladas como adecuadamente procesadas.

10 Además o alternativamente, en la etapa e) del método según la presente invención, las superficies obtenidas en las etapas c) y d) se sustraen de la gráfica de la etapa b) y la superficie así obtenida se señala como adecuadamente procesada.

15 En el caso raro de que ambas alternativas en la etapa e) den superficies diferentes, se determina el tamaño medio para esas superficies.

A fin de facilitar una clasificación de la materia prima para piensos y/o el pienso sometido al método según la presente invención como sobreprocesado, subprocesado o adecuadamente procesado, es necesario además
 20 generar una escala de procesamiento, en la que se representa finalmente el indicador de las condiciones de procesamiento de la etapa f). El tamaño de las superficies determinadas en las etapas c) a e) del método según la presente invención puede diferir en su tamaño, en particular con respecto a su altura (extensión de las superficies en la dirección y o a lo largo de las ordenadas) y/o su longitud (extensión de las superficies en la dirección x o a lo largo de las abscisas). Por lo tanto, en la etapa f) del método según la presente invención, las superficies determinadas en
 25 las etapas c) a e) se estandarizan hasta un tamaño igual y las superficies estandarizadas se clasifican posteriormente de sobreprocesamiento a subprocesamiento o viceversa. Además, se asigna una escala continua a las superficies estandarizadas y clasificadas.

Según la presente invención, los valores de los parámetros obtenidos en las etapas a1) a a3) del método según la
 30 presente invención se insertan en la etapa g) del método según la presente invención en una serie de potencia y los valores así obtenidos se usan para determinar el valor medio, que es el llamado indicador de las condiciones de procesamiento (PCI).

Una serie de potencia típica corresponde a la fórmula

$$35 \quad P(x) = \sum_{n=0}^i (a_{n,0} + a_{n,1} \times x_n + a_{n,2} \times x_n^2 + a_{n,3} \times x_n^3 + \dots + a_{n,i} \times x_i^n)$$

con

- 40 i = número máximo de los parámetros analizados;
- n = parámetro específico;
- x_n = valor de un parámetro específico; y
- 45 a_n = factor de ponderación para el parámetro.

En el contexto de la presente invención, el factor de ponderación es preferiblemente un número entero. Preferiblemente, el factor de ponderación es un número entero de 1 a 10.

50 Considerando la formación del valor medio para los valores procedentes de la serie de potencia, se obtiene el llamado indicador de las condiciones de procesamiento (PCI) por medio de la fórmula

$$PCI = \frac{i}{(i+1)} \sum_{n=0}^i (a_{n,0} + a_{n,1} \times x_n + a_{n,2} \times x_n^2 + a_{n,3} \times x_n^3 + \dots + a_{n,i} \times x_i^n)$$

55 con

i = número máximo de los parámetros analizados;

n = parámetro específico;

5 x_n = valor de un parámetro específico; y

a_n = factor de ponderación para el parámetro.

10 Finalmente, el indicador de las condiciones de procesamiento obtenido en la etapa g) se está representando a continuación finalmente en la etapa h) del método según la presente invención en la escala de procesamiento obtenida en la etapa f) para indicar si la materia prima para piensos y/o el pienso está sobreprocesado, procesado adecuadamente o subprocesado.

15 Preferiblemente, una serie de muestras de una materia prima para piensos y/o un pienso procesado procedente de diferentes momentos de procesamiento del mismo se somete al método según la presente invención a fin de proporcionar una población de muestra exhaustiva. Preferiblemente, dicha serie de muestra comprende al menos 100 muestras, en particular 200, 300, 400, 500 o más muestras. En el caso de una serie de muestra, el tipo de materia prima para piensos y/o pienso es preferiblemente del mismo tipo. Además, se prefiere someter más de una serie de muestra preferiblemente del mismo tipo de materia prima para piensos y/o pienso al método según la
20 presente invención. Esto tiene la ventaja de que también series de muestra de diferentes regiones del mundo se pueden someter al método según la presente invención. Esto permite adquirir un grupo de datos exhaustivo, que también permite determinar la influencia de las influencias del procesamiento sobre el valor nutricional de una materia prima para piensos y/o un pienso de diferentes regiones del mundo. Así, el método según la presente invención también considera las diferentes condiciones climáticas en las diversas regiones del mundo, que junto con el procesamiento también tiene una influencia sobre el valor nutricional de materias primas para piensos y/o piensos.

El crecimiento animal requiere un suministro dietético de aminoácidos. Sin embargo, los aminoácidos presentes en el pienso no son completamente digeribles. En cambio, la digeribilidad de un aminoácido varía entre las materias primas para piensos o los piensos y, además, también varía entre los aminoácidos. Por ejemplo, el contenido de factores antinutritivos o de fibras en la matriz de la materia prima para piensos puede disminuir la digeribilidad de aminoácidos en una especie de animal. Los aminoácidos son digeridos en el intestino delgado. Los aminoácidos digeribles son absorbidos a través de las paredes del intestino delgado. Los materiales no digeridos pasan a lo largo del intestino grueso y son excretados en las heces, al menos teóricamente. Sin embargo, la microflora del intestino grueso puede metabolizar algunos de los aminoácidos no digeridos para su propio crecimiento y desarrollo. Como una consecuencia, la absorción de aminoácidos en una especie de animal no se puede determinar mediante una simple sustracción del contenido de aminoácidos en las heces del contenido de aminoácidos en la dieta suministrada al animal. Para evitar la manipulación por microbios del intestino posterior, la digeribilidad de aminoácidos por animales monogástricos se mide lo más correctamente al final del intestino delgado. Esta parte del intestino también se denomina el íleon. Por lo tanto, en el campo de la nutrición animal, la digeribilidad de aminoácidos respectiva también se denomina la aminodigeribilidad ileal o el coeficiente de digeribilidad ileal. El método de análisis ileal mide la diferencia entre la cantidad de cada uno de los aminoácidos de la dieta y en los digeridos ileales, dividida por la cantidad de cada uno de los aminoácidos de la dieta. Sin embargo, los digeridos recogidos al final del intestino delgado contienen grandes cantidades de proteínas endógenas y, dependiendo de la contribución relativa de pérdidas de aminoácidos endógenos, los coeficientes de digeribilidad ileal de aminoácidos aparente están afectados en diferentes grados. La expresión evidente en el contexto de la digeribilidad ileal de aminoácidos refleja el hecho de que los coeficientes no están ajustados por las pérdidas de nitrógeno y aminoácidos endógenos. Los llamados coeficientes aparentes de digeribilidad ileal de aminoácidos o digeribilidad ileal aparente (AID) se calculan según la ecuación:

50
$$AID (\%) = \frac{AA_{toma} - AA_{excretada}}{AA_{toma}} \times 100$$

con

55 AA_{toma} = la cantidad del aminoácido individual, dada al animal como parte de la dieta, y

$AA_{excretada}$ = la cantidad del aminoácido individual en digeridos ileales.

Las pérdidas de proteínas y aminoácidos endógenos se pueden separar en una pérdida basal (mínima) y una específica adicional. La pérdida basal es inespecífica y está relacionada con la toma de materia seca, mientras que la pérdida específica se relaciona con factores inherentes en los piensos, p. ej. fibra y factores antinutritivos tales como inhibidores de tripsina, lectinas y taninos. Las secreciones endógenas se originan a partir de diversas fuentes incluyendo saliva, secreciones pancreáticas, células epiteliales desprendidas y mucina. Las cantidades de pérdidas basales de proteínas y aminoácidos endógenos en digeridos ileales se pueden determinar mediante diferentes métodos. Estos métodos incluyen aportar dietas libres de proteínas, aportar dietas que contienen fuentes de

proteína que se supone que son completamente (100%) digeribles con absorción completa de aminoácidos y la técnica de regresión.

5 Las imperfecciones de la digeribilidad ileal aparente se vencen cuando los coeficientes de digeribilidad ileal aparente son estandarizados para corregirlos con respecto a las pérdidas basales de aminoácidos endógenos. Los coeficientes de digeribilidad ileal estandarizados o estándar así obtenidos son independientes del nivel de aminoácidos de la dieta. El punto clave para la determinación de la digeribilidad ileal de aminoácidos estandarizada es la cuantificación del nivel de las pérdidas basales de aminoácidos endógenos en digeridos recogidos del extremo del intestino delgado. Los coeficientes de digeribilidad ileal de aminoácidos estándar o los coeficientes de
10 digeribilidad ileal estándar (estandarizados) (SID) se calculan según la ecuación:

$$SID (\%) = \left[\frac{AA_{toma} - (AA_{excretada} - A_{bas. end.})}{AA_{toma}} \right] \times 100,$$

15 con

AA_{toma} = la cantidad del aminoácido individual, aportada al animal como parte de la dieta,

20 $AA_{excretada}$ = la cantidad del aminoácido individual en digeridos ileales, y

$AA_{bas. end.}$ = la cantidad de la pérdida basal de aminoácidos endógenos.

25 Actualmente, solo se usa en la práctica un único coeficiente de digeribilidad estándar de un aminoácido específico en una materia prima para piensos y/o un pienso para una especie de animal para la evaluación del valor nutricional de dicha materia prima para piensos y/o pienso para una especie de animal, independientemente del origen de la materia prima para piensos y/o el pienso. Según esto, los coeficientes de digeribilidad estándar de la práctica actual no consideran impactos regionales sobre el valor nutricional ni consideran impactos de las diferencias en el procesamiento de la materia prima para piensos y/o el pienso.

30 Sin embargo, sin considerar las influencias adicionales sobre el valor nutricional, la práctica actual de uso de un único coeficiente de digeribilidad estándar no permite dar una evaluación fiable y significativa del valor nutricional de una materia prima para piensos y/o un pienso.

35 En comparación, el método según la presente invención considera estas influencias debido a que correlaciona el coeficiente ileal estándar de un aminoácido en una materia prima para piensos y/o un pienso en una especie de animal con el indicador de las condiciones de procesamiento obtenido para la misma materia prima para piensos y/o pienso, que ya refleja las influencias del procesamiento sobre el valor nutricional de la materia prima para piensos y/o el pienso.

40 En una realización, el método según la presente invención comprende además las etapas de

i) determinar el coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado (SID) de un aminoácido en una materia prima para piensos y/o un pienso para una especie de animal mediante

- i1) análisis cuantitativo de la cantidad de dicho aminoácido (AA_{toma}) en la misma muestra que en la etapa a);
- 45 i2) administración de dicha muestra a una especie de animal y determinación de la pérdida endógena de dicho aminoácido ($AA_{basal, excret.}$) y la salida ileal de aminoácido ($AA_{ileal, salida}$); y
- i3) inserción de los valores de los parámetros obtenidos en las etapas i1) y i2) en la fórmula general (II)

$$SID [\%] = \left[\frac{AA_{toma} - (AA_{ileal, salida} - A_{basal, excret.})}{AA_{toma}} \right] \times 100,$$

y

50 j) representar el coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado obtenido en la etapa i) como una función del indicador de las condiciones de procesamiento obtenido en la etapa g) y/o expresar dicho coeficiente de digeribilidad ileal estándar en una ecuación de calibración como una función del indicador de las condiciones de procesamiento obtenido en la etapa g).

ES 2 773 449 T3

Ejemplos para las ecuaciones de calibración que dan el coeficiente de digeribilidad ileal (SID_{AA}) como una función del PCI se dan posteriormente. Estas ecuaciones dan el coeficiente de digeribilidad ileal para un aminoácido específico en haba soja con toda la grasa en aves de corral o cerdos:

5 Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de metionina (SID_{Met}) de habas de soja con toda la grasa en aves de corral

$$SID_{Met} = -0,3581 \times PCI^2 + 8,679 \times PCI + 33,624 \quad R^2 = 0,9399,$$

Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de cistina (SID_{cys}) de habas de soja con toda la grasa en aves de corral

$$SID_{Cistina} = -0,442 \times PCI^2 + 11,983 \times PCI - 13,905 \quad R^2 = 0,9405,$$

10 Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de metionina y cistina ($SID_{Met + Cistina}$) de habas de soja con toda la grasa en aves de corral

$$SID_{Met + Cistina} = -0,3861 \times PCI^2 + 9,8435 \times PCI + 13,53 \quad R^2 = 0,9391,$$

Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de lisina (SID_{Lys}) de habas de soja con toda la grasa en aves de corral

15 $SID_{Lys} = -0,4187 \times PCI^2 + 11,462 \times PCI + 5,6474 \quad R^2 = 0,9139,$

Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de treonina (SID_{Thr}) de habas de soja con toda la grasa en aves de corral

$$SID_{Thr} = -0,368 \times PCI^2 + 9,2054 \times PCI + 21,772 \quad R^2 = 0,9469,$$

20 Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de triptófano (SID_{Trp}) de habas de soja con toda la grasa en aves de corral

$$SID_{Trp} = -0,4046 \times PCI^2 + 9,7674 \times PCI + 23,052 \quad R^2 = 0,9431,$$

Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de arginina (SID_{Arg}) de habas de soja con toda la grasa en aves de corral

$$SID_{Arg} = -0,3033 \times PCI^2 + 7,3008 \times PCI + 41,512 \quad R^2 = 0,9494,$$

25 Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de isoleucina (SID_{Ile}) de habas de soja con toda la grasa en aves de corral

$$SID_{Ile} = -0,3974 \times PCI^2 + 9,211 \times PCI + 29,802 \quad R^2 = 0,9657,$$

Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de leucina (SID_{Leu}) de habas de soja con toda la grasa en aves de corral

30 $SID_{Leu} = -0,3639 \times PCI^2 + 8,3187 \times PCI + 35,843 \quad R^2 = 0,9651,$

Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de valina (SID_{Val}) de habas de soja con toda la grasa en aves de corral

$$SID_{Val} = -0,388 \times PCI^2 + 9,0608 \times PCI + 29,464 \quad R^2 = 0,9639,$$

35 Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de histidina (SID_{His}) de habas de soja con toda la grasa en aves de corral

ES 2 773 449 T3

$$\text{SID}_{\text{His}} = -0,3554 \times \text{PCI}^2 + 9,1547 \times \text{PCI} + 25,938 \quad R^2 = 0,9376,$$

Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de fenilalanina (SID_{Phe}) de habas de soja con toda la grasa en aves de corral

$$\text{SID}_{\text{Phe}} = -0,3523 \times \text{PCI}^2 + 8,0374 \times \text{PCI} + 37,432 \quad R^2 = 0,9719,$$

5 Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de metionina (SID_{Met}) de habas de soja con toda la grasa en cerdos

$$\text{SID}_{\text{Met}} = -0,3286 \times \text{PCI}^2 + 7,3561 \times \text{PCI} + 43,444 \quad R^2 = 0,8625,$$

Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de cistina (SID_{Cys}) de habas de soja con toda la grasa en cerdos

$$\text{SID}_{\text{Cys}} = -0,4982 \times \text{PCI}^2 + 13,115 \times \text{PCI} - 11,392 \quad R^2 = 0,7687,$$

10 Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de metionina y cistina ($\text{SID}_{\text{Met+Cistina}}$) en habas de soja con toda la grasa para cerdos

$$\text{SID}_{\text{Met+Cistina}} = -0,4237 \times \text{PCI}^2 + 10,534 \times \text{PCI} + 14,77 \quad R^2 = 0,8026,$$

Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de lisina (SID_{Lys}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos

$$\text{SID}_{\text{Lys}} = -0,4397 \times \text{PCI}^2 + 11,359 \times \text{PCI} + 11,75 \quad R^2 = 0,8209,$$

Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de treonina (SID_{Thr}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos

15 $\text{SID}_{\text{Thr}} = -0,291 \times \text{PCI}^2 + 6,2769 \times \text{PCI} + 44,594 \quad R^2 = 0,8414,$

Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de triptófano (SID_{Trp}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos

$$\text{SID}_{\text{Trp}} = -0,3167 \times \text{PCI}^2 + 6,6559 \times \text{PCI} + 45,534 \quad R^2 = 0,8544,$$

Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de arginina (SID_{Arg}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos

$$\text{SID}_{\text{Arg}} = -0,261 \times \text{PCI}^2 + 5,3573 \times \text{PCI} + 63,685 \quad R^2 = 0,8894,$$

20 Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de isoleucina (SID_{Ile}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos

$$\text{SID}_{\text{Ile}} = -0,3204 \times \text{PCI}^2 + 6,7739 \times \text{PCI} + 48,135 \quad R^2 = 0,8789,$$

Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de leucina (SID_{Leu}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos

$$\text{SID}_{\text{Leu}} = -0,2901 \times \text{PCI}^2 + 5,7556 \times \text{PCI} + 55,925 \quad R^2 = 0,8801,$$

Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de valina (SID_{Val}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos

25 $\text{SID}_{\text{Val}} = -0,2801 \times \text{PCI}^2 + 5,8136 \times \text{PCI} + 52,234 \quad R^2 = 0,868,$

Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de histidina (SID_{His}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos

$$\text{SID}_{\text{His}} = -0,2915 \times \text{PCI}^2 + 6,548 \times \text{PCI} + 48,067 \quad R^2 = 0,8501,$$

Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de fenilalanina (SID_{Phe}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos

30 $\text{SID}_{\text{Phe}} = -0,2676 \times \text{PCI}^2 + 4,9292 \times \text{PCI} + 62,59 \quad R^2 = 0,8914,$

ES 2 773 449 T3

Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de glicina (SID_{Gly}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos

$$\text{SID}_{\text{Gly}} = -0,3377 \times \text{PCI}^2 + 7,7741 \times \text{PCI} + 35,285 \quad R^2 = 0,7481,$$

Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de serina (SID_{Ser}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos

$$\text{SID}_{\text{Ser}} = -0,3257 \times \text{PCI}^2 + 6,9689 \times \text{PCI} + 44,913 \quad R^2 = 0,8601,$$

5 Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de prolina (SID_{Pro}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos

$$\text{SID}_{\text{Pro}} = -0,4428 \times \text{PCI}^2 + 10,473 \times \text{PCI} + 36,719 \quad R^2 = 0,6098,$$

Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de alanina (SID_{Ala}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos

$$\text{SID}_{\text{Ala}} = -0,3002 \times \text{PCI}^2 + 6,6179 \times \text{PCI} + 44,817 \quad R^2 = 0,8469,$$

10 Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de ácido aspártico (SID_{Asp}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos

$$\text{SID}_{\text{Asp}} = -0,4159 \times \text{PCI}^2 + 10,765 \times \text{PCI} + 9,9347 \quad R^2 = 0,8487,$$

y

Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de ácido glutámico (SID_{Glu}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos

$$15 \quad \text{SID}_{\text{Glu}} = -0,3041 \times \text{PCI}^2 + 6,9635 \times \text{PCI} + 44,434 \quad R^2 = 0,8545.$$

Para cada calibración, se da el coeficiente de determinación, indicado como R², respectivo. En estadística, el coeficiente de determinación es un número que indica qué tan bien se ajustan los datos a un modelo estadístico – a veces simplemente una línea o curva. Una R² de 1 indica que la línea de regresión se ajusta bien a los datos, mientras que una R² de 0 indica que las líneas no se ajustan a los datos en absoluto. En todos los casos, la digeribilidad ileal estandarizada de los aminoácidos tiene una R² que está muy cerca de 1. Según esto, el modelo estadístico se ajusta muy bien a los datos.

25 El análisis cuantitativo de las etapas a1) a a3) del método según la presente invención consume bastante tiempo y dinero. Las medidas en el infrarrojo cercano (NIR) de la materia prima para piensos y/o el pienso respectivo serían una alternativa más eficaz en cuanto al tiempo y el coste para determinar las influencias del procesamiento sobre el valor nutricional de una materia prima para piensos y/o un pienso. Sin embargo, la espectroscopía de infrarrojo cercano no da los resultados con la precisión deseada; en cambio, a menudo conduce a resultados contradictorios. Según esto, ni el análisis cuantitativo ni la espectroscopía de infrarrojo cercano solos son adecuados para una determinación eficaz en cuanto al coste y al tiempo de las influencias del procesamiento sobre el valor nutricional de una materia prima para piensos y/o un pienso.

35 Según la presente invención, este problema se resuelve debido a que las absorciones de infrarrojo cercano obtenidas para una muestra de una materia prima para piensos y/o un pienso se correlacionan con los valores correspondientes del análisis cuantitativo de los mismos. La correlación así obtenida de los valores del análisis cuantitativo con las absorciones de la medida de NIR se dibujan o representan preferiblemente como una gráfica de calibración, lo que facilita el cotejo de las absorciones de las medidas de NIR de otra muestra con los valores exactos correspondientes para los parámetros basados en el análisis cuantitativo.

40 Por lo tanto, otro objetivo de la presente invención es un método ejecutado informáticamente para la evaluación de las influencias del procesamiento sobre el valor nutricional de una materia prima para piensos y/o un pienso, que comprende las etapas de

A) someter a una muestra de la misma materia prima para piensos y/o pienso que en la etapa a) del método para la determinación de la influencia del procesamiento sobre el valor nutricional de una materia prima para piensos y/o un pienso a espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR);

B) cotejar las intensidades de absorción a las longitudes de onda o los números de onda respectivos en el espectro de NIR obtenido en la etapa A) con los parámetros correspondientes y sus valores determinados en las etapas de someter la muestra a

- 5 a1) un análisis cuantitativo de al menos un parámetro seleccionado del grupo que consiste en actividad inhibidora de tripsina, actividad de ureasa, solubilidad de proteínas en álcali e índice de dispersabilidad de proteínas;
- a2) una determinación de la relación de la cantidad reactiva de lisina a la cantidad total de lisina que comprende un análisis cuantitativo de la cantidad reactiva de lisina y la cantidad total de lisina, seguido por la formación de la relación de la cantidad reactiva de lisina a la cantidad total de lisina; y
- 10 a3) un análisis cuantitativo de la cantidad de al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en metionina, cisteína, cistina, treonina, leucina, arginina, isoleucina, valina, histidina, fenilalanina, tirosina, triptófano, glicina, serina, prolina, alanina, ácido aspártico y ácido glutámico;

y

15 C) representar el cotejo de la etapa B) como una gráfica de calibración y/o expresar los parámetros determinados en las etapas a1) a a3) en una ecuación de calibración como una función de las intensidades de absorción en las longitudes de onda o los números de onda respectivos cotejados en la etapa B).

Dependiendo del espectrómetro usado, los espectros de infrarrojo cercano (NIR) de la etapa A) se pueden registrar a longitudes de onda entre 400 y 2.500 nm con cualesquiera espectroscopios de infrarrojos adecuados que trabajen bien sobre el principio del monocromador o bien sobre el principio de la transformada de Fourier. Preferiblemente, los espectros de NIR se registran entre 1.000 y 2.500 nm. Las longitudes de onda se convierten fácilmente en los números de onda respectivos y, por lo tanto, los espectros de NIR se pueden registrar por supuesto a los correspondientes números de onda. Puesto que los compuestos orgánicos que se van a determinar en el método según la presente invención, es decir proteínas y aminoácidos, son ricos en enlaces O-H, enlaces C-H y enlaces N-H, son adecuados para la detección por medio de espectroscopía de infrarrojo cercano. Sin embargo, una muestra biológica tal como un pienso contiene una multitud de diferentes compuestos orgánicos y así representa una matriz compleja. No obstante, cada sustancia biológica tiene un espectro de infrarrojo cercano único, comparable a una huella dactilar individual. Por consiguiente, se puede suponer que dos sustancias biológicas que tienen exactamente el mismo espectro tienen la misma composición física y química y así son idénticas. Por otra parte, si dos sustancias biológicas tienen espectros diferentes, se puede suponer que son diferentes, bien en cuanto a sus características físicas o químicas o bien en ambas. Debido a sus bandas de absorción individuales y muy específicas, las señales de compuestos orgánicos y sus intensidades en espectros de NIR fácilmente se pueden atribuir y correlacionar con un compuesto orgánico específico y su concentración en una muestra de peso conocido. Así, la espectroscopía de NIR permite una predicción o evaluación fiable de, por ejemplo, la cantidad de aminoácidos y proteínas en una muestra. Puesto que la misma muestra de una materia prima para piensos y/o un pienso específico se somete al análisis cuantitativo en la etapa a) y a la espectroscopía de NIR en la etapa A), también es posible atribuir y correlacionar absorciones y sus intensidades en un espectro de NIR con parámetros tales como la actividad inhibidora de tripsina, la actividad de ureasa, la solubilidad de proteínas en álcali y el índice de dispersabilidad de proteínas, y con sus valores y cambios. Una vez que las intensidades de absorción y las longitudes de onda o los números de onda respectivos se han cotejado con éxito, es decir se han atribuido a y correlacionado con los parámetros de interés y sus valores, la espectroscopía de NIR permite una predicción o evaluación fiable de las influencias del procesamiento sobre el valor nutricional de una materia prima para piensos y/o un pienso. Con este propósito, se registra un gran número de espectros de NIR, p. ej. 100, 200, 300, 400, 500 o más, de una materia prima para piensos y/o un pienso, y las intensidades de absorción a las longitudes de onda o los números de onda respectivos se cotejan con los correspondientes parámetros y sus valores. Cuando la muestra de la muestra de la etapa A) no es translúcida, se mide la reflectancia de la luz emitida desde la muestra y la diferencia entre la luz emitida y la luz reflejada se da como absorción. Las intensidades de absorción así obtenidas se usan en las siguientes etapas, p. ej. la etapa B) anterior y las etapas D) y G) posteriores.

50 En una realización, el método para la evaluación de las influencias del procesamiento sobre el valor nutricional de una materia prima para piensos y/o un pienso comprende además las etapas de

D) cotejar las intensidades de absorción a las longitudes de onda o los números de onda respectivos en el espectro de NIR de una muestra obtenida en la etapa B) con el indicador de las condiciones de procesamiento obtenido para la misma muestra en la etapa g) del método para la determinación de la influencia del procesamiento sobre el valor nutricional de una materia prima para piensos y/o un pienso; y

E) representar el cotejo de la etapa D) como una gráfica de calibración y/o expresar el indicador de las condiciones de procesamiento en una ecuación de calibración como una función de las intensidades de absorción a las longitudes de onda o los números de onda respectivos cotejados en la etapa D).

5 Después de la finalización de las calibraciones de NIR, se puede usar espectroscopía de NIR como un método sistemático para evaluar la influencia del procesamiento sobre el valor nutricional de una materia prima para piensos y/o un pienso.

En una realización adicional, el método para la evaluación de las influencias del procesamiento sobre el valor nutricional de una materia prima para piensos y/o un pienso comprende además las etapas de

10 F) someter a una muestra de una materia prima para piensos y/o un pienso de origen desconocido o del mismo origen que en la etapa a) del método para la determinación de la influencia del procesamiento sobre el valor nutricional de una materia prima para piensos y/o un pienso a espectroscopía de NIR;

15 G) leer los valores de al menos uno de los parámetros de las etapas a1) a a3) cotejando con las absorciones en el espectro de NIR obtenido en la etapa F) a partir de la gráfica de calibración de la etapa C), y/o insertar las intensidades de absorción a las longitudes de onda o los números de onda respectivos en el espectro de NIR obtenido en la etapa F) en la ecuación de calibración de la etapa C) para obtener los valores para los parámetros de las etapas a1) a a3);

20 H) insertar los valores para los parámetros obtenidos en la etapa G) en series de potencia y formar la media de los valores obtenidos de cada serie de potencia, en donde dicha media se designa como el indicador de las condiciones de procesamiento (PCI); y/o

I) leer el PCI de la gráfica de calibración de la etapa E) y/o insertar las intensidades de absorción a las longitudes de onda o los números de onda respectivos en la ecuación de calibración de la etapa E) para obtener el indicador de las condiciones de procesamiento; y

25 J) representar el indicador de las condiciones de procesamiento obtenido en la etapa H) y/o I) en la escala de procesamiento del método para la determinación de la influencia del procesamiento sobre el valor nutricional de una materia prima para piensos y/o un pienso para indicar si una materia prima para piensos y/o un pienso está sobreprocesado, procesado adecuadamente o subprocesado.

Preferiblemente, en la etapa G) se obtienen los mismos parámetros que en las etapas a1) a a3).

30 Basándose en las calibraciones ya obtenidas para el indicador de las condiciones de procesamiento y el coeficiente de digeribilidad específico, el método según la presente invención también permite determinar el coeficiente de digeribilidad específico por medio de espectroscopía de NIR.

35 En otra realización, el método para la evaluación de las influencias del procesamiento sobre el valor nutricional de una materia prima para piensos y/o un pienso comprende además por lo tanto la etapa de

40 K) insertar el indicador de las condiciones de procesamiento obtenido en la etapa H) en la ecuación de calibración de la etapa j) y/o leer el valor funcional para el indicador de las condiciones de procesamiento obtenido en la etapa I) para obtener un coeficiente de digeribilidad específico de un aminoácido (D_{AA}) en la materia prima para piensos y/o el pienso de la etapa F).

45 Basándose en los grupos de datos y las calibraciones respectivas obtenidas en los métodos según la presente invención, el método según la presente invención también permite realizar una evaluación de las influencias del procesamiento sobre el valor nutricional de una materia prima para piensos y/o un pienso de un origen desconocido. Alternativamente, la muestra en la etapa F) del método para la evaluación de las influencias del procesamiento sobre el valor nutricional de una materia prima para piensos y/o un pienso es del mismo origen que en la etapa a) del método para la determinación de las influencias del procesamiento sobre el valor nutricional de una materia prima para piensos y/o un pienso.

50 Para una materia prima para piensos y/o un pienso que se considera sobreprocesado, el método también permite determinar la diferencia entre el valor deseado y el valor real del contenido de un aminoácido en una materia prima para piensos y/o un pienso al comparar el máximo del coeficiente de digeribilidad ileal del aminoácido de la materia prima para piensos y/o el pienso en una especie de animal con el coeficiente de digeribilidad específico del aminoácido que se obtiene en el método según la presente invención para una muestra específica.

55

Por lo tanto, el método para evaluar las influencias del procesamiento sobre el valor nutricional de una materia prima para piensos y/o un pienso según la presente invención comprende además la etapa de

5 L) determinar la cantidad diferencial entre el valor deseado y el valor real para la cantidad de un aminoácido en una materia prima para piensos y/o un pienso a partir de la diferencia entre el máximo del coeficiente de digeribilidad ileal de dicho aminoácido del método para la determinación de las influencias del procesamiento sobre el valor nutricional de una materia prima para piensos y/o un pienso y el coeficiente de digeribilidad específico de dicho aminoácido obtenido en la etapa K).

10 Por medio del coeficiente de digeribilidad (D_{AA}) específico obtenido mediante el método según el presente punto para un aminoácido específico en una muestra específica de una materia prima para piensos y/o un pienso, también es posible determinar la cantidad digerible de un aminoácido en dicha muestra. Dicha cantidad digerible de un aminoácido se puede obtener simplemente al multiplicar la cantidad de un aminoácido de una muestra de una materia prima para piensos y/o un pienso según se obtiene en la etapa G) por el indicador de las condiciones de procesamiento obtenido en la etapa K)

15 Por lo tanto, en una realización adicional, el método para evaluar las influencias del procesamiento sobre el valor nutricional de una materia prima para piensos y/o un pienso según la presente invención comprende además la etapa de

20 M) determinar la cantidad digerible de un aminoácido en una muestra de una materia prima para piensos y/o un pienso al multiplicar la cantidad de dicho aminoácido en la muestra de una materia prima para piensos y/o un pienso obtenido en la etapa G) por el coeficiente de digeribilidad específico obtenido en la etapa K).

25 La materia prima para piensos y/o el pienso que se usa en los métodos según la presente invención es preferiblemente soja, habas de soja, preferiblemente habas de soja con toda la grasa, y/o productos de habas de soja, preferiblemente harina de habas de soja y torta/expellers de habas de soja. Esto se debe a que la soja, las habas de soja y los productos de habas de soja son las materias primas para piensos y/o los piensos más importantes.

30 En una realización de los métodos según la presente invención, la materia prima para piensos y/o el pienso es soja, habas de soja o un producto de habas de soja.

35 La determinación del coeficiente de digeribilidad ileal estándar y el coeficiente de digeribilidad específico obtenido mediante los métodos según la presente invención no está sometida a ninguna limitación relativa a una especie de animal. En cambio, estos métodos se pueden usar para la determinación y/o la evaluación del coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado y el coeficiente de digeribilidad específico para cualquier especie de animal concebible. No obstante, las especies animales preferidas en el contexto de la presente invención son animales monogástricos, es decir animales que tienen un estómago de una sola cámara, incluyendo omnívoros tales como cerdos, aves de corral, p. ej. pavos y pollos, carnívoros tales como gatos y herbívoros tales como caballos, ciervos y conejos, y ruminantes, tales como vacas, cabras y ovejas.

40 En una realización de los métodos según la presente invención, la especie de animal es un omnívoro, carnívoro, herbívoro y/o rumiante.

45 El método según la presente invención se puede llevar a cabo en un ordenador. Esto permite realizar el método según la presente invención como un método sistemático. En este caso, las ecuaciones de calibración obtenidas en las etapas C) y j) de los métodos según la presente invención se almacenan en el ordenador, de modo que el ordenador sólo lleve a cabo las etapas F) a J) y opcionalmente la etapa K) del método según la presente invención. Preferiblemente, el ordenador también hace funcionar el espectrómetro de infrarrojo cercano para la etapa F) del método. Adicionalmente o alternativamente, el ordenador que lleva a cabo las etapas F) a J) y opcionalmente la etapa K) del método según la presente invención y el ordenador en el que se almacenan las ecuaciones de calibración no son idénticos. En este caso, el primer ordenador que lleva a cabo las etapas F) a J) y opcionalmente la etapa K) del método según la presente invención y el segundo ordenador en el que se almacena la ecuación de calibración forman una red. Adicionalmente o alternativamente, el conjunto de datos y la curva de calibración se almacenan en una nube a la que tiene acceso el primer ordenador y en este caso el primer ordenador y la nube forman un tipo de red.

50 En una realización del procedimiento ejecutado por ordenador para determinar las influencias del procesamiento sobre el valor nutricional de una materia prima para piensos y/o un pienso, las gráficas de calibración y/o las ecuaciones de calibración de la etapa C) y/o de la etapa E) se almacenan en el ordenador o en una nube.

55 Esto tiene la ventaja de que el procedimiento ejecutado por ordenador no solo indica si la materia prima para piensos y/o el pienso examinado está subprocesado, procesado adecuadamente o sobreprocesado, sino que también indica qué cantidades de un aminoácido específico se requieren a fin de proporcionar una dieta óptima para una especie de animal específica en caso de una materia prima para piensos y/o un pienso inadecuadamente

procesado. Esto también permite hacer funcionar una planta para la preparación o mezclado de piensos mediante un ordenador.

5 Por lo tanto, un objetivo adicional de la presente invención también es un procedimiento para la preparación de un pienso que comprende las etapas

F) someter a una muestra de una materia prima para piensos y/o un pienso de origen desconocido o del mismo origen que en la etapa a) de la reivindicación 1 a espectroscopía de NIR;

10 G) leer los valores de al menos uno de los parámetros de las etapas a1) a a3) cotejando con las absorciones en el espectro de NIR obtenido en la etapa F) a partir de la gráfica de calibración de la etapa C), y/o insertar las intensidades de absorción a las longitudes de onda o los números de onda respectivos en el espectro de NIR obtenido en la etapa F) en la ecuación de calibración de la etapa C) para obtener los valores para los parámetros de las etapas a1) a a3);

15 H) insertar los valores para los parámetros obtenidos en la etapa G) en series de potencia y formar la media de los valores obtenidos a partir de cada serie de potencia, en donde dicha media se designa como el indicador de las condiciones de procesamiento (PCI); y/o

I) leer el PCI de la gráfica de calibración de la etapa E) y/o insertar las intensidades de absorción a las longitudes de onda o los números de onda respectivos en la ecuación de calibración de la etapa E) para obtener el indicador de las condiciones de procesamiento;

20 J) representar el indicador de las condiciones de procesamiento obtenido en la etapa H) y/o I) en la escala de procesamiento de la reivindicación 1 para indicar si una materia prima para piensos y/o un pienso está sobreprocesado, procesado adecuadamente o subprocesado;

25 K) insertar el indicador de las condiciones de procesamiento obtenido en la etapa H) en la ecuación de calibración de la etapa j) y/o leer el valor funcional para el indicador de las condiciones de procesamiento obtenido en la etapa I) para obtener un coeficiente de digeribilidad (D_{AA}) específico de un aminoácido en la materia prima para piensos y/o el pienso de la etapa F); y

L) determinar la cantidad diferencial entre el valor deseado y el valor real para la cantidad de un aminoácido en una materia prima para piensos y/o un pienso a partir de la diferencia entre el máximo del coeficiente de digeribilidad ileal de dicho aminoácido de la reivindicación 2 y el coeficiente de digeribilidad específico de dicho aminoácido obtenido en la etapa K);

30 en donde el procedimiento comprende además al menos una de las etapas

N) procesar adicionalmente la materia prima para piensos y/o el pienso, si la materia prima para piensos y/o el pienso está indicado como subprocesado, y/o

O) complementar la cantidad diferencial de un aminoácido obtenido según la etapa L) a la materia prima para piensos y/o el pienso, si la materia prima para piensos y/o el pienso está indicado como sobreprocesado.

35 Dicho procedimiento facilita el suministro de piensos que no contienen una cantidad crítica de factores antinutritivos, preferiblemente menos de 4 mg de inhibidores de tripsina por g de pienso, y por otra parte contienen la cantidad deseada de aminoácidos para la especie de animal a la que se aportan. La cantidad deseada de aminoácidos para la especie de animal se ajusta por medio de la etapa N).

Figuras:

40 Las figuras 1 a 12 muestran los coeficientes de digeribilidad ileal de aminoácidos (SID_{AA}) en habas de soja con toda la grasa para aves de corral como una función del indicador de las condiciones de procesamiento (el término entre paréntesis es la ecuación matemática para la ecuación de calibración correspondiente). Los diamantes en esta figura (indicados como serie estadística 1) corresponden a los valores individuales para los PCIs de las respectivas habas de soja con toda la grasa procesadas y la línea recta (indicada como polinómica) representa la gráfica de la función para la SID individual para el respectivo aminoácido.

Fig. 1: Coeficiente de digeribilidad ileal de metionina en habas de soja con toda la grasa para aves de corral ($SID_{Met} = -0,3581 \times PCI^2 + 8,679 \times PCI + 33,624$)

Fig. 2: Coeficiente de digeribilidad ileal de cistina en habas de soja con toda la grasa para aves de corral ($SID_{Cistina} = -0,442 \times PCI^2 + 11,983 \times PCI + 13,905$)

5 **Fig. 3:** Coeficiente de digeribilidad ileal de metionina y cistina en habas de soja con toda la grasa para aves de corral ($SID_{Met+Cistina} = -0,3861 \times PCI^2 + 9,8435 \times PCI + 13,53$)

Fig. 4: Coeficiente de digeribilidad ileal de lisina en habas de soja con toda la grasa para aves de corral ($SID_{Lys} = -0,4187 \times PCI^2 + 11,462 \times PCI + 5,6474$)

10 **Fig. 5:** Coeficiente de digeribilidad ileal de treonina en habas de soja con toda la grasa para aves de corral ($SID_{Thr} = -0,368 \times PCI^2 + 9,2054 \times PCI + 12,772$)

Fig. 6: Coeficiente de digeribilidad ileal de triptófano en habas de soja con toda la grasa para aves de corral ($SID_{Trp} = -0,4046 \times PCI^2 + 9,7674 \times PCI + 23,052$)

15 **Fig. 7:** Coeficiente de digeribilidad ileal de arginina en habas de soja con toda la grasa para aves de corral ($SID_{Arg} = -0,3033 \times PCI^2 + 7,3008 \times PCI + 41,512$)

20 **Fig. 8:** Coeficiente de digeribilidad ileal de isoleucina en habas de soja con toda la grasa para aves de corral ($SID_{Ile} = -0,3974 \times PCI^2 + 9,211 \times PCI + 29,802$)

Fig. 9: Coeficiente de digeribilidad ileal de leucina en habas de soja con toda la grasa para aves de corral ($D_{Leu} = -0,3639 \times PCI^2 + 8,3187 \times PCI + 35,843$)

25 **Fig. 10:** Coeficiente de digeribilidad ileal de valina en habas de soja con toda la grasa para aves de corral ($SID_{Val} = -0,388 \times PCI^2 + 9,0608 \times PCI + 29,464$)

Fig. 11: Coeficiente de digeribilidad ileal de histidina en habas de soja con toda la grasa para aves de corral ($SID_{His} = -0,3554 \times PCI^2 + 9,1547 \times PCI + 25,938$)

30 **Fig. 12:** Coeficiente de digeribilidad ileal de fenilalanina en habas de soja con toda la grasa para aves de corral ($SID_{Phe} = -0,3523 \times PCI^2 + 8,0374 \times PCI + 37,432$)

35 Las figuras 13 a 30 muestran los coeficientes de digeribilidad ileal de aminoácidos (SID_{AA}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos como una función del indicador de las condiciones de procesamiento (el término entre paréntesis es la ecuación matemática para la ecuación de calibración correspondiente). Los diamantes en esta figura (indicados como serie estadística 1) corresponden a los valores individuales para los PCIs de las respectivas habas de soja con toda la grasa procesadas y la línea recta (indicada como polinómica) representa la gráfica de la función para la SID individual para el respectivo aminoácido.

40 **Fig. 13:** Coeficiente de digeribilidad ileal estándar de metionina (SID_{Met}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos ($SID_{Met} = -0,3286 \times PCI^2 + 7,3561 \times PCI + 43,444$)

45 **Fig. 14:** Coeficiente de digeribilidad ileal estándar de cistina (SID_{Cys}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos ($SID_{Cys} = -0,4982 \times PCI^2 + 13,115 \times PCI - 11,392$)

Fig. 15: Coeficiente de digeribilidad ileal estándar de lisina ($SID_{Met+Cistina}$) en habas de soja con toda la grasa para cerdos ($SID_{Met+Cistina} = -0,4237 \times PCI^2 + 10,534 \times PCI + 14,77$)

50 **Fig. 16:** Coeficiente de digeribilidad ileal estándar de lisina (SID_{Lys}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos ($SID_{Lys} = -0,4397 \times PCI^2 + 11,359 \times PCI + 11,75$)

Fig. 17: Coeficiente de digeribilidad ileal estándar de treonina (SID_{Thr}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos ($SID_{Thr} = -0,291 \times PCI^2 + 6,2769 \times PCI + 44,594$)

55 **Fig. 18:** Coeficiente de digeribilidad ileal estándar de triptófano (SID_{Trp}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos ($SID_{Trp} = -0,3167 \times PCI^2 + 6,6559 \times PCI + 45,534$)

60 **Fig. 19:** Coeficiente de digeribilidad ileal estándar de arginina (SID_{Arg}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos ($SID_{Arg} = -0,261 \times PCI^2 + 5,3573 \times PCI + 63,685$)

Fig. 20: Coeficiente de digeribilidad ileal estándar de isoleucina (SID_{Ile}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos ($SID_{Ile} = -0,3204 \times PCI^2 + 6,7739 \times PCI + 48,135$)

65 **Fig. 21:** Coeficiente de digeribilidad ileal estándar de leucina (SID_{Leu}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos ($SID_{Leu} = -0,2901 \times PCI^2 + 5,7556 \times PCI + 55,925$)

Fig. 22: Coeficiente de digeribilidad ileal estándar de valina (SID_{Val}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos ($SID_{Val} = - 0,2801 \times PCI^2 + 5,8136 \times PCI + 52,234$)

Fig. 23: Coeficiente de digeribilidad ileal estándar de histidina (SID_{His}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos ($SID_{His} = - 0,2915 \times PCI^2 + 6,548 \times PCI + 48,067$)

Fig. 24: Coeficiente de digeribilidad ileal estándar de fenilalanina (SID_{Phe}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos ($SID_{Phe} = - 0,2676 \times PCI^2 + 4,9292 \times PCI + 62,59$)

Fig. 25: Coeficiente de digeribilidad ileal estándar de glicina (SID_{Gly}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos ($SID_{Gly} = - 0,3377 \times PCI^2 + 7,7741 \times PCI + 35,285$)

Fig. 26: Coeficiente de digeribilidad ileal estándar de serina (SID_{Ser}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos ($SID_{Ser} = - 0,3257 \times PCI^2 + 6,9689 \times PCI + 44,913$)

Fig. 27: Coeficiente de digeribilidad ileal estándar de prolina (SID_{Pro}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos ($SID_{Pro} = - 0,4428 \times PCI^2 + 10,473 \times PCI + 36,719$)

Fig. 28: Coeficiente de digeribilidad ileal estándar de alanina (SID_{Ala}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos ($SID_{Ala} = - 0,3002 \times PCI^2 + 6,6179 \times PCI + 44,817$)

Fig. 29: Coeficiente de digeribilidad ileal estándar de ácido aspártico (SID_{Asp}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos ($SID_{Asp} = - 0,4159 \times PCI^2 + 10,756 \times PCI + 9,9347$)

Fig. 30: Coeficiente de digeribilidad ileal estándar de ácido glutámico (SID_{Glu}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos ($SID_{Glu} = - 0,3041 \times PCI^2 + 6,9635 \times PCI + 44,434$)

Ejemplos:

1. Determinación de las influencias del procesamiento sobre el valor nutricional de habas de soja con toda la grasa y el coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de aminoácidos en aves de corral

Se usaron habas de soja con toda la grasa (FFSB) fabricadas a partir de una sola partida para determinar el efecto de diferentes procedimientos de tratamiento térmico sobre la composición nutricional y la digeribilidad ileal estandarizada (SID) de aminoácidos en aves de corral. FFSB en bruto (K0) se sometieron a un procesamiento breve usando calentamiento en húmedo a 80°C durante 1 minuto (K1) o un procesamiento prolongado a 100°C durante 6 minutos (K2) o a 100°C durante 16 minutos (K3), seguido por una expansión adicional a 115°C durante 15 segundos (K1/K2/K3-115) o a 125°C durante 15 segundos usando una extrusora HL OEE 15.2 de Amandus Kahl GmbH & Co. KG, Hamburgo, Alemania. Submuestras de K3 se sometieron adicionalmente a un tratamiento térmico en una autoclave a 110°C durante 15 minutos (Z1), 30 minutos (Z2), 45 minutos (Z3), 60 minutos (Z4), 120 minutos (Z5), 180 minutos (Z6), 240 minutos (Z7), 300 minutos (Z8) o 360 minutos (Z9). Saliendo del expansor, las FFSB procesadas se transfirieron a una temperatura de aproximadamente 90°C durante 20 segundos a una secadora, donde las FFSB se secan durante 5 minutos con un gradiente de temperatura de 85°C a 40°C. Después de la fase de secado, las FFSB se dejan enfriar hasta una temperatura de 20°C durante 5 minutos.

Las cantidades totales de los aminoácidos y la cantidad de lisina reactiva en las diferentes FFSB procesadas y el indicador de las condiciones de procesamiento (PCI) de aminoácidos en aves de corral se determinaron usando el método según la presente invención.

Las diferentes FFSB procesadas, las cantidades determinadas de los aminoácidos individuales y el indicador de las condiciones de procesamiento (PCI) de aminoácidos en aves de corral se resumen en la tabla 1.

La digeribilidad ileal estandarizada (SID) para cada aminoácido en aves de corral como una función del PCI se muestran en las figuras 1 a 12.

El PCI de FFSB se compara con la curva de la SID para cada aminoácido de las figuras 1 a 12. Esta comparación muestra que los PCIs de las FFSB indicadas como Z1 o Z2 siempre tienen una SID que está en o al menos cerca del máximo de la curva individual. Así, las FFSB indicadas como Z1 o Z2 se consideran adecuadamente procesadas. En comparación, las FFSB indicada como K0, K1-115/125, K2-115/125 y K3-115/125 siempre tienen una SID que está a la derecha del máximo de la curva individual y así se consideran subprocesadas. Además, la SID de las FFSB indicadas como Z3 a Z9 siempre está a la izquierda del máximo de la curva individual y así se consideran sobreprocesadas.

5 Un estudio de los coeficientes de digeribilidad ileal estandarizados de aminoácidos resumidos en la tabla 1 prueba que la clasificación de las FFSB indicadas como Z1 y Z2 como procesadas adecuadamente, de las FFSB indicadas como K0, K1-115/125, K2-115/125 y K3-115/125 como subprocesadas y de las FFSB indicadas como Z3 a Z9 como sobreprocesadas es correcta debido a que las FFSB indicadas como Z1 y Z2 contienen los coeficientes de digeribilidad más altos. En comparación, todas las otras FFSB contienen coeficientes de digeribilidad inferiores. Esto prueba que el uso del PCI es una herramienta útil para la descripción de la influencia de las condiciones de procesamiento sobre la calidad de la materia prima para piensos y/o el pienso.

10

Tabla 1: Resumen de las diferentes FFSB procesadas, los coeficientes de digeribilidad ileal estandarizados determinados de aminoácidos individuales y el indicador de las condiciones de procesamiento (PCI) en aves de corral.

Procesamiento	CP	Met	Cistina	Met+Cistina	Lys	Thr	Trp	Arg	Ile	Leu	Val	His	Phe	PCI
K0	40	43	28	35	49	38	32	47	29	32	30	48	33	23,6
K1-115	58	56	39	47	63	52	47	65	48	51	49	62	53	20,4
K1-125	69	75	59	67	74	68	70	73	67	68	67	75	68	18,5
K2-115	71	77	61	69	75	71	73	75	70	71	70	76	70	17,1
K2-125	75	78	61	69	79	72	70	81	72	73	72	79	74	16,7
K3-115	70	76	62	69	75	70	71	75	70	70	69	76	70	16,8
K3-125	76	81	64	72	81	75	77	80	77	77	76	81	77	15,7
Z1	81	85	68	76	84	80	82	85	82	82	81	85	82	12,3
Z2	82	87	67	77	85	80	83	86	84	84	83	86	84	11,9
Z3	79	85	63	74	82	77	80	85	82	82	81	84	82	10,8
Z4	80	85	65	75	82	78	81	85	83	83	82	84	82	10,1
Z5	78	85	58	72	78	77	81	86	83	84	82	82	84	8,7
Z6	74	82	52	68	71	74	77	82	80	82	80	77	81	7,2
Z7	67	74	46	61	62	66	69	76	73	75	72	71	75	6,5
Z8	64	71	40	57	57	61	65	73	69	71	68	65	72	5,4
Z9	52	60	25	44	40	50	53	63	58	61	57	54	62	4,5

2. Determinación de las influencias del procesamiento sobre el valor nutricional de habas de soja con toda la grasa y el coeficiente de digeribilidad ileal estándar de aminoácidos en cerdos

Se usaron habas de soja con toda la grasa (FFSB) fabricadas a partir de una sola partida para determinar el efecto de diferentes procedimientos de tratamiento térmico sobre la composición nutricional y la digeribilidad ileal estandarizada (SID) de aminoácidos en cerdos. FFSB en bruto (K0) se sometieron a un procesamiento breve usando calor húmedo a 80°C durante 1 minuto seguido por una expansión adicional a 125°C durante alrededor de 15 segundos (K4), un procesamiento prolongado a 100°C durante 6 minutos seguido por una expansión adicional a 125°C durante alrededor de 15 segundos (K5), o un procesamiento prolongado a 100°C durante 16 minutos seguido por una expansión adicional a 125°C durante alrededor de 15 segundos (K6), usando una extrusora OEE 15.2 de Amandus Kahl GmbH & Co. KG, Hamburgo, Alemania. Submuestras de K6 se procesaron adicionalmente en una autoclave a 110°C durante 15 minutos (Z10), 30 minutos (Z11), 45 minutos (Z12) y 60 minutos (Z13). Saliendo del expansor, las FFSB procesadas se transfieren a una temperatura de aproximadamente 90°C durante 20 segundos a una secadora, donde las FFSB se secan durante 5 minutos con un gradiente de temperatura de 85°C a 40°C. Después de la fase de secado, las FFSB se dejan enfriar hasta una temperatura de 20°C durante 5 minutos. Otra parte de la FFSB en bruto (K0) se somete a un tratamiento térmico a 110°C en una autoclave durante 15 minutos (Z14) o durante 30 minutos (Z15), o a un tratamiento térmico a 150°C en una autoclave durante 3 minutos (Z16), 6 minutos (Z17), 9 minutos (Z18) o 12 minutos (Z19).

Las cantidades totales de los aminoácidos y las cantidades de lisina reactiva en las diferentes FFSB procesadas y el indicador de las condiciones de procesamiento (PCI) de aminoácidos en cerdos se determinaron usando el método según la presente invención.

Las FFSB diferentemente procesadas, la cantidad reactiva de los aminoácidos individuales determinada y el indicador de las condiciones de procesamiento (PCI) de aminoácidos en cerdos se resumen en la tabla 2.

El coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado (SID) para cada aminoácido en cerdos como una función del PCI se muestra en las figuras 13 a 30.

El PCI de FFSB se compara con la curva de la SID para cada aminoácido de las figuras 13 a 30. Esta comparación muestra que los PCIs de las FFSB indicadas como Z11 o Z12 siempre tenían una SID que está en el máximo o al menos cerca del máximo de la curva individual. Así, las FFSB indicadas como Z11 o Z12 se consideran adecuadamente procesadas. En comparación, las FFSB indicada como K0 y K4 a K6 siempre tienen una SID que está a la derecha del máximo de la curva individual y así se consideran subprocesadas. Además, la SID de las FFSB indicadas como Z13 a Z19 siempre está a la izquierda del máximo de la curva individual y así se consideran sobreprocesadas.

Un estudio de los coeficientes de digeribilidad ileal estandarizados de aminoácidos resumidos en la tabla 2 prueba que la clasificación de las FFSB indicadas como Z11 y Z12 como procesadas adecuadamente, de las FFSB indicadas como K0 y K4 a K6 como subprocesadas y de las FFSB indicadas como Z13 a Z19 como sobreprocesadas es correcta debido a que las FFSB indicadas como Z11 y Z12 contienen los coeficientes de digeribilidad más altos de los aminoácidos. En comparación, todas las otras FFSB contienen coeficientes de digeribilidad de aminoácidos inferiores. Esto prueba que el uso del PCI es una herramienta útil para la descripción de la influencia de las condiciones de procesamiento sobre la calidad de la materia prima para piensos y/o el pienso.

Tabla 2: Resumen de las diferentes FFSB procesadas, los coeficientes de digeribilidad ileal estandarizados determinados de aminoácidos individuales y el indicador de las condiciones de procesamiento (PCI) en cerdos.

Procesamiento	CP	Met	Cistina	Met+Cistina	Lys	Thr	Trp	Arg	Ile	Leu	Val	His	Phe	Gly	Ser	Pro	Ala	Asp	Glu	PCI
K0	41,7	40,0	30,1	35,3	42,3	36,7	32,9	49,5	35,4	36,0	39,0	45,6	35,2	38,5	34,4	48,5	39,9	38,9	44,8	23,6
K4	52,4	52,6	41,4	47,4	57,4	47,2	43,8	61,3	48,3	47,2	49,8	56,6	46,8	48,9	46,4	60,5	51,3	51,4	56,5	18,5
K5	70,2	73,6	65,3	70,2	74,8	66,0	66,2	79,7	70,9	70,9	69,8	74,9	70,7	65,9	69,2	81,6	68,6	71,7	74,7	16,7
K6	80,5	82,6	75,2	79,8	84,0	76,1	78,1	87,9	81,5	81,0	80,1	83,4	80,6	77,4	79,7	91,8	78,9	81,0	82,7	15,7
Z10	81,3	84,2	74,8	80,4	83,7	77,6	80,1	89,7	83,1	83,0	81,3	84,2	82,4	78,6	81,5	93,0	79,9	80,2	83,9	12,3
Z11	81,8	84,3	72,5	79,1	83,9	77,7	80,7	91,0	83,8	83,9	81,6	84,6	83,6	78,8	82,1	94,9	80,4	79,2	84,7	11,9
Z12	83,2	86,9	73,8	81,1	84,9	79,7	82,6	92,1	86,3	86,3	84,3	86,1	85,8	81,1	83,6	95,8	82,9	79,3	85,7	10,8
Z13	81,4	85,9	69,1	78,1	82,0	78,5	81,4	91,3	85,6	85,6	83,1	84,3	84,6	78,5	82,3	93,1	81,8	75,9	84,1	10,1
Z14	87,4	85,3	77,7	82,4	88,2	81,4	81,6	93,2	84,5	85,2	83,9	87,0	86,8	86,8	84,5	122,3	86,0	81,7	85,2	10,9
Z15	86,3	86,7	77,3	82,9	86,4	82,8	83,5	93,9	85,6	86,6	85,3	87,7	88,7	86,7	85,3	111,7	84,9	76,9	87,1	8,2
Z16	77,4	81,1	61,6	71,8	73,2	77,3	79,0	89,3	81,0	83,2	80,9	81,9	85,4	76,8	80,2	89,4	77,7	65,5	80,2	6,8
Z17	72,6	76,7	50,8	63,9	65,9	73,0	74,9	87,9	78,4	81,0	78,3	78,2	83,4	72,8	76,1	85,1	75,0	59,5	76,5	6,08
Z18	68,9	74,0	45,7	59,9	60,5	70,0	73,0	85,2	75,3	78,2	75,3	75,4	81,0	70,4	73,4	90,5	72,2	58,2	73,8	5,73
Z19	57,6	63,9	25,0	44,0	44,4	59,8	62,4	77,9	67,6	71,8	67,5	65,5	75,2	49,5	63,3	52,4	61,9	44,6	63,5	4,76

REIVINDICACIONES

1. Método para la determinación de influencias del procesamiento sobre el valor nutricional de una materia prima para piensos y/o un pienso, que comprende las etapas de

a) someter a una muestra de una materia prima para piensos y/o un pienso procesados a

5 a1) un análisis cuantitativo de al menos un parámetro seleccionado del grupo que consiste en actividad inhibidora de tripsina, actividad de ureasa, solubilidad de proteínas en álcali e índice de dispersabilidad de proteínas;

10 a2) una determinación de la relación de la cantidad reactiva de lisina a la cantidad total de lisina que comprende un análisis cuantitativo de la cantidad reactiva de lisina y la cantidad total de lisina, seguido por la formación de la relación de la cantidad reactiva de lisina a la cantidad total de lisina; y

a3) un análisis cuantitativo de la cantidad de al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en metionina, cisteína, cistina, treonina, leucina, arginina, isoleucina, valina, histidina, fenilalanina, tirosina, triptófano, glicina, serina, prolina, alanina, ácido aspártico y ácido glutámico;

15 b) representar los parámetros obtenidos en las etapas a1) a a3) como una función de los momentos de procesamiento de la muestra en la etapa a);

20 c) determinar la superficie en la gráfica de la etapa b), donde el valor de la actividad inhibidora de tripsina, expresado como mg de tripsina por g de muestra, es mayor de 4, el incremento en el valor del pH en la determinación de la actividad de ureasa es mayor de 0,35, el valor de la solubilidad de proteínas en álcali, expresado como el porcentaje de proteína en la muestra que es soluble en una solución alcalina, es mayor de 85%, y/o el valor del índice de dispersabilidad de proteínas, expresado como el porcentaje del contenido de nitrógeno original de la muestra, es mayor de 40%, y señalar la superficie así obtenida como subprocesada;

25 d) determinar la superficie en la gráfica de la etapa b), donde el valor de la relación de la cantidad reactiva de lisina a la cantidad total de lisina es menor de 90%, el valor del índice de dispersabilidad de proteínas, expresado como el porcentaje del contenido de nitrógeno original de la muestra, es menor de 15%, y/o el valor de la solubilidad de proteínas en álcali, expresado como el porcentaje de proteína en la muestra que es soluble en una solución alcalina, es menor de 73%, y señalar la superficie así obtenida como sobreprocesada;

30 e) determinar la superficie en la gráfica de la etapa b), donde el valor de la actividad inhibidora de tripsina, expresado como mg de tripsina por g de muestra, es menor de 4, el valor de la solubilidad de proteínas en álcali, expresado como el porcentaje de proteína en la muestra que es soluble en una solución alcalina, está entre 73 y 85%, el valor del índice de dispersabilidad de proteínas, expresado como el porcentaje del contenido de nitrógeno original de la muestra, está entre 15 y 40%, y/o el valor de la relación de la cantidad reactiva de lisina a la cantidad total de lisina es al menos 90%, y señalar la superficie así obtenida como adecuadamente procesada;

y/o

35 sustraer las superficies determinadas en las etapas c) y d) de la gráfica de b) y señalar la superficie así obtenida como adecuadamente procesada;

f) generar una escala de procesamiento al estandarizar las superficies obtenidas en las etapas c) a e) hasta un tamaño igual, clasificarlas de sobreprocesamiento a subprocesamiento o viceversa y asignar una escala continua a las superficies estandarizadas y clasificadas;

40 g) insertar los valores de los parámetros obtenidos en las etapas a1) a a3) en una serie de potencia, y formar la media de los valores obtenidos de cada serie de potencia, en donde dicha media se designa como el indicador de las condiciones de procesamiento (PCI);

y

45 h) representar el indicador de las condiciones de procesamiento obtenido en la etapa g) en la escala de procesamiento obtenida en la etapa f) para indicar si una materia prima para piensos y/o un pienso está sobreprocesado, adecuadamente procesado o subprocesado.

2. Método según la reivindicación 1, que comprende además las etapas de

i) determinar el coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado (SID) de un aminoácido en una materia prima para piensos y/o un pienso para una especie de animal mediante

- 5
- i1) análisis cuantitativo de la cantidad de dicho aminoácido (AA_{toma}) en la misma muestra que en la etapa a) de la reivindicación 1;
 - i2) administración de dicha muestra a una especie de animal y determinación de la pérdida endógena de dicho aminoácido ($AA_{basal, excret.}$) y la salida ileal de aminoácido ($AA_{ileal, salida}$); y
 - i3) inserción de los valores de los parámetros obtenidos en las etapas i1) y i2) en la fórmula general (II)

$$SID [\%] = \left[\frac{AA_{toma} - (AA_{ileal, salida} - A_{basal, excret.})}{AA_{toma}} \right] \times 100,$$

10 y

j) representar el coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado obtenido en la etapa i) como una función del indicador de las condiciones de procesamiento obtenido en la etapa g) de la reivindicación 1 y/o expresar dicho coeficiente de digeribilidad ileal estándar en una ecuación de calibración como una función del indicador de las condiciones de procesamiento obtenido en la etapa g) de la reivindicación 1.

15 3. Método ejecutado informáticamente para la evaluación de las influencias del procesamiento sobre el valor nutricional de una materia prima para piensos y/o un pienso, que comprende las etapas de

A) someter a una muestra de la misma materia prima para piensos y/o pienso que en la etapa a) de la reivindicación 1 a espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR);

20 B) cotejar las intensidades de absorción a las longitudes de onda o los números de onda respectivos en el espectro de NIR obtenido en la etapa A) con los parámetros correspondientes y sus valores determinados en las etapas de someter la muestra a

- a1) un análisis cuantitativo de al menos un parámetro seleccionado del grupo que consiste en actividad inhibidora de tripsina, actividad de ureasa, solubilidad de proteínas en álcali e índice de dispersabilidad de proteínas;
- 25 a2) una determinación de la relación de la cantidad reactiva de lisina a la cantidad total de lisina que comprende un análisis cuantitativo de la cantidad reactiva de lisina y la cantidad total de lisina, seguido por la formación de la relación de la cantidad reactiva de lisina a la cantidad total de lisina; y
- 30 a3) un análisis cuantitativo de la cantidad de al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en metionina, cisteína, cistina, treonina, leucina, arginina, isoleucina, valina, histidina, fenilalanina, tirosina, triptófano, glicina, serina, prolina, alanina, ácido aspártico y ácido glutámico;

y

C) representar el cotejo de la etapa B) como una gráfica de calibración y/o expresar los parámetros determinados en las etapas a1) a a3) en una ecuación de calibración como una función de las intensidades de absorción a las longitudes de onda o los números de onda respectivos cotejados en la etapa B).

35 4. Método ejecutado informáticamente según la reivindicación 3, que comprende además las etapas de

D) cotejar las intensidades de absorción a las longitudes de onda o los números de onda respectivos en el espectro de NIR de una muestra obtenida en la etapa B) de la reivindicación 3 con el indicador de las condiciones de procesamiento obtenido para la misma muestra en la etapa g) de la reivindicación 1; y

E) representar el cotejo de la etapa D) como una gráfica de calibración y/o expresar el indicador de las condiciones de procesamiento en una ecuación de calibración como una función de las intensidades de absorción a las longitudes de onda o los números de onda respectivos cotejados en la etapa D).

5. Método ejecutado informáticamente según la reivindicación 3 o 4, que comprende además las etapas de

5 F) someter a una muestra de una materia prima para piensos y/o un pienso de origen desconocido o del mismo origen que en la etapa a) de la reivindicación 1 a espectroscopía de NIR;

10 G) leer los valores de al menos uno de los parámetros de las etapas a1) a a3) cotejando con las absorciones en el espectro de NIR obtenido en la etapa F) de la gráfica de calibración de la etapa C), y/o insertar las intensidades de absorción a las longitudes de onda o los números de onda respectivos en el espectro de NIR obtenido en la etapa F) en la ecuación de calibración de etapa C) para obtener los valores para los parámetros de las etapas a1) a a3);

H) insertar los valores para los parámetros obtenidos en la etapa G) en series de potencia y formar la media de los valores obtenidos de cada serie de potencia, en donde dicha media se designa como el indicador de las condiciones de procesamiento (PCI); y/o

15 I) leer el PCI de la gráfica de calibración de la etapa E) y/o insertar las intensidades de absorción a las longitudes de onda o los números de onda respectivos en la ecuación de calibración de la etapa E) para obtener el indicador de las condiciones de procesamiento; y

J) representar el indicador de las condiciones de procesamiento obtenido en la etapa H) y/o I) en la escala de procesamiento de la reivindicación 1 para indicar si una materia prima para piensos y/o un pienso está sobrepesado, adecuadamente procesado o subprocesado.

20 6. Método ejecutado informáticamente según la reivindicación 5, en donde en la etapa G) se obtienen los mismos parámetros que en las etapas a1) a a3).

7. Método ejecutado informáticamente según la reivindicación 5 o 6, que comprende además la etapa de

25 K) insertar el indicador de las condiciones de procesamiento obtenido en la etapa H) en la ecuación de calibración de la etapa j) y/o leer el valor funcional para el indicador de las condiciones de procesamiento obtenido en la etapa I) para obtener un coeficiente de digeribilidad (D_{AA}) específico de un aminoácido en la materia prima para piensos y/o el pienso de la etapa F).

30 8. Método ejecutado informáticamente según la reivindicación 7, que comprende además la etapa de

35 L) determinar la cantidad diferencial entre el valor deseado y el valor real para la cantidad de un aminoácido en una materia prima para piensos y/o un pienso a partir de la diferencia entre el máximo del coeficiente de digeribilidad ileal de dicho aminoácido de la reivindicación 2 y el coeficiente de digeribilidad específico de dicho aminoácido obtenido en la etapa K).

9. Método ejecutado informáticamente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende las etapas de

40 M) determinar la cantidad digerible de un aminoácido en una muestra de una materia prima para piensos y/o un pienso al multiplicar la cantidad de dicho aminoácido en la muestra de una materia prima para piensos y/o un pienso obtenida en la etapa G) por el coeficiente de digeribilidad específico obtenido en la etapa K).

45 10. Método ejecutado informáticamente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la materia prima para piensos y/o el pienso es soja, habas de soja o un producto de soja.

11. Método ejecutado informáticamente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la especie de animal es un omnívoro, un carnívoro, un herbívoro y/o un rumiante.

50 12. Método ejecutado informáticamente según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11, en el que las gráficas de calibración y/o las ecuaciones de calibración de la etapa C) según la reivindicación 3 y/o de la etapa E) según la reivindicación 4 se almacenan en el ordenador o una nube.

13. Procedimiento para la preparación de un pienso que comprende las etapas

55 F) someter a una muestra de una materia prima para piensos y/o un pienso de origen desconocido o del mismo origen que en la etapa a) de la reivindicación 1 a espectroscopía de NIR;

- 5 G) leer los valores de al menos uno de los parámetros de las etapas a1) a a3) cotejando con las absorciones en el espectro de NIR obtenido en la etapa F) a partir de la gráfica de calibración de la etapa C), y/o insertar las intensidades de absorción a las longitudes de onda o los números de onda respectivos en el espectro de NIR obtenido en la etapa F) en la ecuación de calibración de la etapa C) para obtener los valores para los parámetros de las etapas a1) a a3);
- H) insertar los valores para los parámetros obtenidos en la etapa G) en series de potencia y formar la media de los valores obtenidos de cada serie de potencia, en donde dicha media se designa como el indicador de las condiciones de procesamiento (PCI); y/o
- 10 I) leer el PCI de la gráfica de calibración de la etapa E) y/o insertar las intensidades de absorción a las longitudes de onda o los números de onda respectivos en la ecuación de calibración de la etapa E) para obtener el indicador de las condiciones de procesamiento;
- J) representar el indicador de las condiciones de procesamiento obtenido en la etapa H) y/o I) en la escala de procesamiento de la reivindicación 1 para indicar si una materia prima para piensos y/o un pienso está sobreprocesado, procesado adecuadamente o subprocesado;
- 15 K) insertar el indicador de las condiciones de procesamiento obtenido en la etapa H) en la ecuación de calibración de la etapa j) y/o leer el valor funcional para el indicador de las condiciones de procesamiento obtenido en la etapa I) para obtener un coeficiente de digeribilidad (D_{AA}) específico de un aminoácido en la materia prima para piensos y/o el pienso de la etapa F); y
- 20 L) determinar la cantidad diferencial entre el valor deseado y el valor real para la cantidad de un aminoácido en una materia prima para piensos y/o un pienso a partir de la diferencia entre el máximo del coeficiente de digeribilidad ileal de dicho aminoácido de la reivindicación 2 y el coeficiente de digeribilidad específico de dicho aminoácido obtenido en la etapa K);
- en donde el procedimiento comprende además al menos una de las etapas
- 25 N) procesar adicionalmente la materia prima para piensos y/o el pienso, si la materia prima para piensos y/o el pienso está indicado como subprocesado, y/o
- O) complementar la cantidad diferencial de un aminoácido obtenido según la etapa L) a la materia prima para piensos y/o el pienso, si la materia prima para piensos y/o el pienso está indicado como sobreprocesado.

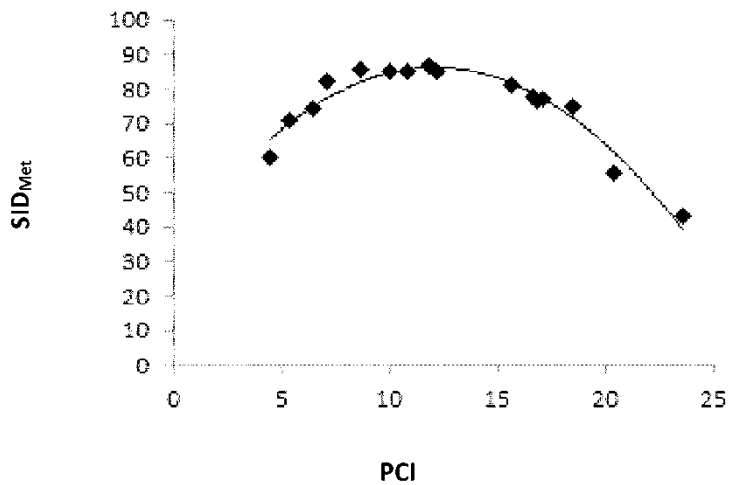


Fig. 1: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de metionina (SID_{Met}) en habas de soja con toda la grasa para aves de corral ($SID_{Met} = -0,3581 \times PCI^2 + 8,679 \times PCI + 33,624$)

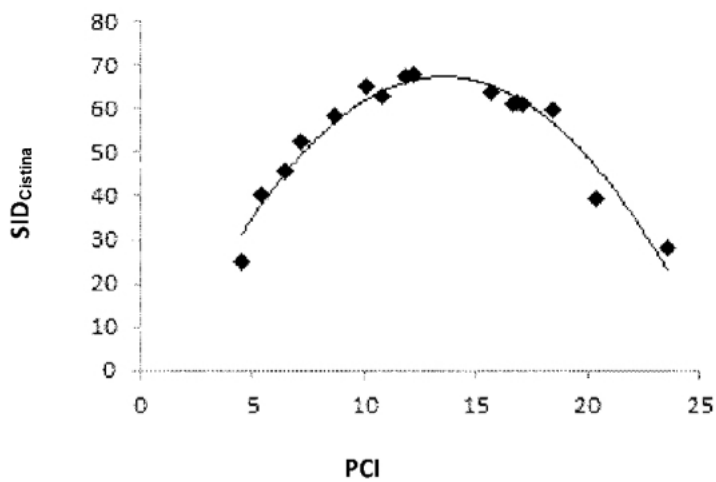


Fig. 2: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de cistina (SID_{Cistina}) en habas de soja con toda la grasa para aves de corral ($SID_{Cistina} = -0,442 \times PCI^2 + 11,983 \times PCI + 13,905$)

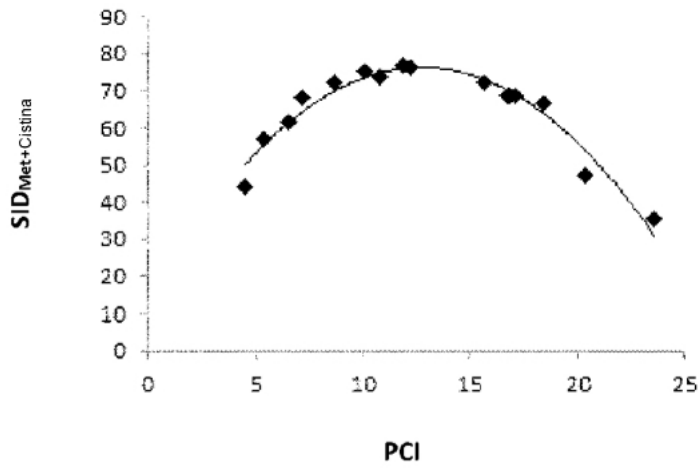


Fig. 3: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de metionina y cistina (SID_{Met+Cistina}) en habas de soja con toda la grasa para aves de corral (SID_{Met+Cistina} = - 0,3861×PCI² + 9,8435×PCI + 13,53)

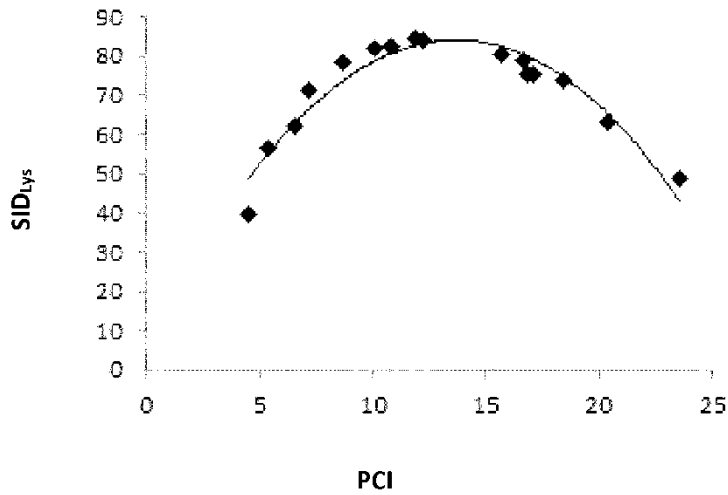


Fig. 4: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de lisina (SID_{Lys}) en habas de soja con toda la grasa para aves de corral (SID_{Lys} = - 0,4187×PCI² + 11,462×PCI + 5,6474)

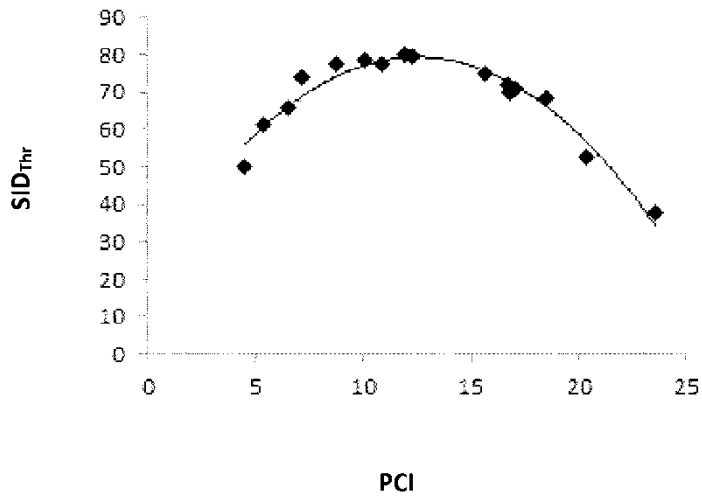


Fig. 5: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de treonina (SID_{Thr}) en habas de soja con toda la grasa para aves de corral ($SID_{Thr} = -0,368 \times PCI^2 + 9,2054 \times PCI + 12,772$)

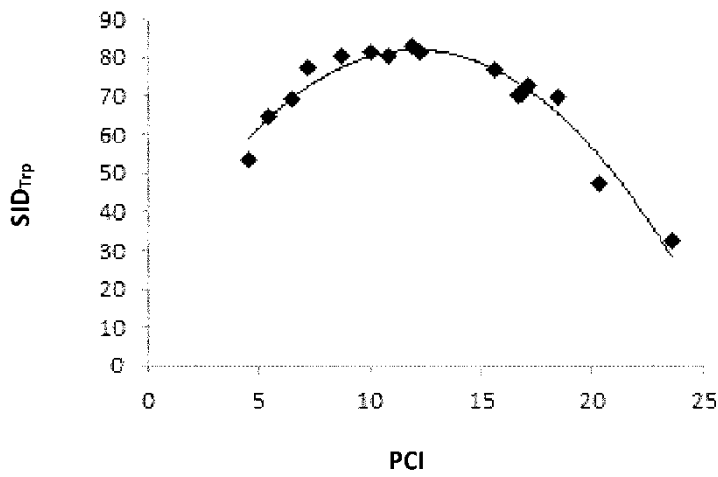


Fig. 6: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de triptófano (SID_{Trp}) en habas de soja con toda la grasa para aves de corral ($SID_{Trp} = -0,4046 \times PCI^2 + 9,7674 \times PCI + 23,052$)

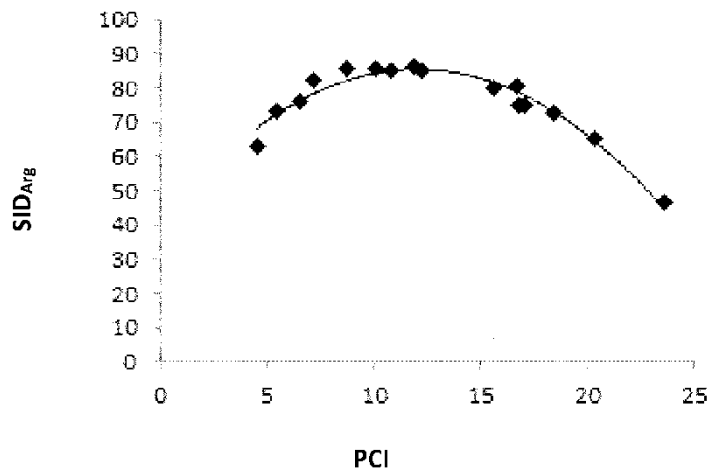


Fig. 7: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de arginina (SID_{Arg}) en habas de soja con toda la grasa para aves de corral ($SID_{Arg} = -0,3033 \times PCI^2 + 7,3008 \times PCI + 41,512$)

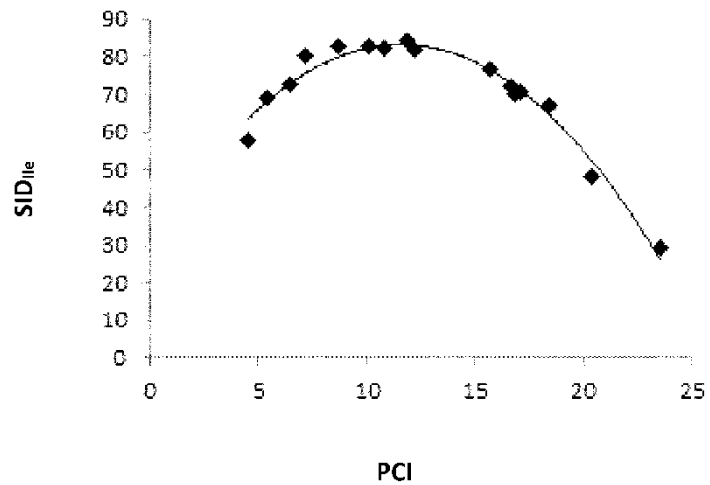


Fig. 8: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de isoleucina (SID_{Ile}) en habas de soja con toda la grasa para aves de corral ($SID_{Ile} = -0,3974 \times PCI^2 + 9,211 \times PCI + 29,802$)

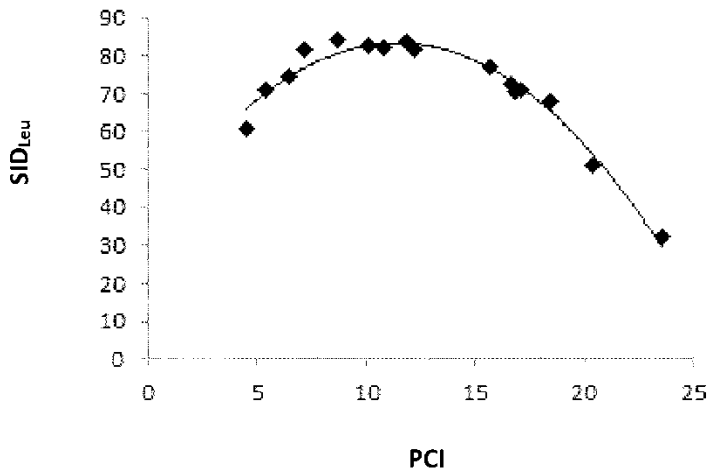


Fig. 9: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de leucina (SID_{Leu}) en habas de soja con toda la grasa para aves de corral ($SID_{Leu} = -0,3639 \times PCI^2 + 8,3187 \times PCI + 35,843$)

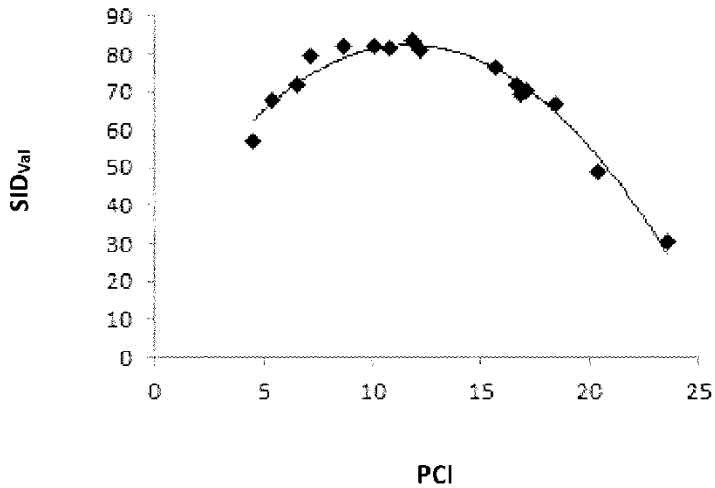


Fig. 10: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de valina (SID_{Val}) en habas de soja con toda la grasa para aves de corral ($SID_{Val} = -0,388 \times PCI^2 + 9,0608 \times PCI + 29,464$)

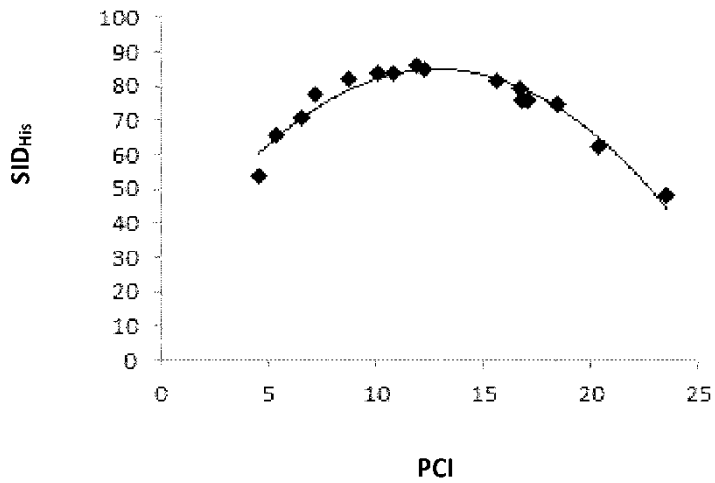


Fig. 11: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de histidina (SID_{His}) en habas de soja con toda la grasa para aves de corral ($SID_{His} = -0,3554 \times PCI^2 + 9,1547 \times PCI + 25,938$)

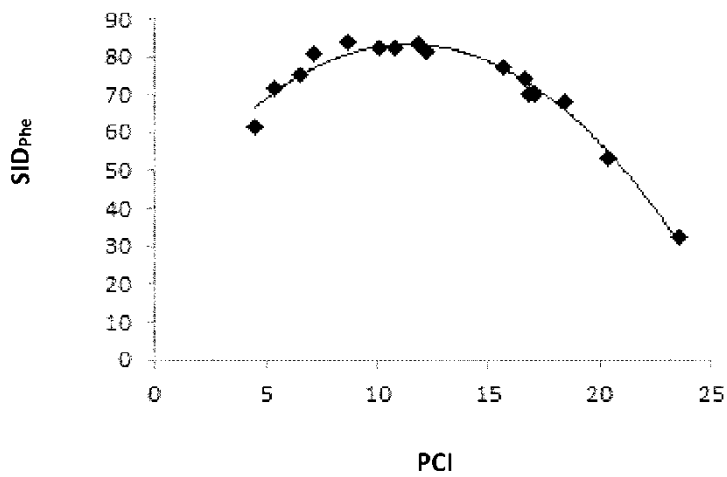


Fig. 12: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de fenilalanina (SID_{Phe}) en habas de soja con toda la grasa para aves de corral ($SID_{Phe} = -0,3523 \times PCI^2 + 8,0374 \times PCI + 37,432$)

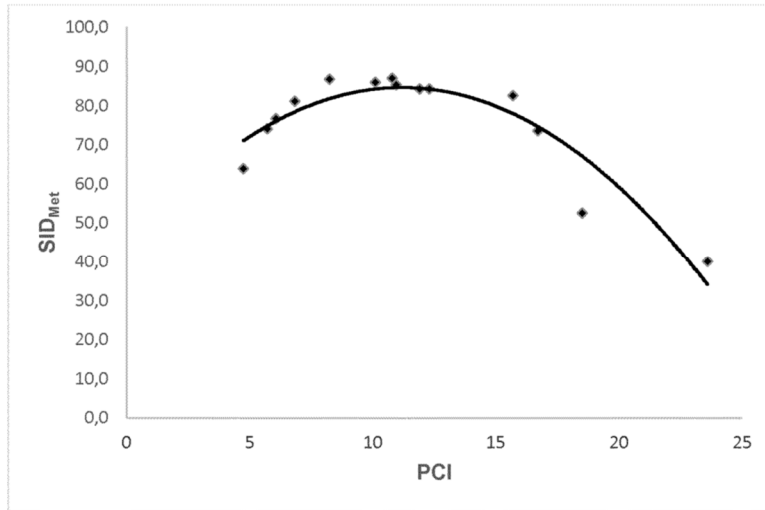


Fig. 13: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de metionina (SID_{Met}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos ($SID_{Met} = -0,3286 \times PCI^2 + 7,3561 \times PCI + 43,444$)

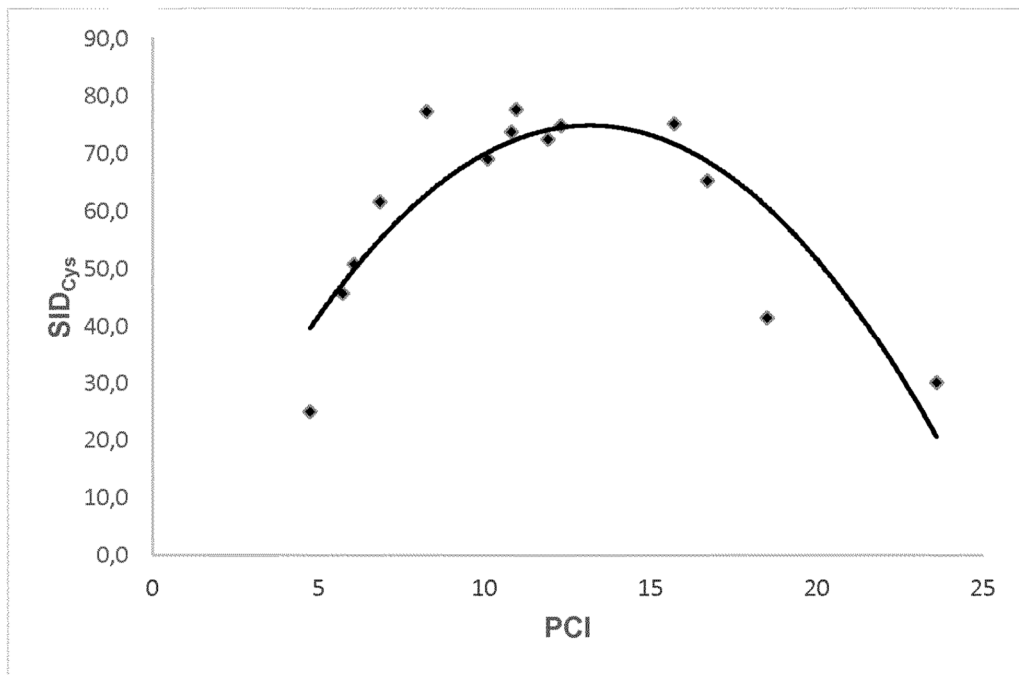


Fig. 14: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de cistina (SID_{Cys}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos ($SID_{Cys} = -0,4982 \times PCI^2 + 13,115 \times PCI - 11,392$)

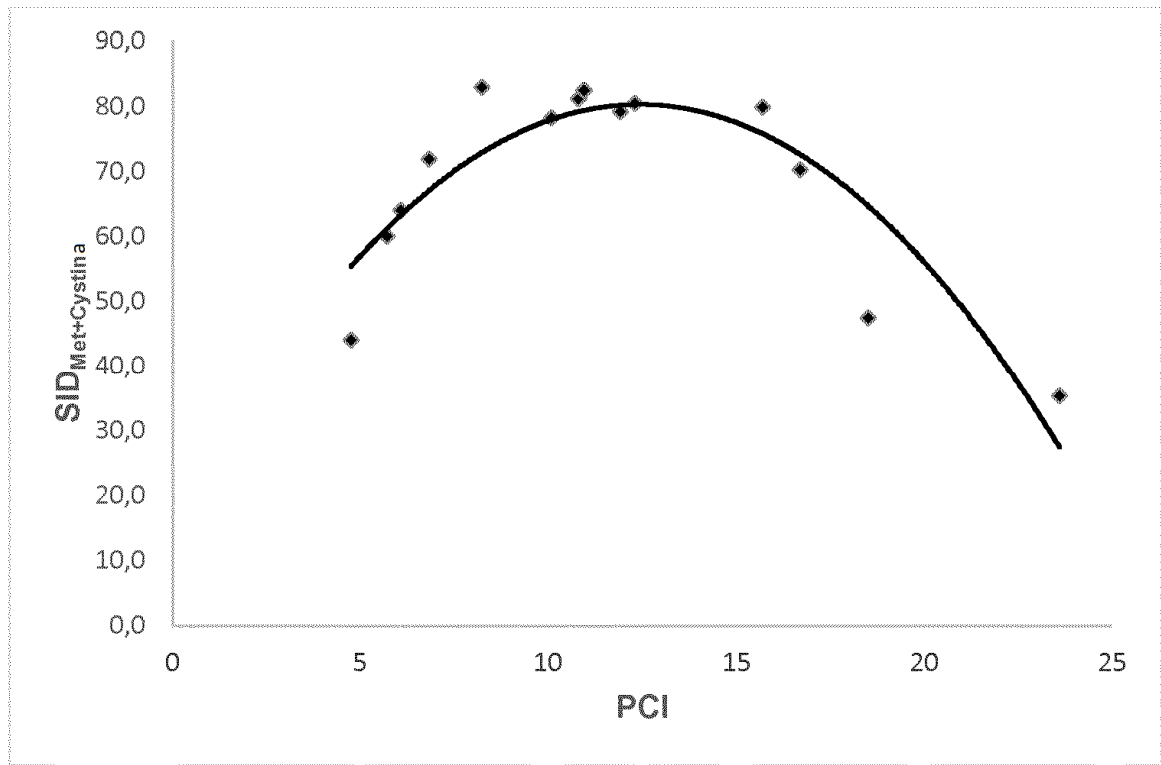


Fig. 15: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de lisina (SID_{Met+Cistina}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos (SID_{Met+Cistina} = - 0,4237 × PCI² + 10,534 × PCI + 14,77)

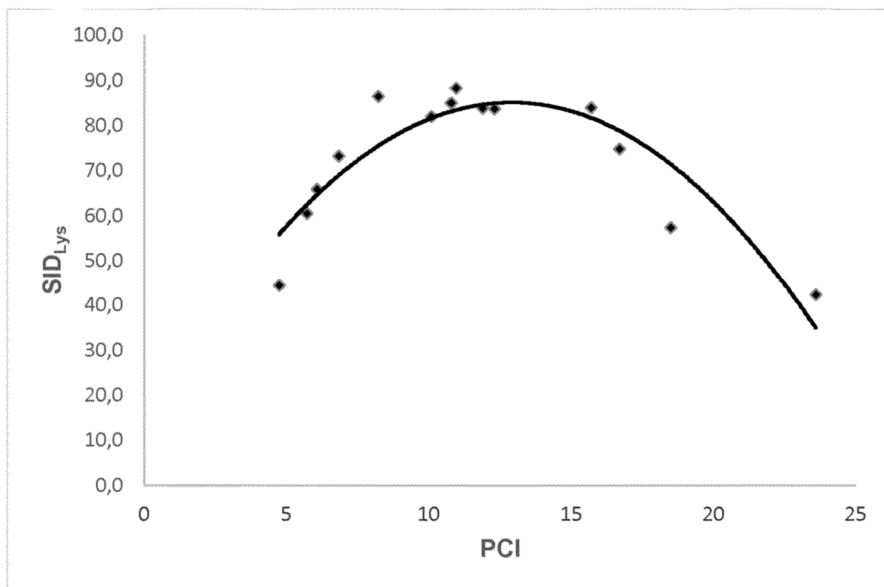


Fig. 16: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de lisina (SID_{Lys}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos (SID_{Lys} = - 0,4397 × PCI² + 11,359 × PCI + 11,75)

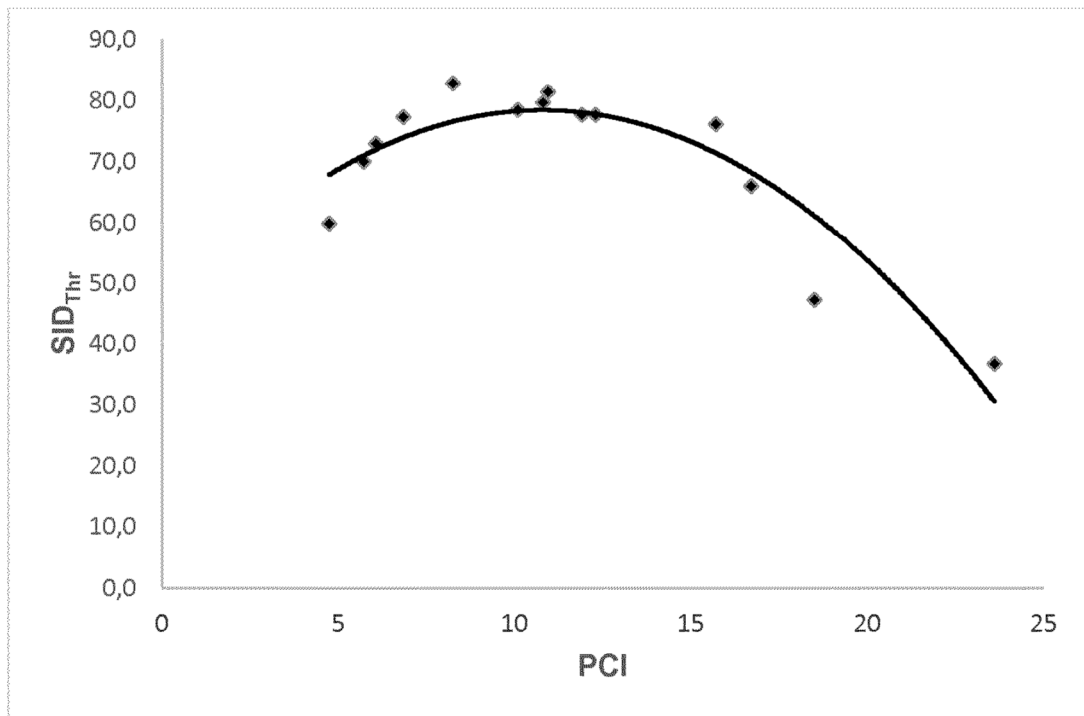


Fig. 17: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de treonina (SID_{Thr}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos ($SID_{Thr} = - 0,291 \times PCI^2 + 6,2769 \times PCI + 44,594$)

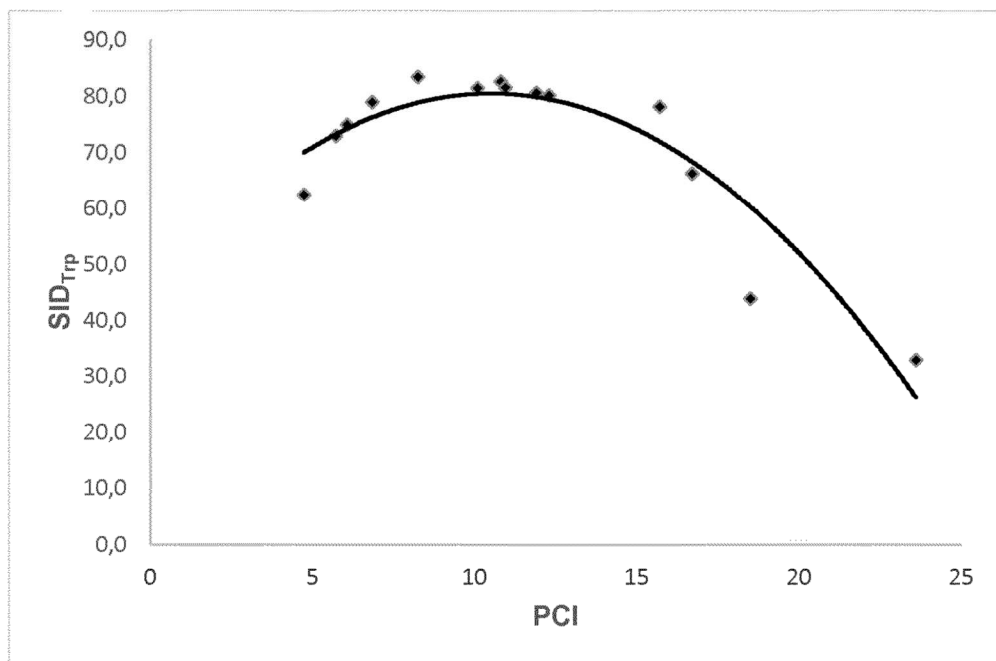


Fig. 18: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de triptófano (SID_{Trp}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos ($SID_{Trp} = - 0,3167 \times PCI^2 + 6,6559 \times PCI + 45,534$)

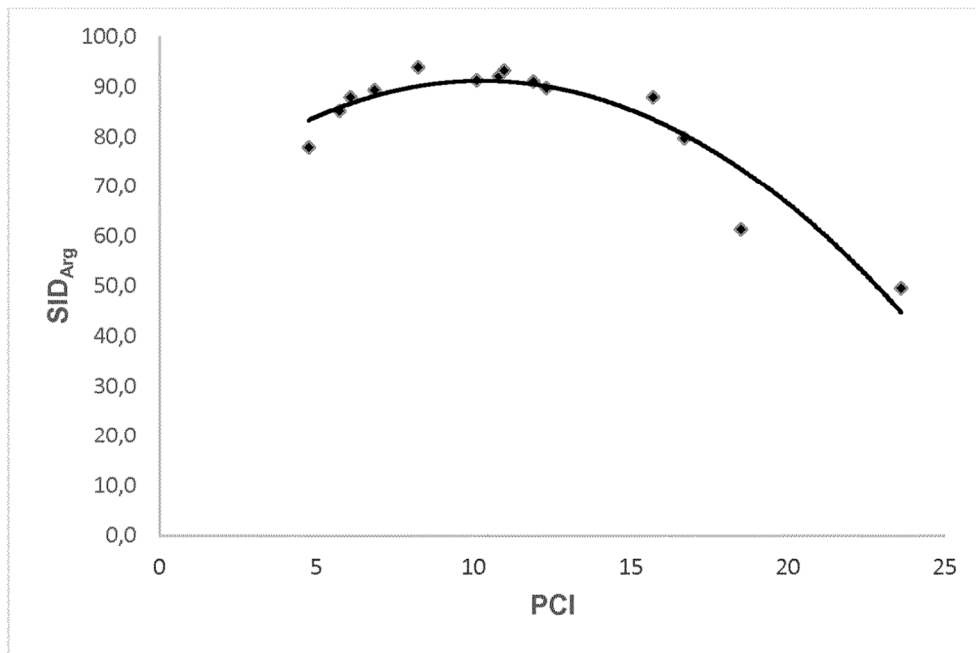


Fig. 19: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de arginina (SID_{Arg}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos (SID_{Arg} = - 0,261 × PCI² + 5,3573 × PCI + 63,685)

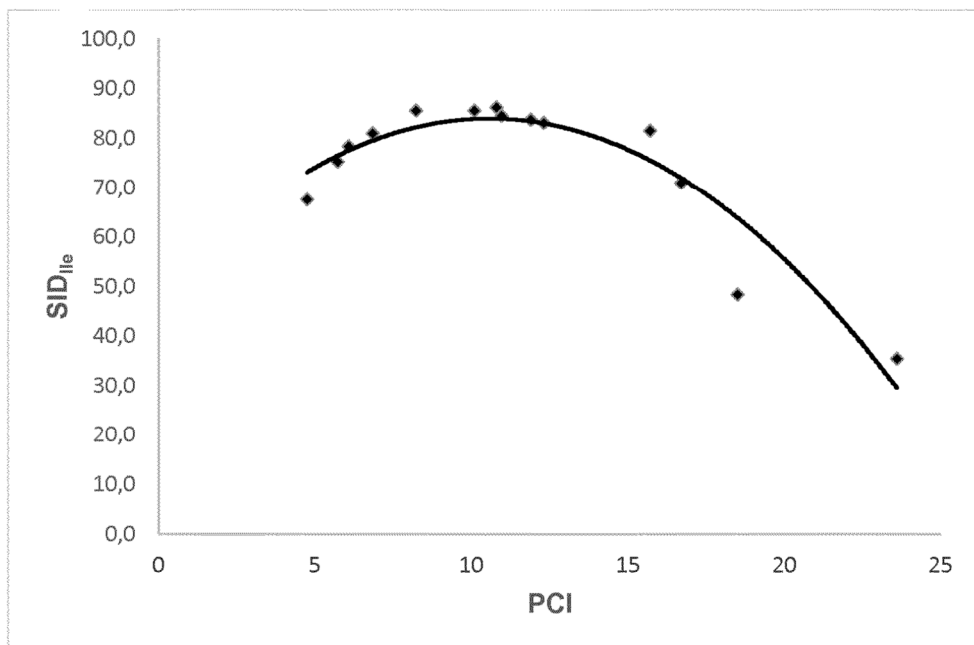


Fig. 20: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de isoleucina (SID_{Ile}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos (SID_{Ile} = - 0,3204 × PCI² + 6,7739 × PCI + 48,135)

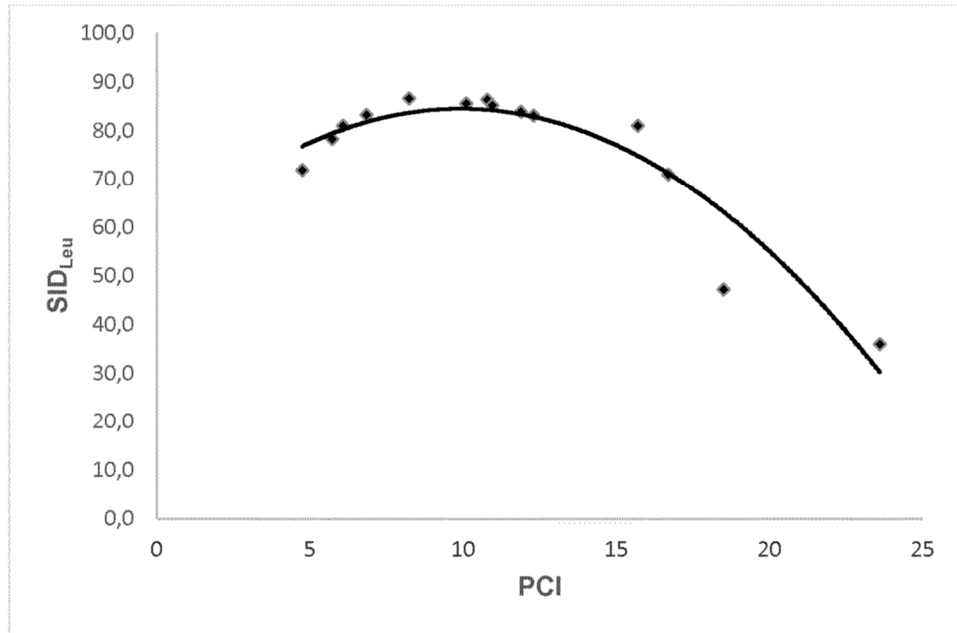


Fig. 21: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de leucina (SID_{Leu}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos (SID_{Leu} = - 0,2901 × PCI² + 5,7556 × PCI + 55,925)

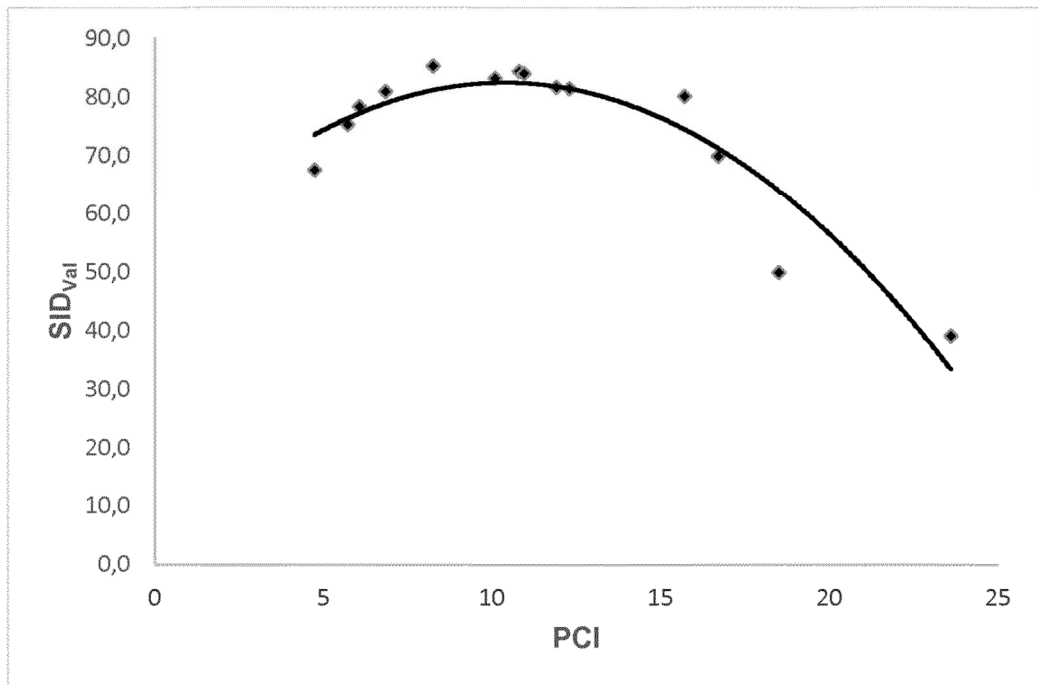


Fig. 22: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de valina (SID_{Val}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos (SID_{Val} = - 0,2801 × PCI² + 5,8136 × PCI + 52,234)

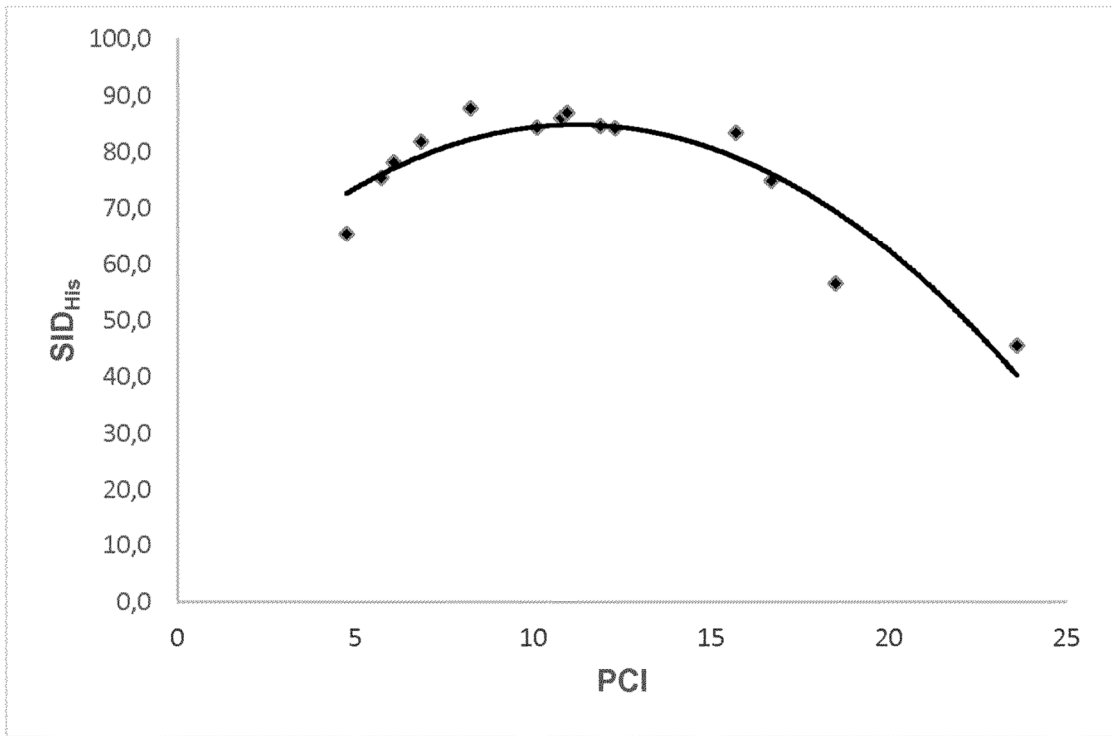


Fig. 23: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de histidina (SID_{His}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos (SID_{His} = - 0,2915 × PCI² + 6,548 × PCI + 48,067)

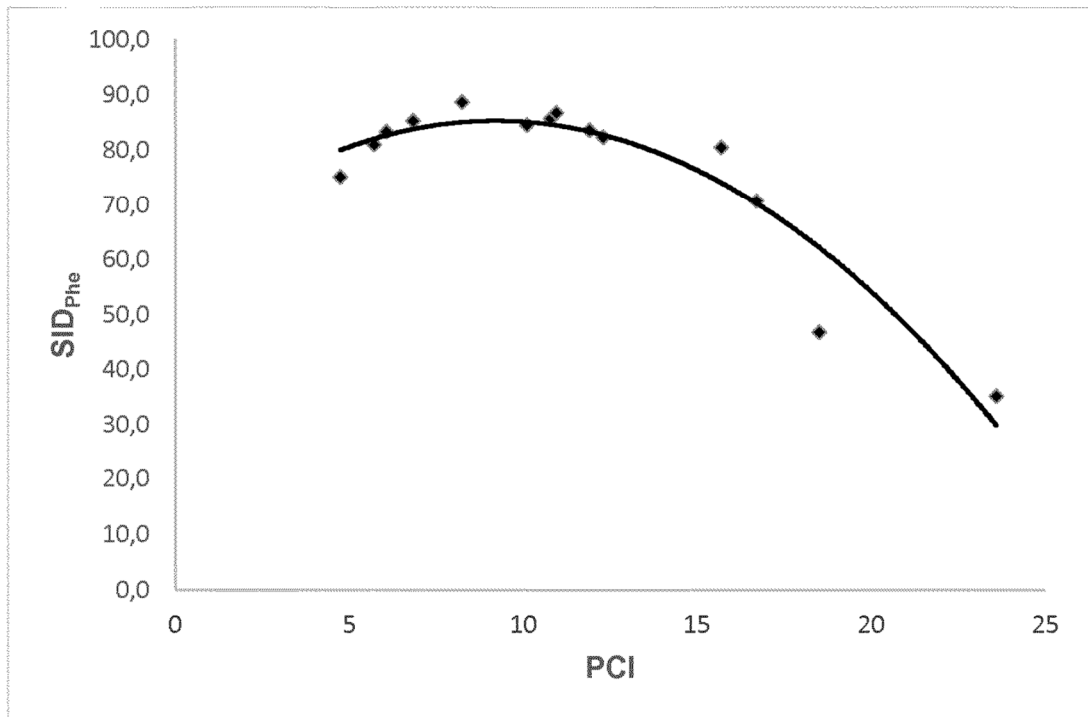


Fig. 24: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de fenilalanina (SID_{Phe}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos (SID_{Phe} = - 0,2676 × PCI² + 4,9292 × PCI + 62,59)

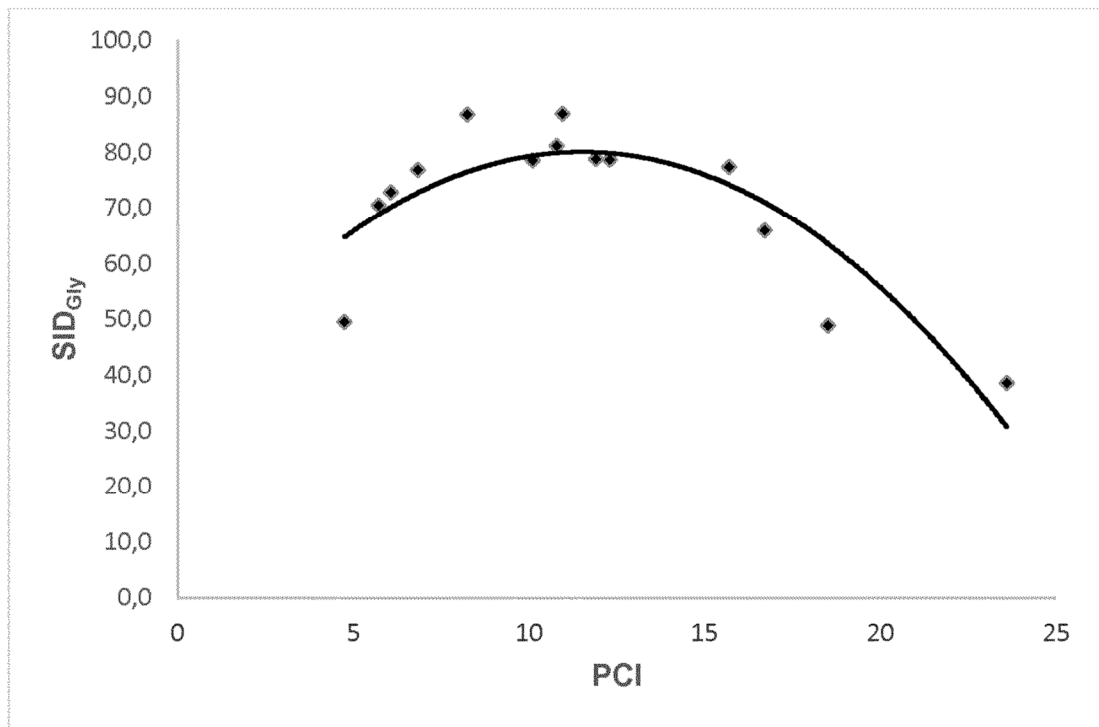


Fig. 25: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de glicina (SID_{Gly}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos (SID_{Gly} = - 0,3377 × PCI² + 7,7741 × PCI + 35,285)

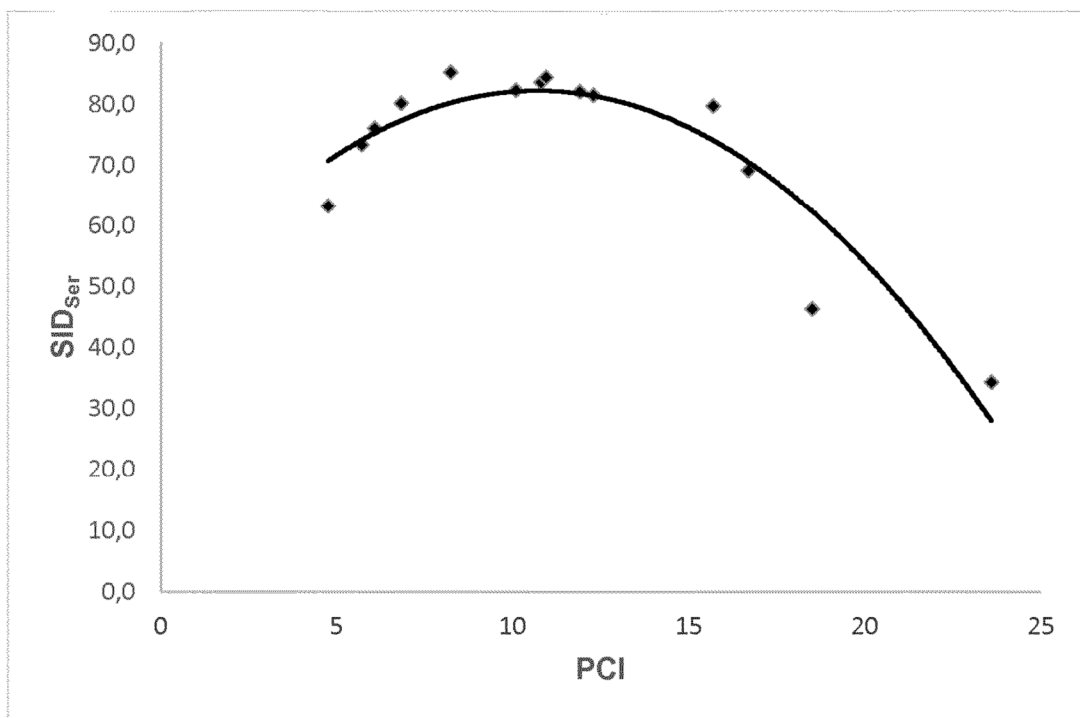


Fig. 26: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de serina (SID_{Ser}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos (SID_{Ser} = - 0,3257 × PCI² + 6,9689 × PCI + 44,913)

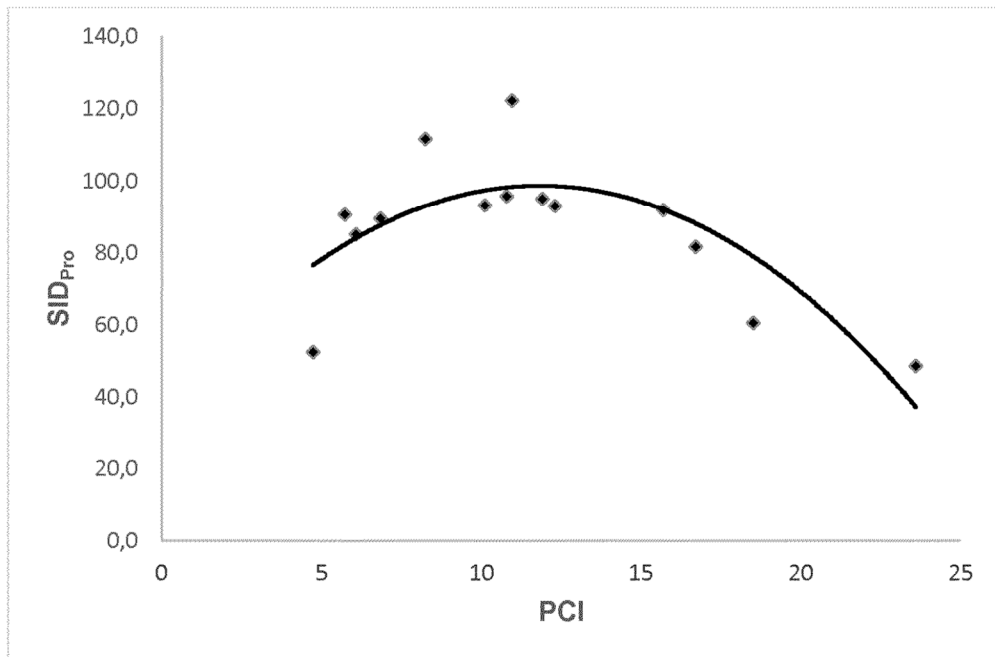


Fig. 27: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de prolina (SID_{Pro}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos ($SID_{Pro} = -0,4428 \times PCI^2 + 10,473 \times PCI + 36,719$)

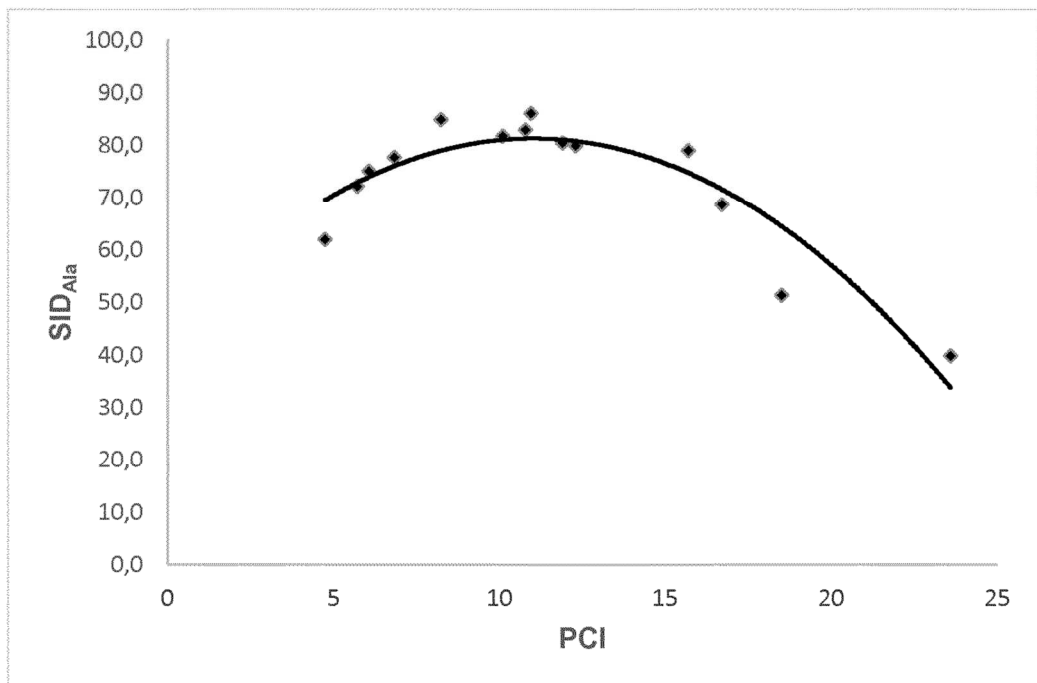


Fig. 28: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de alanina (SID_{Ala}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos ($SID_{Ala} = -0,3002 \times PCI^2 + 6,6179 \times PCI + 44,817$)

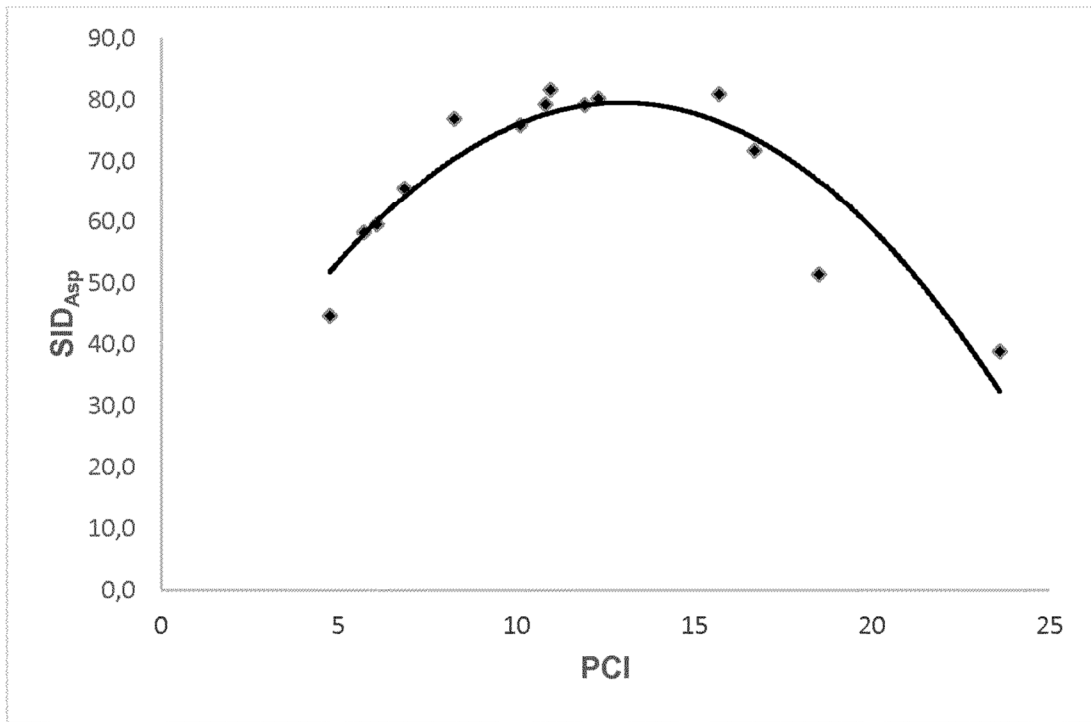


Fig. 29: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de ácido aspártico (SID_{Asp}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos ($SID_{Asp} = -0,4159 \times PCI^2 + 10,756 \times PCI + 9,9347$)

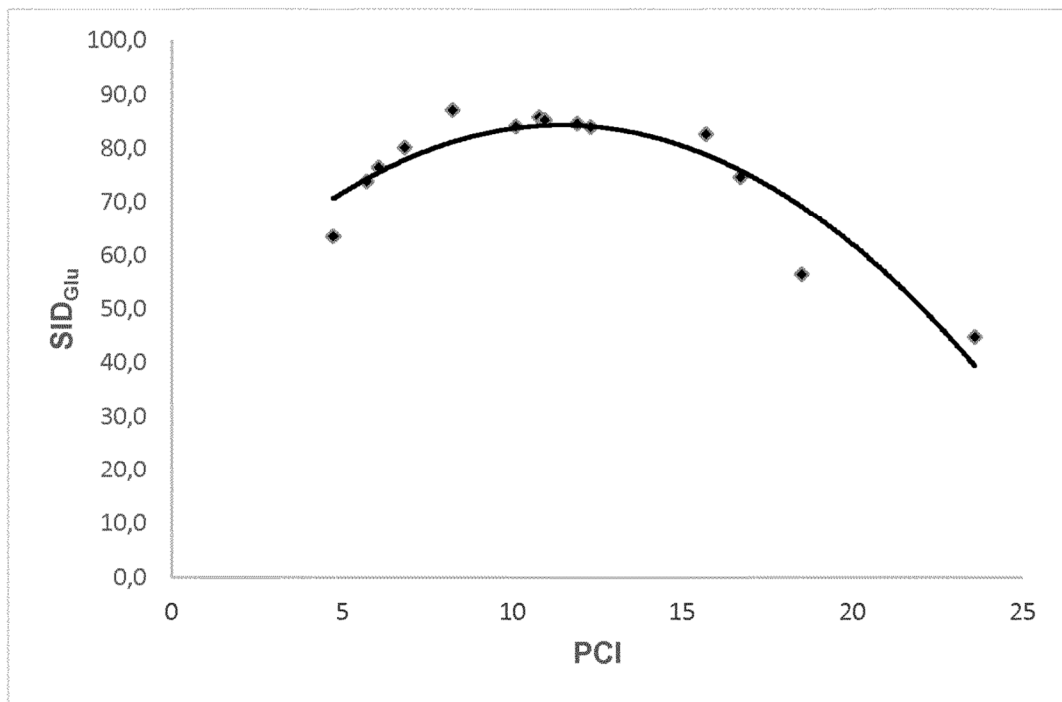


Fig. 30: Coeficiente de digeribilidad ileal estandarizado de ácido glutámico (SID_{Glu}) en habas de soja con toda la grasa para cerdos ($SID_{Glu} = -0,3041 \times PCI^2 + 6,9635 \times PCI + 44,434$)