

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 950 660**

51 Int. Cl.:

A23K 10/30 (2006.01)

A23K 50/75 (2006.01)

A23K 50/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2018** **E 18163002 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2023** **EP 3542639**

54 Título: **Ingrediente para pienso para animales, pienso y método para alimentar animales**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.10.2023

73 Titular/es:

VIKING MALT OY (100.0%)
Niemenkatu 18
15140 Lahti, FI

72 Inventor/es:

REINIKAINEN, PEKKA;
HUTTUNEN, TIMO y
APAJALAHTI, JUHA

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 950 660 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

Ingrediente para pienso para animales, pienso y método para alimentar animales

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece a los campos de la ganadería y el pienso para animales. La presente invención se refiere a un pienso para animales que comprende granos germinados y secos.

10 **Antecedentes**

En la nutrición de los animales, la promoción de la salud y el bienestar de los animales a través de la alimentación es cada vez más importante. Como ejemplo, las personas están interesadas en el impacto de la alimentación en la microbiota intestinal y la salud intestinal que afectan a la fisiología y la salud de un animal de muchas maneras.

La industria de los piensos ha estado aplicando enzimas digestivas de hidratos de carbono en piensos industriales durante casi 30 años. Se usan enzimas para la hidrólisis de polisacáridos no amiláceos ampliamente en la industria de los piensos para mejorar la utilización pienso y aliviar los trastornos digestivos en los animales de producción. Inicialmente, las enzimas se usaban con granos de alta viscosidad, tales como trigo y cebada, para aliviar los trastornos digestivos que provocaban en los animales de producción.

El malteado es el proceso de convertir granos de cereales en malta, por ejemplo, para su uso en elaboración de cerveza, destilación o en alimentos. El propósito principal del malteado es proporcionar cambios físicos, químicos y bioquímicos en el grano, produciendo así enzimas que son capaces de descomponer el almidón del grano. El proceso de germinación convierte parte del almidón, la energía almacenada en la semilla, en azúcares más simples que se usan en su etapa inicial de crecimiento. La conversión de almidón en azúcar se logra mediante enzimas que produce la semilla durante este proceso.

El proceso de malteado normalmente comprende al menos tres fases, concretamente, etapas de inmersión, germinación y secado. En primer lugar, el cereal que va a usarse se purifica y tamiza, y luego se remoja en agua para proporcionar un contenido de humedad adecuado (aprox. el 45 %). Cuando los granos están adecuadamente húmedos, germinan habitualmente durante aproximadamente seis días. La germinación de los granos requiere un contenido de humedad de al menos aproximadamente el 37 %. Después de la germinación, la malta se seca y, de ese modo, el contenido de humedad se reduce hasta aproximadamente el 4-10 %. Después del secado, se eliminan las raicillas.

Los granos de malta expresan muchas actividades enzimáticas que están específicamente dirigidas a hidrolizar macromoléculas vegetales. Las actividades enzimáticas expresadas son un cóctel de amilasas, proteasas, glucanasas, xilanasas, fitasas y muchas otras, lo más probablemente incluso enzimas no caracterizadas, que son importantes para la germinación de las semillas y la nutrición de las plántulas. Pratt *et al.* (documento US 4.251.630) dan a conocer cebada malteada que tiene una actividad alfa-1,6-hidrolasa de al menos 55 unidades por gramo de malta que se usa para producir bebidas alcohólicas y jarabe de maltosa.

Se han alimentado animales con granos sin procesar o sin tratar durante mucho tiempo. Además, se sabe bien que se han alimentado animales con granos malteados. Como ejemplo, Wettstein *et al.* (2000, PNAS vol. 97, n.º 25, 13512-13517) describen la alimentación de pollos con malta de cebada transgénica (línea 5607) y muestran, por ejemplo, un aumento de peso equivalente a las dietas de maíz. En este estudio, la malta Golden Promise también aumentó la ganancia de peso de los pollos en comparación con la dieta normal de cebada. Tiwari y Awasthi (J Food Sci Technol 2014, 51(9): 2256-2259) divulgan harina de avena malteada que tiene una actividad alfa amilasa de 720,0 unidades (µg/ml) que se usa para producir una mezcla para el destete. Bae *et al.* (documento US 6.036.431) dan a conocer cereales germinados y secos que tienen actividad amilasa de más de 100 unidades/g para la fabricación de composiciones de piensos para gallinas, cerdos y perros. Okoh *et al.* (Journal of the Science of Food and Agriculture 1989, 49(3): 271-279) dan a conocer granos de sorgo germinados y secos usados como pienso para pollos.

La infección intestinal denominada coccidiosis es uno de los principales problemas de la industria avícola internacional, especialmente en el sector de pollos de engorde. La coccidiosis del pollo está provocada por microparásitos del género *Eimeria* que infectan el epitelio intestinal. Los coccidios tienen ciclos de vida complejos, que implican multiplicación en el epitelio intestinal y transmisión entre pollitos como ooquistes resistentes a la sequía a través del aire y el polvo. Cada ooquiste lleva ocho esporozoítos unicelulares que, cuando los ingiere un pollo, se liberan en la luz intestinal y se multiplican dentro de las células epiteliales intestinales. La nueva generación de ooquistes se libera el sexto día después de la infección, después de lo cual el pollito generalmente se recupera de la enfermedad y adquiere inmunidad contra las especies específicas de *Eimeria*.

La acción de los parásitos coccidios sobre el epitelio intestinal disminuye la tasa de absorción de nutrientes, daña la función de barrera epitelial contra bacterias patógenas y aumenta enormemente la susceptibilidad a infecciones secundarias. La enteritis necrótica, que es la infección bacteriana más grave asociada con la coccidiosis, provoca pérdidas económicas significativas a los productores avícolas cada año.

Se usan coccidiostáticos, que como compuestos son similares a los antibióticos, en prácticamente todas las dietas de pollos de engorde en todo el mundo debido a la abundancia de coccidios. La Unión Europea ha discutido sobre la posibilidad de prohibir el uso de coccidiostáticos en las dietas de pollos de engorde, como anteriormente prohibió el uso de antibióticos en piensos. Por tanto, los aditivos alimentarios distintos de antibióticos que puedan reducir los efectos negativos de la coccidiosis serían de gran valor para la industria avícola internacional.

En resumen, se garantizan mejoras y desarrollos del pienso para animales para proporcionar piensos rentables y aumentar el bienestar (por ejemplo, el bienestar intestinal o el bienestar del tracto digestivo) de los animales. Además, sigue existiendo la necesidad de ingredientes eficaces y naturales, que tengan impactos ambientales positivos tales como un menor consumo de pienso o una menor producción de excrementos, cuando se usan en piensos para animales.

Sumario

Lo siguiente presenta un sumario simplificado de características dadas a conocer en el presente documento para proporcionar una comprensión básica de algunos aspectos a modo de ejemplo de la invención. Este sumario no es una visión general extensa de la invención. No pretende identificar elementos clave/críticos elementos de la invención ni delinear el alcance de la invención. Su único propósito es presentar algunos conceptos dados a conocer en el presente documento de forma simplificada como prelude de una descripción más detallada.

Según un aspecto, se proporciona la materia de las reivindicaciones independientes. Se definen realizaciones en las reivindicaciones dependientes.

Uno o más ejemplos de implementaciones se exponen en más detalle en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación. Otras características resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

A continuación, la invención se describirá en mayor detalle por medio de realizaciones específicas con referencia a los dibujos adjuntos.

La figura 1 muestra el efecto de la inclusión de malta sobre la solubilización de azúcar a partir de trigo y maíz desalmidonados. La solubilización de azúcar se analizó mediante DNS (panel superior) y HPLC después de la hidrólisis con ácido (panel inferior). Las columnas marcadas con "Trigo" o "Maíz" muestran la solubilización de azúcar a diferentes niveles de inclusión de malta de trigo y maíz, respectivamente. Las columnas marcadas con "Ninguno" muestran la liberación de azúcares a diferentes niveles de malta sola, en ausencia de trigo o maíz. Las barras en las columnas indican el error estándar de la media entre los vasos replicados. Los asteriscos indican la significación estadística de la diferencia con respecto al control en ausencia de malta tal como se define en los ejemplos.

La figura 2 muestra el efecto de la inclusión de malta sobre el grado de polimerización de azúcares solubles liberados de trigo o maíz desalmidonado. Las columnas marcadas con "Trigo" o "Maíz" muestran el grado de polimerización a diferentes niveles de inclusión de malta de trigo o maíz, respectivamente. Las columnas marcadas con "Ninguno" muestran el grado de polimerización de azúcares a diferentes niveles de malta sola, en ausencia de trigo o maíz. Las barras en las columnas indican el error estándar de la media entre los vasos replicados. Los asteriscos indican la significación estadística de la diferencia con respecto al control en ausencia de malta.

Las figuras 3a y 3b muestran el efecto de la inclusión de malta sobre la solubilización de glucosa, xilosa y arabinosa a partir de trigo y maíz desalmidonados. Las columnas marcadas con "Trigo" o "Maíz" muestran la solubilización de azúcar a diferentes niveles de inclusión de malta de trigo o maíz, respectivamente. Las columnas marcadas con "Ninguno" muestran la liberación de azúcares a diferentes niveles de malta sola, en ausencia de trigo o maíz. Las barras en las columnas indican el error estándar de la media entre los vasos replicados. Los asteriscos indican la significación estadística de la diferencia con respecto al control en ausencia de malta.

La figura 4 muestra el aumento de peso promedio en los tres grupos de dieta. La línea discontinua representa el aumento de peso promedio de pollos de engorde Ross, según Aviagen Ltd que es el criador y proveedor de las líneas de abuelos de esta raza de pollos de engorde.

La figura 5 muestra el consumo de pienso promedio por corral durante todo el periodo de estudio (media $\pm$ EE).

5 La figura 6 muestra la razón de conversión de pienso durante el periodo de dieta de inicio (días 1-17; media $\pm$ EE).

La figura 7 muestra la razón de conversión de pienso durante el periodo de dieta de crecimiento (días 17-29; media $\pm$ EE).

10 La figura 8 muestra la razón de conversión de pienso durante todo el periodo de estudio (días 1-29; media $\pm$ EE).

La figura 9 muestra la mortalidad (%) durante todo el periodo de estudio (días 1-29; media $\pm$ EE).

15 La figura 10 muestra los números de estreptococos en muestras de íleon el día 28 tal como se mide mediante qPCR. Las barras son los errores estándar de la media de 14 o 16 muestras repetidas.

La figura 11 muestra los números de lactobacilos en muestras de íleon el día 28 tal como se mide mediante qPCR. Las barras son los errores estándar de la media de 14 o 16 muestras repetidas.

20 La figura 12 muestra los números de enterococos en muestras de íleon el día 28 tal como se mide mediante qPCR. Las barras son los errores estándar de la media de 14 o 16 muestras repetidas.

La figura 13 muestra los números de bifidobacterias en muestras cecales el día 17 tal como se mide mediante qPCR. Las barras son los errores estándar de la media de 14 o 16 muestras repetidas.

25 La figura 14 muestra los números de *Coriobacteriaceae* en muestras cecales el día 17 tal como se mide mediante qPCR. Las barras son los errores estándar de la media de 14 o 16 muestras repetidas.

30 La figura 15 muestra la concentración absoluta de ácido acético en muestras de íleon el día 29. Las barras son los errores estándar de la media de 14 o 16 muestras repetidas.

La figura 16 muestra la concentración absoluta de ácido láctico en muestras de íleon el día 29. Las barras son los errores estándar de la media de 14 o 16 muestras repetidas.

35 La figura 17 muestra la concentración absoluta de VFA totales en muestras cecales el día 17. Las barras son los errores estándar de la media de 14 o 16 muestras repetidas.

La figura 18 muestra la concentración absoluta de ácido acético en muestras cecales el día 17. Las barras son los errores estándar de la media de 14 o 16 muestras repetidas.

40 La figura 19 muestra la concentración absoluta de ácido láctico en muestras cecales el día 17. Las barras son los errores estándar de la media de 14 o 16 muestras repetidas.

45 La figura 20 muestra la concentración absoluta de ácido butírico en muestras cecales el día 29. Las barras son los errores estándar de la media de 14 o 16 muestras repetidas.

La figura 21 muestra la concentración absoluta de ácido láctico en muestras cecales el día 29. Las barras son los errores estándar de la media de 14 o 16 muestras repetidas.

50 Las figuras 22A-C muestran el efecto de la malta sobre el consumo de pienso de pollos de engorde. Los paneles A a C muestran el consumo de pienso/corral durante el periodo de dieta de inicio 0-14 días, el periodo de dieta de crecimiento temprano de 14-21 días y el periodo de ensayo completo de 0-35 días. Los asteriscos muestran la significación de la diferencia con respecto al control mediante la prueba de Dunnett y las barras de error indican el EEM.

55 Las figuras 23A-B muestran el efecto de la malta sobre la razón de conversión de pienso. Los paneles A y B muestran la razón de conversión de pienso durante los periodos de 14-21 días y 0-35 días, respectivamente. El panel C muestra la FCR del ensayo previo durante el periodo de ensayo completo de 0-35 días. Los asteriscos muestran la significación de la diferencia con respecto al control mediante la prueba de Dunnett y las barras de error indican el EEM.

60 La figura 24 muestra el efecto de la malta sobre el % de mortalidad. La figura 24 muestra el % de mortalidad durante el periodo de 0-14 días. Los asteriscos muestran la significación de la diferencia con respecto al control mediante la prueba de Dunnett y las barras de error indican el EEM.

65 Las figuras 25A-B muestran el efecto de la malta sobre eficiencia de conversión de pienso corregida por

mortalidad. Los paneles A y B muestran la FCR corregida por mortalidad durante los periodos de crecimiento de 14-21 y 0-35 días, respectivamente. Los asteriscos muestran la significación de la diferencia con respecto al control mediante la prueba de Dunnett y las barras de error indican el EEM.

5 Las figuras 26A-C muestran el efecto de la malta de cebada sobre el peso corporal de pollos de engorde. Los paneles A, B y C muestran el peso corporal los días 13, 21 y 35, respectivamente. Las barras de error muestran el EEM y los asteriscos la significación de la diferencia con respecto a los controles negativos.

10 Las figuras 27A-D muestran el efecto de la malta de cebada sobre el aumento de peso corporal de pollos de engorde. Los paneles A, B, C y D muestran el aumento de peso corporal durante los periodos de crecimiento de 0-13, 13-21, 21-35 y 0-35 días, respectivamente. Las barras de error muestran el EEM y los asteriscos la significación de la diferencia con respecto a los controles negativos.

15 Las figuras 28A-D muestran el efecto de la malta de cebada sobre el consumo de pienso de pollos de engorde. Los paneles A, B, C y D muestran el consumo de pienso durante los periodos de crecimiento de 0-13, 13-21, 21-35 y 0-35 días, respectivamente. Las barras de error muestran el EEM y los asteriscos la significación de la diferencia con respecto a los controles negativos.

20 Las figuras 29A-D muestran el efecto de la malta de cebada sobre la razón de conversión de pienso de pollos de engorde. Los paneles A, B, C y D muestran la eficiencia de conversión de pienso durante los periodos de crecimiento de 0-13, 13-21, 21-35 y 0-35 días, respectivamente. Las barras de error muestran el EEM y los asteriscos la significación de la diferencia con respecto a los controles negativos.

25 La figura 30 muestra el efecto de la malta de cebada sobre la mortalidad de pollos de engorde. La figura 30 muestra la mortalidad durante el periodo de crecimiento completo de 0-35 días. Las barras de error muestran entre las réplicas.

30 Las figuras 31A-D muestran el efecto de la malta de cebada sobre la razón de conversión de pienso corregida por mortalidad de pollos de engorde. Los paneles A, B, C y D muestran la eficiencia de conversión de pienso corregida por mortalidad durante los periodos de crecimiento de 0-13, 13-21, 21-35 y 0-35 días, respectivamente. Las barras de error muestran el EEM y los asteriscos la significación de la diferencia con respecto a los controles negativos.

35 La figura 32 muestra el efecto de la malta de cebada sobre lesiones de NE del yeyuno de pollos de engorde. La figura 32 muestra las puntuaciones de lesiones del yeyuno el día 21. Las barras de error muestran el EEM.

40 La figura 33 muestra los números de bacterias totales en muestras de íleon en el punto de muestreo del día 21 tal como se mide mediante qPCR. Las barras son los errores estándar de la media de muestras repetidas y los asteriscos la diferencia estadística con respecto a la dieta de control negativo con la prueba de la t.

Figura 34. Números de *Eimeria* en muestras de íleon en el punto de muestreo del día 21 tal como se mide mediante qPCR. Las barras son los errores estándar de la media de muestras repetidas y los asteriscos la diferencia estadística con respecto a la dieta de control negativo 1 con la prueba de la t.

45 Figura 35. Números de *C. perfringens* en muestras de íleon en el punto de muestreo del día 21 tal como se mide mediante qPCR. Las barras son los errores estándar de la media de muestras repetidas y los asteriscos la diferencia estadística con respecto a la dieta de control negativo 1 con la prueba de la t.

50 La figura 36 muestra los promedios de digestibilidad de la dieta obtenidos de materia seca, materia orgánica y proteína en bruto.

La figura 37 muestra los promedios de digestibilidad de la dieta obtenidos para ceniza, fibra en bruto, NDF y ADF.

55 La figura 38 muestra las respuestas de glucosa para las dietas experimentales.

La figura 39 muestra la respuesta de insulina para las dietas experimentales.

60 La figura 40 muestra la respuesta del lactato en sangre para las dietas experimentales.

Descripción detallada de realizaciones

65 Las siguientes realizaciones son a modo de ejemplo. Aunque la memoria descriptiva puede referirse a “una” o “algunas” realización/realizaciones en varias ubicaciones, esto no significa necesariamente que cada una de tales referencias sea a la(s) misma(s) realización/realizaciones, o que la característica se aplique solo a una única realización. También pueden combinarse características individuales de diferentes realizaciones para

proporcionar otras realizaciones. Además, las expresiones “que comprende”, “que contiene” y “que incluye” deben entenderse como no limitativas de las realizaciones descritas para que consistan solo en las características que se han mencionado y tales realizaciones pueden contener también características/estructuras que no se han mencionado específicamente.

5

La presente invención proporciona un pienso para animales para solucionar los problemas de la alimentación animal, concretamente la falta de un pienso natural eficaz que provoque bienestar.

La invención se basa en la idea de usar granos germinados y secos específicos en el pienso para animales. De hecho, mediante la presente invención, es posible lograr efectos que incluyen una mejora de la salud intestinal de aves de corral durante y/o después de la infección por *Eimeria*, una reducción de la gravedad de la infección por *C. perfringens* en aves de corral y una mejora del rendimiento de las aves de corral en condiciones de exposición a enteritis necrótica. También se da a conocer que pueden lograrse efectos que incluyen pero no se limitan a reducción del consumo de pienso, mejora de la tasa de conversión de pienso, aumento de peso, disminución de la producción de heces, bienestar intestinal o bienestar del tracto digestivo, reducción de la gravedad de la infección por *C. perfringens* durante la fase aguda de la enteritis necrótica y mejora del rendimiento de los animales. Estos efectos se logran usando granos germinados y secos específicos en el pienso. El uso de solo pequeñas cantidades del ingrediente disminuye los costes de producción del pienso para animales y, por tanto, tiene también efectos ambientales positivos debido a los menores volúmenes de producción. Además, el sabor o la palatabilidad del pienso logrado mediante la presente invención es muy bueno y el pienso no provoca problemas digestivos. Un objeto de la presente invención es proporcionar un ingrediente o componente natural para piensos que haga posible lograr de manera rentable resultados eficaces en animales en comparación con los presentes métodos de alimentación.

La presente invención proporciona componentes muy eficaces, que pueden utilizarse en el pienso para animales sin ninguna enzima para pienso producida industrialmente. La mayoría de las enzimas industriales son formas recombinantes producidas en bacterias y hongos. Según la presente invención, es posible lograr productos de piensos más naturales evitando estas enzimas industriales o disminuyendo el número de enzimas usadas como aditivos para piensos.

30

La presente invención proporciona un medio para aliviar los efectos negativos de la coccidiosis inducida por *Eimeria máxima* en el rendimiento de pollitos de engorde, usando granos germinados y secos específicos en el pienso para animales para inhibir la infección por *C. perfringens* durante la fase grave de la enteritis necrótica. La invención cambia la fermentación microbiana en una dirección beneficiosa: En el intestino delgado, los números de bacterias productoras de ácido láctico aumentaron y la fermentación se dirigió en una dirección heterofermentativa, que se ha encontrado previamente que indica un buen rendimiento de los animales.

35

En detalle, la presente invención se basa en un/unos componente(s) o ingrediente(s) específico(s), concretamente granos germinados y secos que tienen una actividad alfa-amilasa de al menos 60 DU/g de p.s. y su uso en pienso para animales. De hecho, productos de malta cuidadosamente seleccionados y producidos proporcionan beneficios significativos cuando se incluyen en las dietas para animales. Mediante la presente invención, se garantiza un pienso de alta calidad para los animales. La presente invención también hace posible utilizar granos locales y métodos sostenibles para la producción de granos germinados y secos específicos para pienso para animales.

45

En resumen, la presente invención proporciona un componente o ingrediente simple y natural para pienso para animales. El control de la alimentación de los animales es importante para mantener la salud de los animales y para un crecimiento o producción satisfactorio de, por ejemplo, carne.

El método de la presente divulgación puede utilizarse para optimizar la alimentación de los animales.

50

Granos y malteado

En una realización de la invención, los granos usados para la germinación y el secado tienen la siguiente calidad de grano:

55

% de contenido de proteína (% de masa/masa en base seca)

9 - 16

Los granos adecuados para la germinación y el secado según la presente invención incluyen cualquier grano tal como cebada, trigo, avena o centeno. Además, los granos de la presente invención pueden incluir granos de cereal de uno o más cereales seleccionados del grupo que consiste en cebada, trigo, centeno, avena. Las variedades adecuadas incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, la variedad de cebada Polartop, Repekka, Vipekka, Popekka.

60

Los granos usados para la germinación y el secado según la presente invención pueden estar sin pelar porque las pruebas de malteado han mostrado que los granos pelados o rotos presentan una baja germinación. En

65

algunas realizaciones, puede haber una combinación de granos pelados y sin pelar en el pienso.

El malteado tiene efectos de mejora sobre las actividades de muchas enzimas en el grano. Además, los granos malteados son de importancia debido a otra clase de componentes saludables, tanto conocidos como no conocidos. En una realización específica de la invención, los granos malteados tienen características específicas que pueden lograrse utilizando granos específicos. En otra realización, una combinación de granos específicos y un proceso de malteado específico producen el producto deseado.

Los granos germinados y secos de la presente invención tienen una actividad alfa-amilasa de al menos 60 DU/g de p.s., específicamente de 70 a 200 DU/g de p.s., más específicamente de 80 a 150 DU/g de p.s. Las enzimas alfa-amilasa (1,4-alfa-D-glucanohidrolasa, E.C.3.2.1.1) hidrolizan enlaces alfa de polisacáridos grandes con uniones alfa, tales como almidón y glucógeno. Para ser exactos, las alfa-amilasas catalizan la hidrólisis de uniones glucosídicas α -1,4 en polisacáridos de tres o más unidades de D-glucosa unidas en α -1,4 para producir maltosa y oligosacáridos más grandes (por ejemplo, glucosa). La alfa-amilasa está presente en semillas que contienen almidón como reserva de alimento. Hay varios métodos para la determinación de la actividad alfa-amilasa (es decir, la capacidad de endohidrolizar uniones glucosídicas 1,4- α -D de los polisacáridos) y los conoce un experto en la técnica. La actividad alfa-amilasa en el grano puede medirse, por ejemplo, mediante el número de caída de Hagberg-Perten, una prueba para evaluar los daños en los brotes o el método de Phadebas. La prueba de amilasa de Phadebas se usa como prueba cualitativa y cuantitativa dentro de muchas industrias, tales como detergentes, diversos alimentos de harina, granos y malta, y biología forense. Según la presente invención, la actividad alfa-amilasa se ha medido según el método Analytica-EBC, 4.13, Contenido en alfa-amilasa de la malta.

El poder diastásico se refiere al poder de hidrolización del almidón de los granos germinados y secos. Tal como se usa en el presente documento, "poder diastásico" se refiere a la capacidad de los granos germinados y secos para descomponer los almidones en azúcares fermentables. El término "diastásico" se refiere a enzimas "diastasa". Hay dos enzimas "diastasa", la primera es la alfa-amilasa y la segunda es la beta-amilase. El poder diastásico se mide en grados lintner (a menudo indicados con una L mayúscula) o unidades de Windisch-Kolbach (grados WK). La conversión de unos a otros es posible usando las siguientes ecuaciones $\text{Lintner} = (\text{WK} + 16) / 3,5$ o $\text{WK} = 3,5 \times \text{Lintner} - 16$. Un experto en la técnica conoce métodos para la determinación del poder diastásico y pueden llevarse a cabo, por ejemplo, según el método Analytica-EBC 4.12, Poder diastásico de la malta. En una realización específica de la invención, los granos germinados y secos tienen un poder diastásico de 500 a 1400 WK/100 g de p.s., más específicamente de 650 a 1300 WK/100 g de p.s., lo más específicamente de 800 a 1200 WK/100 g de p.s.

Las enzimas beta-amilasa (1,4-alfa-D-glucano maltohidrolasa, E.C.3.2.1.2) hidrolizan uniones glucosídicas (1->4)-alfa-D en polisacáridos. Trabajando desde el extremo no reductor, la beta-amilasa cataliza la hidrólisis del segundo enlace glucosídico α -1,4, escindiendo dos unidades de glucosa (maltosa) a la vez. Las enzimas beta-amilasa actúan sobre almidón, glucógeno y polisacáridos y oligosacáridos relacionados produciendo beta-maltosa mediante una inversión. La beta-amilasa está presente en una forma inactiva antes de la germinación de las semillas.

En una realización específica de la invención, los granos germinados y secos tienen *endo*-xilanasa. La *endo*-xilanasa (*endo*-1,4- β -xilanasa, EC 3.2.1.8) es responsable de la degradación hidrolítica de los xilanos. Las *endo*-xilanasas hidrolizan los enlaces glucosídicos β -1,4 que unen los residuos de xilopiranosilo presentes en la cadena principal de los xilanos. La actividad *endo*-xilanasa puede medirse, por ejemplo, usando el método de DNS, el método de Nelson Somogyi o métodos basados en sustratos teñidos (McCleary & McGeough, 2015; Somogyi, 2052; McCleary 1991).

Los granos malteados son granos de cereal que se han germinado y secado en un proceso conocido como "malteado" o "brotación". Se hace que los granos germinen remojándolos en agua, y luego se les impide seguir germinando secándolos con aire caliente. Tal como se usa en el presente documento, malteado se refiere a un método de procesamiento de granos que comprende al menos tres etapas, concretamente, etapa de inmersión, germinación y secado con aire caliente, sin embargo, sin destruir actividades enzimáticas significativas. En una realización específica de la invención, los granos malteados se tratan por métodos específicos para proporcionar un claro valor añadido al pienso para animales.

En la etapa de inmersión, el cereal se sumerge en agua para proporcionar un contenido en humedad adecuado (por ejemplo, aproximadamente el 45 %). Cuando los granos están lo suficientemente húmedos (por ejemplo, al menos aproximadamente el 37 %), comienzan a germinar. Esta etapa de germinación dura varios días (por ejemplo, aproximadamente seis días). En la etapa de germinación, los granos pueden voltearse constantemente y/o secarse al aire. La malta germinada se seca con aire caliente con el fin de detener la germinación y el contenido de humedad disminuye de ese modo (por ejemplo, hasta aproximadamente el 7 %). Puede usarse secado en horno para lograr el color y la especificación deseados. El color de las maltas oscila entre maltas muy pálidas a cristalinas y de ámbar a chocolate o negras. La temperatura del secado en horno es habitualmente de

alrededor de 55 °C.

En una realización específica, el secado de granos germinados con aire caliente comprende secar a la temperatura de aproximadamente 60 °C. En otras palabras, los granos germinados se secan con aire caliente a la temperatura de aproximadamente 40 a 70 °C. La temperatura de aproximadamente 60 °C permite mantener las actividades enzimáticas de los granos.

En una realización específica, el proceso de malteado incluye además una etapa de purificación y/o tamizado del cereal antes de la etapa de inmersión y/o una etapa de eliminación de las raicillas de las semillas parcialmente germinadas después de la etapa de secado. Un experto en la técnica conoce métodos de purificación y tamizado o eliminación de raicillas. En otra realización específica, antes de la etapa de inmersión, las semillas se almacenan durante una o más semanas para superar la dormición de las semillas.

Pueden maltearse granos de diferentes cereales o bien en las mismas condiciones o bien en condiciones diferentes.

En una realización específica de la divulgación, los granos germinados y secos se han producido mediante cualquier método descrito en esta divulgación.

Pienso

El pienso o composición de pienso de la presente invención comprende granos germinados y secos. Los granos germinados y secos de la presente invención pueden estar presentes en el pienso en cualquier cantidad adecuada para el animal en cuestión, tal como seleccionada del grupo que consiste en el 0,1 - 50 % (p/p), el 1 - 40 % (p/p), el 1 - 35 % (p/p), el 1 - 30 % (p/p), el 1 - 20 % (p/p), el 1 - 15 % (p/p), el 1 - 10 % (p/p), el 1 - 5 % (p/p), 0,5 - 30 % (p/p), el 0,5 - 20 % (p/p), el 0,5 - 10 % (p/p), el 10 - 20 % (p/p), el 10 - 30 % (p/p), el 10 - 40 % (p/p), el 10 - 50 % (p/p), el 20 - 30 % (p/p), el 20 - 40 % (p/p), el 20 - 50 % (p/p), el 30 - 40 % (p/p), el 30 - 50 % (p/p) o el 40 - 50 % (p/p). Tal como se usa en el presente documento, “% (p/p)” se refiere a fracción de masa, es decir, % de masa/masa. Dosis muy específicas de granos germinados y secos y/o pienso pueden tener las ventajas más eficientes y rentables en animales. Los granos germinados y secos de uno o varios cereales diferentes pueden estar presentes en el pienso de la presente invención. En una realización, los granos germinados y secos son de una o varias variedades.

Además de granos germinados y secos, el pienso o composición de pienso de la presente invención puede comprender uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en grano de cereal sin maltear, heno, fuente de proteína vegetal o animal, aceites, grasas, minerales y vitaminas.

Tal como se usa en el presente documento, “fuente de proteína vegetal” se refiere a cualquier vegetal o cualquier parte del mismo tal como una semilla, grano o fruto, que contiene proteínas, más normalmente muchas proteínas (es decir, nutriente rico en proteínas). Por ejemplo, habitualmente están presentes granos no germinados en el pienso. Tal como se usa en el presente documento, “fuente de proteína animal” se refiere a cualquier producto animal derivado o producido por un animal o cualquier parte del mismo, por ejemplo carne, huevo, hueso o pescado, que contiene proteínas, más normalmente muchas proteínas (es decir, nutriente rico en proteínas). Pueden elegirse vegetales, animales o partes de los mismos adecuados para pienso para animales para la composición de la presente invención. Se usan comúnmente proteínas animales en el pienso para animales en combinación con proteínas vegetales.

El pienso de la presente invención puede comprender aceites o grasas seleccionados del grupo que consiste en aceite vegetal, grasa vegetal, aceite animal y grasa animal. “Aceite vegetal” o “grasa vegetal”, en este contexto, se refiere a aceite o grasa de origen vegetal obtenido extrayendo o produciendo aceite o grasa a partir de semillas o frutos que se procesan con fines comestibles. “Aceite animal” o “grasa animal”, en este contexto, se refiere a aceite o grasa de origen animal obtenido extrayendo o produciendo aceite o grasa, que se procesan con fines comestibles.

También se da a conocer un pienso o composición de pienso para caballos que comprende

- a) granos germinados y secos 30-40 % (por ejemplo, 35 %) (p/p) y
- b) heno seco (por ejemplo, hierba timotea) 60-70 % (por ejemplo, 65 %) (p/p).

Los granos con los que se alimentan los caballos pueden variar de un continente a otro, siendo por ejemplo cebada o avena. Esos granos se usan también como componentes principales en piensos granulados comerciales. La cebada y la avena tienen cáscara o cascarilla que proporciona fibra esencial para una función apropiada del tracto digestivo. Sin embargo, la fuente principal de fibra es el heno. Se recomienda que la porción de grano no sea superior al 60 % (en energía) de la ración diaria de un caballo.

En una realización muy específica de la invención, el pienso o composición para aves de corral (por ejemplo, pollos) comprende

- | | |
|---|--|
| a) granos germinados y secos | 0,5-30 % (por ejemplo, 1, 5, 10, 15 o 20 %) y |
| b) dieta de inicio o dieta de crecimiento | 70-99,5 % (por ejemplo, 80, 85, 90, 95 o 99 %) |

- 5 En una realización de la invención, el pienso puede comprender además minerales y/o vitaminas. Los minerales y vitaminas pueden incluir cualquier mineral o vitamina bien conocido en la técnica incluidos, pero sin limitarse a, vitaminas K, E, D, C, B₉, B₇, B₆, B₅, B₃, B₂, B₁₂, B₁, A e incluidos, pero sin limitarse a, minerales de calcio, fósforo, potasio, azufre, sodio, cloro, magnesio, hierro, cobalto, cobre, zinc, manganeso, molibdeno, yodo, bromo y selenio. El pienso de la presente invención puede comprender una o más vitaminas y/o uno o más minerales. Un experto en la técnica conoce bien minerales y/o vitaminas adecuados y pueden utilizarse en el pienso de la presente invención.

- 15 En una realización específica, el pienso de la presente invención no comprende ningún agente farmacéutico. Sin embargo, opcionalmente, la composición puede comprender agentes farmacéuticos usados convencionalmente en pienso para animales. Los agentes farmacéuticos adecuados para la composición de la presente invención se conocen bien en la técnica.

- 20 Además, el pienso puede comprender enzimas añadidas, aun cuando estas puedan no ser necesarias además de los granos germinados y secos de la presente invención con el fin de lograr excelentes resultados. En una realización específica de la invención, el pienso comprende una o más enzimas añadidas seleccionadas del grupo que consiste en xilanas, proteasa, alfa-amilasa, beta-amilasa, pectinasa, fitasa, otras enzimas hidrolíticas y cualquier otra enzima bien conocida en la técnica y adecuada para pienso para animales. Un experto en la técnica conoce bien enzimas adecuadas. En una realización adicional, el pienso para animales de la presente invención no comprende ninguna enzima añadida, transgénica o exógena.

- 25 El pienso o composición de pienso para animales puede contener adicionalmente cualquier otro agente o componente opcional que se use generalmente en composiciones de pienso habituales.

- 30 En una realización específica, la dieta básica (por ejemplo fase de inicio, crecimiento o finalización) para aves de corral (por ejemplo, pollos de engorde) comprende los siguientes ingredientes:

	% (p/p)
granos germinados y secos y otros granos ricos en almidón (por ejemplo, trigo y maíz)	45-85
componentes ricos en proteínas (por ejemplo, harina de soja)	15-45
aceites y grasas (por ejemplo, aceite de soja y de girasol, sebo)	1-5

- 35 En una realización de la invención, el pienso o composición de pienso es un pienso o composición de pienso orgánico, respectivamente.

- 40 Los medios y métodos para formular físicamente los presentes granos germinados y secos o las preparaciones o composiciones de pienso los conocen los expertos en la técnica y pueden fabricarse de una manera que se conoce en sí, por ejemplo, por medio de adición, mezclado, combinación, trituración, granulación, peletización, disolución, machacado, troceado convencionales o procesos similares. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente los métodos de formulación adecuados. En una realización de la invención, el pienso para animales se encuentra en forma de dieta normal para animales, en la que se han añadido los granos germinados y secos en cualquier forma (por ejemplo, mezcla de heno y granos germinados y secos). Dichas formas incluyen, pero no se limitan a, gránulos (por ejemplo, combinados, peletizados), cápsulas, migas, puré, producto machacado, polvo, líquido o cualquier combinación de los mismos. Además, el pienso de la presente invención puede comprender, por ejemplo, semillas enteras, guisantes, frijoles, granos, cualquier parte de los mismos y/o polvo de los mismos. En algunas realizaciones, el pienso tiene una forma similar al muesli, es decir, contiene partículas o fragmentos de diferentes tamaños. La formación física de los piensos (por ejemplo, adición, mezclado, combinación, trituración, granulación, peletización, disolución, machacado o troceado) puede cambiar el tamaño de las partículas del pienso.

- 50 En una realización de la invención, los granos secos germinados en cualquier forma y los otros ingredientes de la dieta animal se le dan a comer a un animal por separado. En una realización, los granos están en forma de granos, producto triturado, harina, gránulos, cápsulas, migas, puré, producto machacado, líquido, extracto o cualquier combinación de los mismos.

- 55 El pienso o composición de pienso de la invención puede darse de comer a un animal en cualquier momento durante el período de crianza, pero, si se desea, puede alimentarse a un animal con el pienso o composición de

pienso de la invención a intervalos predeterminados. Los animales pueden alimentarse con la composición de pienso de la invención continuamente todos los días. En una realización específica, no se necesita pienso adicional. Alternativamente, el pienso de la presente invención puede darse de comer a los animales periódicamente, por ejemplo, uno o varios días, semanas o meses a la vez, una o varias veces al día, por ejemplo, durante un período de tiempo específico, o durante varios períodos de tiempo consecutivos. En realizaciones específicas, el pienso está disponible para los animales todo el tiempo. En otra realización específica, no se da de comer a un animal otro pienso que no sea el pienso de la presente invención. En una realización más específica, están disponibles libremente el pienso de la presente invención y agua para los animales. Además del pienso, un animal puede recibir, por ejemplo, agua, sal, minerales y/o composiciones farmacéuticas. En una realización, el pienso de la presente invención se proporciona junto con cualquier otro pienso o composición a un animal.

También se da a conocer que la composición o pienso para animales se usa para alimentar a caballos todos los días, por ejemplo, una o varias veces (por ejemplo, tres veces) al día durante un período de tiempo. El período de tiempo puede incluir, por ejemplo, una o varias semanas, un mes o varios meses o un año o varios años, por ejemplo toda la vida.

En una realización de la invención, la composición o pienso para animales se usa para alimentar aves de corral (por ejemplo, pollos de engorde) diariamente durante un período de hasta 35 días o durante toda la vida. En otra realización específica de la invención, la composición o pienso es para una dieta de inicio, crecimiento o finalización.

Puede utilizarse cualquier método de alimentación habitual para alimentar a los animales según la presente divulgación. Un experto en la técnica conoce bien métodos de alimentación y sabe cuándo y cómo aplicar estos métodos. Un experto sabe que la cantidad de pienso consumido depende, por ejemplo, del tamaño y la edad de un animal, la cantidad de ejercicio físico, las condiciones de vida y/o la necesidad de energía individual.

El pienso y el método de alimentación de la divulgación son adecuados para cualquier animal, o bien animales salvajes o bien animales domésticos. Hay tres clases de animales domesticados: (1) comensales, adaptados a un nicho humano (por ejemplo, perros, gatos, cobayas); (2) animales de producción criados como alimento (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, cabras); y (3) animales destinados para recursos de tiro y no alimentarios (por ejemplo, caballo, camello, burro). Como ejemplo, puede seleccionar un animal de *Equidae*, que es la familia taxonómica de caballos y animales relacionados, incluidos los caballos, burros y cebras existentes; de *Artiodactyla*, incluidos animales tales como ovejas, cabras, camellos, cerdos, vacas, ciervos, jirafas y antílopes; o aves de corral, que lo más normalmente pertenecen al superorden *Galloanserae* (aves). En una realización, un animal que va a alimentarse según la presente descripción puede seleccionarse del grupo que consiste en animales domésticos o ganado, animales de producción monogástricos o rumiantes, caballos, ovejas, porcinos, cerdos, cerdos, aves de corral, animales de carne, animales productores de leche, gatos o perros. En una realización adicional, las aves de corral se seleccionan del grupo que consiste en pollos de engorde, pollos (por ejemplo, reproductores o ponedores), pavos y aves de caza.

Según la presente divulgación, la palatabilidad (aroma, sabor, consistencia y/o textura) del cereal o grano malteado fue buena para todos los animales. El pienso se digirió bien y los nutrientes se absorbieron bien desde el intestino. Además, los animales alimentados estaban sanos.

Efectos sobre los animales

El pienso de la invención tuvo varios efectos positivos en comparación con pienso que no comprende granos germinados y secos que tienen una actividad alfa-amilasa de al menos 60 DU/g de p.s., específicamente de 70 a 200 DU/g de p.s., más específicamente de 80 a 150 DU/g de p.s.

Los granos germinados y secos tal como se dan a conocer en el presente documento estimularon significativamente la solubilización e hidrólisis de hidratos de carbono en los materiales del pienso. En el proceso de malteado usado en la presente invención, los granos expresaron enzimas que atacan fácilmente sustratos de hidratos de carbono distintos de almidón presentes en los materiales del pienso que se usan lo más comúnmente por la industria de piensos global.

Los granos germinados y secos usados tal como se da a conocer en el presente documento mejoraron el aumento de peso de los animales y redujeron el consumo de pienso. Las enzimas y los nutrientes fácilmente digeribles de los granos germinados y secos son beneficiosos para diferentes animales (por ejemplo caballos, cerdos o aves de corral). El crecimiento más rápido y el consumo reducido de pienso se convierten en razones de conversión de pienso mejoradas, indicando una mejor rentabilidad de, por ejemplo, los pollitos. La utilización de pienso mejorada en los ejemplos de la presente divulgación sugiere que los granos germinados y secos de la presente invención son un excelente ingrediente de piensos para animales. Los estudios de los ejemplos muestran que la inclusión de malta seca produjo un mejor rendimiento de las aves que la tasa de inclusión de malta fresca.

La acción de los parásitos sobre el epitelio intestinal disminuye la tasa de absorción de nutrientes, daña la función de barrera epitelial frente a bacterias patógenas y aumenta enormemente la susceptibilidad a infecciones secundarias. Como ejemplo, la infección intestinal denominada coccidiosis es uno de los principales problemas para la industria avícola internacional, especialmente en el sector de pollos de engorde. La coccidiosis del pollo está provocada por microparásitos del género *Eimeria* que infectan el epitelio intestinal. La enteritis necrótica, que es la infección bacteriana más grave asociada con la coccidiosis, provoca pérdidas económicas significativas a los productos avícolas cada año.

Según los ejemplos de la presente divulgación, el pienso que comprende granos germinados y secos fue capaz de tener efectos positivos sobre los pollos durante y/o después de la infección por *Eimeria*. El pienso de la presente invención tiene efectos sobre el intestino de las aves de corral. El pienso provoca un cambio en los parámetros del intestino delgado de pollos jóvenes en la dirección que indica bienestar intestinal. En el sistema de defensa inmunológica, el nivel del anticuerpo secretado más importante, inmunoglobulina A, se elevó significativamente por la inclusión de granos germinados y secos de la invención, y el aumento significativo en la concentración residual de ácido láctico que se encontró que dichos granos catalizan también puede considerarse un indicador de bienestar intestinal mejorado. La inclusión de granos germinados y secos de la invención cambió la fermentación microbiana en una dirección beneficiosa, que se midió mediante múltiples parámetros. En el intestino delgado, los números de bacterias productoras de ácido láctico aumentaron y la fermentación se dirigió en una dirección heterofermentativa, que se ha encontrado previamente que indica un buen rendimiento de los animales. En el ciego, los parámetros que indican un paso excesivo de azúcares desde el intestino delgado mostraron que el grano germinado y seco pudieron reducir esta tendencia, reteniendo así una mayor proporción de energía de la dieta en el huésped animal.

Además, la inclusión de granos germinados y secos suprimió significativamente los números de *C. perfringens*, mientras que *Eimeria* así como los recuentos microbianos totales no se vieron afectados. La supresión específica de *C. perfringens* junto con la mejora de FCR en el ensayo de exposición sugieren fuertemente que la inclusión de granos germinados y secos en la dieta reduce eficientemente la gravedad de la infección por *C. perfringens* durante la fase aguda de la enteritis necrótica en pollos.

La inclusión de granos germinados y secos en la dieta mejoró el rendimiento de pollos de engorde de manera sumamente significativa en condiciones de exposición a enteritis necrótica. A un 5 % y un 10 % de inclusión, el producto de malta aumentó la ganancia de peso corporal durante todo el periodo de ensayo de 0-35 d en 137 y 157 gramos, y redujo el consumo de pienso en un 6 % y un 7 %, respectivamente. Durante el periodo de dieta de inicio, antes de la exposición a enteritis necrótica, se logró la mejor eficiencia de conversión de pienso con un 5 % de inclusión de malta. Durante el periodo de dieta de crecimiento, en la fase de recuperación, se lograron los mejores resultados con un 10 % de inclusión de malta. Solo durante la fase más grave de la enteritis necrótica, el coccidiostático Narasin produjo una mejor eficiencia de conversión de pienso que los granos germinados y secos.

La digestión en el intestino delgado es el punto clave de la alimentación con granos en caballos. La producción y actividad de amilasa en el tracto digestivo equino son factores limitantes importantes para el uso de granos en dietas equinas. La amilasa es la enzima que se encarga de la digestión del almidón, y cuando la capacidad se sobrecarga, fluye almidón al intestino grueso y crea posiblemente problemas. Según la presente divulgación, la disponibilidad y capacidad digestiva del intestino delgado del almidón de granos germinados y secados mejoró en comparación con otros granos. El nivel de glucosa en sangre estacionario durante un tiempo prolongado después de la ingestión de harina de granos malteados proporciona energía fácilmente disponible al caballo. Por tanto, los granos germinados y secos se consideraron eficaces en el aumento de la digestibilidad prececal del grano. Con la mejora de la digestibilidad del almidón, pueden proporcionarse porciones más grandes de almidón de manera segura sin efectos perjudiciales (por ejemplo cólicos, acidosis intestinal o laminitis) en el tracto digestivo. Un estado metabólico estacionario significa un mejor bienestar para el caballo.

Según la presente divulgación, pueden usarse granos germinados y secos que tienen una actividad alfa-amilasa de al menos 60 DU/g de p.s., específicamente de 70 a 200 DU/g de p.s., más específicamente de 80 a 150 DU/g de p.s. en la alimentación de caballos como grano de cereal principal o como componente principal en piensos comerciales, por ejemplo compuestos.

Un método a modo de ejemplo para alimentar animales comprende proporcionar pienso para los animales, en el que dicho pienso comprende granos germinados y secos que tienen una actividad alfa-amilasa de al menos 60 DU/g de p.s., específicamente de 70 a 200 DU/g de p.s., más específicamente de 80 a 150 DU/g de p.s.

Un pienso para animales a modo de ejemplo comprende granos germinados y secos, que tienen una actividad alfa-amilasa de al menos 60 DU/g de p.s., específicamente de 70 a 200 DU/g de p.s., más específicamente de 80 a 150 DU/g de p.s.

Un uso a modo de ejemplo comprende el uso de granos germinados y secos que tienen una actividad alfa-

amilasa de al menos 60 DU/g de p.s., específicamente de 70 a 200 DU/g de p.s., más específicamente de 80 a 150 DU/g de p.s., en pienso para animales.

5 Un uso a modo de ejemplo comprende el uso de granos germinados y secos que tienen una actividad alfa-amilasa de al menos 60 DU/g de p.s., específicamente de 70 a 200 DU/g de p.s., más específicamente de 80 a 150 DU/g de p.s., en pienso para animales para mejorar la tasa de conversión de pienso en pollos.

10 Un uso a modo de ejemplo comprende el uso de granos germinados y secos que tienen una actividad alfa-amilasa de al menos 60 DU/g de p.s., específicamente de 70 a 200 DU/g de p.s., más específicamente de 80 a 150 DU/g de p.s., en pienso para animales para mejorar la salud intestinal de los pollos durante y/o después de la infección por *Eimeria*.

15 Un uso a modo de ejemplo comprende el uso de granos germinados y secos que tienen una actividad alfa-amilasa de al menos 60 DU/g de p.s., específicamente de 70 a 200 DU/g de p.s., más específicamente de 80 a 150 DU/g de p.s., en pienso para animales para reducir la gravedad de la infección por *Clostridium perfringens* infección en pollos.

20 Un uso a modo de ejemplo comprende el uso de granos germinados y secos que tienen una actividad alfa-amilasa de al menos 60 DU/g de p.s., específicamente de 70 a 200 DU/g de p.s., más específicamente de 80 a 150 DU/g de p.s., en pienso para animales para mejorar el rendimiento de pollos en condiciones de exposición a enteritis necrótica.

25 Un uso a modo de ejemplo comprende el uso de granos germinados y secos que tienen una actividad alfa-amilasa de al menos 60 DU/g de p.s., específicamente de 70 a 200 DU/g de p.s., más específicamente de 80 a 150 DU/g de p.s., en pienso para animales tales como caballos para aumentar la digestibilidad prececal del grano.

30 Un pienso a modo de ejemplo comprende el 0,5 - 100 % (p/p), el 0,1 - 50 % (p/p), el 0,5 - 50 % (p/p), el 1 - 40 % (p/p), el 1 - 35 % (p/p), el 1 - 20 % (p/p), el 1 - 15 % (p/p), el 1 - 10 % (p/p) o el 1 - 5 % (p/p) de granos germinados y secos.

Un pienso a modo de ejemplo para caballos comprende

- | | |
|--------------------------------------|----------------|
| a) granos germinados y secos | 30-40 % (p/p), |
| b) heno seco tal como hierba timotea | 60-70 % (p/p). |

35 En una realización, el pienso para aves de corral comprende

- | | |
|---|------------------|
| a) granos germinados y secos | 0,5-30 % (p/p), |
| b) dieta de inicio o dieta de crecimiento | 70-99,5 % (p/p). |

En una realización, el pienso comprende minerales, vitaminas y/o enzimas.

40 En una realización, los animales se seleccionan del grupo que consiste en animales de la familia *Equidae* tales como caballos, animales de la familia *Artiodactyla* tales como ovejas, cabras, cerdos y vacas, aves de corral tales como pollos de engorde, pollos, pavos y aves de caza, y comensales tales como perros y gatos.

45 En una realización, los animales se seleccionan del grupo que consiste en caballos, cerdos y pollos de engorde.

En una realización, los granos germinados y secos tienen un poder diastásico de 500 a 1400 WK/100 g de p.s., más específicamente de 650 a 1300 WK/100 g de p.s., lo más específicamente 800 a 1200 WK/100 g de p.s.

50 En una realización, los granos tienen la siguiente calidad de grano:

% de contenido de proteína (% de masa/masa en base seca)	9-16.
--	-------

En una realización, los granos incluyen granos de cereal de uno o más cereales seleccionados del grupo que consiste en cebada, trigo, centeno, avena.

55 En una realización, los granos están en forma de granos, producto triturado, harina, gránulos, cápsulas, migas, puré, producto machacado, líquido, extracto o cualquier combinación de los mismos.

En una realización, los granos se han secado con aire caliente que comprende secar en la temperatura de aproximadamente 40-70 °C.

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, que no se pretende que sean limitativos de ningún modo.

5 Ejemplos

I. Productos derivados de malta como ingredientes de piensos de valor añadido – estudio de evaluación basado en modelos de laboratorio *in vitro*

10 1. Materiales y métodos

1.1. Materias primas ricas en hidratos de carbono

1.1.1. Eliminación de almidón

15

Se seleccionaron trigo y maíz para este estudio como ejemplos de granos que se usan comúnmente en piensos para animales monogástricos. El objetivo específico del trabajo fue estudiar si las enzimas de la malta pueden hidrolizar polisacáridos no amiláceos en los granos. Puesto que hasta el 60 % de la materia seca del trigo y el maíz puede ser almidón, se decidió eliminar tanto almidón como fuera posible de las preparaciones de granos antes de la prueba de hidrólisis de la malta. El motivo era que se suponía que el alto contenido en hidratos de carbono presente en las materias primas hacía imposible la detección de la hidrólisis de polisacáridos no amiláceos debido al alto fondo de azúcar.

20

Se suspendieron 100 gramos de trigo o maíz triturado en 900 ml de H₂O. Se añadió CaCl₂ (0,5 mM) para ayudar en la siguiente precipitación con EtOH. Se añadieron 200 µl de α-amilasa (Sigma A3306) y se calentó la mezcla hasta 90-100 °C. Se continuó la reacción durante 60 minutos, mezclando una vez cada 5 minutos. Entonces se permitió que la suspensión se enfriara hasta temperatura ambiente y luego se centrifugó a 30 000 × g durante 20 minutos. Se recogió el sobrenadante (denominado S1) y se suspendió el sedimento en 100 ml de H₂O sometida a intercambio iónico para lavar el sedimento. Entonces se centrifugó de nuevo la suspensión a 30000 × g durante 20 minutos. Se combinó el sobrenadante con el sobrenadante previo (S1) y el sedimento (denominado P1) congelado para su uso posterior.

25

30

Los polisacáridos en los sobrenadantes combinados se precipitaron añadiendo EtOH a la concentración final de 80 %. Después de la precipitación durante la noche, se centrifugó la mezcla de reacción a 30000 × g durante 20 minutos. El sobrenadante que contenía hidratos de carbono monoméricos de la hidrólisis enzimática se desechó y el sedimento con hidratos de carbono oligo y poliméricos se suspendió en 100 ml de H₂O. Se añadieron 20 µl de amiloglicosidasa (Fluka A9913) para convertir el resto de la maltosa, maltotriosa o dextrina límite en glucosa monomérica. Se continuó la reacción a 55 °C durante 60 minutos, mezclando una vez cada 5 minutos. Los polisacáridos en el sobrenadante se precipitaron añadiendo EtOH a la concentración final del 80 %. Después de la precipitación durante la noche, se centrifugó la mezcla de reacción a 30000 × g durante 20 minutos. El sedimento que contenía polisacáridos no amiláceos se combinó con la fracción insoluble en agua del material original (P1). Se usó este producto en el estudio de hidrólisis de malta.

35

40

Las recuperaciones de las fracciones usadas fueron de 48,9 y 50,9 gramos a partir de 100 gramos de material de partida de trigo y maíz triturado, respectivamente. Estas cifras son consecuentes con una eliminación casi completa del almidón de los granos.

45

1.1.2. Tratamientos

50

Se digirieron preparaciones de trigo y maíz pobres en almidón con el producto de malta de cebada rico en enzimas (actividad alfa-amilasa > 100 DU p.s., poder diastásico >700 WK p.s.). La lista de tratamientos para trigo y maíz fue tal como sigue en la tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos para trigo y maíz.

55

Tratamiento n.º	Malta (g)	Trigo (g)	Maíz (g)	Réplicas
1	0,1	Ninguno	Ninguno	5
2	0,2			5
3	2,0			5
4	0 (0 %)	2,0	Ninguno	5
5	0,1 (5 %)	1,9		5
6	0,2 (10 %)	1,8		5
7	0 (0 %)	Ninguno	2,0	5
8	0,1 (5 %)		1,9	5
9	0,2 (10 %)		1,8	5

El principio básico fue que, en tratamientos con trigo o maíz, la materia seca total añadida en cada recipiente de reacción fue de 2,0 gramos. Cuando se introdujo malta sola, las cantidades absolutas de malta fueron los mismos niveles que se añadieron junto con los granos (0,1 y 0,2 g de materia seca). Además, se añadieron 2,0 gramos de materia seca de malta sola para observar cuántos productos de reacción se liberan cuando las enzimas endógenas de la malta hidrolizan los polímeros (almidón, hemicelulosa, glucanos) en la propia malta. Los tratamientos y las réplicas se ejecutaron y se analizaron en un orden aleatorizado para evitar cualquier cambio sistemático provocado por el orden de manipulación.

1.1.3. Protocolo de digestión

Se pesaron el trigo, el maíz y la malta pretratados en recipientes de reacción según la tabla 1 de tratamientos anterior y luego se añadieron 4 ml de H₂O. Las fases de hidrólisis imitaban las condiciones a las que se expone el pienso para pollos tal como sigue:

1. Prealimentación: 1,0 h a 25 °C, pH tal cual,
2. Buche: 1,0 h a 40 °C, pH 4,5,
3. Proventrículo (estómago): 0,5 h a 40 °C, pH 3,5,
4. Duodeno (parte más superior del intestino delgado): 1,0 h a 40 °C, pH 6,5.

Las enzimas digestivas secretadas al estómago y duodeno del huésped *in vivo* se omitieron porque alterarían significativamente las posibilidades de detectar las actividades del producto de prueba. Al final del protocolo de digestión, se añadió H₂O en cada recipiente de reacción hasta el volumen final de 20 ml. Después de agitar a fondo, se tomaron muestras para diversos análisis y se congelaron inmediatamente.

1.1.4. Análisis

Se descongelaron las muestras y se centrifugaron a 30 000 × *g* durante 10 minutos. Entonces se analizó el sobrenadante para determinar los azúcares reductores solubles totales (extremos de cadenas de azúcar u oligosacáridos) mediante el método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). Este método proporciona solo información sobre la cantidad total de azúcares reductores, no sobre su tipo.

La composición de hidratos de carbono solubles se analizó mediante HPLC después de la hidrólisis con ácido. Puesto que este método muestra la cantidad total y el tipo de monómeros de azúcar, se esperaba que proporcionara un mayor número de equivalentes que el método de DNS que mide el número de unidades de azúcares reductores antes de la hidrólisis.

1.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico consistió en pruebas de la *t* bilaterales para todos los parámetros medidos. Las pruebas se realizaron para las 2 materias primas del pienso a niveles de 25 y 50 mg/ml de inclusión de malta. La comparación se llevó a cabo frente al pienso correspondiente sin malta incluida de manera similar a la prueba a posteriori de Dunnett. Sin embargo, se eligió la prueba de la *t* para dejar que el nivel de inclusión individual fuera independiente del otro nivel sometido a prueba simultáneamente.

Significación según la prueba de la *t* de Student:

valor *p* < 0,1 ~

valor *p* < 0,05 *

valor *p* < 0,01 **

valor *p* < 0,001 ***

valor *p* < 0,0001 ****

2. Resultados

2.1. Hidrólisis y solubilización de polisacáridos en trigo y maíz por la malta

En este estudio, se usaron trigo y maíz desalmidonados como sustratos para las enzimas de la malta. Además, la eliminación de la mayor parte del almidón mejora significativamente las posibilidades de detectar la función de

las enzimas derivadas de la malta que son capaces de atacar hemicelulosa soluble e insoluble.

Se expusieron gradualmente preparaciones de trigo y maíz a condiciones que imitan la humectación del pienso, el buche del pollo, el estómago del pollo y el intestino delgado proximal. La solubilización de los azúcares se analizó al final del protocolo.

Cuando se expusieron trigo y maíz al protocolo descrito sin malta añadida, 500 mg de preparación de granos desalmidonados produjeron aproximadamente 20 mg de azúcares reductores, calculados como equivalentes de glucosa (figura 1). Cuando se analizó mediante HPLC después de la hidrólisis con ácido, las correspondientes concentraciones de azúcar fueron de aproximadamente 120 y 90 mg para trigo y maíz, respectivamente. La diferencia procede del hecho de que el método de DNS cuenta solo grupos hidroxilo reductores de los azúcares, reduciéndose la señal por unidad de masa cuando la longitud de la cadena de azúcar aumenta. A partir de la diferencia entre el número de extremos reductores y el número total de unidades de azúcar, puede estimarse la longitud promedio de oligómeros de azúcar. Sin inclusión de enzimas, el grado de polimerización promedio fue de aproximadamente 7 y 5 unidades de azúcar para trigo y maíz, respectivamente (figura 2).

Cuando se añadió malta, la concentración de azúcares solubles aumentó significativamente cualquiera que fuera el método usado para el análisis de azúcar. La masa de todos los azúcares solubles mostrada mediante el método de HPLC casi alcanzó su máximo en el nivel más bajo de inclusión de malta de 25 mg/ml (50 mg/g de material de pienso). El aumento de la dosis de malta hasta 50 mg/ml tuvo un efecto de aumento del -10 % sobre la solubilización de los azúcares del maíz, pero poco o ningún efecto adicional sobre el trigo (figura 1). Con el análisis de los azúcares reductores, los resultados fueron diferentes. La duplicación de la dosis de malta aumentó el número de extremos de azúcares reductores en un 30 %. Globalmente, esto sugiere que la dosis más pequeña de malta fue suficiente para la solubilización de los hidratos de carbono, pero con un aumento de la dosis de malta, las cadenas de azúcares solubles se hidrolizaron además con más eficiencia. Tal como se muestra en la figura 2, el grado de polimerización estimado para el trigo cayó desde ~7 hasta 2,5 y para el maíz desde ~5 hasta 2,5 por enzimas de la malta.

En la figura 1, también se muestra la liberación de azúcares de la propia malta (columnas marcadas con "Ninguno"). Estos tratamientos se incluyeron para garantizar que los productos de azúcar medidos no proceden de la hidrólisis de la propia malta. Cuando malta sola pasó por el protocolo a las mismas dosis usadas en otros tratamientos con trigo y maíz, la liberación de azúcares fue insignificante en comparación con los tratamientos que contienen también las preparaciones de granos. Los hidratos de carbono de los controles de malta tenían el grado de polimerización promedio de 2 o menos (columnas marcadas con "Ninguno" en la figura 2).

Globalmente, los resultados indican que las enzimas de la malta i) mejoraron la solubilización de los hidratos de carbono de la fase sólida y ii) cortaron los hidratos de carbono solubles en oligómeros más pequeños. A partir de 500 mg de preparación de granos, la malta solubilizó tanto como 100 mg de azúcares, de los cuales de 10 a 20 mg procedían de la propia malta.

El análisis de HPLC indicó que había 3 azúcares principales presentes en el hidrolizado de ácido, glucosa, xilosa y arabinosa. En trigo, la glucosa representaba aproximadamente el 94 % y la xilosa + arabinosa el 6 % de todos los azúcares. En maíz, el porcentaje de xilosa + arabinosa fue menor, solo el 1-2 %. Estos números son consecuentes con los datos previamente publicados.

El mezclado de la malta con las preparaciones de granos catalizó la solubilización de azúcar; la concentración de los azúcares mencionados se duplicó en la fase soluble (figuras 3a, 3b). El efecto de la malta fue sumamente significativo estadísticamente para todos los azúcares.

II. Efecto de los productos de malta sobre el rendimiento de pollitos de engorde expuestos a coccidios

1. El experimento

1.1. Tratamientos dietéticos

La dieta fue pienso de tipo comercial a base de trigo y soja para pollitos de engorde sin coccidiostáticos ni enzimas para piensos. La tabla 2 muestra la formulación dietética de las dietas de inicio y de crecimiento. La dieta de inicio se dio de comer los días 1-17 y la fórmula de crecimiento los días 17-29. Se analizó la harina de trigo y soja para determinar los nutrientes básicos y los perfiles de aminoácidos de la formulación final.

El ensayo incluyó los siguientes tratamientos dietéticos:

1. Control. Control negativo, sin enmiendas

2. Malta de cebada seca, 10 %, secada con aire caliente (alfa-amilasa > 100 DU p.s., poder diastásico > 700 WK p.s.)

3. Malta de cebada fresca, 5 %, suavemente secada al aire

Se sometieron a prueba dos productos de malta: granos de malta completos que se secaron usando calor en Viking Malt, y granos de malta frescos que se secaron al aire suavemente en Alimetrics. Los productos de malta reemplazaron un peso igual del trigo de la fórmula dietética. Ambos tipos de granos de malta se trituraron hasta una harina gruesa en el molino de pienso de Agrifood Research Finland (Jokioinen) justo antes del mezclado de los piensos. El motivo de usar la malta fresca fue que el calor del proceso de secado normal probablemente inactiva algunas de las enzimas en semillas malteadas. Por tanto, los beneficios para la salud podrían ser mayores en la malta fresca que en la malta secada con calor. Para la formulación de las dietas, se obtuvieron los valores de nutrientes para la malta de cebada a partir de los valores de la tabla de Agrifood Research Finland.

Tabla 2. Fórmulas dietéticas.

Ingredientes	Control		Malta seca		Malta fresca	
	% de inicio	% de crecimiento	% de inicio	% de crecimiento	% de inicio	% de crecimiento
Trigo	57,42	67,53	49,55	53,66	56,85	60,98
Harina de soja	34,79	26,97	32,50	28,10	31,60	27,20
Aceite de girasol	4,00	1,25	4,00	4,00	2,60	2,60
Fosfato de monocalcio	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Caliza	1,30	1,40	1,30	1,40	1,30	1,40
NaCl	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Premezcla de minerales*)	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Premezcla de vitaminas**)	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Metionina	0,10	0,15	0,15	0,15	0,15	0,13
Lisina	0,09	0,30	0,20	0,34	0,20	0,34
Treonina	0,00	0,10	0,00	0,05	0,00	0,05
Producto de prueba	0,00	0,00	10,00	10,00	5,00	5,00
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

*) Contenido de la premezcla de minerales: calcio 296,8 g/kg, hierro 12,5 g/kg, cobre 4 g/kg, manganeso 25 g/kg, zinc 32,5 g/kg, yodo 0,225 g/kg, selenio 0,1 g/kg.

**) Contenido de la premezcla de vitaminas: calcio 331,3 g/kg, vitamina A 6000000 UI, vitamina D3 2250000 UI, vitamina E 30000, tocoferol 27270 mg/kg, vitamina K3 1505 mg/kg, vitamina B1 1257,3 mg/kg, vitamina B2 3000 mg/kg, vitamina B6 2009,7 mg/kg, vitamina B12 12,5 mg/kg, biotina 75 mg/kg, ácido fólico 504 mg/kg, niacina 20072 mg/kg, ácido pantoténico 7506,8 mg/kg.

1.2. Animales y alojamiento

Se adquirieron crías de pollos de engorde macho Ross 508 del criadero comercial de HK-Ruokatalo (Mynämäki). Un veterinario comprobó la salud de ellos pollitos el día 1, y entregó un certificado para verificar que se encontraban en condiciones corporales normales al inicio del ensayo. El experimento fue aprobado por la Junta Nacional de Experimentación Animal de Finlandia.

Los pollitos se alojaron en corrales abiertos (1,125 m² cada uno) con lecho de virutas de madera, 15 pollitos por corral. Cada corral estaba equipado con un comedero. Una línea de irrigación de tetinas sirvió a dos bebederos de tetina en cada corral. Las lámparas de la incubadora se ajustaron para proporcionar calentamiento extra a los pollitos durante la primera semana.

El programa de iluminación en la nave imitó las condiciones de las naves comerciales de pollos de engorde en Finlandia. El día 1, las luces estuvieron encendidas durante 24 horas. A partir del día 2, el periodo de oscuridad aumentó una hora al día, hasta que el día 7 hubo 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad al día. Este ciclo de luz:oscuridad de 18/6 se continuó luego hasta el final del ensayo.

El programa de temperatura siguió las instrucciones de Aviagen para pollos de engorde Ross. La temperatura se monitorizó y se registró diariamente con varios termómetros.

Las aves se asignaron aleatoriamente a los tres tratamientos dietéticos. Hubo ocho corrales repetidos (120 pollitos) en el tratamiento de control, y siete corrales repetidos (105 pollitos) para los tratamientos con malta de cebada. Los corrales de tratamiento se aleatorizaron en la sala. Cada pollito se marcó con color permanente en las plumas que identificaba el tratamiento pero no el animal individual.

Estuvieron disponibles pienso y agua libremente en todo momento durante el estudio. Los pollitos se comprobaron al menos una vez al día, y dos veces al día durante el periodo de exposición, por personal formado.

1.3. Exposición a *Eimeria*

El día 11, se pesaron los pollitos y se expusieron a ooquistes de *Eimeria máxima* de la cepa Weybridge. La exposición, 1500 ooquistes por ave, se inoculó por vía oral a cada pollito individual en 150 µl de agua corriente.

5 La exposición tenía como objetivo inducir una coccidiosis subclínica con una disminución del rendimiento de las aves pero sin un aumento en la mortalidad.

1.4. Parámetros de rendimiento

10 Se pesaron los pollitos individualmente los días 1, 11, 17, 22 y 29. El pienso administrado a los corrales se pesó y se registró, y el pienso sobrante en los comederos se pesó en cada punto de tiempo. El motivo de los múltiples puntos de medición del rendimiento es que el objetivo es averiguar el efecto del aditivo para pienso tanto en el proceso patológico como en la recuperación de la enfermedad. Se midieron la ingesta de pienso por corral y la razón de conversión de pienso (FCR) durante los siguientes cuatro periodos:

- 15
- Días 1-11, periodo de dieta de inicio, antes de la exposición,
 - Días 11-17, periodo de dieta de inicio, exposición a coccidiosis,

20

 - Días 17-22, periodo de dieta de crecimiento, coccidiosis,
 - Días 22-29, periodo de dieta de crecimiento, periodo de recuperación.

25 La razón de conversión de pienso (FCR) mide la cantidad de pienso que es necesaria para producir una masa unitaria de ave durante un cierto periodo de tiempo. Para un productor de pollos de engorde, esta razón es crucial para los cálculos de rentabilidad. Para medir la FCR, se mide la masa viva de los pollitos al comienzo del periodo de tiempo seleccionado, se mide el pienso administrado a los pollitos y al final del periodo de estudio se pesan los pollitos y el pienso sobrante.

30 Las aves que se encontraron muertas en los corrales, y las aves que se sacrificaron debido a problemas en las patas, lesiones u otros problemas de salud, se pesaron y se registraron, y se almacenaron en un congelador hasta el final del ensayo. Puesto que la mortalidad en el ensayo se mantuvo baja, y no hubo síntomas de otras enfermedades distintas de coccidiosis, las aves muertas no se sometieron a necropsia.

35 1.5. Toma de muestras y almacenamiento de muestras

El día 17, se pesaron dos aves por corral y se sacrificaron mediante dislocación cervical. Se abrió la cavidad abdominal, y se extirparon el íleon y los ciegos pares. El íleon y los ciegos pares se empaquetaron en bolsas de plástico individuales, se congelaron inmediatamente y se almacenaron en un congelador. El día 29, se recogió un conjunto similar de muestras, y todas las aves restantes se pesaron y se sacrificaron. Conjuntamente, los dos puntos de toma de muestras produjeron 88 muestras de digesto de íleon y 88 de digesto cecal.

40

1.6. Extracción de ADN bacteriano de muestras de íleon y cecales

45 Para la extracción de ADN, se separaron las bacterias de las muestras mediante centrifugación diferencial, se rompieron las paredes celulares bacterianas y se purificó cuantitativamente el ADN cromosómico usando el protocolo interno de Alimetrics, que está optimizado y validado para la extracción de ADN bacteriano de muestras de digesto de pollo. En la etapa de lavado inicial de las muestras, el objetivo principal fue eliminar partículas de pienso y polisacáridos complejos, que alteran el proceso de purificación de ADN posterior y las aplicaciones de PCR posteriores. En consecuencia, un total de 88 muestras de ADN de íleon y 88 de ADN cecal se sometieron a análisis de qPCR tal como se especifica a continuación.

50

1.7. Análisis de PCR en tiempo real cuantitativa

55 El sistema de PCR en tiempo real se basa en la detección y cuantificación de un indicador fluorescente. Esta señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de PCR en la reacción. Al registrar la cantidad de emisión de fluorescencia en cada ciclo, es posible monitorizar la reacción PCR durante la fase exponencial donde el primer aumento significativo en la cantidad de producto de PCR se correlaciona con la cantidad inicial de molde diana.

60

En este estudio, todos los resultados (con excepción de *Clostridium perfringens* con el que se aplicará una sola copia del gen como diana) se expresarán como número de copias del gen de ARN ribosómico (ARNr) por 1 g de digesto. Con el fin de estimar el número de cromosomas/genomas en los análisis, deben dividirse los resultados obtenidos entre el número de copias de ARNr promedio de los organismos diana. Para *E. coli*, el número de copias es 7, mientras que el genoma de *Eimeria* codifica aproximadamente 100-200 copias de ARN dependiendo

65

de la especie.

Se aplicó el siguiente panel de qPCR a muestras de digesto de íleon (gen diana entre paréntesis):

- 5 1) eubacterias totales (gen de ARNr 16S),
- 2) *Lactobacillus* spp. (gen de ARNr 16S),
- 3) *Enterococcus* spp. (gen de ARNr 16S),
- 10 4) *Streptococcus* spp. (gen de ARNr 16S),
- 5) *Escherichia coli* (gen de ARNr 16S),
- 15 6) *Clostridium perfringens* (plc; toxina alfa),
- 7) *Eimeria* spp. (gen de ARNr 5S)).

Se aplicó el siguiente panel de qPCR a muestras de digesto cecal (gen diana entre paréntesis):

- 20 1) Eubacterias totales (gen de ARNr 16S),
- 2) *Lachnospiraceae* (gen de ARNr 16S),
- 25 3) *Ruminococcaceae* (gen de ARNr 16S),
- 4) *Bifidobacterium* spp. (gen de ARNr 16S),
- 5) *Lactobacillus* spp. (gen de ARNr 16S),
- 30 6) *Coriobacteriaceae* (gen de ARNr 16S),
- 7) *Escherichia coli* (gen de ARNr 16S),
- 35 8) *Clostridium perfringens* (plc; gen que codifica la toxina alfa),
- 9) *Eimeria* spp. (gen de ARNr 5S).

1.8. Perfiles de ácidos grasos de cadena corta (SCFA)

40 Los ácidos grasos de cadena corta son los principales productos de fermentación microbiana que proporcionan información sobre las actividades metabólicas y los patrones de fermentación de la comunidad microbiana. Se analizó el perfil de SCFA de 88 muestras de íleon y 88 cecales mediante cromatografía de gases. Los SCFA individuales analizados fueron ácidos láctico, acético, propiónico, butírico y valérico, y los ácidos grasos de 45 cadena ramificada (ácidos isovalérico, isobutírico y 2-metil-butírico).

1.9. Estadísticas

50 El análisis estadístico consistió en pruebas de la t bilaterales para todos los parámetros medidos. Se eligió la prueba de la t de Student para permitir que los tratamientos individuales fueran independientes de los otros tratamientos sometidos a prueba simultáneamente. Significación según prueba de la t de Student (presentada en las figuras como asteriscos):

valor $p < 0,1$ ~

55 valor $p < 0,05$ *

valor $p < 0,01$ **

60 valor $p < 0,001$ ***

valor $p < 0,0001$ ****

2. Resultados

65 2.1. Aumento de peso de las aves

Durante el periodo antes de la exposición, los pollitos gozaban de una buena salud. El peso medio de las crías el día 1 era de 43,5 g, sin diferencias estadísticas entre los tres grupos de dieta.

- 5 La media ($\pm$ EE) del peso de las aves los días 11, 17, 22 y 29 se muestra en la tabla 3. La figura 4 ilustra el aumento de peso promedio de cada grupo de tratamiento y el aumento de peso promedio de pollitos de engorde Ross.

- 10 En el periodo antes de la exposición, la malta seca al 10 % aumentó la ganancia de peso promedio de los pollitos, dando como resultado aves un 5,8 % más pesadas el día 11 ($p < 0,05$). El 3,3 % más de peso de las aves en el tratamiento con malta fresca al 5 %, en comparación con las aves de control, no fue estadísticamente significativo. De manera similar, el día 17, los pollitos con malta seca eran en promedio un 8,2 % más pesados que los pollitos con la dieta de control ($p < 0,01$), mientras que el aumento de peso del 3,7 % mediante la malta fresca no fue suficiente para la significación estadística. Durante el periodo de dieta de crecimiento, el beneficio del grupo de malta seca persistió, pero ya no fue estadísticamente significativo. La significación perdida puede deberse al aumento de la variación entre aves provocada por la coccidiosis. El peso de los pollitos en el grupo de malta fresca fue también estadísticamente similar al de las aves de control.

- 20 Tabla 3. Peso medio de los pollitos en cuatro puntos de tiempo. Los asteriscos en el grupo de malta seca los días 11 y 17 indican una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el tratamiento de control.

Dieta	Día 11		Día 17		Día 22		Día 29	
	media, g	EE	media, g	EE	media, g	EE	media, g	EE
Control	278	4,1	504	8,15	819	20,3	1516	28,1
Malta seca	294*	4,8	545**	6,87	857	19,3	1576	27,4
Malta fresca	287	3,7	522	6,70	808	15,6	1526	20,5

- 25 La comparación de las curvas de crecimiento en el presente estudio con el crecimiento medio de las aves Ross (figura 4) ilustra la reducción de la tasa de crecimiento durante la coccidiosis, y también la recuperación de la enfermedad. Durante la última semana del experimento, todos los tratamientos casi habían alcanzado la curva de aumento de peso de Ross medio, lo que significa que las aves fueron capaces de compensar la reducción del aumento de peso corporal inducida por la coccidiosis. En el grupo de tratamiento de malta seca, la recuperación fue numéricamente más rápida que con los otros tratamientos.

30 2.2. Consumo de pienso

- 35 Se midió el consumo de pienso por corral dos veces durante el periodo de dieta de inicio y dos veces en el periodo de dieta de crecimiento (tabla 4; figura 5). El consumo de pienso promedio fue menor en el tratamiento con malta seca que en el tratamiento de control en tres de los cuatro periodos medidos. El efecto fue casi estadísticamente significativo para los días 1-11 ($p < 0,1$), y significativo para los días 22-29 ($p < 0,05$), y solo numéricamente reducido para los días 1-17. El periodo entre los días 17-22 fue el único periodo en el consumo de pienso del tratamiento con malta seca fue mayor que el del tratamiento de control. Esto se debe lo más probablemente a una mejor salud de las aves en este grupo de tratamiento.

- 40 Los efectos de la malta fresca fueron en la misma dirección que la malta seca, pero la magnitud de los efectos fue menos que en la malta seca, y siguieron siendo no significativos en comparación con el tratamiento de control. En cuanto a la malta seca, el consumo de pienso por corral fue mayor en el grupo de control solo en el periodo entre los días 17-22, lo que sugiere una recuperación más rápida de la coccidiosis en los tratamientos con malta de cebada que en el tratamiento de control.

- 45 Tabla 4. Consumo de pienso por corral durante los dos periodos de la dieta de inicio y los dos periodos de la dieta de crecimiento. La significación según la prueba de la t de Student se proporciona como asteriscos.

Dieta	Días 1-11		Días 11-17		Días 17-22		Días 22-29	
	media, g	EE	media, g	EE	media, g	EE	media, g	EE
Control	5305	305	10075	344	12310	1255	11958	946
Malta seca	4594~	244	8969	641	13063	1189	9489*	505
Malta fresca	4851	237	9169	635	12886	735	10011	453

- 50 Durante todo el ensayo de 29 días, en comparación con el grupo de control, los tratamientos con malta seca y malta fresca consumieron en promedio un 8,9 % y un 6,9 % menos de pienso, respectivamente (figura 5).

2.3. Razón de conversión de pienso

- 55 Durante el periodo antes de la exposición (días 1-11), la FCR fue un 17,2 % y un 13,8 % mejor que el control en

los tratamientos con malta seca y malta fresca, respectivamente ($p < 0,1$). En la primera semana de coccidiosis, la mejora de la FCR fue de un 18,0 % para malta seca ($p < 0,05$) y de un 11,8 % para malta fresca (NS). Durante todo el periodo de dieta de inicio, la malta seca mejoró la FCR en un 17,6 % y la malta fresca en un 12,9 % ($p < 0,05$ para ambos tratamientos; figura 6).

Entre los días 17 y 22 (coccidiosis aguda), la FCR no difirió estadísticamente entre los tratamientos. La FCR en el periodo final (días 22-29) mejoró de nuevo significativamente por la malta seca (+22,7 %, $p < 0,05$). La FCR del periodo total de la dieta de crecimiento (días 17-29) fue de manera numérica, pero no estadística, significativamente mejor para ambos tratamientos con malta que para el grupo de control (figura 7).

Durante todo el ensayo de 29 días, la FCR mejoró en un 12,8 % por la malta seca ($p < 0,05$) y un 7,2 % por la malta fresca (NS), tal como se muestra en la figura 8.

Tabla 5. Razón de conversión de pienso por corral durante los dos periodos de la dieta de inicio y los dos periodos de la dieta de crecimiento. La significación según la prueba de la t de Student se proporciona como asteriscos.

Dieta	Días 1-11		Días 11-17		Días 17-22		Días 22-29	
	media, g/g	EE	media, g/g	EE	media, g/g	EE	media, g/g	EE
CONTROL	1,54	0,093	3,10	0,114	3,21	0,319	1,38	0,115
Malta seca	1,27~	0,078	2,54*	0,239	3,30	0,279	1,06*	0,048
Malta fresca	1,33~	0,067	2,73	0,187	3,52	0,273	1,16	0,63

2.4 Síntomas de coccidiosis y mortalidad

La exposición a *E. máxima* el día 11 dio como resultado coccidiosis, que disminuyó el rendimiento de los pollitos de engorde y provocó signos clínicos de enfermedad como diarrea, letargo y falta de apetito. Fueron visibles lesiones por coccidios descamación del epitelio mucoso en el epitelio intestinal de la mayoría de las aves que se muestrearon el día 17.

La mortalidad total permaneció por debajo del 4 % durante todo el periodo de estudio (figura 9), a pesar de los claros síntomas de coccidiosis especialmente durante la tercera semana del ensayo. No hubo diferencias significativas entre los grupos de dieta durante ninguno de los periodos (tabla 6). La mayoría de las mortalidades se produjeron antes de la exposición, y se debieron a la incapacidad de comenzar a alimentarse y a insuficiencias cardíacas, que son ambos problemas comunes pollitos de engorde jóvenes.

Tabla 6. Mortalidad (%) durante los dos periodos de la dieta de inicio y los dos periodos de la dieta de crecimiento. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento.

Dieta	Días 1-11		Días 11-17		Días 17-22		Días 22-29	
	media, %	EE	media, %	EE	media, %	EE	media, %	EE
CONTROL	1,67	1,091	0,83	0,833	0,89	0,893	0,00	0,000
Malta seca	2,86	1,983	1,02	1,020	0,00	0,000	0,00	0,000
Malta fresca	0,00	0,000	1,90	1,230	0,00	0,000	0,28	0,181

2.5 Evaluación de las bacterias totales y los grupos microbianos individuales en el íleon

ÍLEON, DÍA 17

Ninguno de los grupos microbianos analizados difirió entre el tratamiento de control y con malta con una significación estadística el día 17 debido a una alta variación entre aves provocada por exposición a *Eimeria* grave.

ÍLEON, DÍA 29

Lactobacillus y *Streptococcus* son, en muchos casos, géneros bacterianos dominantes en el intestino delgado, mostrando un metabolismo del ácido láctico homofermentativo. En este ensayo, los números de estreptococos en el íleon fueron significativamente mayores con malta fresca el día 29 (figura 10). Además, el tratamiento con malta seca tendió a aumentar los números de estreptococos. Sin embargo, este resultado no fue estadísticamente significativo debido a una alta variación entre aves. Cabe señalar que los patrones de lactobacilos fueron bastante similares a los de estreptococos, es decir, tanto la malta seca como la fresca parecían aumentar los números de estas bacterias productoras de ácido láctico (figura 11). Sin embargo, estos resultados no fueron estadísticamente significativos al nivel de riesgo de $\alpha = 0,05$.

El metabolismo de los enterococos es similar al de los lactobacilos y estreptococos homofermentativos. Un rasgo

característico de los enterococos es que tienden a poseer y transferir genes de resistencia a antibióticos y, por tanto, se consideran un grupo de bacterias potencialmente peligroso están usándose o se han usado antibióticos terapéuticos o profilácticos. La dieta de malta seca tendió a reducir los números de enterococos (figura 12). Sin embargo, este resultado no fue estadísticamente significativo.

5

2.6. Evaluación de las bacterias totales y los grupos microbianos individuales en el ciego

CIEGO, DÍA 17

- 10 El análisis de las bacterias totales mide la densidad bacteriana global en el ciego. A diferencia del intestino delgado, una alta densidad bacteriana en el ciego indica descomposición de componentes del pienso no disponibles para el sistema de digestión del huésped. Cuando las bacterias están convirtiendo tales compuestos de la dieta en ácidos grasos de cadena corta que proporcionan energía para el huésped, la energía metabolizable aparente tiende a aumentar y la FCR, por consiguiente, mejora. En este ensayo, no hubo cambios observables en los números de bacterias totales del ciego entre los tratamientos.

15

Las bifidobacterias son sacarolíticas y, por tanto, su alta abundancia indica la presencia de hidratos de carbono metabolizables en el ciego. En granjas comerciales, la abundancia de bifidobacterias varía enormemente. Aun cuando la alta abundancia de bifidobacterias en el intestino humano se considera beneficiosa, este no parece ser el caso en animales de producción tales como pollos de engorde. De hecho, se ha observado que una alta abundancia de bifidobacterias se correlaciona negativamente con el rendimiento de los pollos de engorde. Esto se debe posiblemente al hecho de que indica una mala captura de la energía unida a los hidratos de carbono por el huésped.

20

- 25 En este ensayo de alimentación, los números de bifidobacterias tendieron a disminuir con la inclusión tanto de malta seca como fresca (figura 13). Sin embargo, los resultados no fueron estadísticamente significativos lo más probablemente a una alta variación dentro de los grupos de tratamiento provocada por la exposición a coccidiosis.

- 30 *Coriobacteriaceae* es una familia bacteriana que pertenece al filo Actinobacteria, que se sabe que alberga organismos Gram-positivos anaerobios obligatorios con ADN cromosómico de alto contenido en G+C. *Eggerthella lenta* y *Collinsella aerofaciens* son los representantes mejor conocidos de este grupo, y *C. aerofaciens* es un miembro especialmente bien conocido de la microbiota intestinal de los mamíferos. Sin embargo, estas bacterias han estado frecuentemente subrepresentadas en estudios de secuenciación del gen de ARNr 16S de las comunidades microbianas del intestino. Esto se debe lo más probablemente a las condiciones de PCR aplicadas, que son desfavorables para bacterias un % de G+C. La contribución de *Coriobacteriaceae* a la salud y el performance de los pollos de engorde no se ha investigado a fondo. Sin embargo, en estudios recientes, se ha mostrado que la abundancia de *C. aerofaciens* se correlaciona positivamente con el bienestar intestinal humano. Los números de *Coriobacteriaceae* aumentaron significativamente con la dieta de malta seca (figura 14). También se observó un aumento pequeño pero no estadísticamente significativo con la dieta de malta fresca. Por tanto, estos resultados sugieren que la inclusión de malta puede tener un efecto estimulante sobre los números de especies coriobacterias supuestamente beneficiosas.

40

CIEGO, DÍA 29

45

Ninguno de los grupos microbianos del ciego analizados difirió entre los tratamientos de control y con malta con una significación estadística el día 29.

2.7. Perfiles de SCFA del íleon

50

La fermentación bacteriana anaerobia en un hábitat rico en hidratos de carbono tal como el íleon produce normalmente SCFA como productos metabólicos finales, siendo los dominantes ácido láctico y acético. En este estudio, la proporción de ácido acético en las muestras de íleon fue marginal en comparación con el ácido láctico. Esto sugiere que el íleon de los pollos de engorde de las aves expuestas estaba dominado por bacterias del ácido láctico homofermentativas, que fermentan glucosa con lactato como producto final primario.

55

ÍLEON, DÍA 17

- 60 Ninguno de los grupos microbianos del íleon analizados difirió entre los tratamientos de control y con malta con una significación estadística el día 17. El resultado es según los resultados microbianos del mismo punto de muestreo de 17 días.

ÍLEON, DÍA 29

- 65 Aunque los niveles de ácido acético fueron bajos en todos los tratamientos, la dieta de malta seca mostró un efecto creciente significativo sobre los niveles de ácido acético el día 29 (figura 15). Además, se observó un

aumento similar a una tendencia del ácido láctico en el íleon, especialmente con la dieta de malta fresca (figura 16). Estos resultados pueden indicar la recuperación más rápida de la coccidiosis de las aves con las dietas de malta.

5 CIEGO, DÍA 17

Los SCFA funcionan generalmente como fuentes sistémicas de energía en el intestino inferior. La concentración de ácido total indica la actividad de fermentación global y la abundancia relativa de ácidos individuales indica la actividad respectiva de las diferentes rutas de fermentación. En el ciego de pollos sanos, la concentración residual de ácido láctico es baja y los ácidos principales son SCFA más reducidos, tales como ácidos acético, butírico y propiónico. El motivo por el cual se considera beneficioso el aumento de la formación de ácidos grasos volátiles (VFA) (por ejemplo, butirato, acetato y propionato) en el intestino delgado es el hecho de que hasta el 95 % de los SCFA producidos durante la fermentación de hidratos de carbono los utiliza el huésped, lo que proporciona una proporción significativa de los requisitos energéticos totales. Además, los trastornos nutricionales y los problemas de enteritis a menudo se reflejan en el perfil de los SCFA del ciego, que, por tanto, pueden utilizarse como indicadores de salud. Tal como se ilustra en la figura 17, la dieta de malta seca estimuló significativamente la formación de VFA el día 17. De los ácidos individuales analizados, especialmente la concentración de ácido acético aumentó en comparación con el control negativo. No se observó un efecto estimulante similar con la dieta de malta fresca (figura 18).

El ácido láctico es el más fuerte de los principales SCFA producidos por las bacterias intestinales y, por tanto, tiende a reducir el pH residual más que otros SCFA. El lactato producido por las bacterias del ácido láctico rara vez está presente en el ciego en altas cantidades, ya que normalmente se absorbe rápidamente en el intestino o se usa como sustrato para las bacterias que utilizan lactato. Sin embargo, en ciertas condiciones, tales como coccidiosis, se produce una acumulación anómala de ácido láctico como resultado de la malabsorción de hidratos de carbono en el intestino superior y el posterior crecimiento excesivo de bacterias productoras de ácido láctico debido al aumento del suministro de hidratos de carbono fácilmente metabolizados al intestino inferior. En consecuencia, la producción de ácido láctico excede la capacidad amortiguadora y de absorción del ciego y el pH del hábitat disminuye, con la inhibición concomitante de la actividad de los usuarios de lactato. Esta cascada de acontecimientos puede conducir finalmente a un deterioro del bienestar del huésped.

En este estudio, la concentración de ácido láctico de las muestras cecales fue excepcionalmente alta en todas las muestras, lo que sugiere un estado muy grave de infección por coccidiosis el día 17. Sin embargo, los resultados también mostraron que los niveles de lactato fueron significativamente más bajos con la dieta de malta seca que con el control negativo (figura 19). Además, el porcentaje de ácido láctico de los SCFA totales se redujo significativamente (datos no mostrados). La supresión de la acumulación de lactato se considera un resultado muy prometedor e indica, junto con el aumento de la concentración de VFA cecales, que la malta seca puede reducir la gravedad de la infección derivada de la exposición y, en consecuencia, facilitar la absorción de nutrientes en el intestino delgado.

40 CIEGO, DÍA 29

Entre los SCFA, el butirato ha atraído especial interés, ya que se sabe que regula la diferenciación y proliferación celular dentro de la mucosa del colon y es una fuente de energía preferida para los colonocitos epiteliales. Además, se ha demostrado que el butirato inhibe la invasión de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis en células epiteliales cecales de pollo. Aunque la producción de butirato se distribuye entre muchos grupos de clostridios del filo Firmicutes, se produce principalmente por miembros de las familias bacterianas *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*. En este estudio, la concentración de ácido butírico cecal tendió a ser mayor con la dieta de malta seca en comparación con el control negativo el día 29. No se observó una tendencia similar con la dieta de malta fresca (figura 20). En su lugar, la malta fresca mostró un pequeño aumento de la concentración de ácido láctico (figura 21).

Cabe señalar que los niveles de ácido láctico fueron considerablemente más bajos el día 29 que el día 17 con los tres tratamientos (figuras 19 y 21). Este resultado sugiere fuertemente que las aves se recuperaron bien de la exposición a la coccidiosis el día 29.

III. Efecto de los productos de malta sobre el rendimiento de pollos de engorde

1. Métodos

1.1 Tratamientos dietéticos

La dieta fue pienso a base de trigo y soja para pollos de engorde tal como se especifica en la tabla 7. La formulación de inicio se usó durante las primeras 2 semanas y la dieta de crecimiento durante las siguientes 3 semanas del ensayo. Las dietas de inicio se prepararon como gránulos de 2 mm y las dietas de crecimiento como gránulos de 4 mm. Los piensos se fabricaron en el Nature Resources Institute Finland (previamente

denominado Agrifood Research Finland). El ensayo tuvo 8 tratamientos dietéticos (tabla 8). Basándose en los análisis previos con malta de cebada añadida, las dietas se equilibraron para la energía metabolizable (MJ/kg), la proteína en bruto, los principales aminoácidos limitantes, Ca y P. La cebada malteada (poder diastásico > 700 WK; alfa-amilasa >100 DU) reemplazó a una cantidad igual de trigo en las dietas. En tratamientos 6, 7 y 8, se incluyó malta solo en las dietas de inicio mientras que en los tratamientos 3, 4 y 5 la malta se dio de comer en todo el ensayo.

Tabla 7. Dieta de control básica.

	Inicio, %	Crecimiento, %
Trigo	56,88	66,19
Harina de soja 48	35,00	27,00
Aceite de girasol	3,90	3,00
Fosfato de monocalcio	1,70	1,67
Caliza	1,30	1,00
NaCl	0,42	0,42
Premezcla de minerales*	0,20	0,20
Premezcla de vitaminas**	0,20	0,20
Metionina	0,20	0,16
L-Lisina HCl	0,20	0,16
Total	100	100
*) Contenido de la premezcla de minerales: calcio 296,8 g/kg, hierro 12,5 g/kg, cobre 4 g/kg, manganeso 25 g/kg, zinc 32,5 g/kg, yodo 0,225 g/kg, selenio 0,1 g/kg.		
**) Contenido de la premezcla de vitaminas: calcio 331,3 g/kg, vitamina A 6000000 UI, vitamina D3 2250000 UI, vitamina E 30000, tocoferol 27270 mg/kg, vitamina K3 1505 mg/kg, vitamina B1 1257,3 mg/kg, vitamina B2 3000 mg/kg, vitamina B6 2009,7 mg/kg, vitamina B12 12,5 mg/kg, biotina 75 mg/kg, ácido fólico 504 mg/kg, niacina 20072 mg/kg, ácido pantoténico 7506,8 mg/kg.		

Tabla 8. Tratamientos de prueba.

Tratamientos	Dieta de inicio 0-14 días (kg/tn)	Dieta de inicio 14-35 días (kg/tn)	Corrales repetidos
1. Control negativo	-	-	8
2. Control positivo (Rovabio® Excel AP T-Flex)	0,05	0,05	6
3. Cebada malteada, 5 %	50	50	8
4. Cebada malteada, 10 %	100	100	8
5. Cebada malteada, 15 %	150	150	7
6. Cebada malteada, 5 %	50	-	8
7. Cebada malteada, 10 %	100	-	8
8. Cebada malteada, 15 %	150	-	7

1.2 Animales y alojamiento

El ensayo de 35 días se realizó en la granja de pollos de engorde de Alimetrix en el sur de Finlandia, en junio-julio de 2015. La temperatura de la nave se elevó hasta 32 °C dos días antes de que llegaran los pollitos. La luminosidad se ajustó a 20 lux y la humedad del aire se ajustó según las recomendaciones. Las lámparas de la incubadora se ajustaron para proporcionar calentamiento extra a los pollitos durante la primera semana. La temperatura disminuyó gradualmente hasta 22 °C a lo largo del periodo de crianza. El sistema automatizado de temperatura, ventilación y humedad se monitorizó y registró durante todo el experimento diariamente. Las horas de oscuridad se aumentaron gradualmente en el plazo de una semana, de modo que el ciclo de luz-oscuridad fue de 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad diariamente.

Las aves se alojaron en 60 corrales abiertos (1,125 m² cada uno) con lecho de virutas de madera. Los números de corrales repetidos para cada tratamiento se muestran en la tabla 8.

El día 1, había 15 aves en cada corral y el número total de aves era de 900. Un veterinario inspeccionó la salud de los pollitos al comienzo del ensayo. Las aves se observaron dos veces al día. Los pollitos con problemas de salud se excluyeron del ensayo. Estaban disponibles pienso y agua a voluntad en todo momento.

1.3 Parámetros de rendimiento

Las aves se pesaron los días 0, 14, 21, 28 y 35. Por consiguiente, se midieron la ingesta de pienso por corral y la razón de conversión de pienso (FCR) durante los siguientes periodos:

- Días 0-14, periodo de dieta de inicio temprano
 - Días 14-21, periodo de dieta de crecimiento temprano
 - Días 21-28, periodo de dieta de crecimiento medio
 - Días 28-35, periodo de dieta de crecimiento tardío
- 5
- 10 Se pesaron las aves muertas y las aves sacrificadas por problemas de salud. Se registró la mortalidad diaria. Se calculó la FCR tanto corregida como no corregida para la mortalidad.
- 1.4 Análisis estadístico
- 15 Los datos de rendimiento se analizaron mediante la prueba de Dunnett (bilateral) usando el paquete de software estadístico SPSS (versión 22). El grupo de tratamiento 1 (dieta no modificada) se usó como control frente al que comparar los tratamientos de prueba. Los valores p obtuvimos menores de 0,1 se muestran como símbolos en los gráficos.
- 20 2. Resultados
- 2.1 Efecto de la malta de cebada sobre el peso corporal y el aumento de peso de pollos de engorde
- 25 No hubo diferencias estadísticamente significativas en el peso corporal o el aumento de peso entre los tratamientos en ningún periodo de crecimiento, aunque hubo efectos de la dosis de tipo tendencia similares con la cebada malteada, tal como se encontró en el ensayo previo.
- 2.2 Efecto de la malta sobre el consumo de pienso
- 30 Durante el periodo de dieta de inicio temprano de 0-14 días, la cebada malteada tendió a disminuir el consumo de pienso especialmente a la dosis más baja (50 kg/tn) (figura 22A).
- 35 La disminución del consumo de pienso fue más clara durante el periodo de dieta de crecimiento temprano de 14-21 días, cuando las diferencias fueron estadísticamente significativas con todas las dosis de cebada malteada en los piensos de crecimiento. Aun cuando se añadió malta solo en el pienso de inicio, la disminución de la ingesta de pienso continuó después de la retirada del producto a la dosis más baja y más alta de cebada malteada (figura 22B).
- 40 La malta a una dosis del 5 % y el 15 % disminuyó el consumo de pienso de manera estadísticamente significativa durante el periodo de ensayo completo de 0-35 días si se añadía tanto en la dieta de inicio como en la de crecimiento (figura 22C).
- 2.3 Efecto de la malta sobre eficiencia de conversión de pienso
- 45 Durante el periodo de dieta de inicio (0-14 días), no hubo diferencias estadísticamente significativas en la FCR entre los tratamientos. La mayoría de los efectos sobre la FCR se observaron en el periodo de dieta de crecimiento temprano (14-21 días). La inclusión de malta a todas las dosis mejoró la FCR de manera estadísticamente significativa y la mejora prácticamente no se vio afectada por la dosis. Cincuenta kilogramos de producto por tonelada mostraron una mejora igual a la dosis tres veces superior (figura 23A). Cuando se calculó
- 50 durante todo el periodo de crecimiento de 35 días, se midió una mejor FCR cuando estaba presente malta también en los piensos de crecimiento (figura 23B).
- 2.4 Efecto de la malta sobre la mortalidad
- 55 La malta a una dosis de 100 kg/tn (tratamiento 4) pareció aumentar la mortalidad de los pollos de engorde en el periodo de dieta de inicio. Sin embargo, esto es lo más probablemente un efecto aleatorio, ya que no se observó tal efecto en el tratamiento 7, que tenía una dieta idéntica durante el periodo de inicio (figura 24).
- 60 La mortalidad del periodo de inicio afectó también a las mortalidades calculadas para el periodo de ensayo completo de 35 días. Esta mortalidad medida significa en la práctica que, en promedio, de 0,7 a 1 ave murió por cada corral de 15 aves.
- 2.5 Efecto de la malta sobre la eficiencia de conversión de pienso corregida por mortalidad
- 65 No hubo diferencias estadísticamente significativas en la FCR corregida por mortalidad durante el periodo de

dieta de inicio (0-14 días). La malta mejoró de manera estadísticamente significativa la FCR corregida por mortalidad durante el periodo de pienso de crecimiento temprano con todas las dosis ($p < 0,001$). La mejora de la FCR no se vio afectada por la retirada del producto después del periodo de dieta de inicio en los tratamientos 6, 7 y 8 (figura 25A).

Durante todo el periodo de crecimiento de 35 días, la malta mejoró la FCR corregida por mortalidad con todas las dosis. Las mejoras más estadísticamente significativas fueron cuando estaba presente cebada malteada en el pienso durante el periodo de ensayo completo. Sin embargo, el efecto positivo parecía estar también cuando se dio de comer malta solo las primeras dos semanas (figura 25B).

IV. Efecto del grano malteado sobre el rendimiento de pollos de engorde en el modelo de exposición a enteritis necrótica

1. Materiales y métodos

1.1 Tratamientos dietéticos

La dieta fue pienso a base de trigo y soja para pollitos de engorde tal como se especifica en la tabla 9. La formulación de inicio se usó durante las primeras 3 semanas y la dieta de crecimiento durante las siguientes 2 semanas del ensayo. Las dietas de inicio se prepararon como gránulos de 2 mm y las dietas de crecimiento como gránulos de 4 mm. Los piensos se produjeron en el Nature Resources Institute Finland.

Tabla 9. Dieta de control básica.

	% de trigo y soja, dieta de inicio (d 0-21)	% de trigo y soja, dieta de crecimiento (d 21-35)
Trigo	58,16	66,22
Harina de soja 48	33,30	25,10
Aceite de girasol	4,20	4,70
Fosfato de monocalcio	1,46	1,22
Caliza	1,48	1,32
NaCl	0,45	0,48
Premezcla de minerales*	0,20	0,20
Premezcla de vitaminas**	0,20	0,20
DL-Metionina	0,27	0,27
L-Lisina HCl	0,19	0,24
Treonina	0,09	0,05
Total	100	100
DM	0,89	0,89
Lys	1,29	1,12
Met+Cys	0,95	0,88
Met	0,60	0,56
Thr	0,92	0,76
Ca	0,93	0,80
AvP	0,40	0,35
Na	0,18	0,19
MJ/kg	12,35	12,80
CP g/kg	229,20	199,69

*) Contenido de la premezcla de minerales: calcio 296,8 g/kg, hierro 12,5 g/kg, cobre 4 g/kg, manganeso 25 g/kg, zinc 32,5 g/kg, yodo 0,225 g/kg, selenio 0,1 g/kg.

**) Contenido de la premezcla de vitaminas: calcio 331,3 g/kg, vitamina A 6000000 UI, vitamina D3 2250000 UI, vitamina E 30000, tocoferol 27270 mg/kg, vitamina K3 1505 mg/kg, vitamina B1 1257,3 mg/kg, vitamina B2 3000 mg/kg, vitamina B6 2009,7 mg/kg, vitamina B12 12,5 mg/kg, biotina 75 mg/kg, ácido fólico 504 mg/kg, niacina 20072 mg/kg, ácido pantoténico 7506,8 mg/kg.

Hubo 5 tratamientos dietéticos con 12 corrales repetidos (tabla 10). Basándose en los análisis previos de cebada malteada, las dietas se equilibraron para la energía metabolizable (MJ/kg), la proteína en bruto, los principales aminoácidos limitantes, Ca y P disponible. La malta de cebada (poder diastásico > 700 WK, alfa-amilasa > 100 DU) reemplazó a una cantidad igual de trigo en las dietas. El coccidiostático usado como control positivo fue Monteban G100 ionofórico (Narasin al 10 %, un antimicrobiano activo).

Tabla 10. Tratamientos dietéticos

Tr. n.º	Tratamientos	Corrales	Aves repetidas/corral	Dosis de HDBM kg/tn (0-35 días)
1.	Control negativo	12	11	-

2.	Control	12	11	-
	positivo/coccidiostático			
3.	Malta de cebada, 5 %	12	11	50
4.	Malta de cebada, 10 %	12	11	100
5.	Malta de cebada, 15 %	12	11	150
		60		

1.2 Animales y alojamiento

El ensayo de 35 días se realizó en la granja de pollos de engorde de Alimetrics en el sur de Finlandia, en mayo-junio de 2016. La temperatura de la nave se elevó hasta 32 °C dos días antes de que llegaran los pollitos. La luminosidad se ajustó a 20 lux y la humedad del aire se fijó según fuera apropiado. Las lámparas de la incubadora se ajustaron para proporcionar calentamiento extra a los pollitos durante la primera semana. La temperatura disminuyó gradualmente hasta 22 °C a lo largo del periodo de crianza. La temperatura, ventilación y humedad se monitorizaron y registraron durante todo el experimento diariamente. Las horas de oscuridad se aumentaron gradualmente en el plazo de una semana, de modo que el ciclo de luz-oscuridad fue de 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad diariamente.

Se asignaron pollitos de engorde Ross 308 macho recién nacidos a 60 corrales de 1,125 m² con lecho de virutas de madera/paja troceada. Al comienzo del ensayo, había 11 aves en cada corral y el número total de aves era de 660. Los pollitos tenían libre acceso a pienso y agua potable durante todo el ensayo. Un veterinario comprobó la salud de los pollitos al comienzo del ensayo. Inicialmente, las aves se observaron dos veces al día y, después de la exposición a *C. perfringens*, cuando los síntomas fueron los más graves, las aves se observaron una vez cada cuatro horas. Los pollitos con problemas de salud se sacrificaron.

1.3 Inoculación con *Eimeria máxima* y *C. perfringens*

El día 13, se inocularon en los pollitos individualmente 5000 ooquistes de *E. máxima* (Biopharm, República Checa). Se eligió el tamaño del inóculo que proporciona un efecto claro pero subclínico sobre el rendimiento. Los ooquistes se suspendieron en agua corriente un día antes de la inoculación para mejorar la eficiencia de exquistación. Se pipeteó la cantidad definida de ooquistes en el pico de cada pollito en 300 µl de suspensión, que los pollitos podían tragar fácilmente.

El día 17, en cada pollo de engorde se inoculó por vía oral un cultivo reciente de *C. perfringens* (0,5 × 10⁹ células vivas). La cepa de *C. perfringens* se aisló originalmente del contenido del íleon de pollitos de engorde afectados por NE. Se ha encontrado repetidamente que la cepa provoca NE siempre que los pollos estén sensibilizados por la exposición a *E. maxima*. Las aves muertas y las aves sacrificadas por problemas de salud se registraron y se pesaron.

1.4 Parámetros de rendimiento

Se pesaron los pollitos los días 0, 13, 21 y 35. Por consiguiente, se midieron la ingesta de pienso por corral y la razón de conversión de pienso (FCR) durante los siguientes periodos:

- Días 0-13, periodo antes de las exposiciones,
- Días 13-21, periodo de las inoculaciones de *E. máxima* y *C. perfringens*,
- Días 21-35, periodo después de las inoculaciones.

1.5 Muestreo

El día 21, dos aves seleccionadas al azar de cada corral se pesaron individualmente, se sacrificaron, se abrió la cavidad abdominal y se extirpó el íleon para el análisis. Se abrió el yeyuno para puntuar las lesiones de NE usando una escala de 0 a 6 tal como se describe por Shojadoost *et al.* (Veterinary Research 2012, 43:74).

1.5 Análisis microbiano de muestras de digesto del íleon

Se llevó a cabo un panel de análisis de PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR) en muestras de íleon. A partir de los 3 grupos de tratamiento enumerados a continuación, se sometieron un total de 72 muestras de íleon al análisis descrito a continuación.

1 Dieta de control negativo,

2. Dieta de control positivo (coccidiostático ionofórico; Narasin como antimicrobiano activo),

3. Malta de cebada, 10 % (100 kg/tn).

Inicialmente, se lavaron las muestras para eliminar partículas sólidas y polisacáridos complejos, que alteran el proceso de purificación de ADN posterior y las aplicaciones de qPCR posteriores. La fase líquida se sometió a centrifugación diferencial para recoger las células bacterianas. Se rompieron las paredes celulares de las células bacterianas, y se purificó cuantitativamente el ADN cromosómico usando el protocolo interno de Alimetrics, que se optimizó y validó para la extracción de ADN bacteriano de muestras de íleon de pollo. En consecuencia, se sometieron un total de 72 muestras de ADN de íleon a análisis de qPCR tal como se especifica a continuación.

El sistema de qPCR se basa en la detección y cuantificación de un indicador fluorescente. Esta señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de PCR en la reacción. Al registrar la cantidad de emisión de fluorescencia (química de SYBR Green) en cada ciclo, es posible monitorizar la reacción PCR durante la fase exponencial donde el primer aumento significativo en la cantidad de producto de PCR se correlaciona con la cantidad inicial de molde diana.

En este estudio, todos los resultados se expresan como $\log_{10}$ de copias de gen diana por 1 gramo de digesto del íleon.

Se aplicaron los siguientes ensayos de qPCR a muestras de ADN de digesto (gen diana entre paréntesis):

- 1) Eubacterias totales (gen de ARNr 16S),
- 2) *Clostridium perfringens* (plc; gen que codifica la toxina alfa),
- 3) *Eimeria* spp. (gen de ARNr 5S).

1.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos de qPCR consistió en pruebas de la t de Student bilaterales para todos los parámetros medidos. Las pruebas se realizaron frente a la dieta de control negativo tal como se habría usado para la prueba a posteriori de Dunnett, pero se eligió la prueba de la t para permitir que los tratamientos individuales fueran independientes de los otros tratamientos sometidos a prueba simultáneamente.

Significación según la prueba de la t de Student:

valor $p < 0,1$ ~

valor $p < 0,05$ *

valor $p < 0,01$ **

valor $p < 0,001$ ***

2. Resultados

2.1 Peso corporal medio

- El día 13, antes de las exposiciones, la malta de cebada aumentó el peso medio de las aves de manera estadísticamente significativa a todas las dosis. La mejora fue de 30 g en comparación con el grupo de control negativo (figura 26A). Con el coccidiostático, la mejora en el peso medio fue incluso más grande, mayor de 60 g. El hecho de que el coccidiostático tuviera este efecto significativo antes de las exposiciones sugiere que hay una exposición microbiana natural en la instalación del ensayo.

- Después de las inoculaciones de *Eimeria* y *C. perfringens* y el día de los síntomas más graves el día 21, todas las dosis de malta de cebada proporcionaron efectos positivos sobre el peso medio. La mejora fue más significativa con una dosis del 10 % (64 g) (figura 26B).

- Después de la recuperación de las aves de las exposiciones al final del ensayo de 35 días, la dosis de malta de cebada al 5 % y al 10 % mejoró el peso corporal medio de manera estadísticamente significativa (~150 g). Con el coccidiostático, la mejora fue de más de 300 gramos en comparación con el control negativo (figura 26C).

2.2 Aumento de peso corporal medio

- Durante los días 0-13, el periodo antes de las exposiciones microbianas, todas las dosis de malta de

cebada reforzaron el aumento de peso significativamente (figura 27A).

- Después de las inoculaciones de *Eimeria* y *C. perfringens* y durante la fase de los síntomas más graves de NE (días 13-21), ninguna de las dosis de malta de cebada mejoró el aumento de peso de las aves de manera estadísticamente significativa. Se observó mejora numérica, especialmente con la dosis del 10 % (figura 27B). Con Narasin, la mejora fue estadísticamente significativa, como era de esperar.
- Durante la fase de recuperación del ensayo (días 21-35), el aumento de peso promedio tendió a mejorar a dosis de malta de cebada del 5 y el 10 % (figura 27C). Numéricamente, la mejora fue similar al control positivo.
- Durante el periodo de crecimiento de 35 días completo, el coccidiostático y la dosis de malta de cebada al 5 % y al 10 % mejoró el aumento de peso promedio de manera estadísticamente significativa (figura 27D). La magnitud de la mejora con malta de cebada fue de -150 gramos.

2.3 Consumo de pienso

- Durante el periodo de antes de la exposición de 0-13 días, el coccidiostático y la malta de cebada al 15 % aumentaron el consumo de pienso de manera estadísticamente significativa. El consumo de pienso medio parecía correlacionarse positivamente con la dosis de malta de cebada a pesar de hecho de que los valores de nutrientes y energía en el pienso estaban equilibrados (figura 28A).
- Solo en el grupo de coccidiostático el consumo de pienso aumentó de manera estadísticamente significativa durante los días después de la inoculación de *Eimeria* y *C. perfringens*, 13-21 días (figura 28B).
- Durante la fase de recuperación del ensayo (días 21-35), ni el coccidiostático ni la malta de cebada afectaron al consumo de pienso significativamente, aunque hubo un aumento numérico con el coccidiostático (figura 28C).
- Durante el periodo de crecimiento de 35 días completo, solo la dieta de coccidiostático aumentó el consumo de pienso de manera estadísticamente significativa (figura 28D).

2.4 Razón de conversión de pienso

- La dosis de malta de cebada al 5 y al 10 % mejoró la FCR de manera estadísticamente significativa durante el periodo antes de las inoculaciones, días 0-13. La mejora fue de ~6 puntos (figura 29A).
- Durante el periodo de los síntomas más graves de NE (días 13-21), la razón de conversión de pienso mejoró de manera estadísticamente significativa solo con la modificación de coccidiostático (figura 29B).
- Durante la fase de recuperación (días 21-35), la dosis de malta de cebada al 10 % mejoró la FCR numéricamente pero sin significación estadística (figura 29C).
- Durante el periodo de ensayo de 35 días completo, la dosis de malta de cebada al 10 % mejoró la FCR de manera estadísticamente significativa, siendo la mejora de gran significación práctica, 0,11 kg de pienso/kg de peso corporal (también denominado 11 puntos). El efecto de la cebada malteada excedió también el efecto positivo del coccidiostático (figura 29D).

2.5 Mortalidad

- No hubo diferencias en la mortalidad entre los tratamientos durante ningún periodo de crecimiento del ensayo (figura 30).

2.6 Razón de conversión de pienso corregida por mortalidad

- Durante el primer periodo de crecimiento del ensayo, 0-13 días, la dosis de malta de cebada al 5 % mejoró la razón de conversión de pienso corregida por mortalidad de manera estadísticamente significativa con 6 puntos. Además, el coccidiostático y la dosis de malta de cebada al 10 % tuvieron un efecto positivo sobre la FCR corregida por mortalidad (figura 31A).
- Después de las inoculaciones de *Eimeria* y *C. perfringens* y durante la fase grave de los síntomas de NE (días 13-21), el coccidiostático mejoró la FCR corregida por mortalidad significativamente, así como las dosis de malta de cebada al 10 y al 15 %. La magnitud numérica de los efectos positivos por la inclusión del 10 % de malta fue significativa, ~11 puntos (figura 31B).
- El efecto sobre la FCR corregida por mortalidad de la dosis del 10 % de malta de cebada se mantuvo

significativa durante el resto del ensayo (21-35 días) (figura 31C).

- Durante el ensayo de exposición a NE de 35 días completo, la razón de conversión de pienso con corrección de la mortalidad mejoró de manera estadísticamente significativa con malta de cebada a todas las dosis. La magnitud del efecto fue igual a la obtenida con el coccidiostático (figura 31D). A la dosis del 10 % de malta de cebada, la mejora fue de 11 puntos.

2.7 Lesiones de NE del yeyuno el día 21

- No hubo efectos de la dieta estadísticamente significativos sobre la enteritis necrótica provocados por lesiones del yeyuno el día 21 (figura 32).

2.8 Evaluación de las bacterias totales y los grupos microbianos individuales en el íleon

En general, se acepta que las bacterias compiten directamente con el huésped por nutrientes específicos en el intestino delgado del pollo. Por tanto, el crecimiento excesivo de poblaciones bacterianas puede reducir la captura de nutrientes por el huésped, alterando por tanto el aumento de peso corporal y la razón de conversión de pienso. Por otro lado, altos niveles bacterianos en el intestino delgado pueden aumentar el efecto de barrera frente a bacterias patógenas. Además, el lactato secretado por bacterias del ácido láctico tiende a disminuir el pH del tracto intestinal, lo que altera el crecimiento de patógenos sensibles a ácido tales como *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*.

Eubacterias totales - Día 21

Tal como se ilustra en la figura 33, los números de bacterias totales en muestras de digesto del íleon fueron significativamente menores con la dieta de control positivo, que mostró cantidades microbianas absolutas casi un 80 % menores en comparación con la dieta de control negativo el día 21. Este resultado sugiere fuertemente que el coccidiostático aplicado actuó como inhibidor general de la microbiota del íleon en el ensayo.

Los resultados también mostraron que la malta de cebada al 10 % no tuvo ningún efecto sobre las cantidades absolutas de los números de bacterias en el punto de muestreo del día 21. Esto era de esperar ya que la malta contiene compuestos nutritivos en vez de inhibidores.

Eimeria spp. y *Clostridium perfringens* - Día 21

La coccidiosis de los pollos es una enfermedad intestinal provocada por protozoos parásitos del género *Eimeria*. La transmisión se produce por medio de la ingestión de ooquistes infecciosos que han esporulado a lo largo de varios días tras su excreción en las heces. El daño epitelial por *Eimeria* induce la fuga de proteínas plasmáticas; además, la infección por coccidios potencia la producción de moco. Ambos efectos proporcionan un aumento de la disponibilidad de nutrientes para el crecimiento de *C. perfringens* patógeno, conduciendo a enteritis necrótica.

Tal como se ilustra en la figura 34, se detectaron genomas de *Eimeria* en el punto de muestreo de 21 días con los tres grupos de tratamiento analizados. Tal como se esperaba, el control positivo inhibió significativamente el crecimiento de *Eimeria*, mientras que la malta de cebada al 10 % no difirió significativamente del control negativo. En una magnitud, la supresión de *Eimeria* con el control positivo estaba por encima del 95 % del control negativo.

La figura 35 muestra que ambos tratamientos con control positivo y malta de cebada al 10 % inhibieron el crecimiento de *C. perfringens* con una significación estadística. En una magnitud, la tasa de inhibición con el control positivo y malta de cebada al 10 % estuvo por encima del 99 % y el 92 % del control negativo, respectivamente.

El efecto inhibidor del control positivo era de esperar, ya que se mostró que suprimía generalmente la microbiota del íleon (véase la figura 33). Por otro lado, el modo de acción inhibitorio de la malta de cebada al 10 % sigue siendo desconocido. Es posible que la inclusión de malta de cebada en la dieta reduce el daño epitelial intestinal durante la coccidiosis, lo que en consecuencia disminuiría la disponibilidad de sustrato a base de proteína animal para la proliferación *C. perfringens*.

Globalmente, la supresión del crecimiento de *C. perfringens* con malta de cebada es según la mejora observada de la razón de conversión de pienso (FCR) durante el ensayo de 35 días. Por tanto, los resultados de este estudio sugieren fuertemente que la inclusión de malta de cebada en la dieta es muy prometedora como inhibidor eficaz de la infección por *C. perfringens* durante la fase grave de la enteritis necrótica.

V. "Grano malteado" como producto de pienso saludable para caballos – digestibilidad y respuesta de glucosa de los caballos a la cebada malteada (no según la invención)

1. Material y métodos

1.1 Caballos y dietas

Para el ensayo, se seleccionaron seis yeguas Finnhorse sedentarias (tipo mesomórfico), de 6 a 14 años de edad, con un peso de $617 \pm 41,9$ kg. Los caballos se alojaron individualmente en un establo con camas de turba y comederos diseñados para una alimentación precisa. Los caballos se pesaron al comienzo de la prueba y los jueves durante la semana de recogida. Durante el ensayo, se permitió que los caballos se ejercitaran en un potrero, 2 horas diarias.

El pienso experimental fue cebada malteada cuya palatabilidad, digestibilidad y efectos metabólicos se compararon con la cebada arrollada normal y el grano más común usado para los caballos, la avena. Además, se dio de comer heno seco a todos los caballos. La asignación de pienso se calculó individualmente para cada caballo según el contenido de materia seca de los piensos y el peso vivo del caballo. Las dietas se diseñaron para cumplir con un aporte diario de 70 g de DM/kg, de los cuales el 35 % consistía en grano y el 65 % en heno seco. Se usaron las recomendaciones de alimentación finlandesas para caballos sedentarios como guía para el cálculo (Tablas de alimentación y recomendaciones de alimentación, MTT 2014). Se dio de comer a los caballos tres veces al día y se registró el consumo de pienso pesando el pienso ofrecido y rechazado durante todo el experimento. Se dio de comer una mezcla de minerales comercial (Ca:P=2:1) a una tasa de 130 a 150 g/día durante los días 1-13 de cada período. Estaban disponibles agua y bloques de sal (NaCl) libremente. Las raciones diarias de grano y heno se pesaron y se empaquetaron en recipientes o baldes de plástico y se dejaron esperando para la alimentación. Se tomaron muestras representativas del pienso para los análisis durante el período de recogida y se almacenaron a temperatura ambiente.

1.2 Procedimiento experimental

1.2.1 Digestibilidad

El ensayo de 9 semanas tuvo tres períodos y la duración de cada período fue de 21 días. Los periodos consistieron en 4,5 días para el cambio de dieta, 12 días de aclimatación y 4 días de toma de muestras. El último día (0,5 días) de cada período se realizó una prueba de respuesta de glucosa.

La digestibilidad aparente *in vivo* de las dietas se midió con los caballos mediante un método de marcadores de digestibilidad. Se usó ceniza insoluble en ácido (AIA), que es un ingrediente natural del pienso, como marcador de digestibilidad. La cantidad de un marcador no digerible evacuado en las heces, cuando se da de comer de manera continua a lo largo del tiempo, es constante. La concentración del marcador en las heces se relaciona directamente con la producción de heces (ecuación 1). La digestibilidad de la dieta y los nutrientes específicos pueden calcularse entonces cuando se conocen el consumo de pienso y la producción de heces (ecuación 2).

La producción de DM fecal (kg/d) basada en el método de marcador se calculó tal como sigue:

$$\frac{\text{Concentración de AIA del pienso (mg/Kg de DM)}}{\text{Concentración de AIA fecal (mg/Kg de DM)}} \times \text{Ingesta de DM (kg/d)} \quad (1)$$

Los coeficientes de digestibilidad *in vivo* aparentes del tracto total se calcularon tal como sigue:

$$\frac{\text{Componente consumido en el pienso (g/d)} - \text{Componente excretado en las heces (g/d)}}{\text{Componente consumido en el pienso (g/d)}} \quad (2)$$

Las muestras de heces se tomaron varias (3-4) veces al día durante las horas de trabajo. Las muestras se tomaron de montones recientes de heces evitando cuidadosamente su contaminación con el material de cama o pienso. Además, se evitaron las heces que se habían contaminado con orina. Las muestras de heces se almacenaron en un recipiente de plástico sellado durante el período de recogida y se enviaron al laboratorio para su análisis después del período. El pienso ofrecido y rechazado se registró diariamente, y los rechazos de pienso se muestrearon y analizaron para determinar la materia seca.

1.2.2 Prueba de respuesta de glucosa intravenosa (IVGRT)

La prueba de respuesta de glucosa intravenosa se realizó el último día (viernes) de cada período. El jueves por la tarde, el día previo a la IVGRT, los caballos se inmovilizaron en cepos y se sedaron para la inserción del catéter en la vena yugular. Se insertó un catéter (Milacath 14G x 13 cm, Mila International, Kentucky, EE.UU.) en la vena yugular usando un bloqueo con anestésico local (lidocaína al 2%, lidocaína 20 mg/ml, Orion Pharma, Turku, Finlandia). Finalmente, los catéteres con válvulas de 3 vías se heparinizaron y se suturaron a la piel.

A la mañana siguiente, tras 10 h de ayuno, se comprobó el funcionamiento de las sondas y se extrajo la primera muestra (basal) antes de la alimentación. La alimentación comenzó a las 6:30 para los dos primeros caballos y luego después de cinco minutos el segundo par y nuevamente después de cinco minutos los dos últimos. Solo se dio una porción de grano (1,7 kg), sin heno. Se extrajeron ocho muestras de sangre cada 15 minutos (+15, +30, +45, +60, +75, +90, +105, +120) desde el inicio de la alimentación y después de eso otras seis muestras cada 30 minutos (+150, +180, +210, +240, +270, +300). Con este procedimiento, la última muestra se tomó cinco horas después de iniciada la alimentación con granos y el número total de muestras fue de 15. Los catéteres se retiraron después de la última muestra.

Se recogieron muestras de sangre en tubos (Vacuette®; Greiner Bio-One International GmbH, Austria) que contenían oxalato de potasio y fluoruro de sodio para el análisis de glucosa y lactato en plasma, y en tubos sin aditivos para el análisis de insulina sérica. Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante una hora antes de centrifugar a $3000 \times g$ durante 10 minutos. El suero y el plasma se almacenaron en tubos de plástico a -70°C hasta el análisis de las concentraciones de glucosa, insulina y lactato en Movet Laboratory Ltd, Kuopio, Finlandia.

El análisis de glucosa se realizó con un método espectrofotométrico basado en glucosa hexocinasa según la norma de IFCC. Se determinó el lactato plasmático con el método enzimático-fotométrico. Se determinó la insulina sérica por duplicado mediante el uso de radioinmunoensayo (RIA) comercialmente disponible.

1.2.3 Modelo experimental y análisis estadísticos

Los seis caballos se asignaron aleatoriamente en tratamientos en un diseño de repetido de cuadrados latinos de 3×3 (tabla 11). Este modelo experimental produce seis observaciones para cada tratamiento, pero en este caso tuvo que excluirse un caballo del último período debido a una enfermedad y, por tanto, falta un valor para la dieta 2 (cebada). Los tratamientos fueron: A) avena, 35% + heno seco, 65%, B) cebada, 35% + heno seco, 65% y C) cebada malteada, 35% + heno seco, 65%.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el procedimiento MIXED del sistema SAS (SAS 9.3, 2008). Los conjuntos de datos para ambas especies animales se analizaron en primer lugar por separado. La variable respuesta (Y) se analizó según el siguiente modelo estadístico: $Y_{ijkl} = \mu + \text{Caballo}_i + \text{Periodo}_j + \text{Cuadrado}_k + \text{Dietal} + \varepsilon_{ijkl}$. El efecto del cuadrado no fue estadísticamente significativo y finalmente quedó fuera del modelo.

Tabla 11. Tratamientos de seis caballos.

Periodo	Cuadrado I			Cuadrado II		
	Caballo 1	Caballo 2	Caballo 3	Caballo 4	Caballo 5	Caballo 6
I	A	B	C	C	A	B
II	B	C	A	B	C	A
III	C	A	B	A	B	C

1.2.4 Análisis químicos

El contenido de DM de las muestras de grano, heno y heces se determinó secando a 105°C durante 20 h. Para los análisis químicos, las muestras se secaron a 60°C hasta que se secaron y se molieron a través de un tamiz de 1 mm. La muestra se calcinó a 600°C durante 2 h (AOAC, 1990; método 942.05) y la concentración de materia orgánica (MO) se calculó como DM - ceniza.

Las muestras de pienso se analizaron para determinar el nitrógeno mediante el método de Dumas usando un analizador de nitrógeno Leco FP 428 (Leco Corp., St Joseph, EE.UU.) (AOAC, 1990; método 968.06) y las muestras fecales con métodos internos acreditados 1120, 1122 y 1125 Kjeldahl; método oficial AOAC-984.13 (AOAC, 1990) usando Cu como catalizador de digestión y usando una unidad analizadora Foss Kjeltac 2400 (Foss Tecator AB, Höganäs, Suecia). La proteína en bruto (CP) se calculó multiplicando N por 6,25. La fibra en bruto (CF) se determinó con un sistema Fibertech 2023 FiberCap (Foss Tecator Ltd, Höganäs, Suecia) (EEC 92/89, ASN 3802). La figura detergente neutra (NDF) se analizó según Van Soest *et al.* (1991), mientras que para la fibra detergente ácida (ADF) se aplicó el método de Robertson y Van Soest (1981). Todas las muestras se analizaron para determinar la ceniza insoluble en ácido (AIA) mediante el método descrito en la Directiva de la Comisión de la UE 71/250/EEC (Comisión Europea, 1971). La medición del pH de las muestras fecales se realizó con un medidor de pH Mettler Toledo 345 (Mettler-Toledo AG, Schwerzenbach, Suiza).

2 Resultados

2.1 Composición química

La composición química de los piensos experimentales se presenta en la tabla 12. El heno seco que se usó para

la alimentación basal representó valores nutricionales típicos para el heno Timoteo de corte temprano. El contenido de proteína en bruto (CP) fue bajo (7,8 %), pero puede considerarse normal para henos producidos para fines de alimentación de caballos. El heno tenía alto contenido de materia orgánica (OM), bajo contenido de ceniza y fibra y buena calidad higiénica. La palatabilidad del heno era buena.

5

La composición química de los granos fue bastante similar entre la fibra en bruto en las dos cebadas, pero la cebada malteada contenía ligeramente menos fibra detergente neutral (NDF) y más CP. La avena y la cebada tenían un contenido de CP similar, pero la avena contenía mucha más fibra (CF, NDF, ADF) y ceniza.

10 Tabla 12. Composición química de los piensos

Pienso	DM	OM	Ceniza	CP	CF	NDF	ADF
	%	g/kg de DM	g/kg de DM	g/kg de DM	g/kg de DM	g/kg de DM	g/kg de DM
Heno seco	85,6	949,7	50,3	77,6	318,8	599,4	315,5
Avena	86,2	967,0	33,0	104,3	103,2	280,0	119,1
Cebada	87,3	974,1	25,9	109,0	44,7	180,3	40,8
Cebada malteada	91,5	976,2	23,8	123,8	48,1	152,2	47,6

2,2 Digestibilidad

15 Los valores más altos de digestibilidad total de nutrientes en el tracto se lograron con dietas que contenían cebada malteada. Los valores de digestibilidad de materia seca, materia orgánica y proteína en bruto se presentan en la figura 36. El reemplazo de avena o cebada por cebada malteada potenció la digestibilidad de la materia seca en de 3 a 5 unidades porcentuales, la materia orgánica en de 3 a 5 unidades y la proteína en bruto en de 4 a 8 unidades.

20

Además del menor contenido de fibra de la cebada malteada en comparación con los otros granos examinados, la fracción de fibra también se digirió mejor en las dietas que contenían cebada malteada (figura 37). Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Cuando la avena se reemplazó por cebada y luego por cebada malteada, se logró una mejora lineal de la digestibilidad de NDF de la dieta. La digestibilidad de la fibra en bruto también mejoró notablemente al reemplazarla por cebada malteada. La digestibilidad de ADF también se potenció con respecto a la de la cebada normal, pero no en comparación con la avena.

25

Las estimaciones basadas en el modelo de los coeficientes de digestibilidad con significación estadística se presentan en la tabla 13. Faltaba un valor para la dieta 2 en el último período, porque uno de los caballos tuvo que retirarse del experimento. Esto afectó al análisis estadístico y dificultó el logro de la significación estadística debido al pequeño conjunto de datos. Aunque la digestibilidad de todos los nutrientes mejoró numéricamente con las dietas de cebada malteada, las únicas mejoras de digestibilidad estadísticamente significativas fueron las de la materia seca, materia orgánica y proteína en bruto ($P < 0,05$). Además, la gran variación dentro de los valores de digestibilidad de la fibra de la dieta debilitó el poder del análisis estadístico y no pudo detectarse significación. Sin embargo, la correlación entre la digestión de materia orgánica y la digestión de fibra fue altamente significativa en el conjunto de datos.

35

Tabla 13. Coeficientes de digestibilidad estimados de diferentes dietas y pH para heces excretadas con las dietas.

40

	Avena	Cebada	Cebada malteada	S.E.	Avena frente a cebada	Avena frente a cebada malteada
Materia seca, g/kg	572,1	606,0	625,3	1,19/1,28*	ns	**
Materia orgánica, g/kg de DM	587,6	620,2	640,5	1,21/1,30*	ns	**
Proteína en bruto, g/kg de DM	695,0	655,1	739,7	2,09/2,22*	ns	**
Fibra en bruto, g/kg de DM	332,5	325,3	354,0	2,16/2,36*	ns	ns
NDF, g/kg de DM	372,5	392,7	396,5	2,21/2,37*	ns	ns
ADF, g/kg de DM	329,1	320,1	333,2	2,78/2,98*	ns	ns
Ceniza, g/kg de DM	270,7	314,0	305,9	1,66/1,84*	ns	ns
pH	6,73	6,30	6,50	0,177/0,18 9*	ns	ns
*Error estándar para las dietas 1 y 3/dieta 2. Diferencia en los valores debido a una observación que falta para la dieta 2.						

La digestión mejorada de la dieta con cebada malteada se debió al mayor contenido de proteína y menor contenido de fibra de la cebada malteada y a la mejor digestibilidad de estas fracciones en el grano de cebada

malteada. Esto significa que la energía necesaria y la concentración de nutrientes de la dieta se logran con una porción de grano más pequeña. La dieta de cebada malteada dio como resultado un pH más alto en las heces en comparación con la dieta de cebada, pero no alcanzó los valores más altos obtenidos con la dieta de avena. Las diferencias en el pH no fueron estadísticamente significativas. La palatabilidad de la cebada malteada fue buena.

5 Todos los caballos individuales en el ensayo consumieron cebada malteada sin dudarlo.

2.3 Efecto de la dieta sobre los metabolitos sanguíneos

10 La cebada malteada fue responsable de una elevación más rápida (90 min frente a 120 min) en el nivel de glucosa en sangre después de dar de comer la porción de grano de la dieta (figura 38). El valor pico (7,16 mmol/l) también fue mayor en comparación con las otras dietas (cebada 6,92 y avena 6,49 mmol/l). La cebada malteada mantuvo el nivel de glucosa más alto (>6 mmol) por más tiempo en comparación con las otras dietas. En promedio, la duración del nivel más alto de azúcar en la sangre fue de 120 min para la cebada malteada, 45 min para la cebada y 30 min para la avena.

15 La concentración de insulina en sangre es básicamente un reflejo de la glucosa, ya que la insulina es un importante regulador de la glucosa en sangre. Cuando la concentración de glucosa en sangre aumenta, comienza la secreción de insulina y les indica a las células del cuerpo (músculo, tejido adiposo) que tomen glucosa para obtener energía. La insulina también tiene varios efectos en el hígado que estimulan la síntesis de glucógeno a partir de glucosa. La concentración de insulina para la cebada malteada fue mayor durante los primeros 210 minutos de la prueba (figura 39). Cuando el nivel de glucosa cayó en la última parte de la prueba, también sucedió con la concentración de insulina. Se observó el mismo desarrollo con la cebada, solo que la concentración permaneció en un nivel más bajo. La concentración de insulina con avena continuó elevándose durante toda la prueba. Esto fue sorprendente. Basándose en los valores muy altos de insulina en algunos de los caballos, estos individuos padecían resistencia a la insulina (IR), que es un trastorno metabólico parecido a la diabetes forma II en seres humanos.

30 Los niveles de lactato en sangre fueron muy bajos durante toda la prueba (figura 40). Los niveles de lactato en sangre comenzaron a aumentar lentamente después de 15 minutos tras la alimentación y, para la cebada y la cebada malteada, la concentración se estabilizó después de 75 minutos. Para la avena, el valor basal fue menor, pero la elevación fue más rápida y los valores de cebada y cebada malteada se alcanzaron a los 105 minutos. El lactato en sangre en caballos en reposo se origina principalmente a partir de metabolitos bacterianos en el intestino grueso. Por tanto, la parte final de la curva es la más interesante y refleja la porción de grano que ingresa al intestino grueso. Después de 150 minutos, puede observarse una caída en la curva de lactato de la dieta de cebada malteada. Al mismo tiempo, la concentración de lactato para la cebada y la avena siguió aumentando. Esto puede explicarse como el efecto de una digestión potenciada del almidón de la cebada malteada en el intestino delgado.

40 La producción de ácido láctico en el intestino grueso resultante de la sobrecarga de granos es uno de los problemas ampliamente reconocidos de la alimentación con granos. Dado que la digestibilidad del almidón de la cebada y la avena fue inferior en comparación con la cebada malteada (véase la figura 38), entra más almidón en el intestino grueso, dando como resultado una fermentación que produce ácido láctico. Las condiciones ácidas en el ciego y el colon son factores de predisposición a la laminitis y otros problemas originados en el tracto digestivo (Rowe *et al.* 1994).

4 Conclusiones

50 La palatabilidad de la cebada malteada fue buena para todos los caballos del experimento. Habitualmente, se notifica que la cebada es menos apetecible que la avena, pero ese efecto no se observó en este experimento.

55 La digestibilidad de la materia seca, la materia orgánica y la proteína en bruto fue mejor en la dieta de cebada malteada en comparación con el grano más común usado para los caballos, la avena. Hubo una fuerte correlación entre la materia orgánica y la digestibilidad de la fibra y la digestión de la fibra también mejoró en las dietas de cebada malteada. Se considera que el contenido de fibra del pienso tiene el mayor efecto sobre la digestibilidad de un pienso. La fibra vegetal, en su mayoría material de pared celular, no se digiere por las enzimas digestivas del caballo, pero puede digerirse en cierta medida por los microorganismos del intestino grueso. La porción de pared celular (FDN) del pienso contiene celulosa, hemicelulosa y lignina. La fibra detergente ácida contiene celulosa y lignina. Estos hidratos de carbono complejos son los más difíciles de digerir, la lignina se considera indigerible y la celulosa solo se digiere parcialmente. En la cebada malteada, la proporción de solubles celulares de fácil digestión es mayor en comparación con otros granos, lo que tiene un efecto positivo sobre la digestibilidad. La digestión de las fracciones de fibra, especialmente la ADF resistente a la digestión, mejoró en la cebada malteada y mejoró la digestibilidad global de la dieta.

65 Basándose en el efecto de la harina de cereales sobre los metabolitos sanguíneos, la capacidad y disponibilidad digestiva en el intestino delgado del almidón de cebada malteada mejoraron en comparación con otros granos. Por tanto, el malteado se considera un método eficaz para aumentar la digestibilidad prececal de la cebada. Se

ha sugerido que el límite superior para la digestión prececal del almidón es de 3,5 a 4,0 g de almidón/kg de peso corporal/comida, pero actualmente se recomiendan ingestas más bajas (>2 g) para evitar efectos perjudiciales en el tracto digestivo. Al mejorar la digestibilidad del almidón, pueden darse de comer con seguridad porciones más grandes de almidón.

5

En este estudio, la digestibilidad global de la dieta de cebada malteada fue mejor en comparación con la dieta de cebada regular o avena. Basándose en los hallazgos en la respuesta metabólica de estas dietas, también se argumentó que la digestibilidad del almidón en el intestino delgado mejora en la cebada malteada. Esto significa que la cebada malteada tiene un mejor valor nutritivo y sus nutrientes se utilizan mucho más fáciles y eficientemente en comparación con la avena y la cebada. El nivel de glucosa en sangre estacionario durante mucho tiempo después de la ingestión de harina de cebada malteada proporciona energía fácilmente disponible para el caballo. La digestión eficaz del almidón de cebada malteada en el intestino delgado reduce los riesgos de dar de comer granos a un caballo, por ejemplo, acidosis intestinal o laminitis. Un estado metabólico estacionario significa un mejor bienestar para el caballo.

10

15

La cebada malteada puede usarse como grano de cereal principal en la alimentación de caballos o como componente principal en piensos compuestos comerciales, basándose en las ventajas observadas en este estudio. Por tanto, es recomendable la formulación de piensos (compuestos granulados) con cebada malteada.

20

Resultará obvio para un experto en la técnica que, a medida que avanza la tecnología, el concepto inventivo puede implementarse de varios modos. La invención y sus realizaciones no se limitan a los ejemplos descritos anteriormente, sino que pueden variar dentro del alcance de las reivindicaciones.

Bibliografía:

25

McCleary, B.V. & McGeough, P. 2015. A comparison of polysaccharide substrates and reducing sugar methods for the measurement of endo-1,4- β -Xylanase. Appl. Biochem. Biotechnol. 177, 1152-1163.

30

Somogyi, M. (1952). Note on sugar determination. J. Biol. Chem. 195, 19-23. McCleary, B.V. 1991. Measurement of polysaccharide degrading enzymes using chromogenic and colorimetric substrates. Chemistry in Australia, septiembre, 398-401.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Pienso para animales que comprende granos germinados y secos que tienen actividad alfa-amilasa de al menos 60 DU/g de p.s., específicamente de 70 a 200 DU/g de p.s., más específicamente de 80 a 150 DU/g de p.s. para su uso en la mejora de la salud intestinal de aves de corral durante y/o después de la infección por *Eimeria*.
- 10 2. Pienso para animales que comprende granos germinados y secos que tienen una actividad alfa-amilasa de al menos 60 DU/g de p.s., específicamente de 70 a 200 DU/g de p.s., más específicamente de 80 a 150 DU/g de p.s. para su uso en la reducción de la gravedad de la infección por *Clostridium perfringens* en aves de corral.
- 15 3. Pienso para animales que comprende granos germinados y secos que tienen una actividad alfa-amilasa de al menos 60 DU/g de p.s., específicamente de 70 a 200 DU/g de p.s., más específicamente de 80 a 150 DU/g de p.s. para su uso en la mejora del rendimiento de aves de corral en condiciones de exposición a enteritis necrótica.
- 20 4. Pienso para animales para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el pienso comprende el 0,5 - 100 % (p/p), el 0,1 - 50 % (p/p), el 0,5 - 50 % (p/p), el 1 - 40 % (p/p), el 1 - 35 % (p/p), el 1 - 20 % (p/p), el 1 - 15 % (p/p), el 1 - 10 % (p/p) o el 1 - 5 % (p/p) de granos germinados y secos.
5. Pienso para animales para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el pienso comprende
- | | | |
|----|--|------------------|
| a) | granos germinados y secos | 0,5-30 % (p/p), |
| b) | dieta de inicio o dieta de crecimiento | 70-99,5 % (p/p). |
- 25 6. Pienso para animales para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el pienso comprende minerales, vitaminas y/o enzimas.
- 30 7. Pienso para animales para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los animales se seleccionan de aves de corral tales como pollos de engorde, pollos, pavos y aves de caza.
8. Pienso para animales para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los granos germinados y secos tienen un poder diastásico de 500 a 1400 WK/100 g de p.s., más específicamente de 650 a 1300 WK/100 g de p.s., lo más específicamente de 800 a 1200 WK/100 g de p.s.
- 35 9. Pienso para animales para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los granos tienen la siguiente calidad de grano:
- | | |
|--|-------|
| % de contenido de proteína (% de masa/masa en base seca) | 9-16. |
|--|-------|
- 40 10. Pienso para animales para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los granos incluyen granos de cereal de uno o más cereales seleccionados del grupo que consiste en cebada, trigo, centeno, avena.
- 45 11. Pienso para animales para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los granos están en forma de granos, producto triturado, harina, gránulos, cápsulas, migas, puré, producto machacado, líquido, extracto o cualquier combinación de los mismos.
12. Pienso para animales para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los granos se han secado con aire caliente que comprende secado en la temperatura de aproximadamente 40-70 °C.
- 50

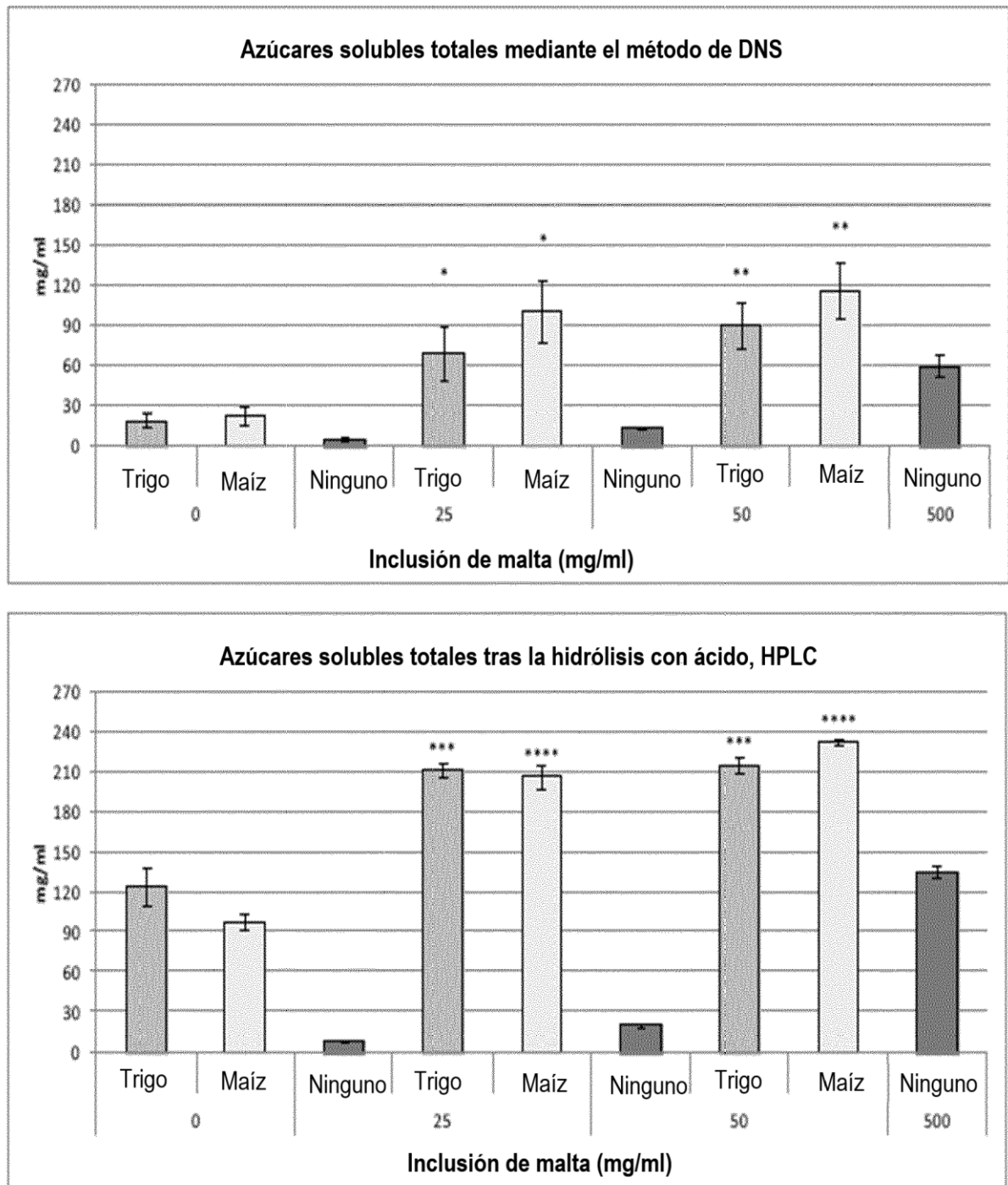


Figura 1

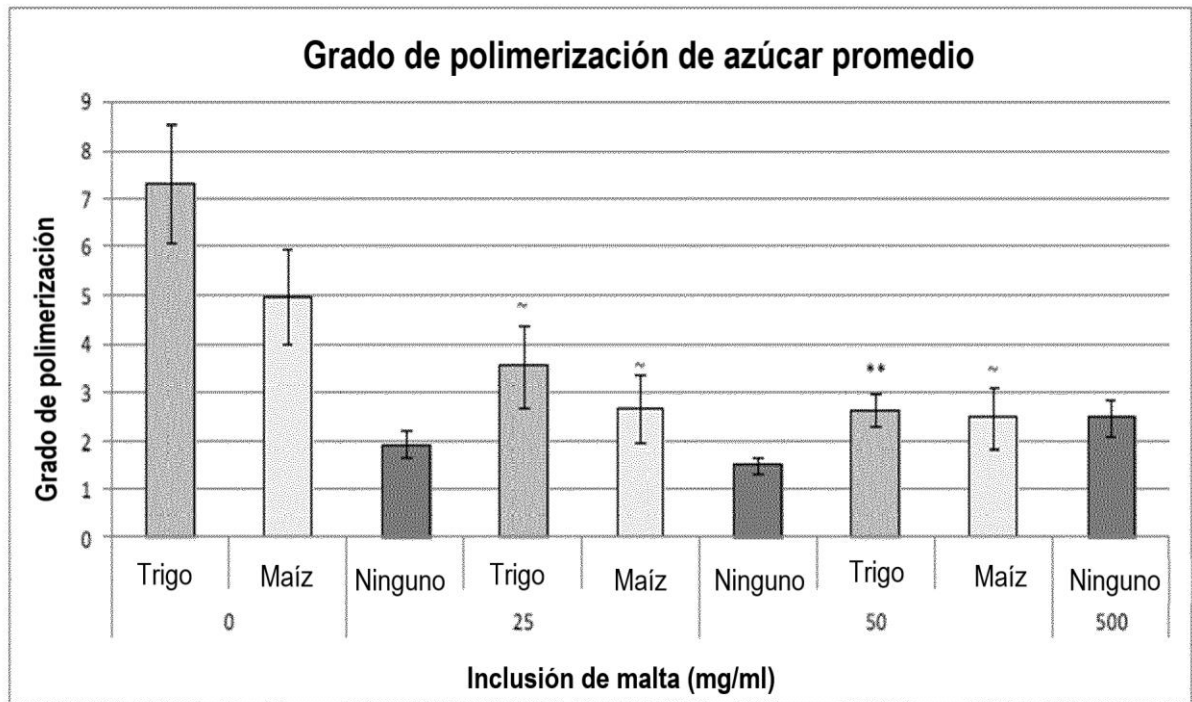


Figura 2

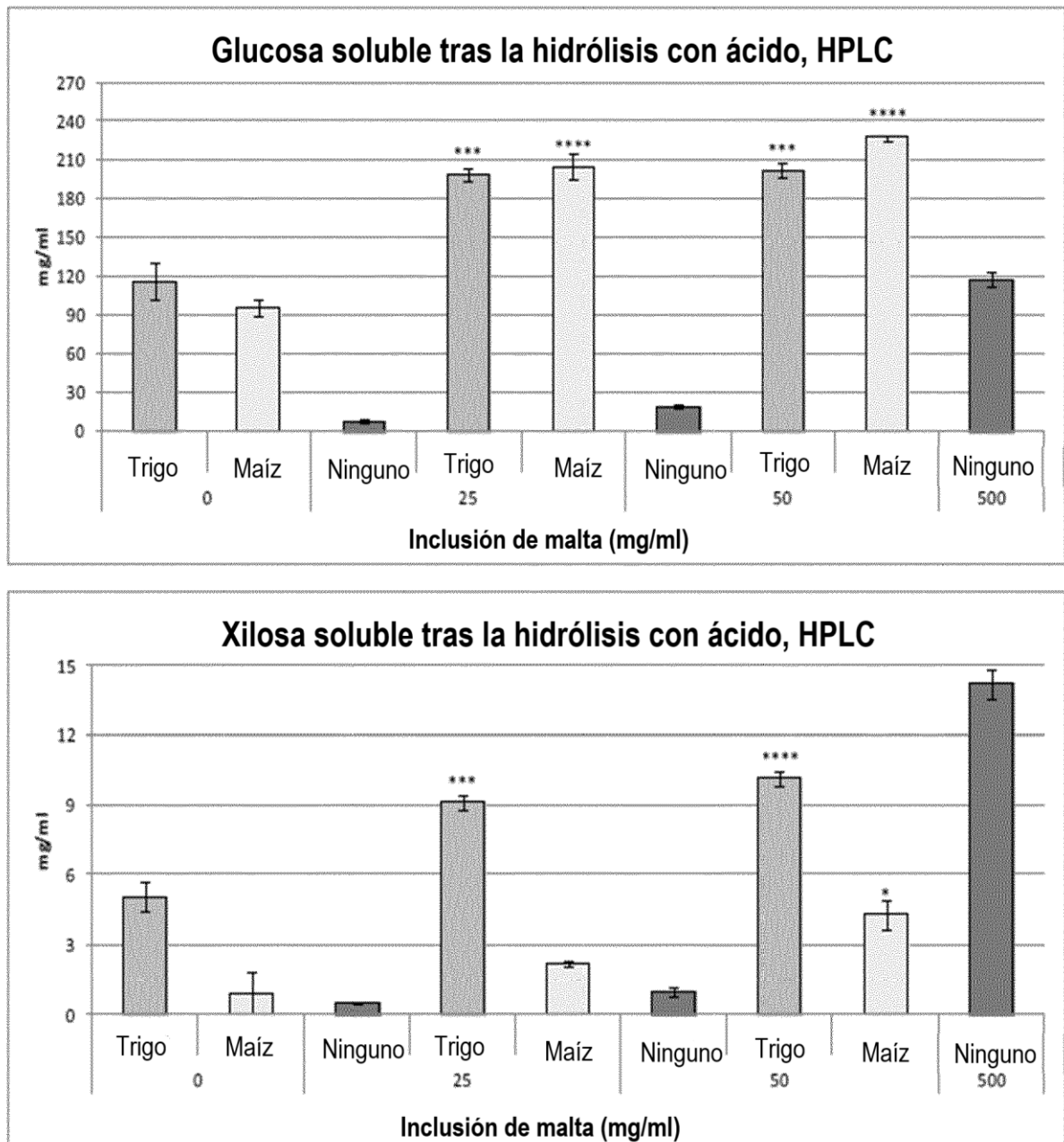


Figura 3a

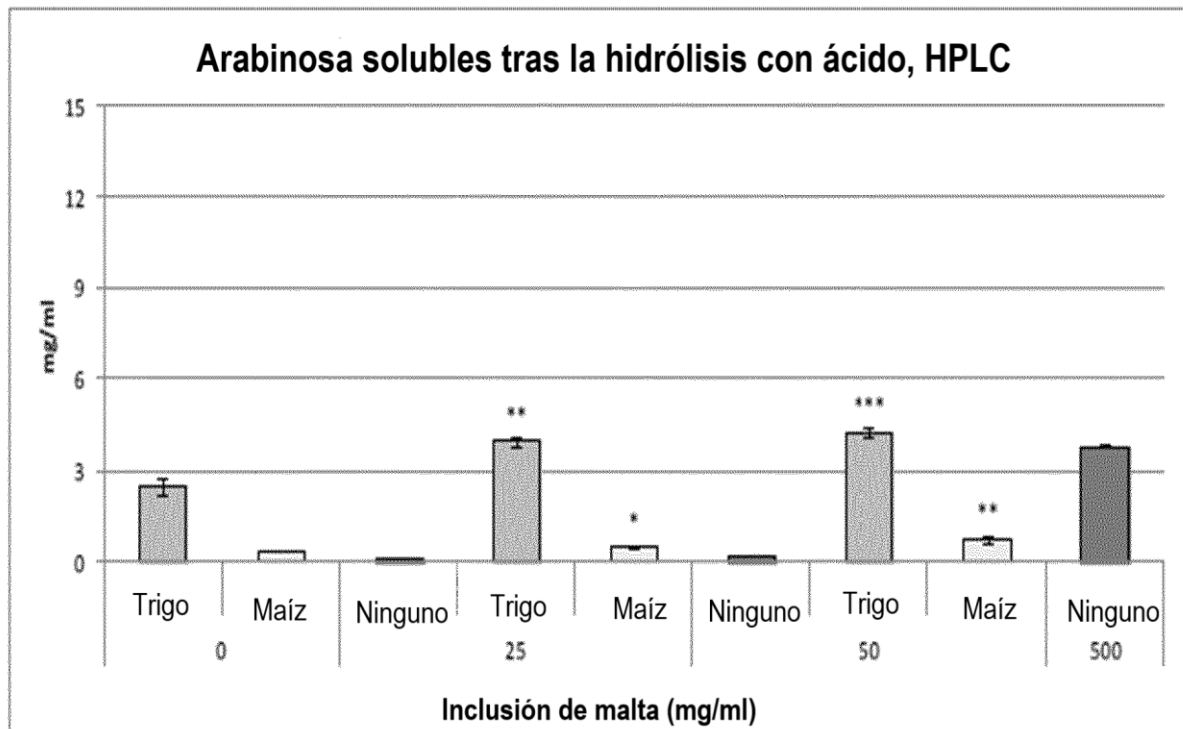


Figura 3b

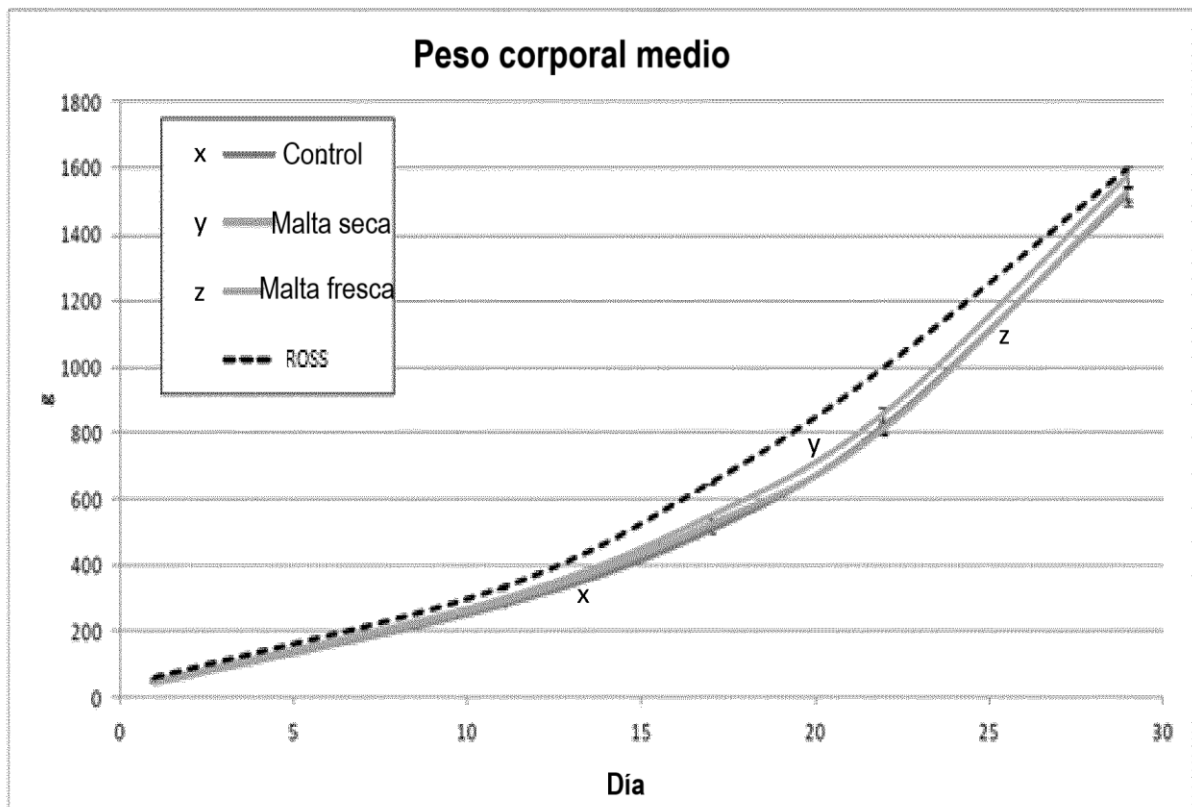


Figura 4

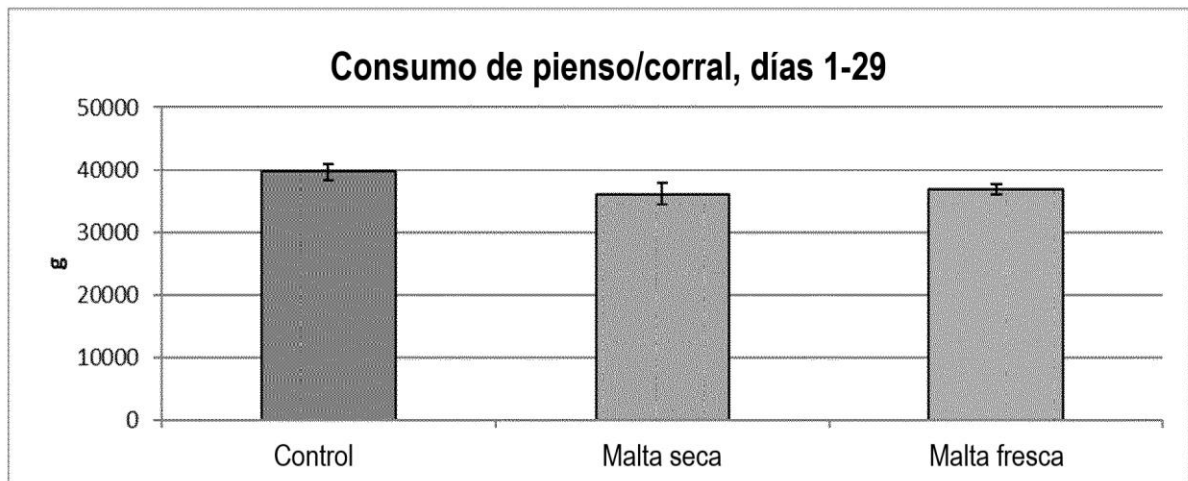


Figura 5

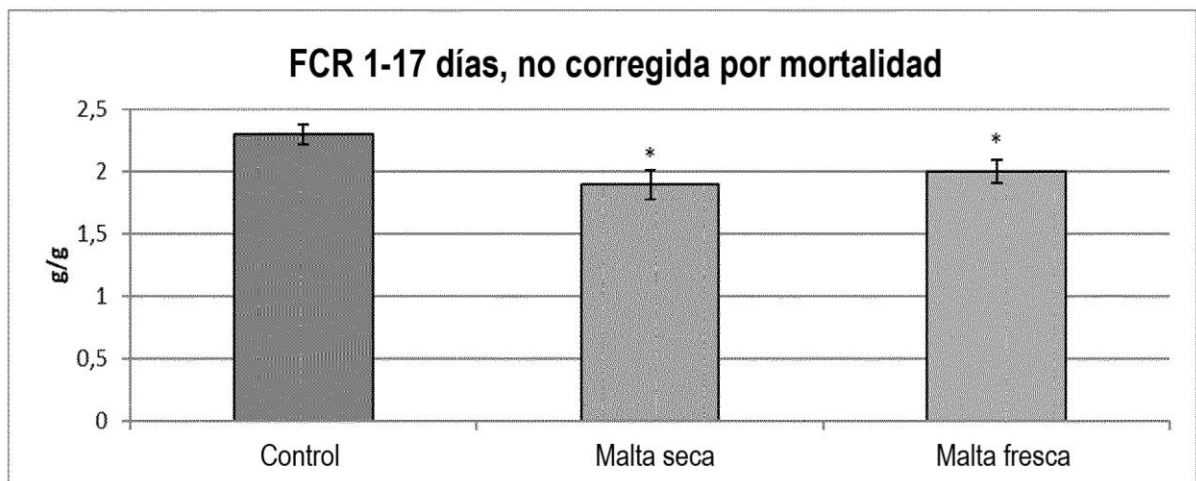


Figura 6

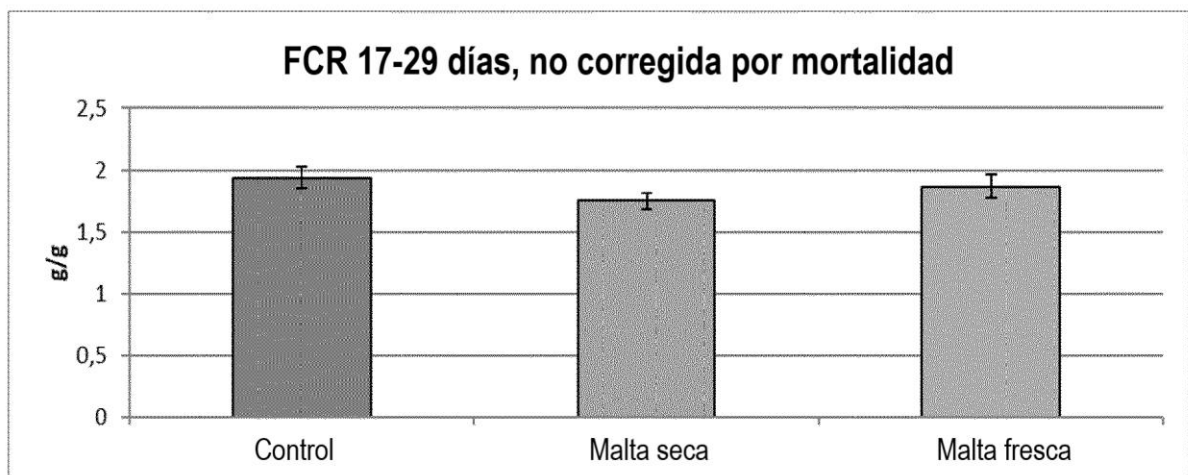


Figura 7

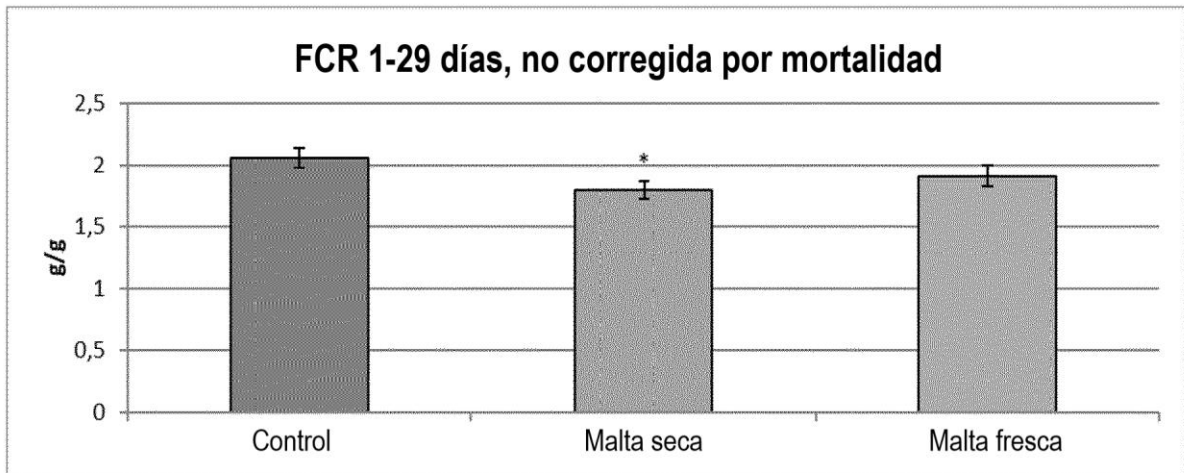


Figura 8

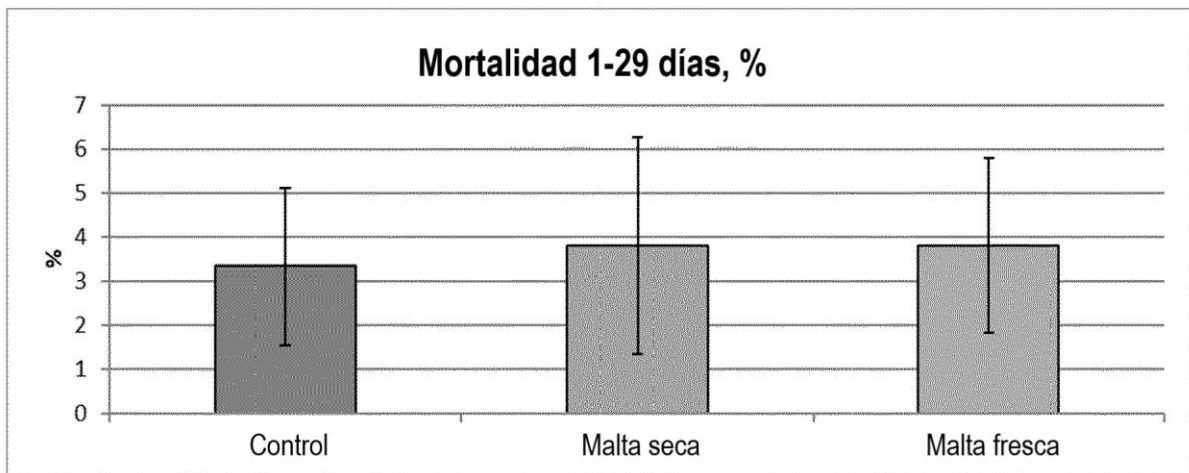


Figura 9

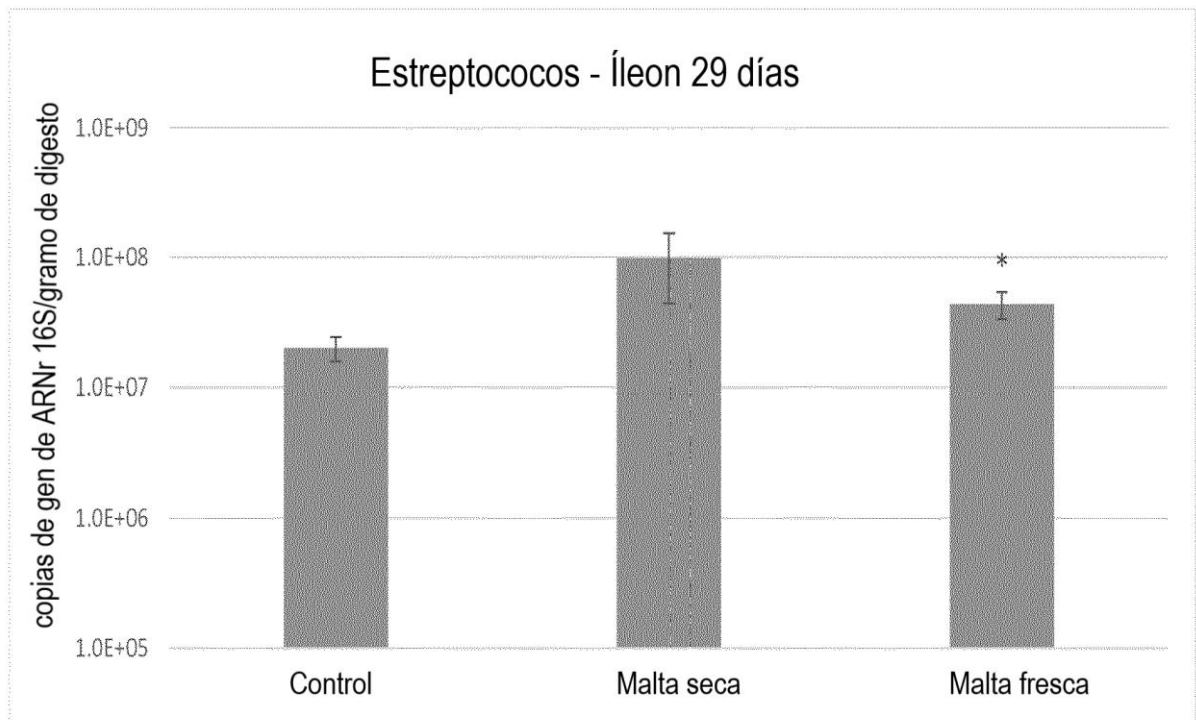


Figura 10

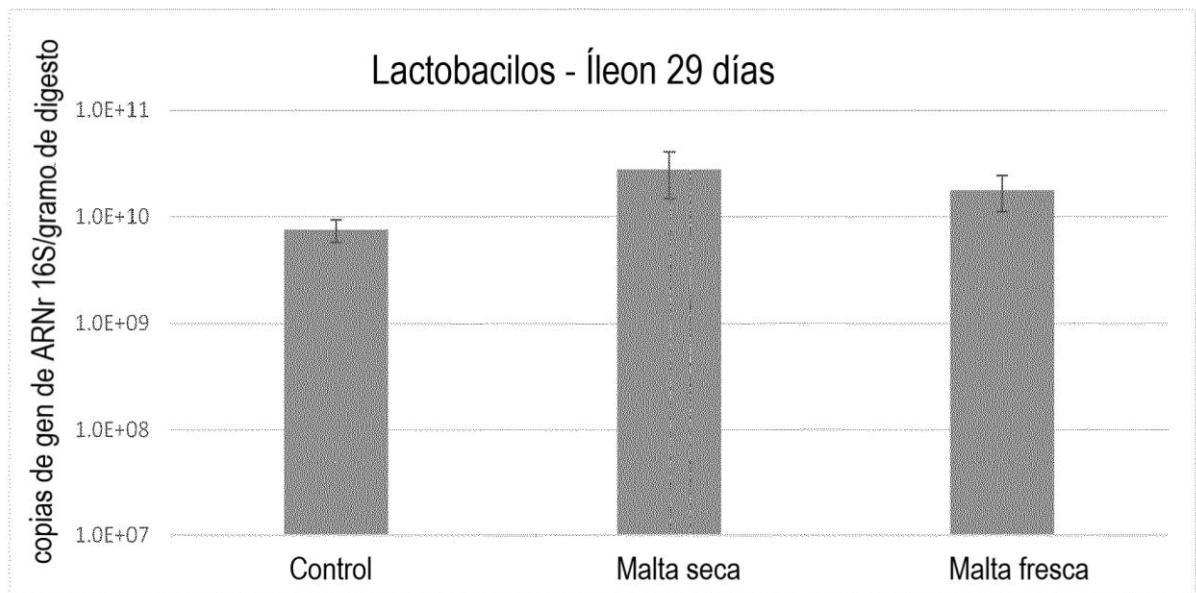


Figura 11

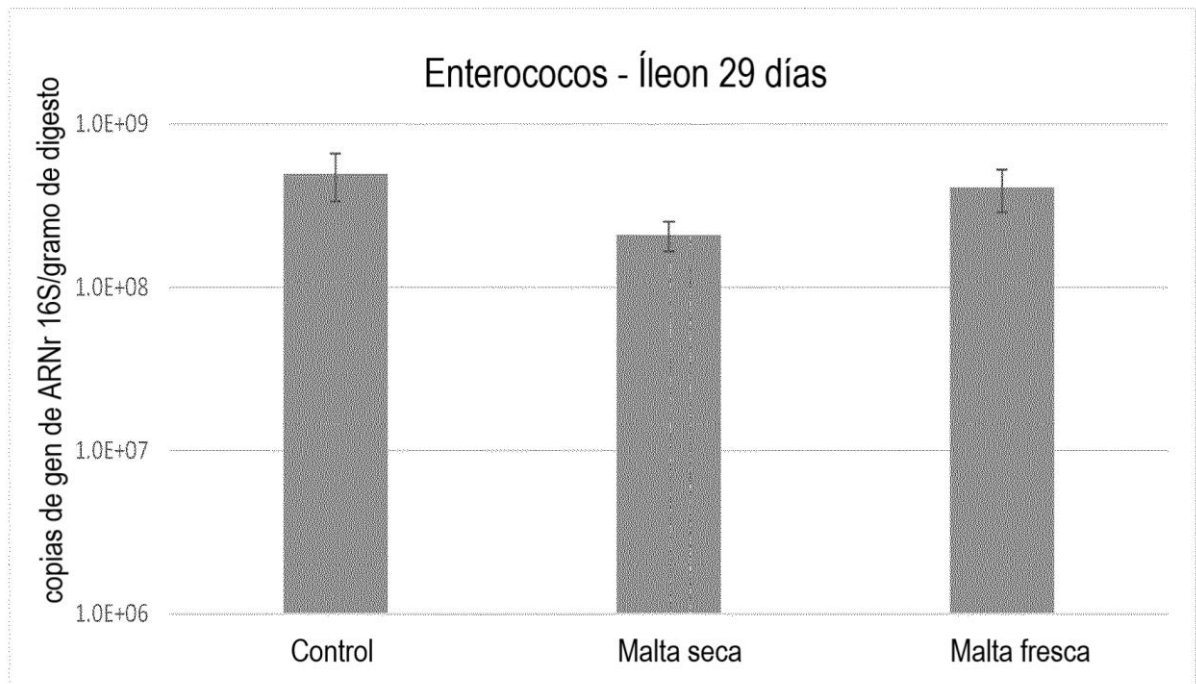


Figura 12

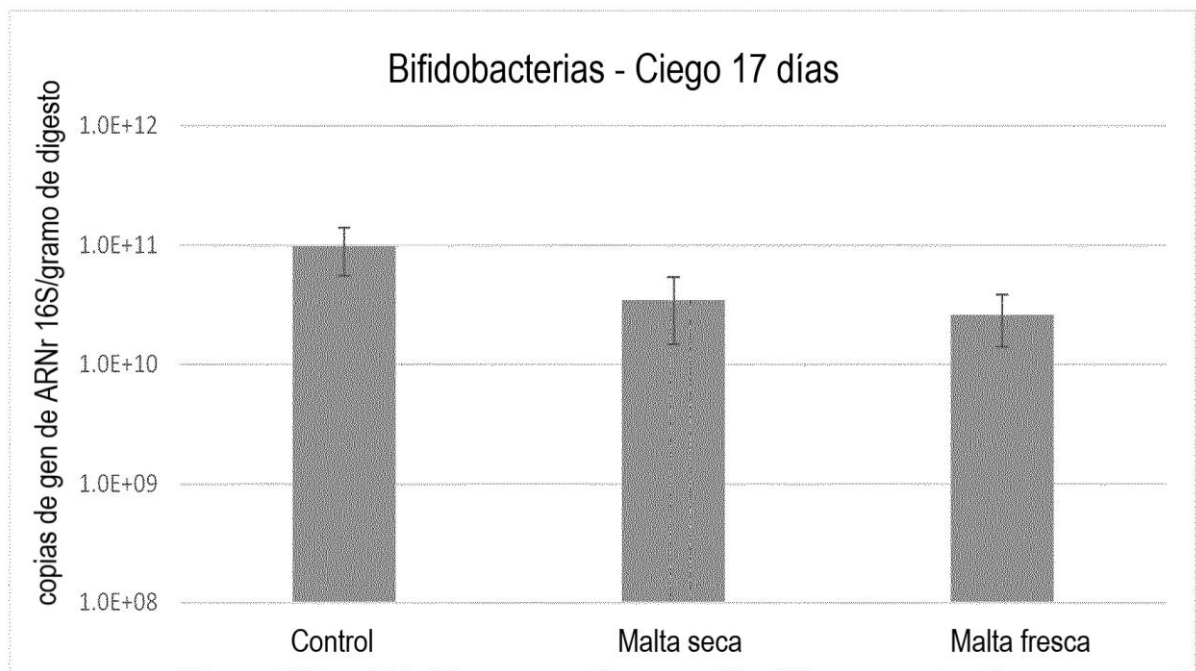


Figura 13

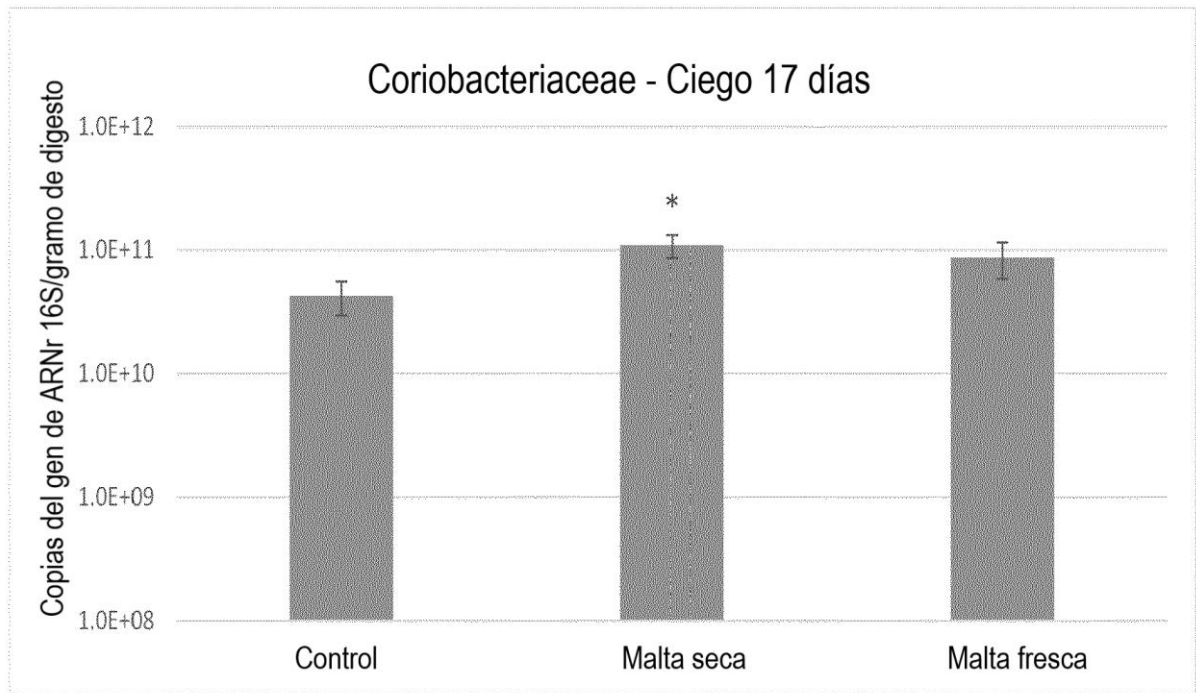


Figura 14

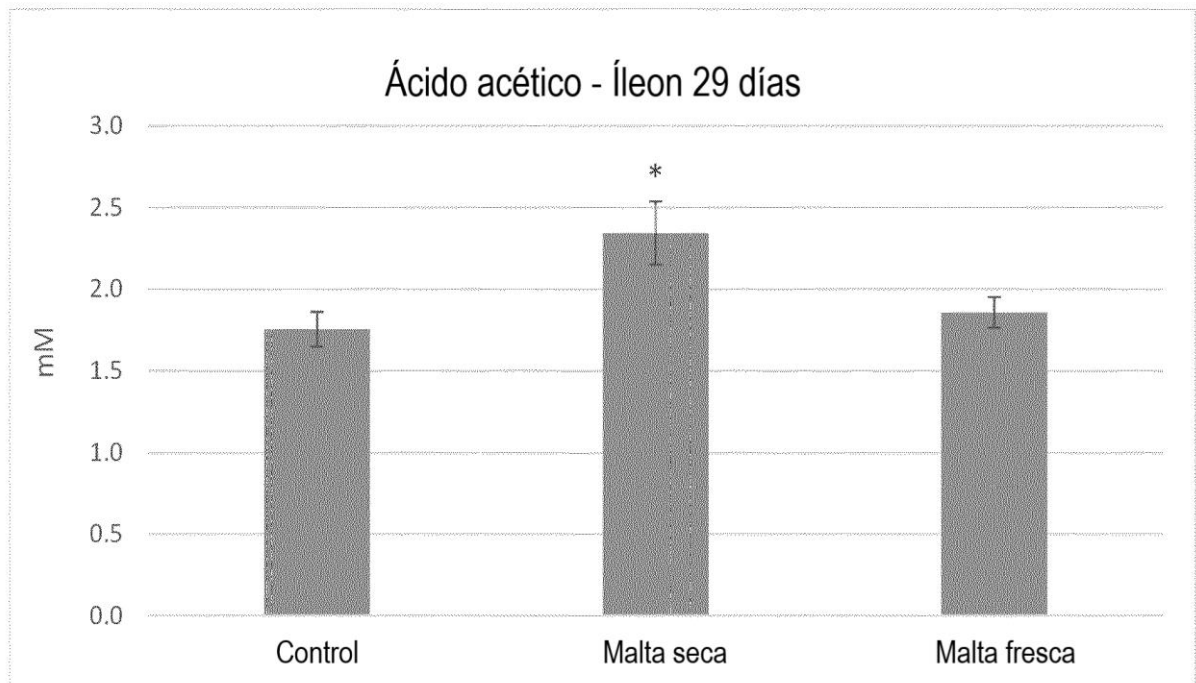


Figura 15

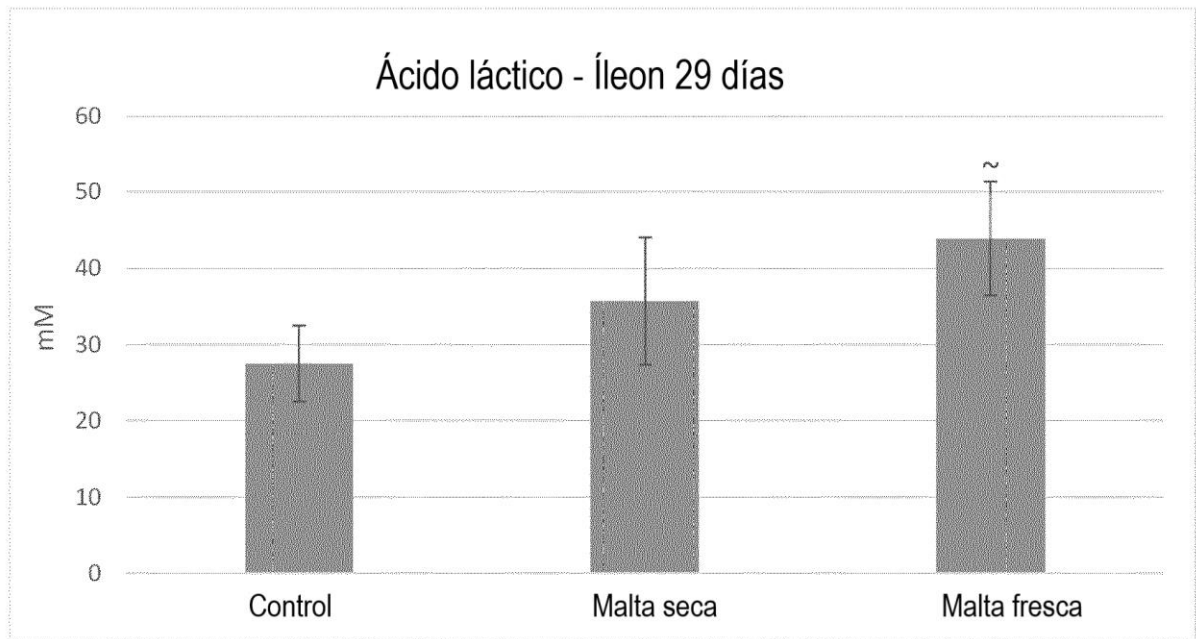


Figura 16

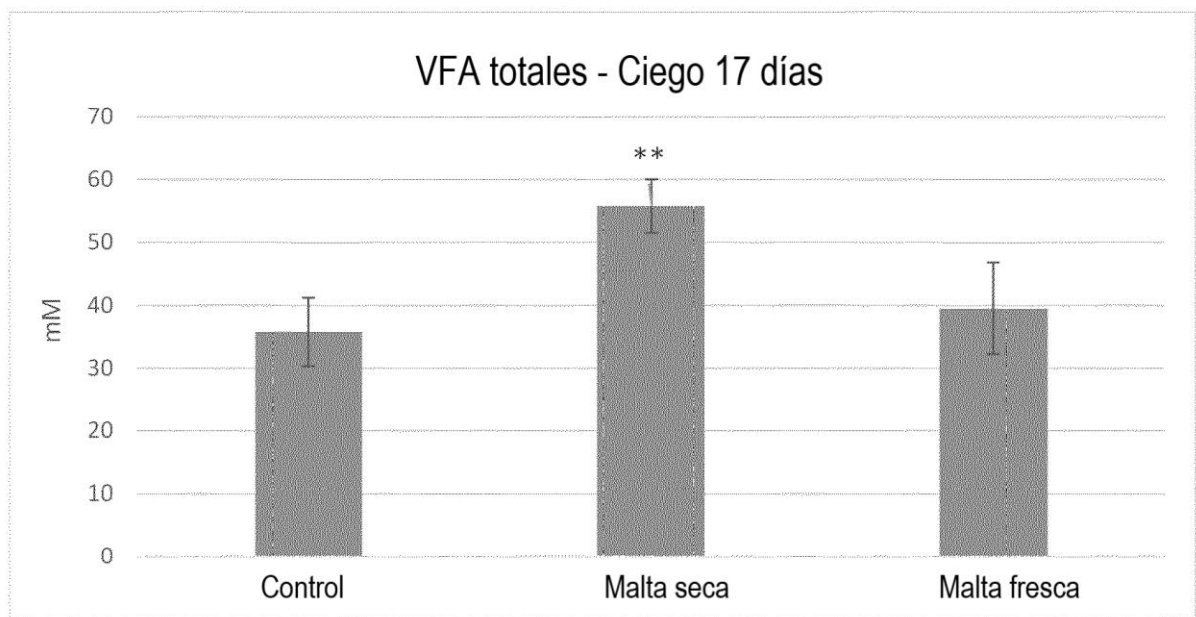


Figura 17

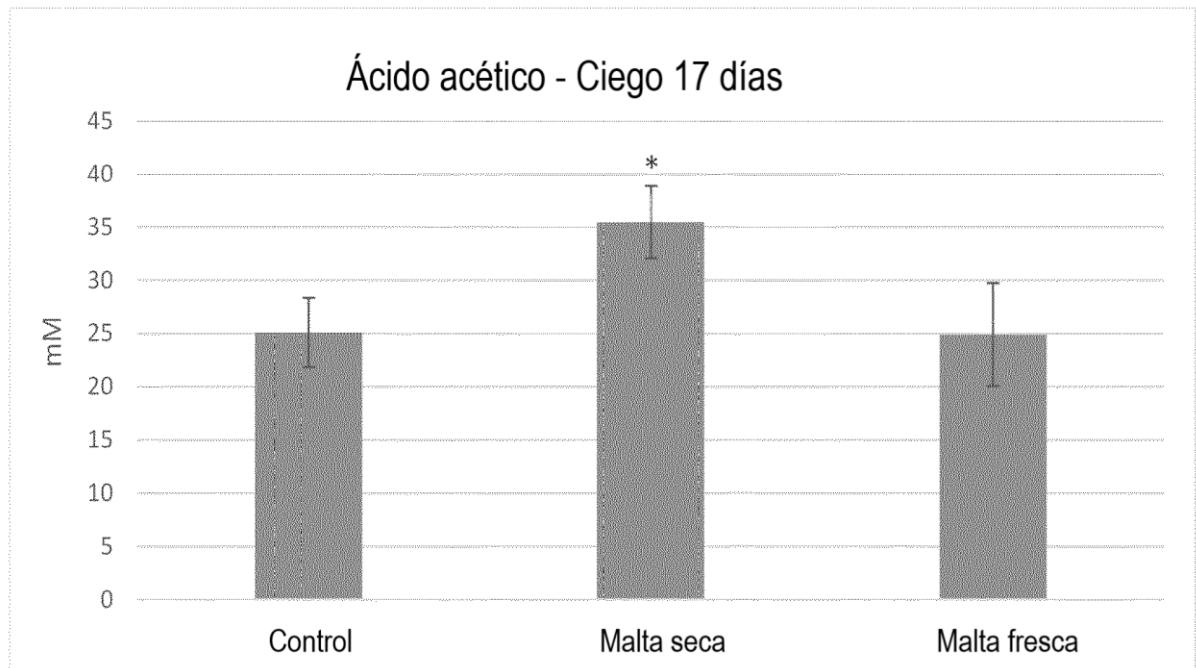


Figura 18

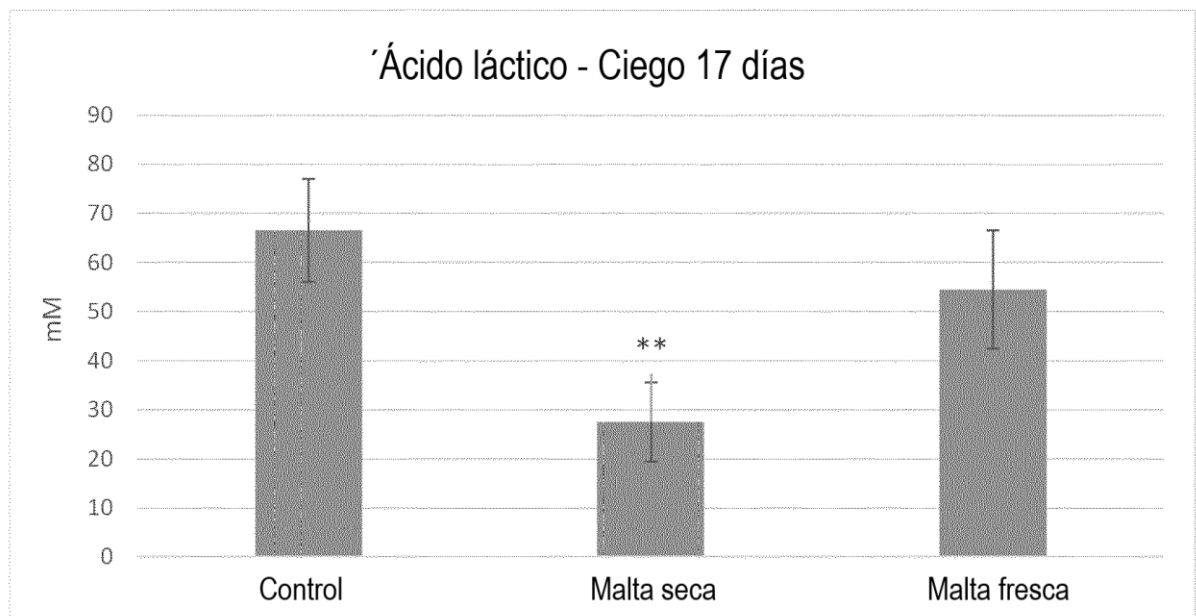


Figura 19

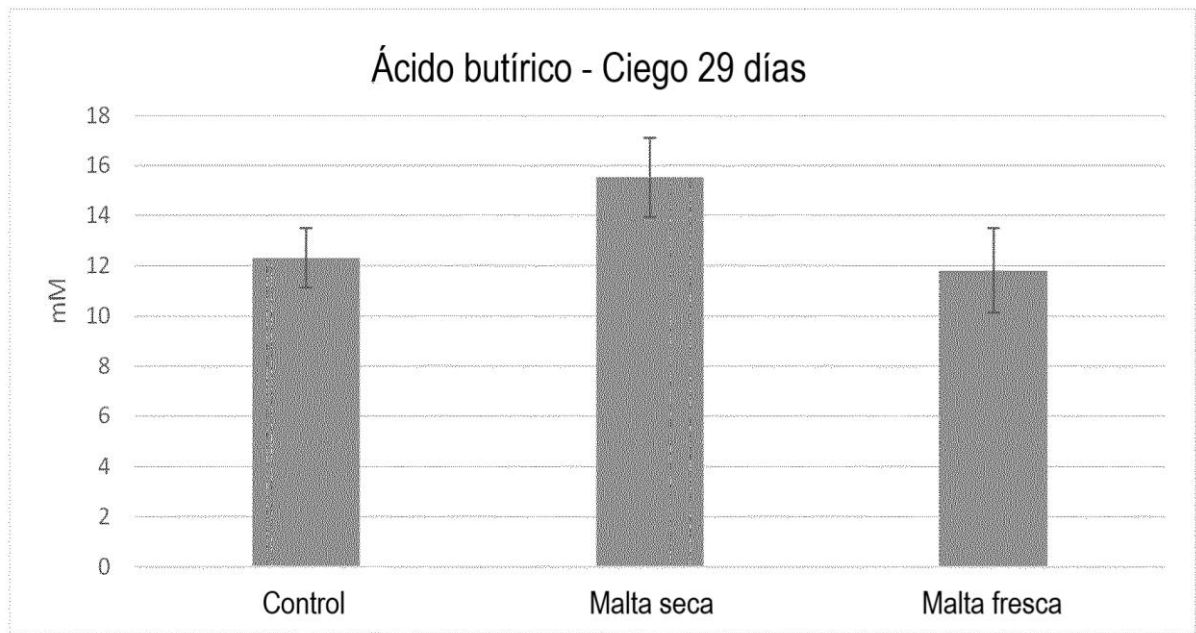


Figura 20

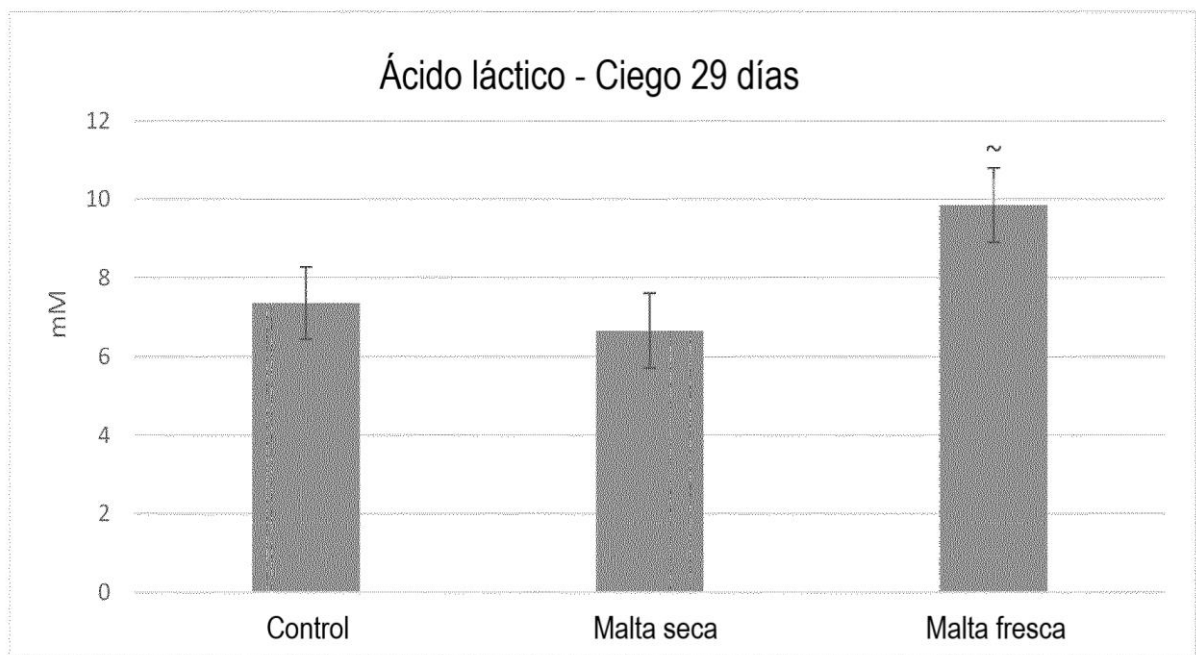


Figura 21

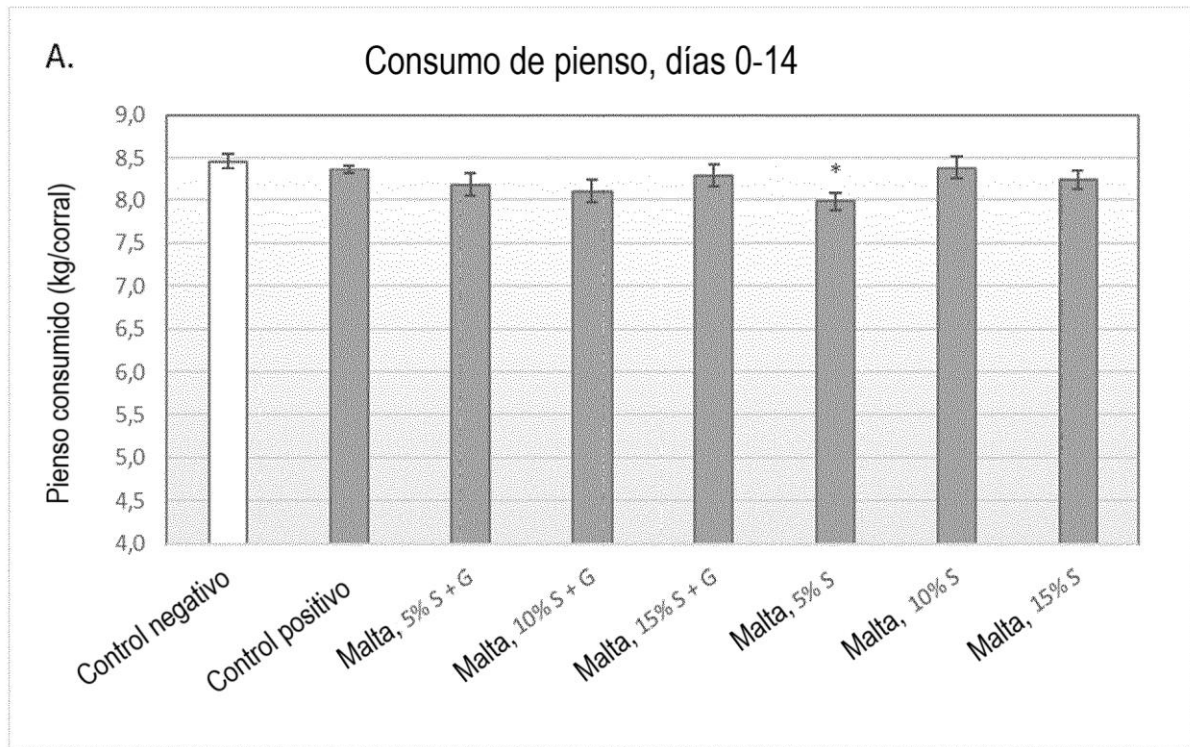


Figura 22A

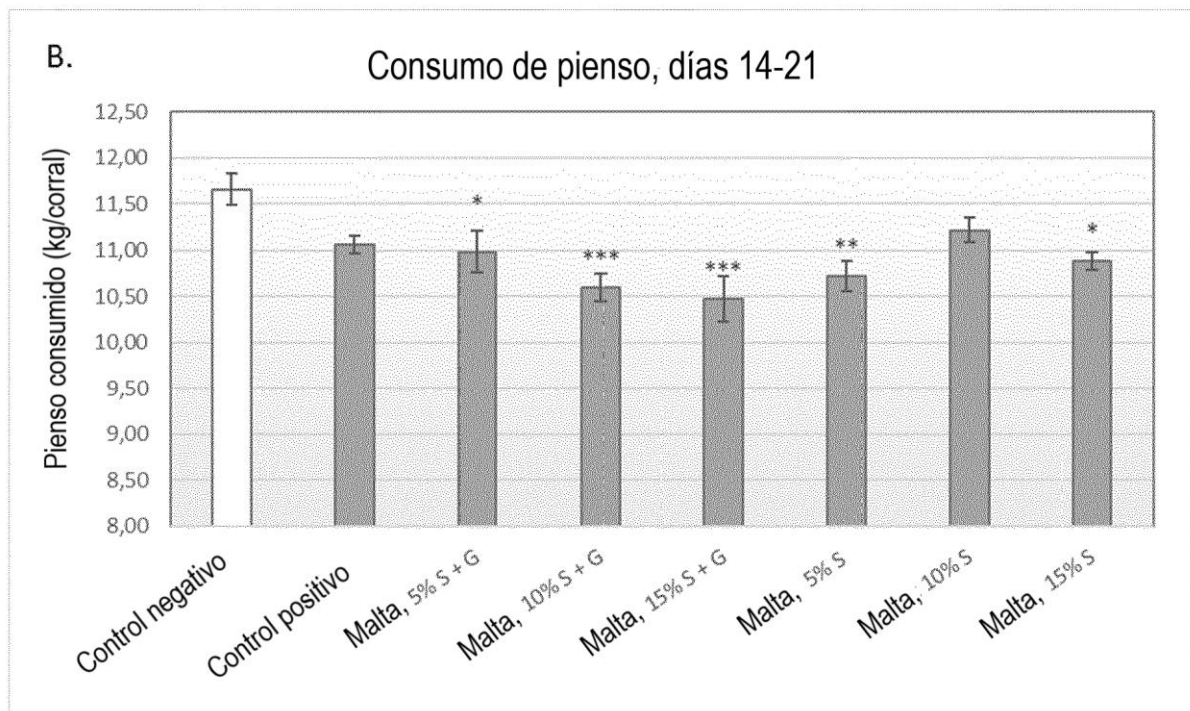


Figura 22B

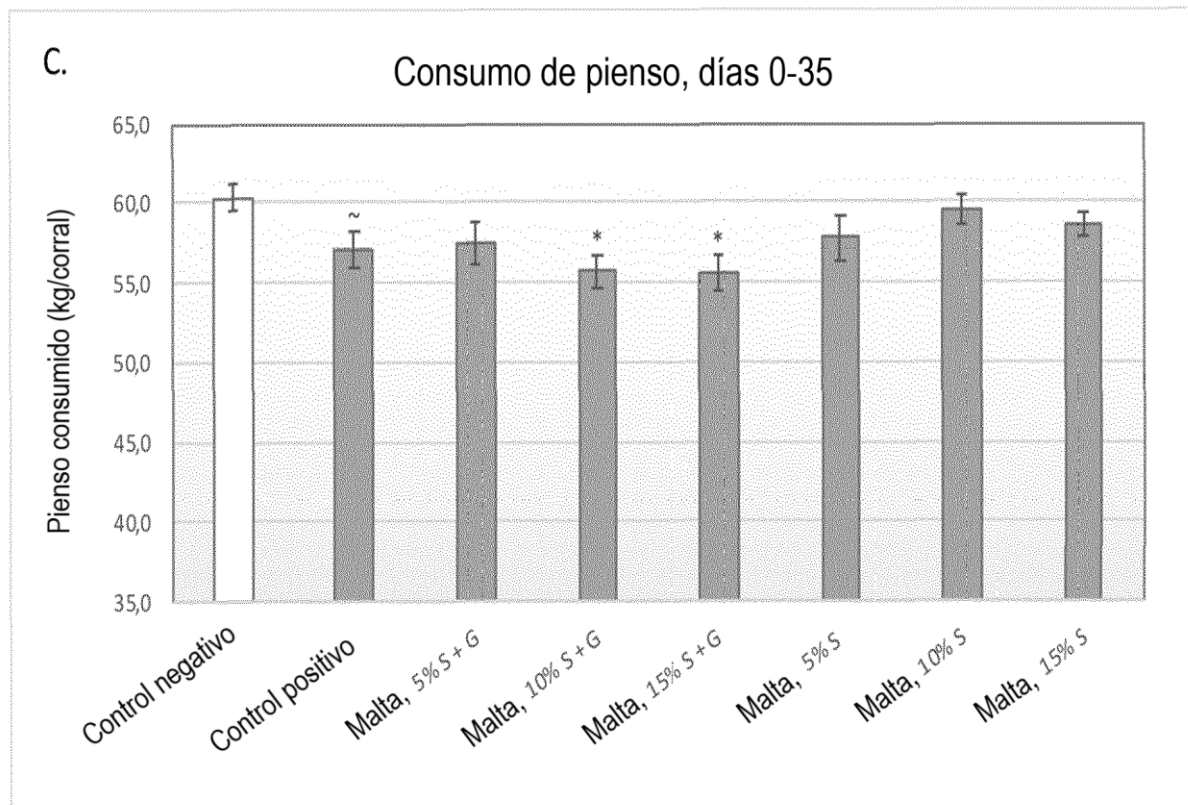


Figura 22C

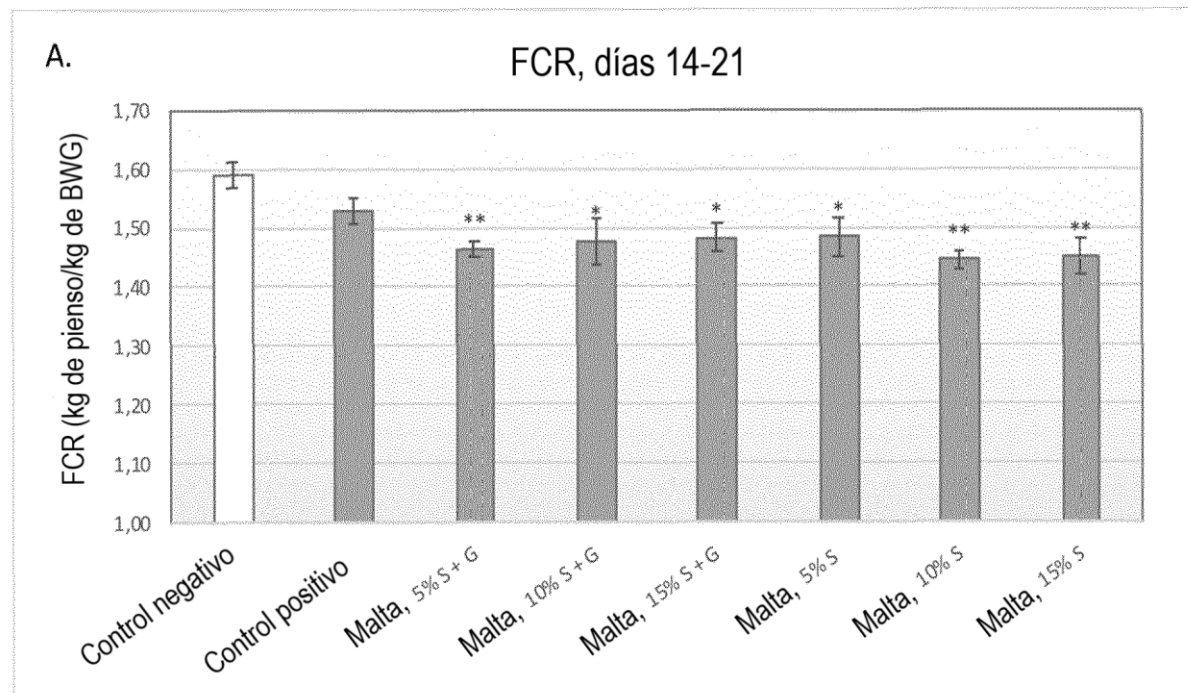


Figura 23A

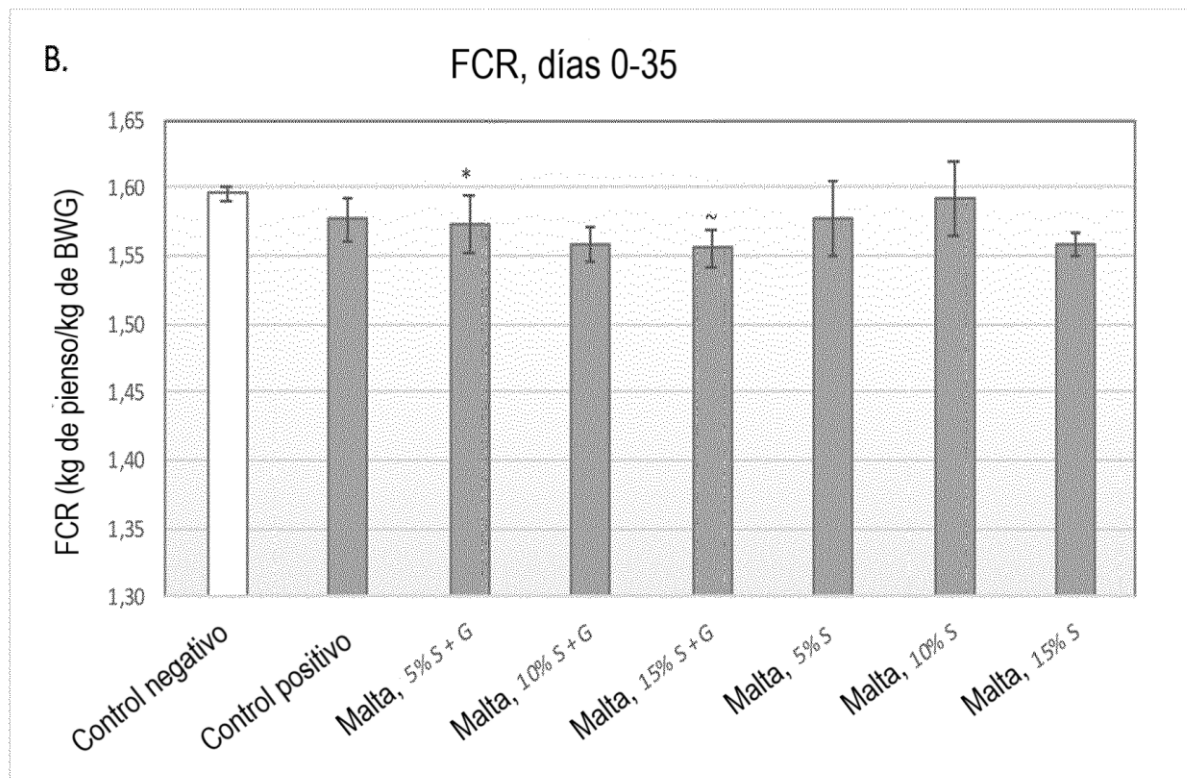


Figura 23B

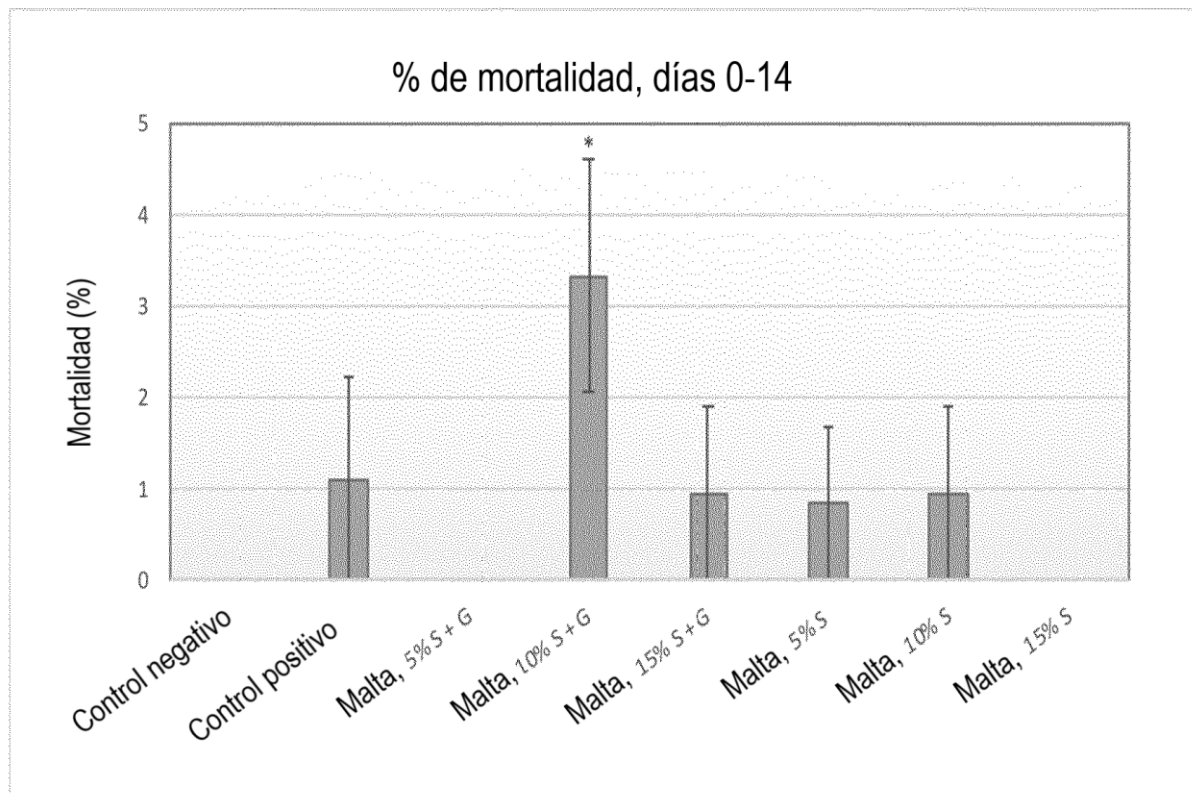


Figura 24

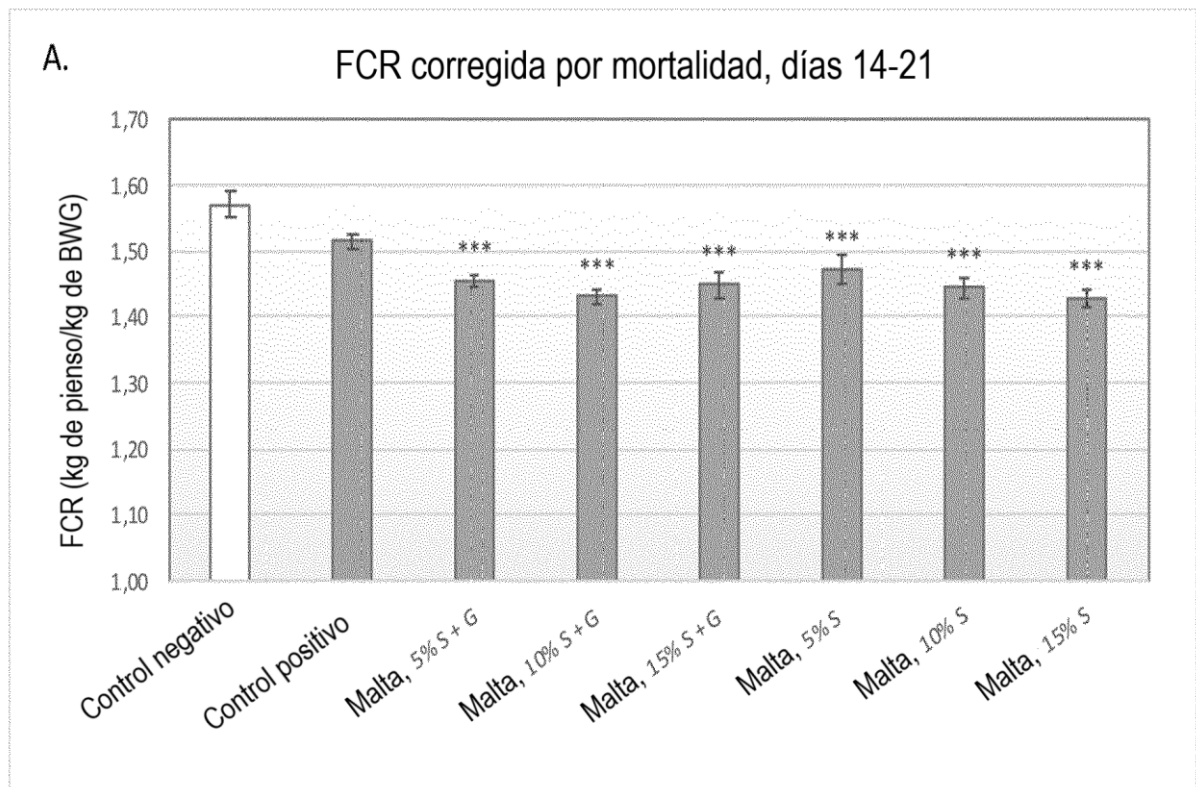


Figura 25A

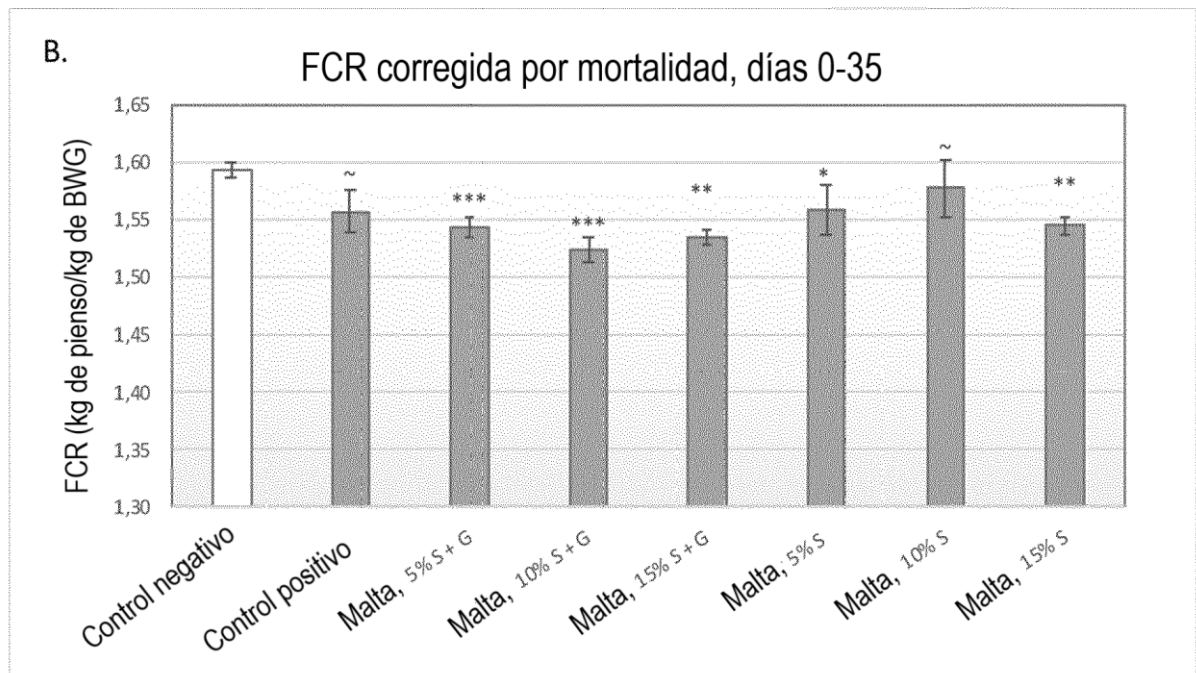


Figura 25B

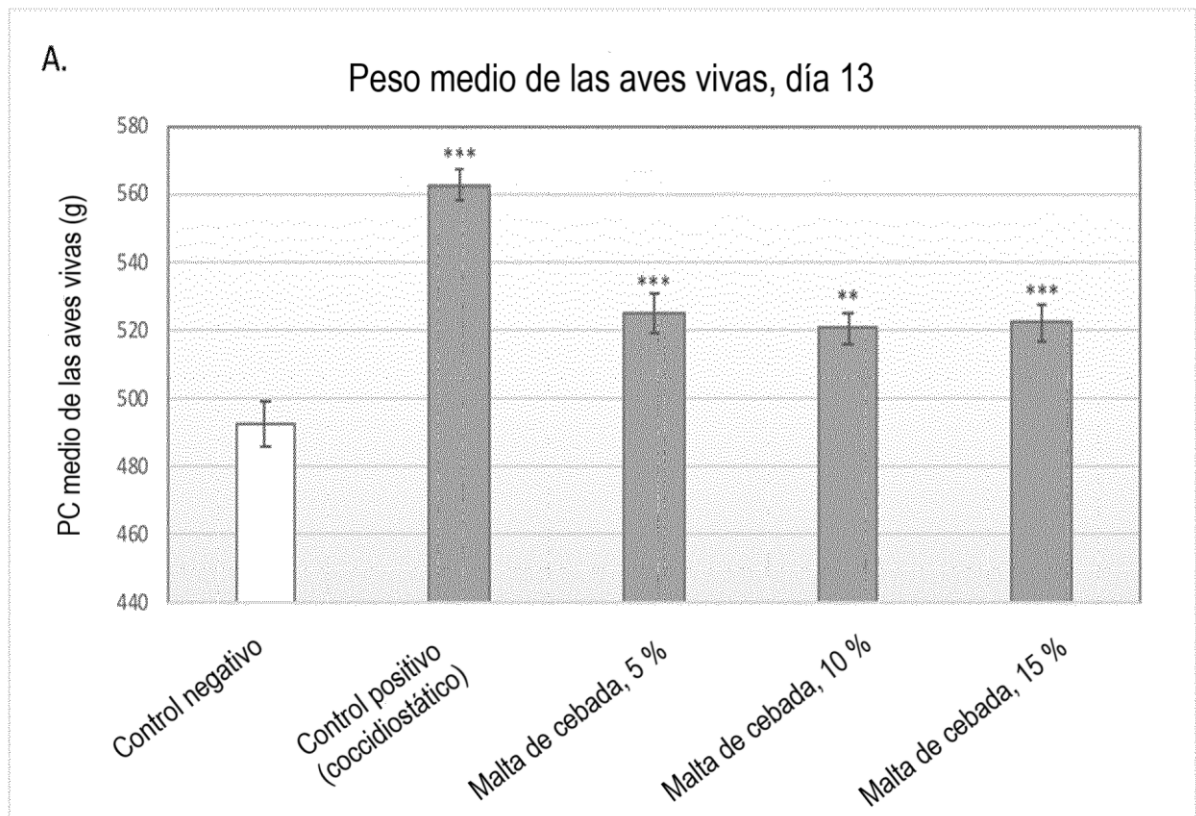


Figura 26A

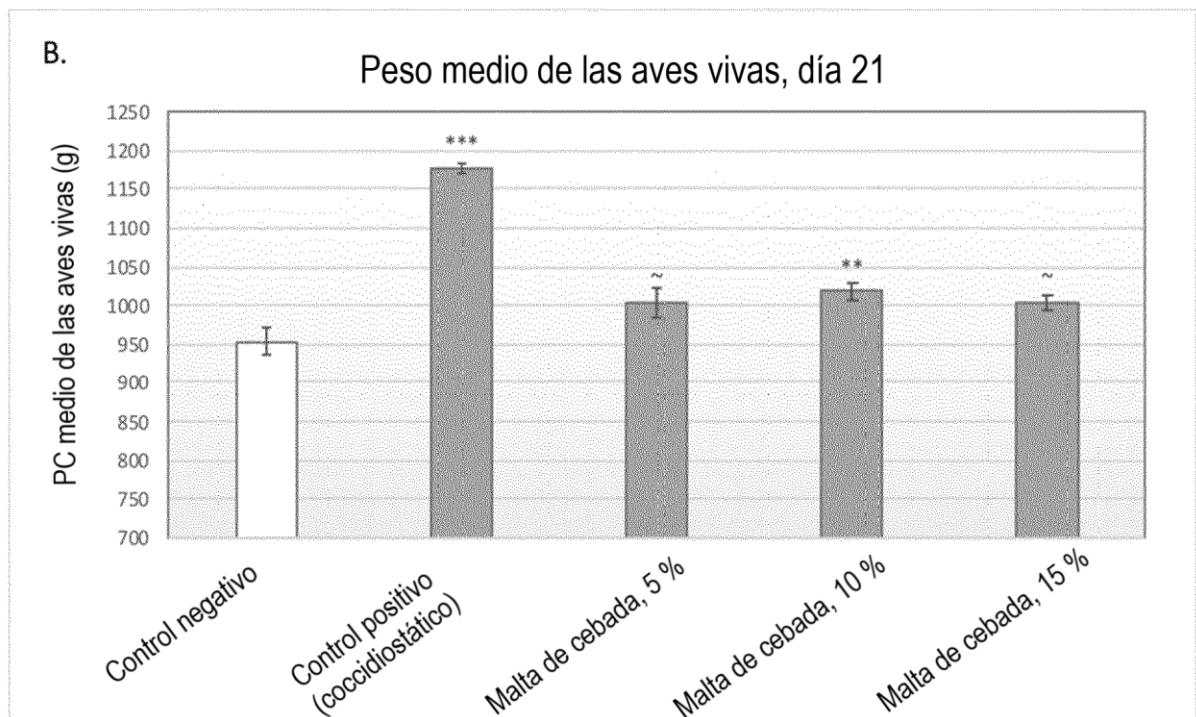


Figura 26B

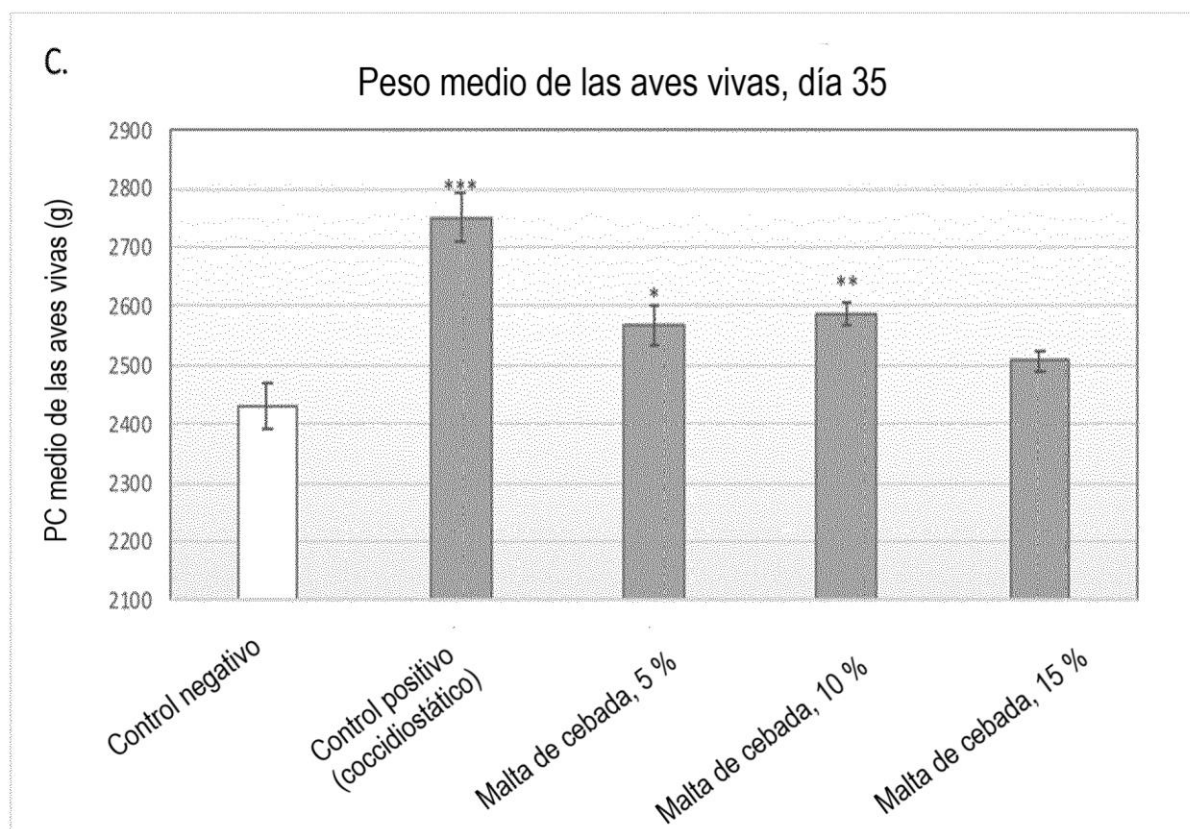


Figura 26C

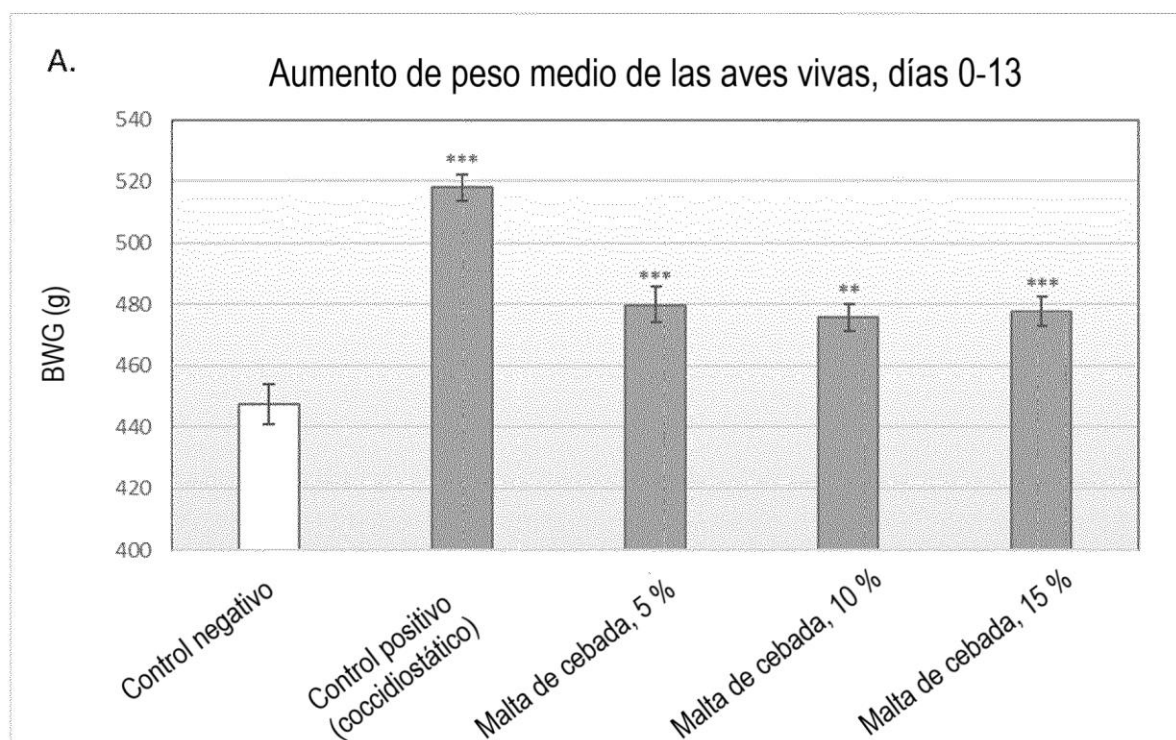


Figura 27A

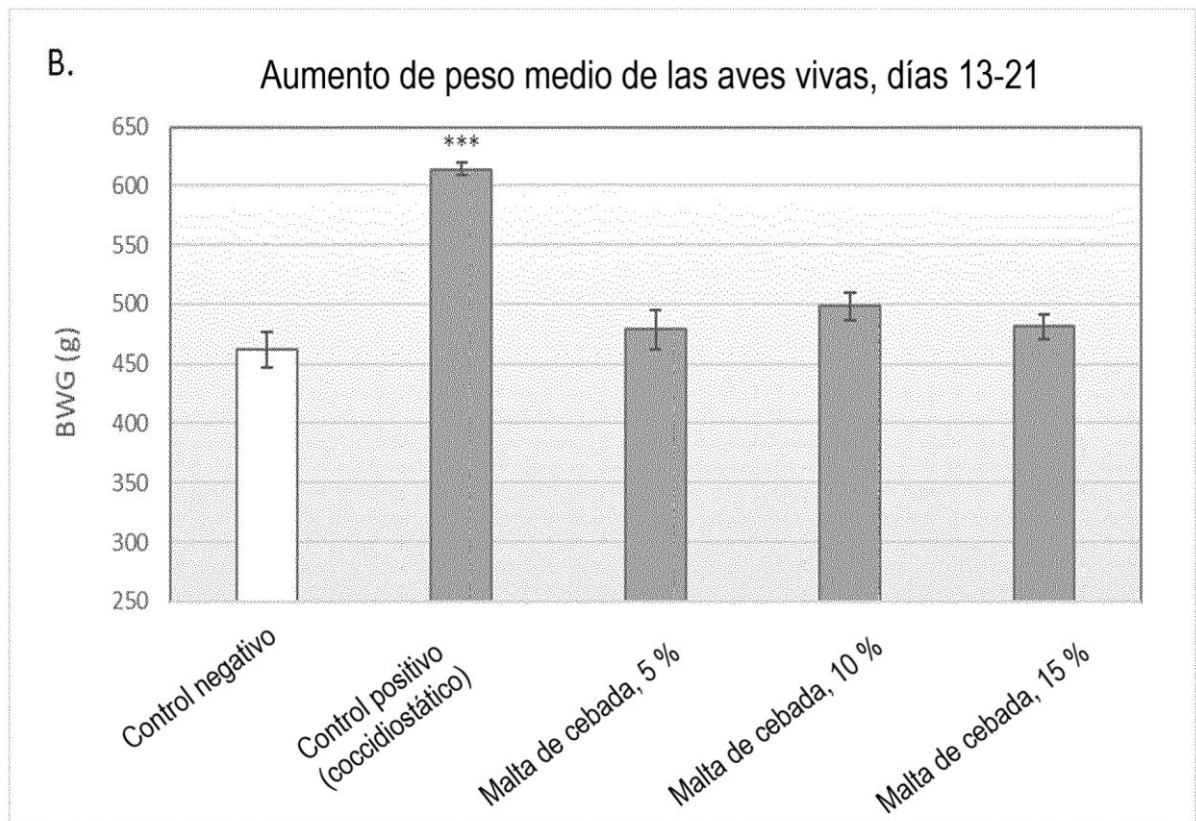


Figura 27B

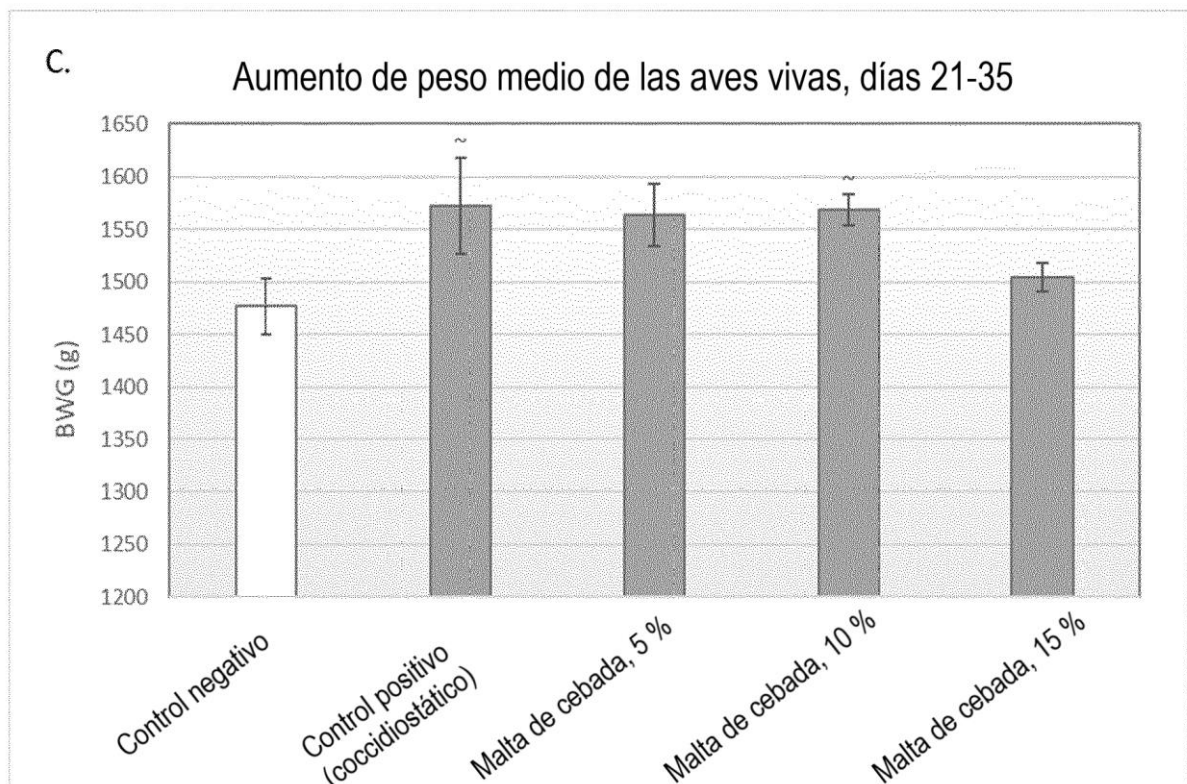


Figura 27C

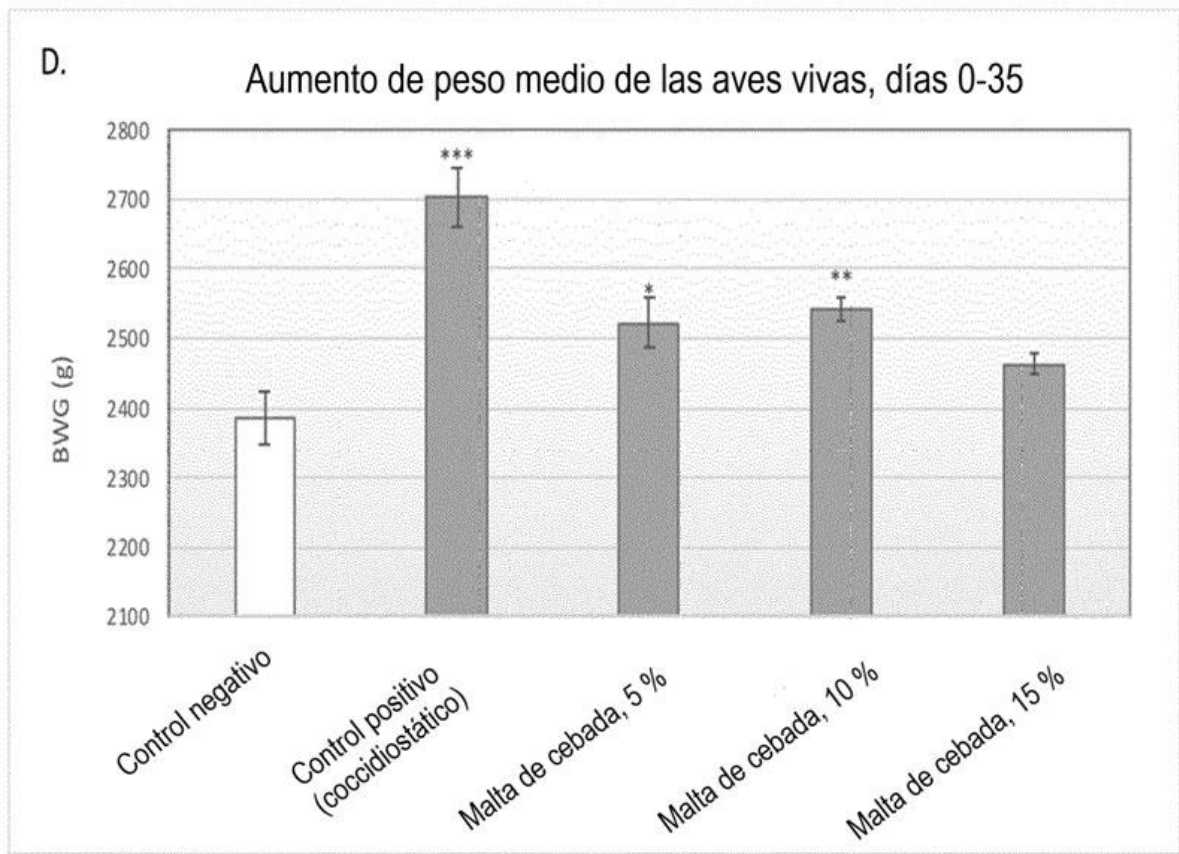


Figura 27D

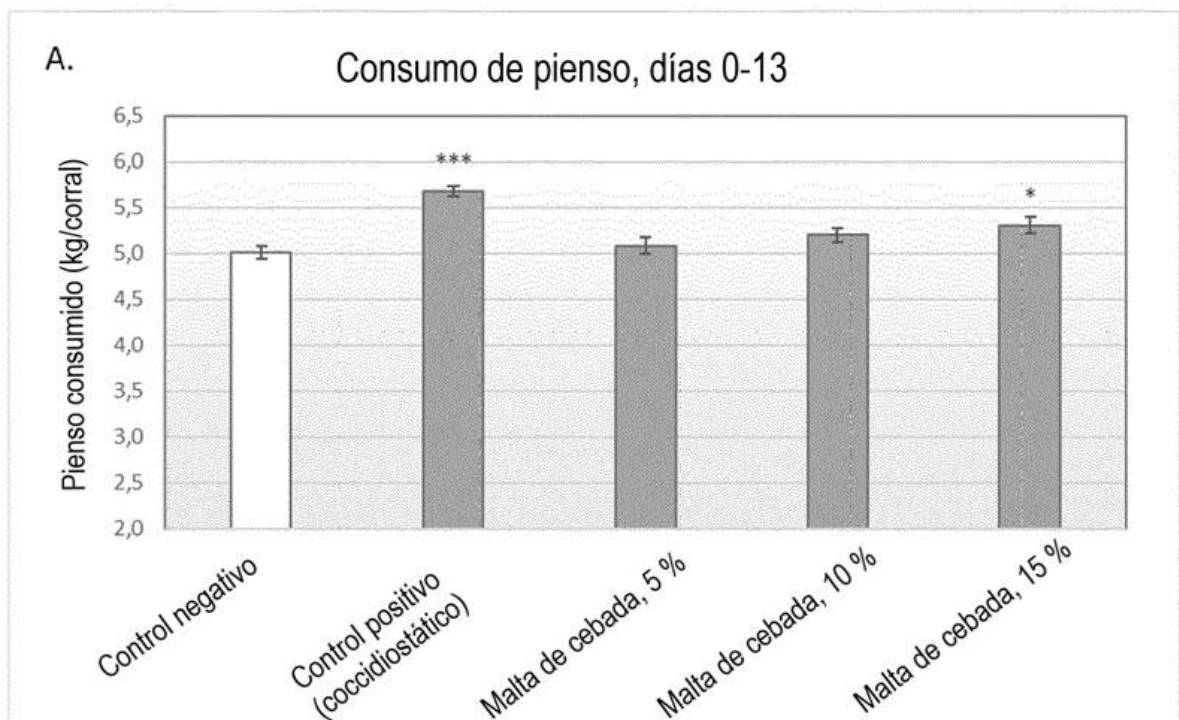


Figura 28A

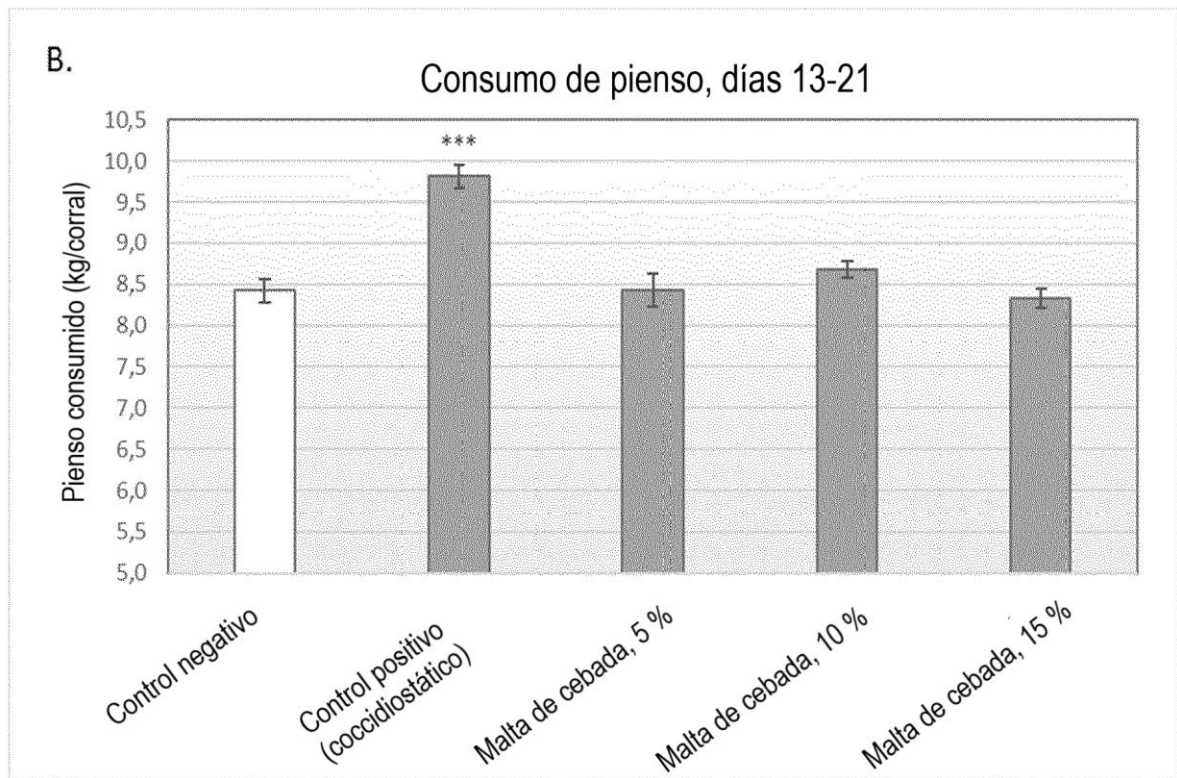


Figura 28B

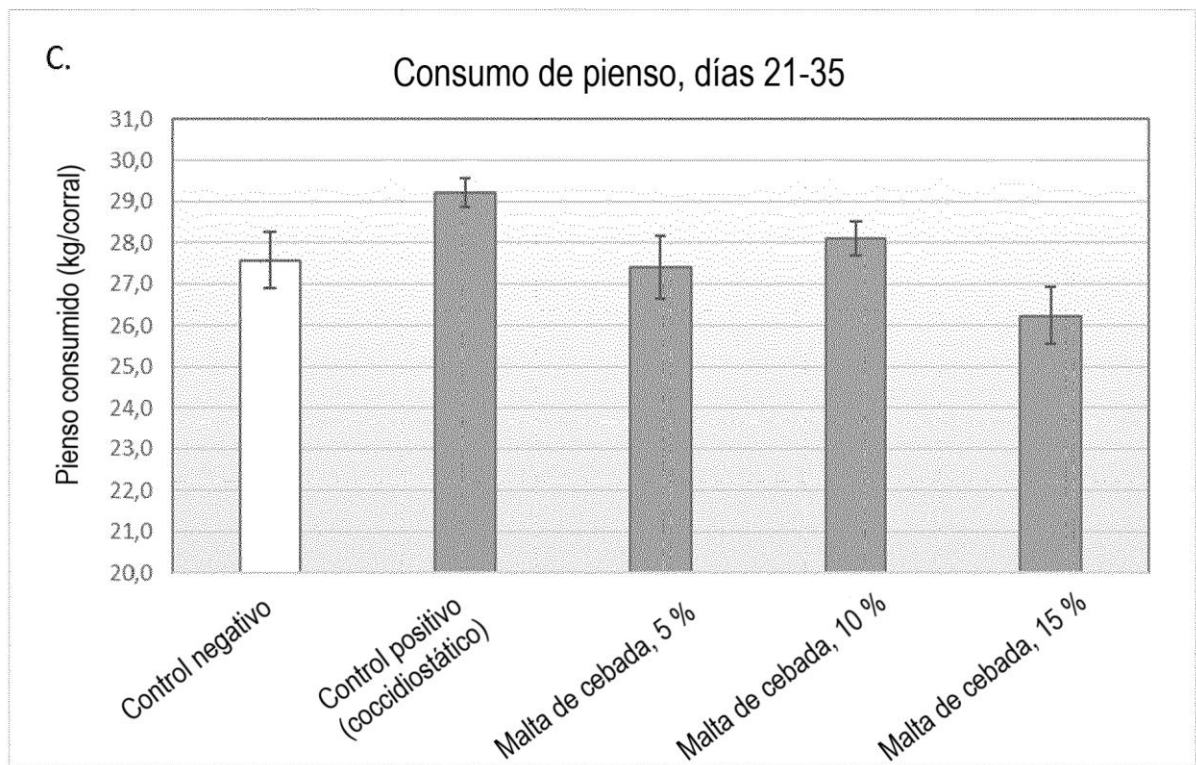


Figura 28C

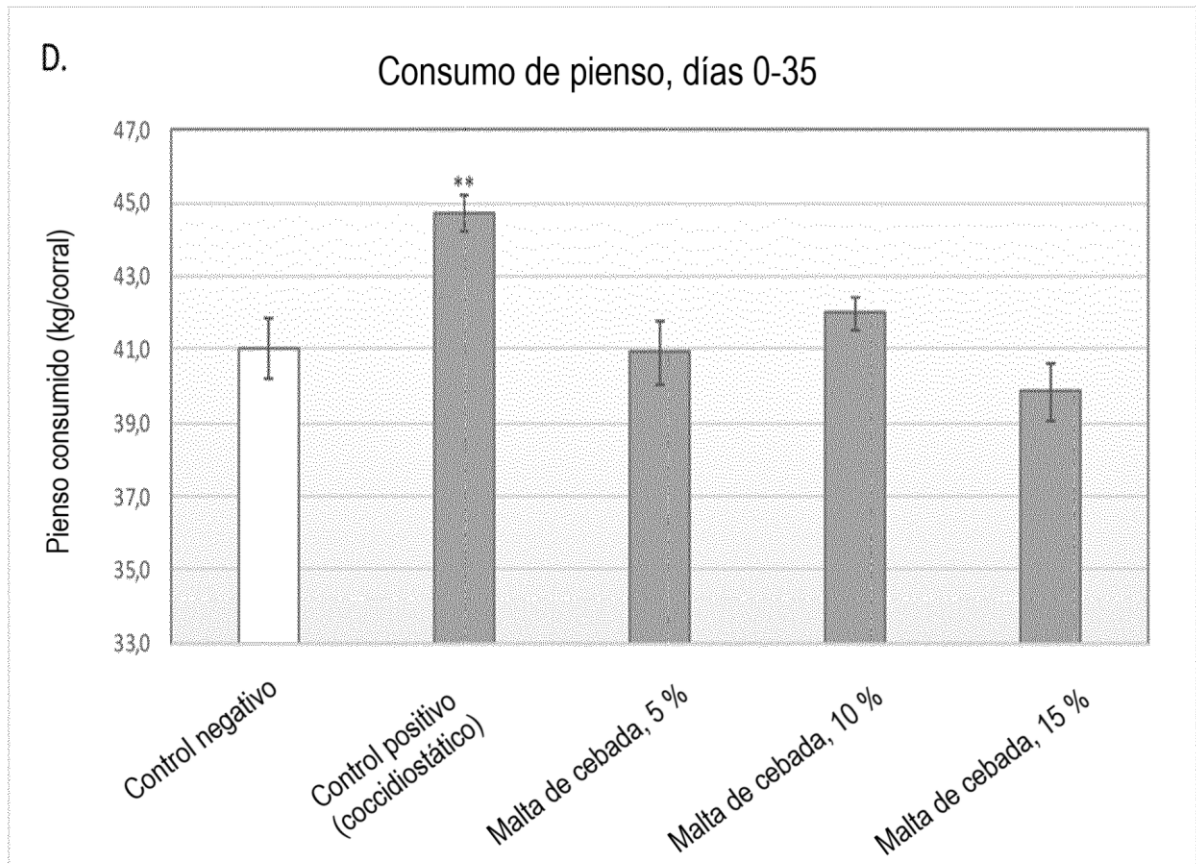


Figura 28D

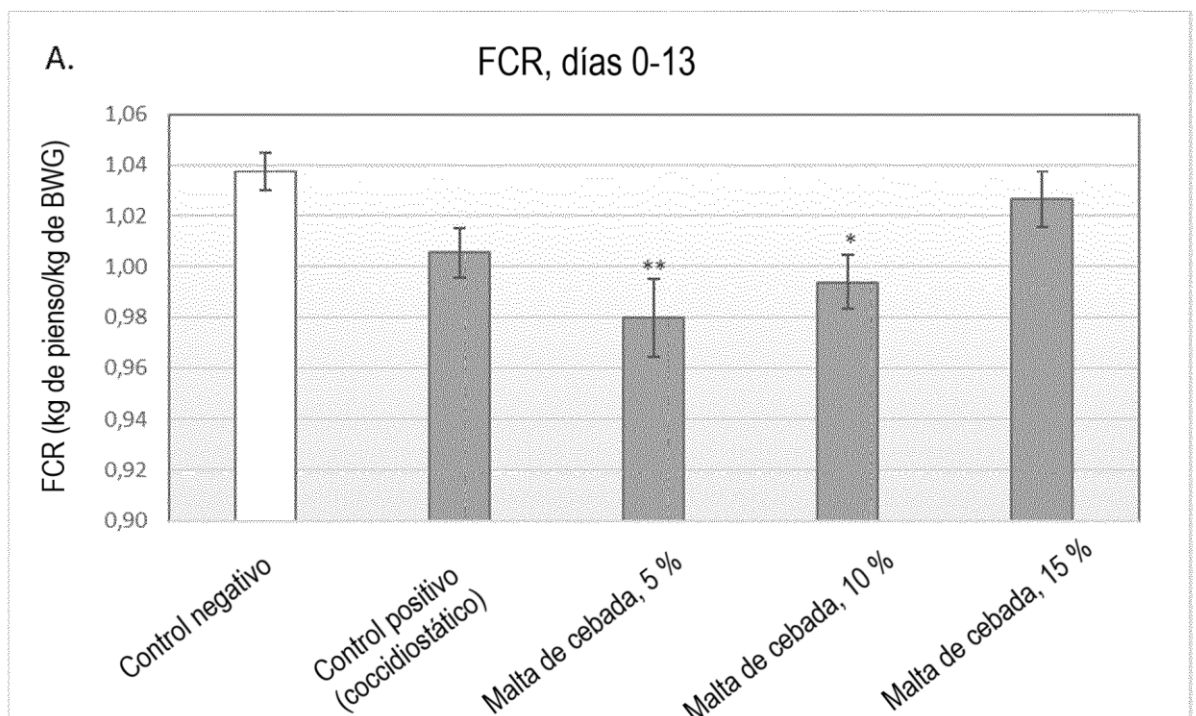


Figura 29A

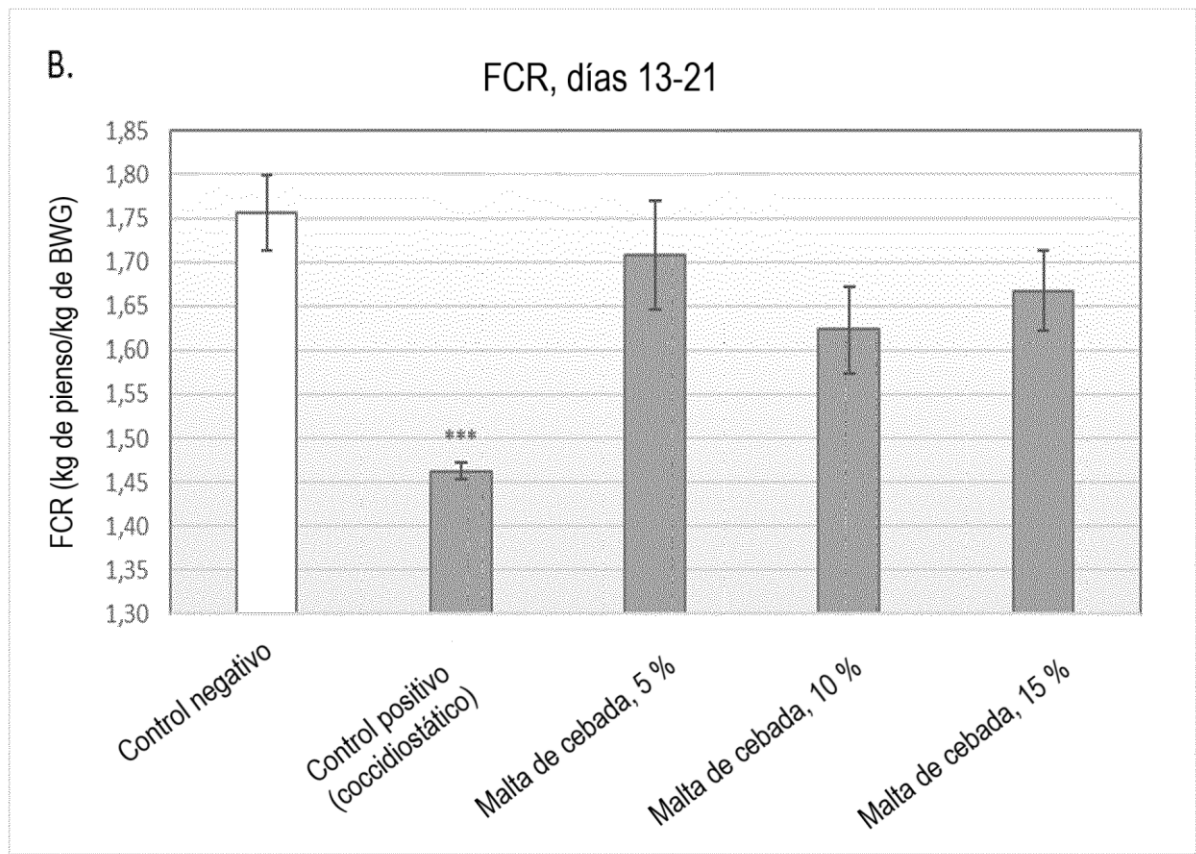


Figura 29B

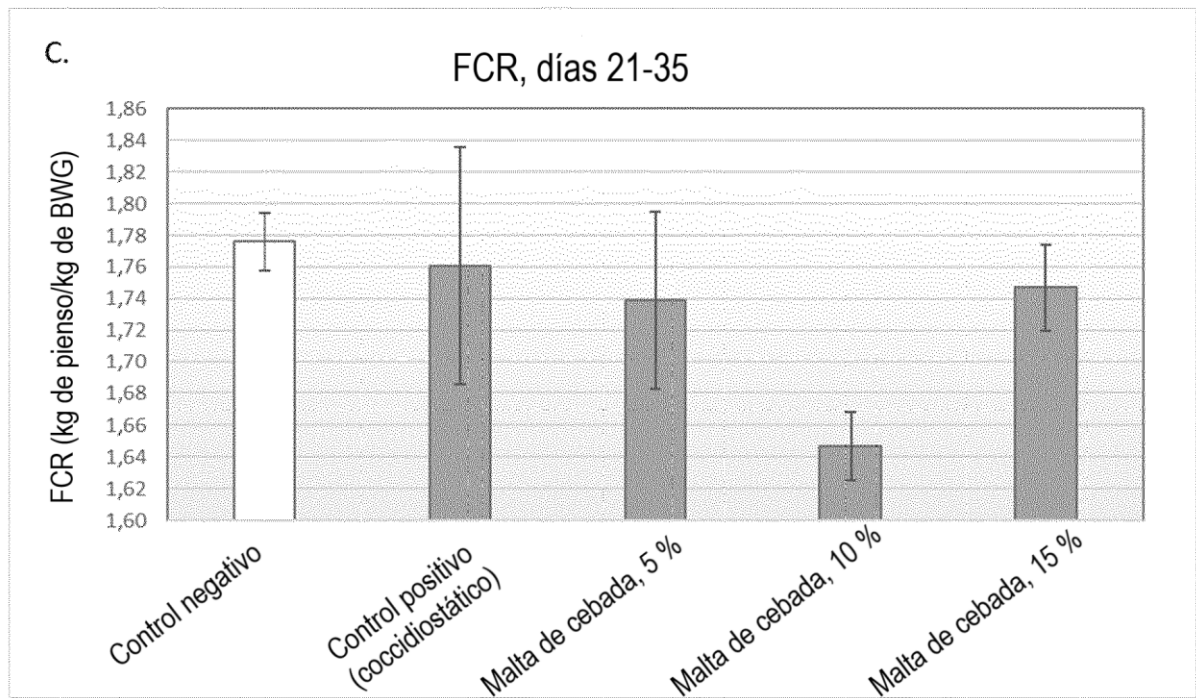


Figura 29C

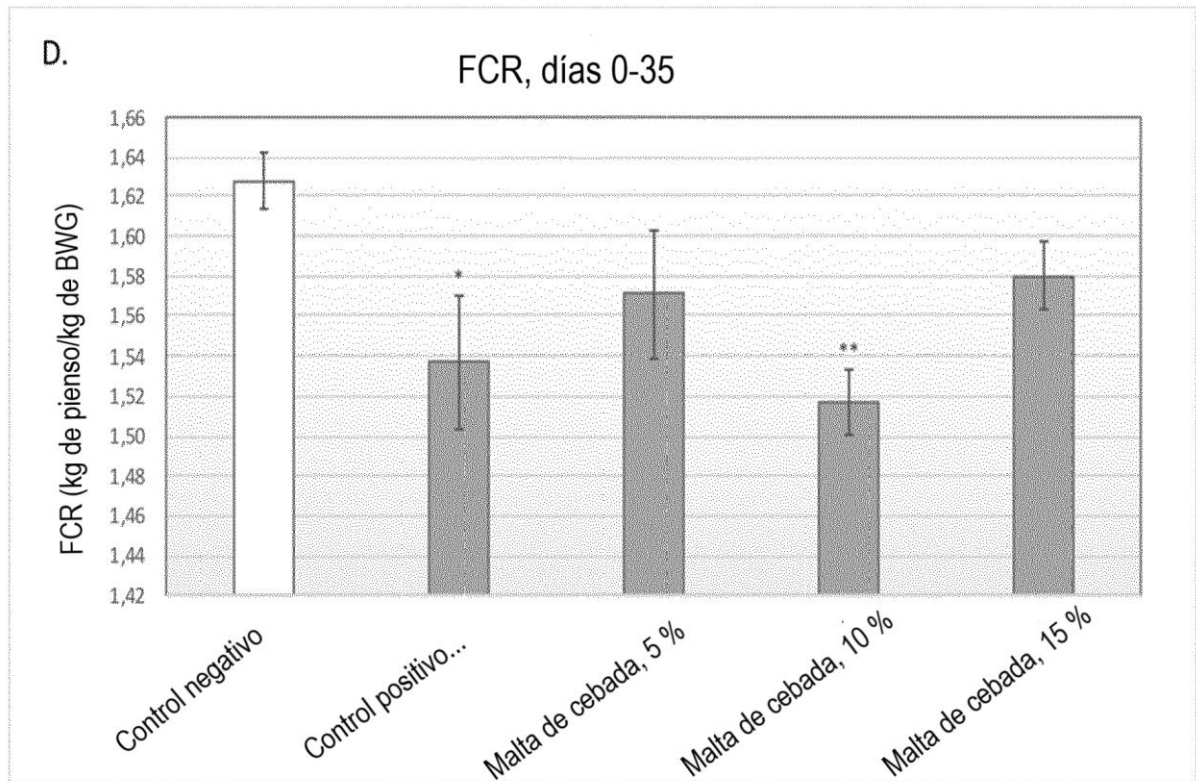


Figura 29D

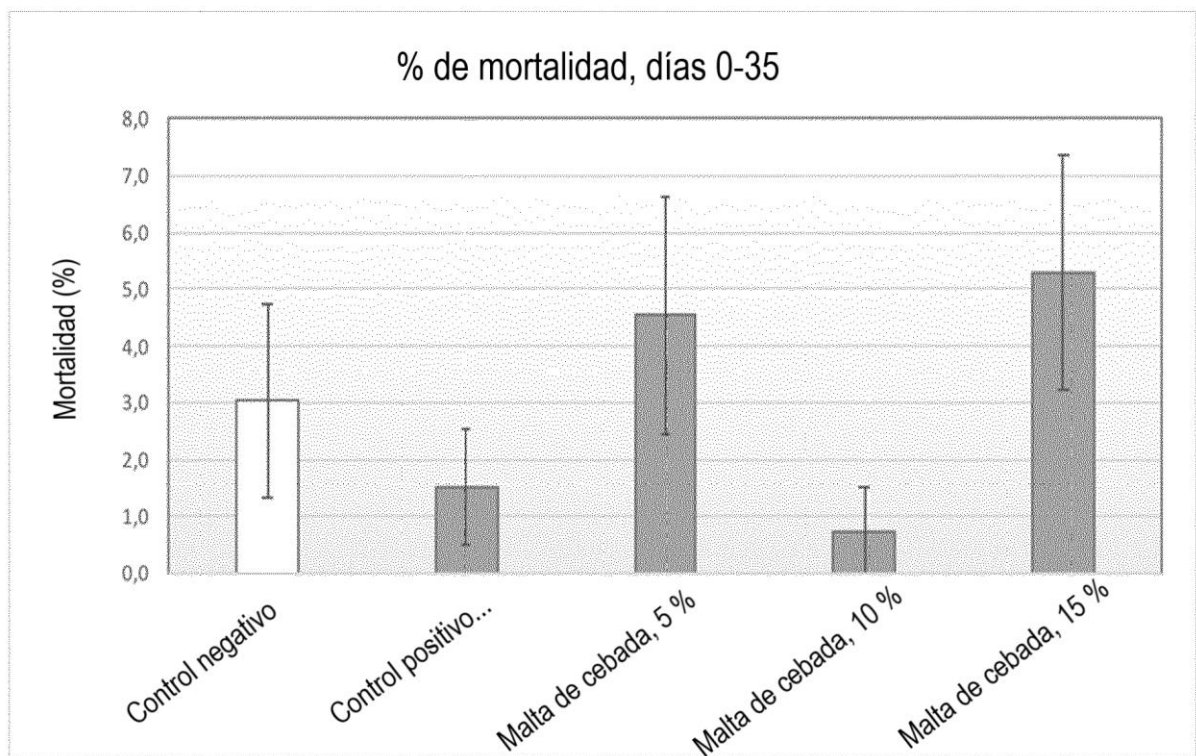


Figura 30

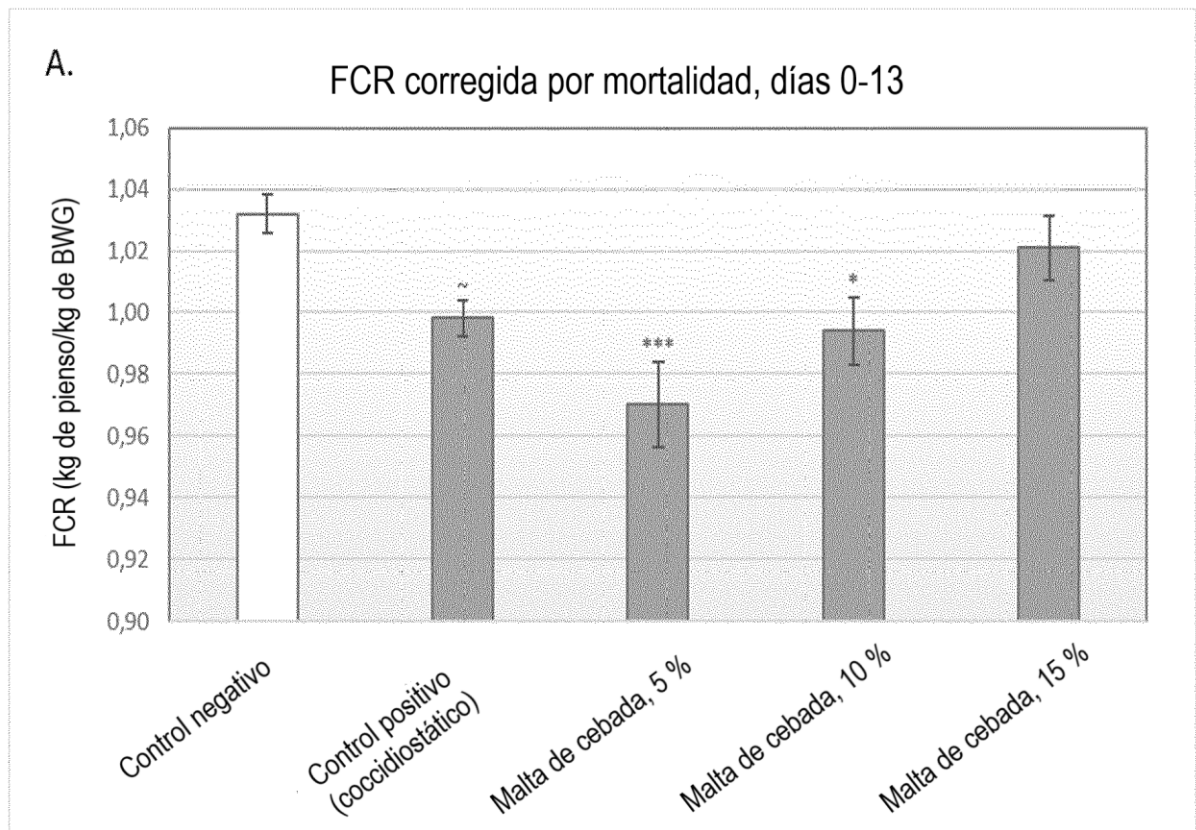


Figura 31A

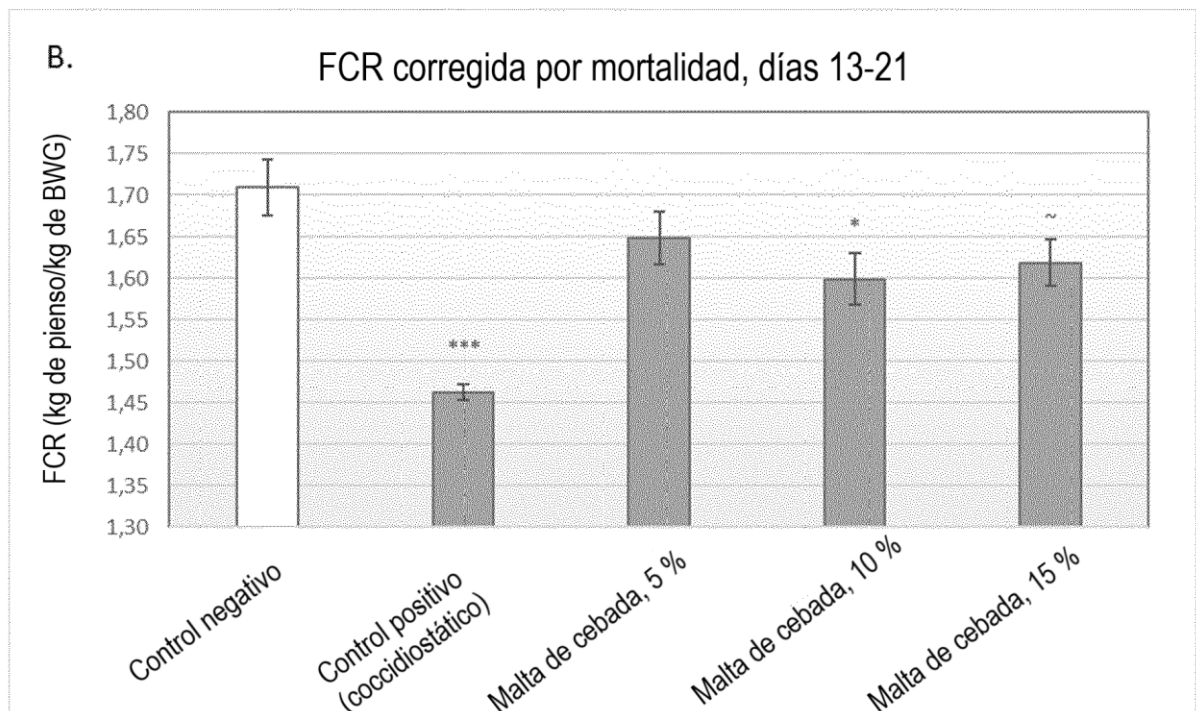


Figura 31B

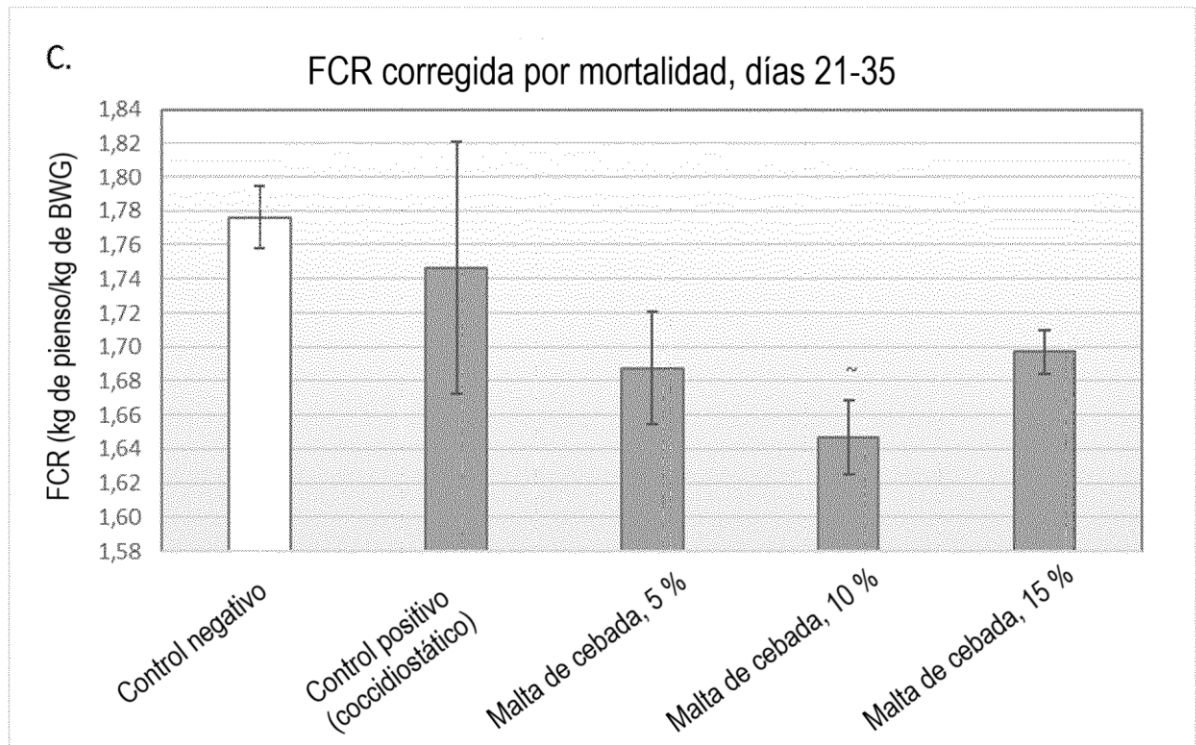


Figura 31C

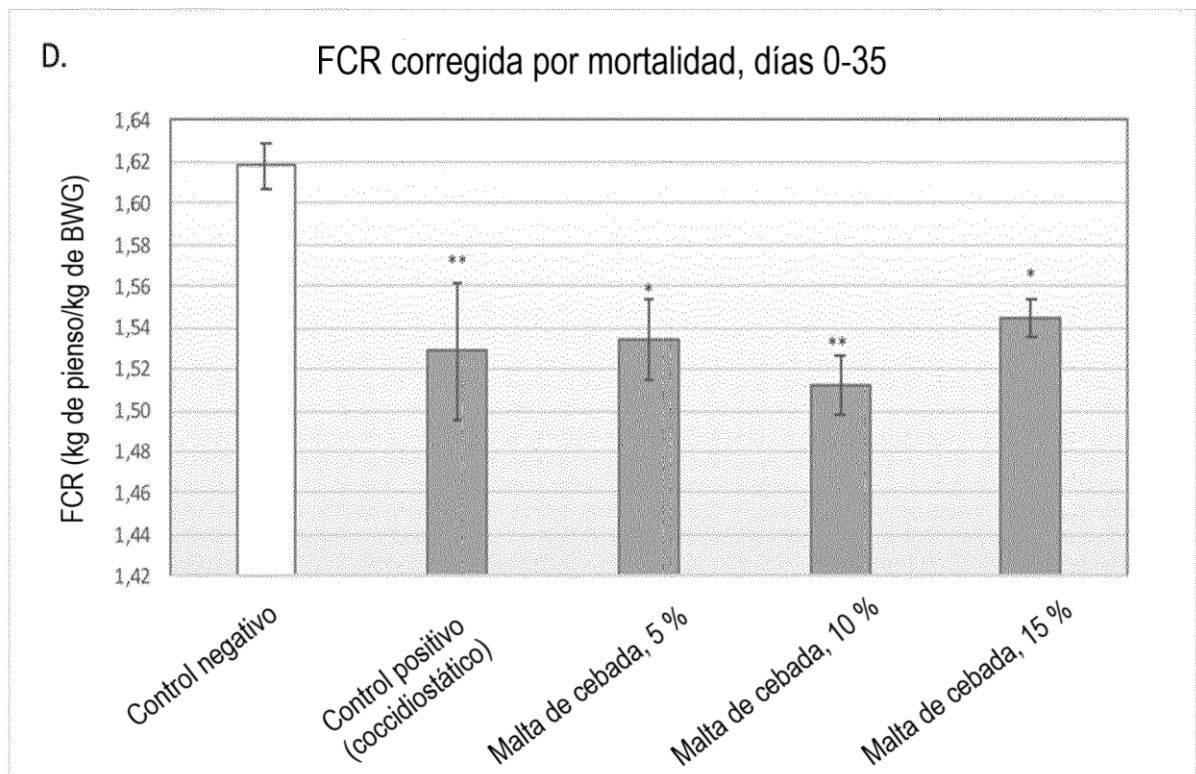


Figura 31D

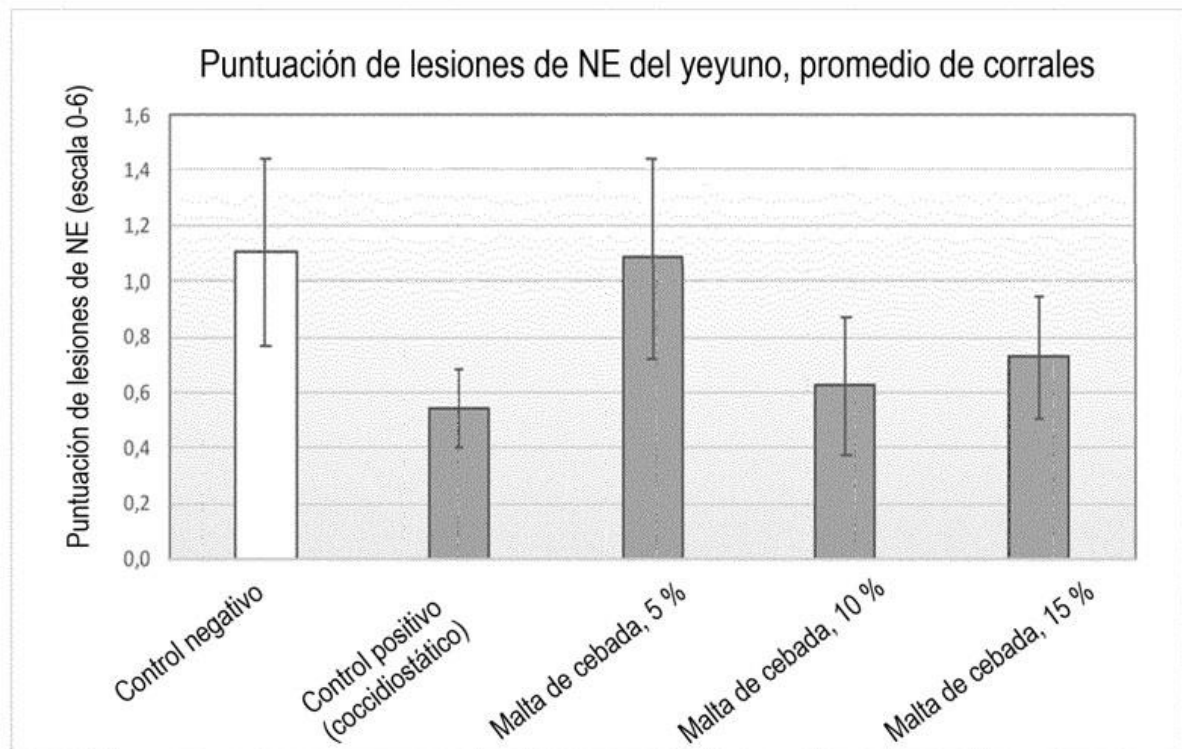


Figura 32

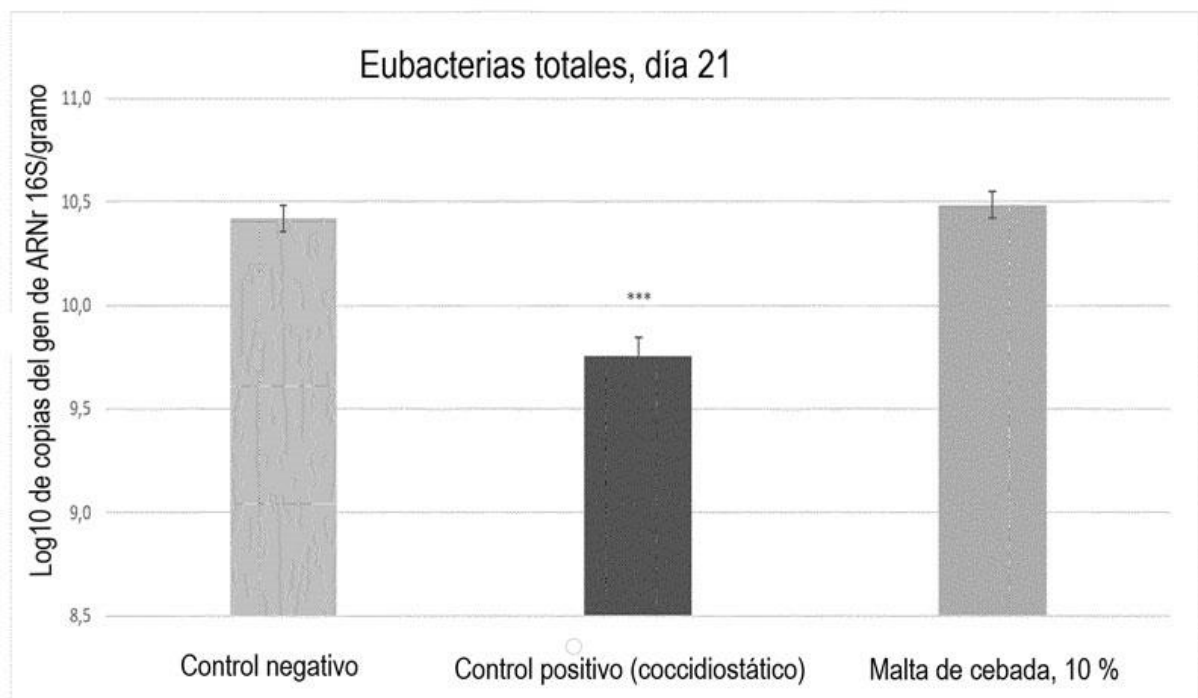


Figura 33

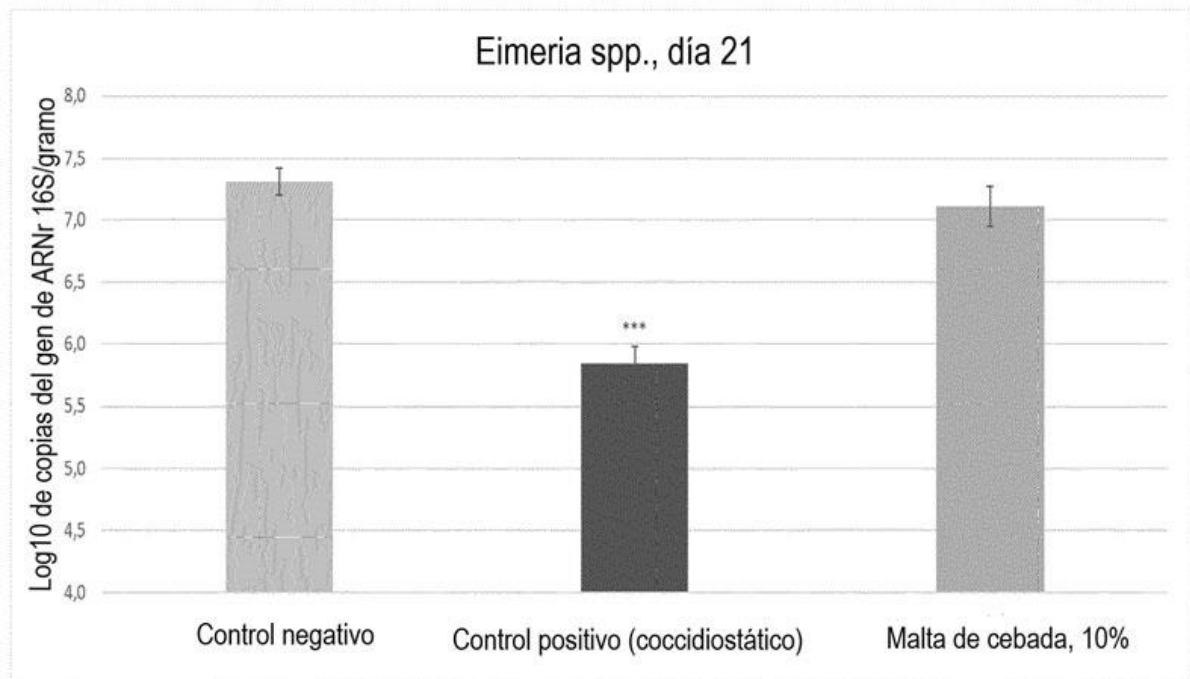


Figura 34

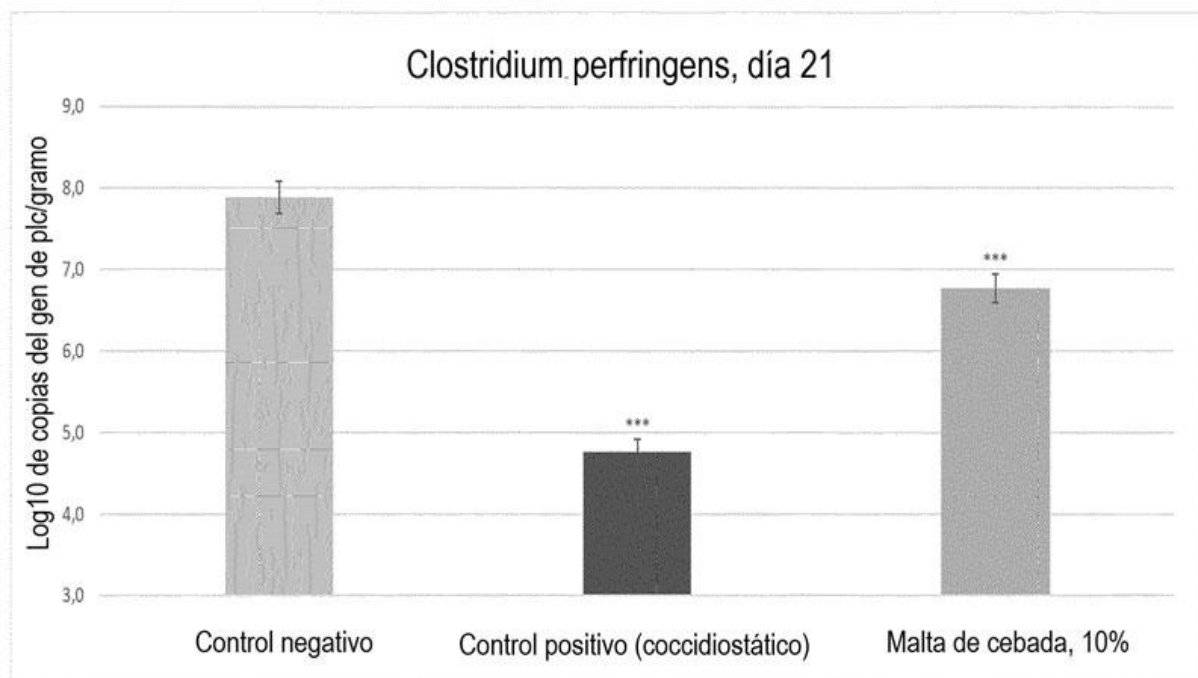


Figura 35

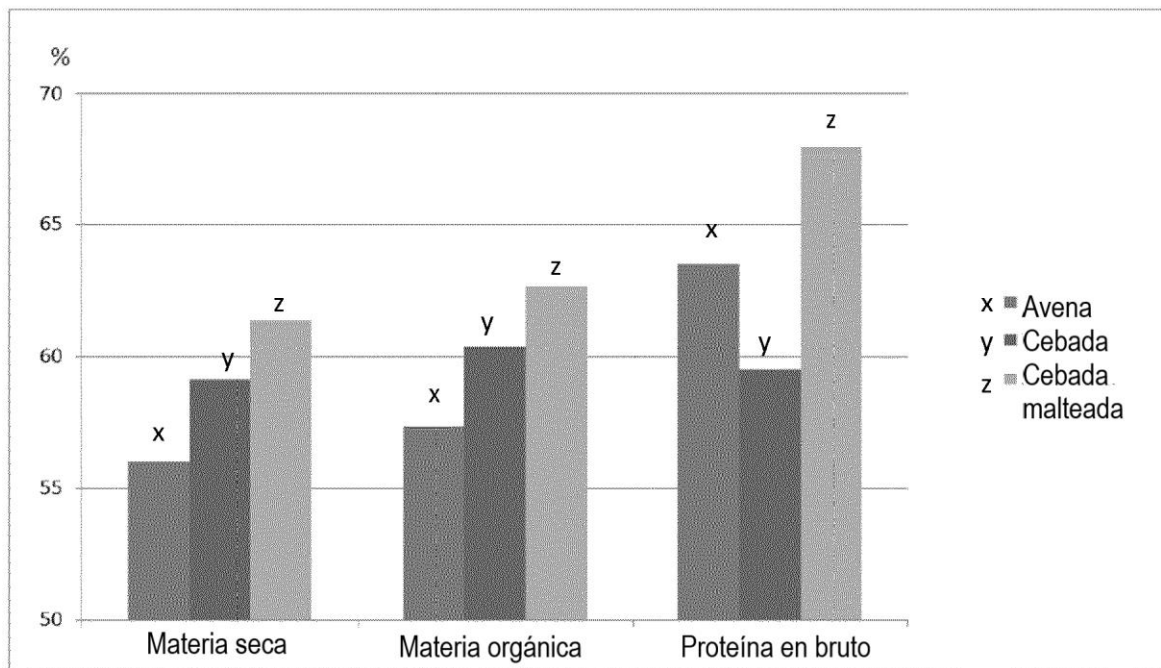


Figura 36

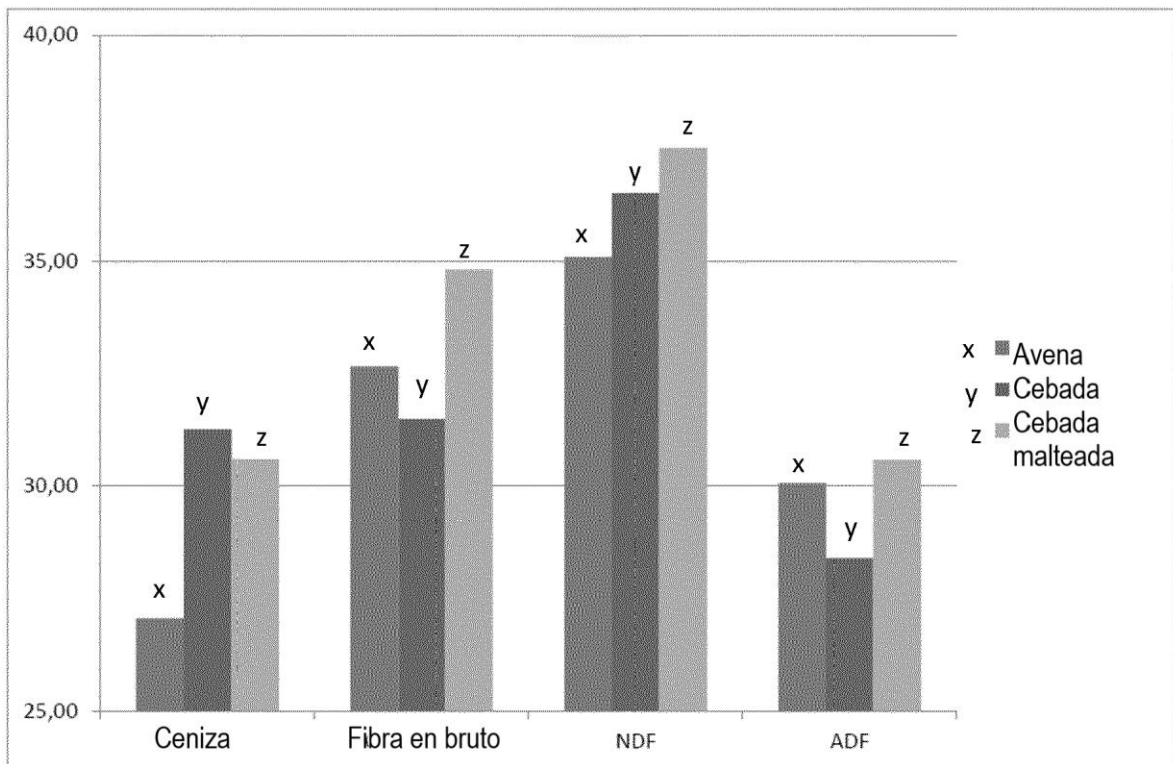


Figura 37

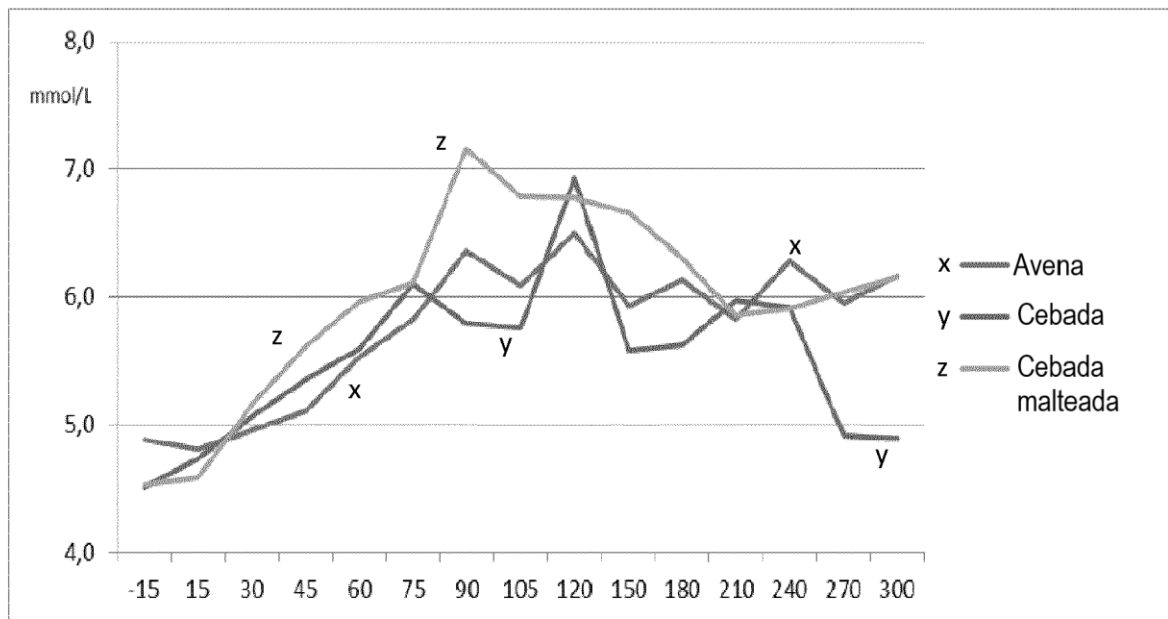


Figura 38

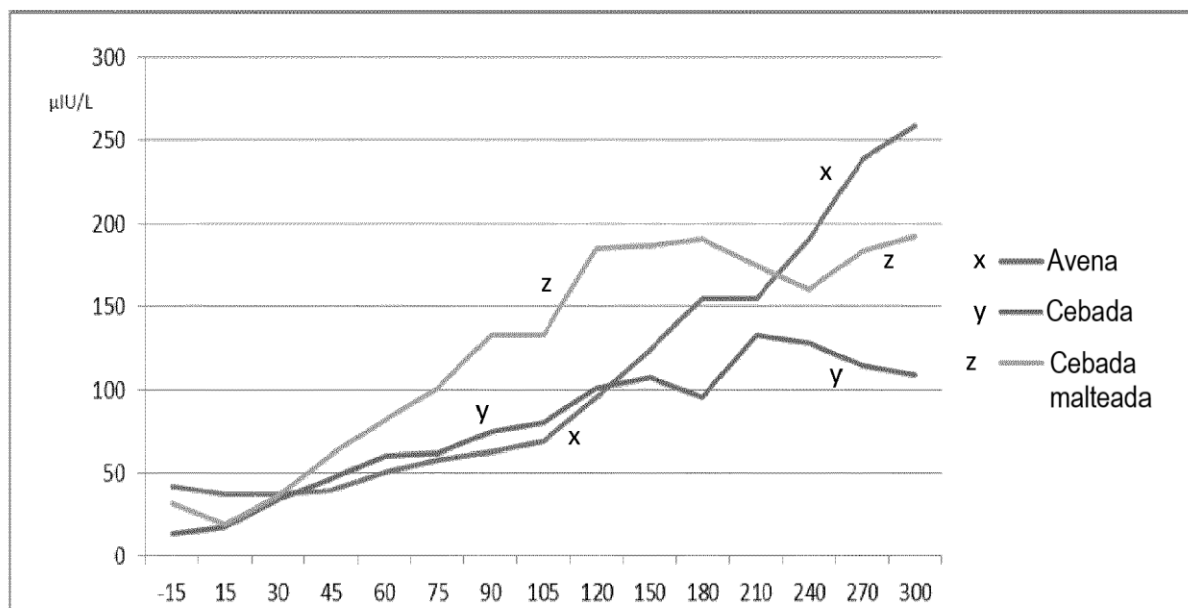


Figura 39

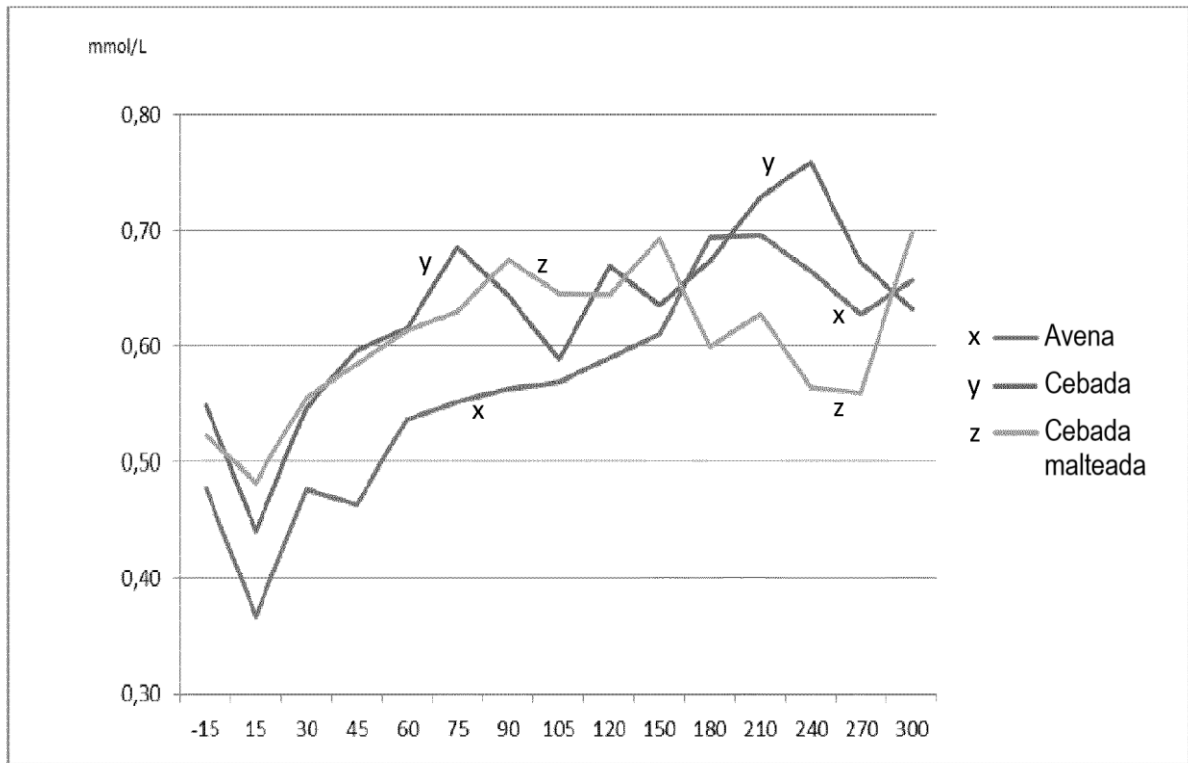


Figura 40