



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 319 095**

(51) Int. Cl.:

A23K 1/16 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

A61K 31/23 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **00938765 .5**

(96) Fecha de presentación : **06.06.2000**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1182939**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **06.03.2002**

(54) Título: **Uso combinado de triglicéridos que contienen ácidos grasos de cadena media y enzimas lipolíticas exógenas como suplementos alimentarios.**

(30) Prioridad: **07.06.1999 EP 99870120**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.05.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.05.2009

(73) Titular/es: **AVEVE N.V.**
Eugeen Meeusstraat 6
B-2170 Merksem, BE
Vitamex N.V.

(72) Inventor/es: **Decuypere, Jaak y**
Dierick, Noël

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

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

Uso combinado de triglicéridos que contienen ácidos grasos de cadena media y enzimas lipolíticas exógenas como suplementos alimentarios.

Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de triglicéridos (TG) que contienen ácidos grasos de cadena media (AGCM, C4 a C12), combinados con enzimas lipolíticas exógenas (esterasas o lipasas) como suplemento alimentario para animales, especialmente cerdos recién destetados, para prevenir y/o aliviar los problemas que se encuentran frecuentemente en este momento. Ésto da como resultado una marcada mejora de los rendimientos de crecimiento sin el uso de los aditivos alimentarios clásicos, pero rebatidos.

Antecedentes de la invención

El destete temprano (a las 3 a 4 semanas de edad) de lechones se ha convertido en una práctica general en los sistemas de crianza de cerdos para aumentar la productividad y mantener el aprovechamiento. Sin embargo, el destete temprano carga al lechón con muchas tensiones, principalmente de origen ambiental, nutricional e inmunológico, combinado con una depresión más o menos pronunciada de la ingesta de pienso y la movilización de las reservas corporales. La mala digestión y la mala absorción agravan a menudo la situación, dando como resultado molestias digestivas debidas al crecimiento bacteriano excesivo y/o infecciones víricas. Estos fenómenos interfieren en gran medida con la rentabilidad de la empresa. Existe un vasto cuerpo bibliográfico que trata estos temas (por ejemplo, VAN DER PEET, 1992; PARTRIDGE, 1993).

Los procedimientos actualmente usados para tratar estos problemas se dirigen a la adaptación del pienso a la capacidad digestiva del lechón, y/o a mejorar la aceptabilidad del pienso mediante el uso de ingredientes específicos (por ejemplo, leche en polvo y derivados, tales como suero y lactosa, suero sanguíneo en polvo, aromas), combinados o no con un aumento del contenido energético del pienso. Puede obtenerse un aumento del contenido energético, entre otros modos, incluyendo grasas fácilmente digeribles o metabolizables. La utilidad de los triglicéridos de cadena media (TGCM) en este contexto está bien documentada tanto en lechones neonatos (ODLE, 1999) como en lechones destetados (CERA y col., 1989). Las razones de la utilidad de los TGCM son su tasa digestiva y metabólica específica, revisada por BACH y BABAYAN (1982).

Las molestias digestivas se previenen y/o tratan suplementando el pienso con sustancias farmacéuticas antimicrobianas (antibióticos o sustancias quimioterapéuticas denominadas antibióticos en adelante). Los efectos combinados de las intervenciones anteriormente mencionadas dan como resultado en general una pronunciada mejora de los rendimientos de crecimiento (denominada "estímulo del crecimiento" en adelante). Este estímulo del crecimiento se debe principalmente, dependiendo de las circunstancias, a una ingesta de pienso mejorada combinada o no con una mejor conversión de pienso (= kg de pienso/kg de ganancia). Sin embargo, existe una creciente preocupación por el uso de antibióticos para el estímulo del crecimiento en sistemas de producción animal. Específicamente, existe un miedo bien fundado en el riesgo de emergencia de resistencia cruzada a algunos antibióticos de último recurso usados en medicina humana (CORPET, 1996; WEGENER y col., 1998). Por lo tanto, la mayoría de estos antibióticos (también denominados estimulantes del crecimiento) están ya prohibidos o lo estarán en el futuro próximo en la UE, lo que justifica la necesidad urgente de alternativas.

Debido a que existe la creencia general de que la patología digestiva en cerdo recién destetado está causada principalmente por bacterias gramnegativas (especialmente *E. coli*), y que las bacterias acidolácticas grampositivas (bifidobacterias, lactobacilos) tienen un efecto protector y/o antagonista contra ellas, las alternativas propuestas actualmente se seleccionan por su actividad anti-*E. coli*: por ejemplo, compuestos de cobre y cinc, ácidos orgánicos seleccionados (ácidos grasos de cadena corta (AGCC, ácido fórmico, acético, propiónico), láctico, fumárico, cítrico, málico, sórbico), probióticos (principalmente bacterias acidolácticas) y/o prebióticos (principalmente oligosacáridos bifidogénicos, denominados NDO). Los compuestos de Cu y/o Zn son eficaces pero no son aceptables debido a su efecto sobre el entorno (contaminación). Los resultados obtenidos con pro- y/o prebióticos son impredecibles y en general decepcionantes (CHESSON, 1994).

Existen problemas similares en otras especies animales y en animales de otros grupos de edad.

Sólo los AGCC y los ácidos orgánicos "clásicos" son las alternativas más prometedoras por el momento (ROTH y col., 1998). Sin embargo, son necesarias dosis bastante altas, de modo que su utilidad está limitada por su alto coste, su naturaleza corrosiva y su sabor desagradable que interfiere en gran medida con la ingesta de pienso de los lechones.

Los efectos antimicrobianos de los ácidos grasos (AG) en general y sus sales (jabones) son ya conocidos hace décadas. Se proporciona una reevaluación de los efectos antimicrobianos de AG seleccionados (y derivados) en la revisión de KABARA (1978). Se prestaba especial atención así al ácido láurico (C12, un miembro de la familia de AGCM) y derivados.

Datos bibliográficos adicionales conducen a concluir la contribución relativamente importante de los AGCM en los lípidos de la leche de ciertas especies animales (por ejemplo, conejo, cabra, caballo), mientras que en otras especies las concentraciones eran bajas o incluso nulas como en la leche de cerda (DIERICK, 1998, recopilación bibliográfica, comunicación personal). En la mayoría de los mamíferos, existe una actividad lipolítica preduodenal (=de origen no pancreático) más o menos pronunciada originada por secreciones linguales o gástricas. La actividad de estas lipasas es independiente de la presencia de colipasa y ácidos biliares, son activas y estables en un amplio intervalo de pH y tienen preferencia por AGCM en la grasa de la leche. La actividad lipasa preduodenal es alta en terneros prerrumiantes y conejos, moderada en lechones y ausente en aves de corral (MOREAU y col., 1988). Un exceso de AGCM puede tener importantes efectos secundarios: es más, hay datos de que pueden ser hipnóticos en cerdos recién nacidos (ODLE, 1999), y son un fuerte estímulo para CCK, una hormona intestinal con una pronunciada actividad saciante que podría interferir con la ingesta de pienso (LEPINE y col., 1989). Una menor ingesta de pienso podría ser también el resultado del fuerte olor (similar a cabra) y sabor desagradable de los AGCM libres, aunque los datos en este contexto son escasos y no concluyentes.

Por último, el documento EP 0.600.439 da a conocer que la supervivencia y crecimiento de lechones mejoran mediante la incorporación de grasas y aceites que comprenden triglicéridos de ácido graso de cadena media en su pienso líquido.

Resumen de la invención

La presente invención se dirige a proporcionar nuevos suplementos alimentarios para piensos animales, particularmente para cerdos recién destetados, que pueden reemplazar a los antibióticos usados habitualmente (y recurridos) y a otros potenciadores del crecimiento.

La presente invención se refiere a un suplemento alimentario o composición alimentaria en el que el suplemento alimentario es una premezcla de aditivos alimentarios (vitaminas, minerales, antibióticos, entre otros) con un portador para uso como parte (en general de 1 a 5%) de un alimento completo, y en el que la composición alimentaria es el listado completo de los diferentes ingredientes alimentarios usados en un pienso completo: otro término usado a menudo es "fórmula alimentaria".

La presente invención proporciona el uso de al menos un triglicérido (TG) que contiene ácidos grasos de cadena media (AGCM: C4 a C12) combinados con al menos una enzima lipolítica exógena (esterasa o lipasa) como suplemento alimentario para piensos animales, especialmente para cerdos destetados tempranamente, para prevenir y/o aliviar los problemas de alimentación que a menudo aparecen en ese momento. La adición de esta combinación de TG y enzimas lipolíticas exógenas al pienso sorprendentemente da como resultado un entorno fisiológico en el estómago que regula y estabiliza la microflora gastrointestinal. Este efecto, combinado con el hecho de que se proporciona una fuente de energía fácilmente digerible y metabolizable, sorprendentemente da como resultado una marcada mejora del crecimiento que es comparable con el estímulo del crecimiento obtenida con los antibióticos usados habitualmente (y recurridos) y otros potenciadores del crecimiento sin efectos secundarios negativos para el animal, la industria alimentaria y el consumidor.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 se refiere a los resultados obtenidos en el ejemplo 1 y presenta los AGCM liberados *in vitro* (expresados como g/100 g de TG) para los diferentes TG examinados (fig. 1.a. aceite de coco, fig. 1.b. TGCM1, fig. 1.c. TGCM2, fig. 1.d. grasa láctea) y las enzimas seleccionadas. Las enzimas, codificadas L1 a L6, se usaron en una dosis de 10.000 ppm basada en el TG. Se estudió la liberación de AG en medio tamponado a pH 2, 3, 4 y 5 como representativo de las condiciones de pH que prevalecen *in vivo* en el estómago.

La Fig. 2. se refiere a los resultados obtenidos en el ejemplo 2 y presenta los recuentos bacterianos totales y selectivos (expresados como $\log_{10}$ de unidades formadoras de colonias, UFC por g de contenidos recientes) en los contenidos del estómago de cerdos canulados. Las Fig. 2.a, 2.b. y 2.c. dan los resultados de los piensos con 5% de aceite de coco, TGCM1 y grasa láctea respectivamente. El primer componente de cada figura representa los resultados obtenidos sin enzimas lipolíticas, el segundo y tercer bloques, los resultados con la adición de L2 y L5 (1.000 ppm basada en el pienso) respectivamente. La primera barra es el recuento total, las barras siguientes son el número de lactobacilos, estreptococos y *E. coli*. Los resultados indican que, con cada TG, las enzimas causan la reducción del recuento total y del número de lactobacilos.

La Fig. 3 se refiere a los resultados del análisis de las fracciones grasas en los contenidos gástricos (en g/100 g de contenidos) de los cerdos canulados usados en el ejemplo 2. Se da la proporción de AG libre a AG total para los piensos con los diferentes AG usados sin enzima (V1: aceite de coco, V4: TGCM1; V7: grasa láctea) o con el suplemento de L2 o L5 (1000 ppm basada en el pienso). Los AG libres liberados sin enzimas son el resultado de la actividad de las lipasas preduodenales endógenas. Los resultados indican que las enzimas lipolíticas usadas potencian en gran medida la liberación de AG libres de cada TG ensayado.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al uso de al menos un triglicérido (TG) que contiene ácidos grasos de cadena media (AGCM) combinado con al menos una enzima lipolítica exógena (esterasa o lipasa) como suplemento alimentario para piensos animales para prevenir y/o aliviar los problemas que se encuentran frecuentemente en ese momento.

La presente invención se refiere por tanto también a una composición de suplemento alimentario que comprende al menos un triglicérido (TG) que contiene ácidos grasos de cadena media (AGCM) y al menos una enzima lipolítica exógena (esterasa o lipasa).

Los ácidos grasos de cadena media según la presente invención incluyen tanto ácidos grasos pares como impares, tales como ácidos grasos que contienen C4 (ácido butírico, ácido butanoico), C5 (ácido valérico), C6 (ácido caproico, ácido hexanoico), C7 (ácido heptanoico), C8 (ácido caprílico, ácido octanoico), C9 (ácido pelargónico), C10 (ácido cáprico, ácido decanoico), C11 (ácido undecanoico) o C12 (ácido láurico, ácido dodecanoico). El componente triglicérido con AGCM según la presente invención puede ser una composición que contiene triglicéridos de origen natural, tal como grasa láctea y aceite de coco. Como alternativa, dicho componente triglicérido puede comprender uno o más triglicéridos preparados industrialmente o una mezcla de triglicéridos de origen natural y preparados industrialmente. Dichos triglicéridos pueden prepararse mediante interesterificación de ácidos grasos de cadena C4 a C12.

Los ejemplos de sustancias de origen natural que son ricas en triglicéridos que contienen ácido graso de cadena media incluyen, pero sin limitación, aceite de coco, aceite de semilla de palma, aceite de babasú, aceite de palma corozo, aceite de teca, aceite de cufea derivado de semillas de planta, leche de especies de mamífero tales como leche de caballo, rata, cabra y conejo, o grasa láctea.

Los ejemplos de fuentes comerciales de triglicéridos estructurados que contienen ácido graso de cadena media sintetizados químicamente o preparados a medida incluyen, pero sin limitación, aquellos dados en la Tabla 10 o aquellos ejemplificados en la sección de materiales de los ejemplos.

El componente de enzima lipolítica según la presente invención puede comprender una lipasa o una esterasa, una mezcla de lipasas o una mezcla de esterases o una mezcla de lipasas y esterases. Dichas lipasas o esterases pueden ser de origen natural o prepararse industrialmente. Dichas enzimas lipolíticas pueden ser de origen microbiano, de mamífero o planta.

Los ejemplos de lipasas de planta comercialmente disponibles incluyen, pero sin limitación, lipasas de trigo, semilla de ricino, colza, mostaza y altramuz.

Los ejemplos de lipasas microbianas comercialmente disponibles incluyen, pero sin limitación, las lipasas dadas en la Tabla 11 o aquellas ejemplificadas en la sección de materiales de los ejemplos.

Los ejemplos de esterases comercialmente disponibles incluyen, pero sin limitación, esterasa pregástrica (EPG) de tejido sublingual de ternero, cabrito y cordero, cuajo en pasta de cuajar repleto de ternero, cabrito y cordero, esterasa de hígado de conejo o de hígado porcino.

Preferiblemente, dicho componente triglicérido según la invención como se define anteriormente se añade a una concentración de 0,25% a 10% al pienso.

Preferiblemente, dicho componente enzimático lipolítico se añade a una concentración de 100 a 10.000 ppm al pienso.

El uso de una composición de suplemento alimentario según la presente invención es preferiblemente como suplemento alimentario para piensos animales, particularmente para cerdos recién destetados. El uso de las composiciones de suplemento alimentario según la presente invención no excluye sin embargo el uso de dichas composiciones como suplemento alimentario para cerdos de otras categorías de edad o como suplemento alimentario para otros tipos de animales.

La presente invención se refiere también al uso de una combinación de al menos un TG de AGCM y al menos una enzima lipolítica según la presente invención para la preparación de un suplemento alimentario preferiblemente para lechones destetados tempranamente.

La presente invención se refiere también a procedimientos para la preparación de suplementos alimentarios según la presente invención que comprenden la etapa de mezclado de diferentes TG de AGCM y componentes de enzima lipolítica según la invención.

El mecanismo mediante el que los AGCC, AGCM y otros ácidos orgánicos ejercen actividades antimicrobianas está bien documentado en la bibliografía. La creencia actual es que los ácidos no disociados (RCOOH = no ionizados) son permeables a lípidos y de este modo pueden atravesar la membrana celular microbiana y disociarse ($\text{RCOOH} \rightarrow \text{RCOO}^- + \text{H}^+$) en el interior más alcalino del microorganismo. Esto causa la acidificación del pH intracelular por debajo de niveles permisibles para la supervivencia. En otras palabras, los ácidos orgánicos actúan como protonóforos que

aumentan la entrada de H^+ de modo que el flujo de salida no es suficientemente rápido para alcalinizar el citoplasma de nuevo. Las características fisicoquímicas de los ácidos orgánicos influyen en gran medida en su capacidad de actuar como protonóforos: (peso molecular, pK_a (constante de disociación), solubilidad). El entorno fisiológico en el que están presentes (especialmente el pH en las diferentes localizaciones del tracto gastrointestinal) es también un factor muy importante. Adicionalmente, el tipo de cubierta microbiana (principalmente peptidoglicano en bacterias grampositivas y lipopolisacárido en gramnegativas) influye en gran medida en el paso de los ácidos a través de la membrana.

En primer lugar, en experimentos preliminares *in vitro* en los que se ensayó en un amplio intervalo de ácidos orgánicos (AGCC, AGCM y otros ácidos orgánicos usados habitualmente en la industria de piensos y alimentos) su actividad antibacteriana contra las bacterias dominantes de la microflora del intestino delgado, los presentes inventores encontraron inesperadamente que los AGCC y los ácidos orgánicos usados habitualmente eran bacteriostáticos sólo a altas concentraciones (0,02 a 0,04 M) para la flora gramnegativa (y en menor extensión para los estreptococos). Sin embargo, con los AGCM se encontró una actividad bacteriostática y bactericida inesperadamente alta contra bacterias tanto grampositivas como gramnegativas. La actividad antibacteriana era dependiente del pH y mayor a pH menor, por tanto, cuando una proporción relativamente alta del AG estaba en la forma no disociada. En los mismos experimentos, se propuso una concentración bactericida mínima aproximada de 0,005 a 0,01 M.

Era también inesperado que usando una combinación de AGCM pudiera imitarse totalmente el espectro antibacteriano de los estimulantes de crecimiento antibióticos usados en la producción intensiva de animales.

Las características específicas de los TGCM como fuente de energía fácilmente disponible están bien documentadas. Su efecto beneficioso puede resumirse como sigue (BACH y BABAYAN, 1982):

- los TGCM se digieren, absorben y transportan rápidamente en trastornos en los que la digestión y absorción no son óptimas. Se observan a menudo mala digestión y mala absorción en lechones recién destetados, y se atribuyen a una caída brusca de la actividad de la mayoría de las enzimas digestivas. La deficiencia de enzimas lipolíticas poco después del destete es muy pronunciada.

- los TGCM se oxidan rápidamente en el organismo y son una fuente de energía abundante y rápidamente disponible. Sin embargo, los TGCM son cetogénicos lo que, cuando se dan dosis altas, puede tener efectos secundarios narcóticos. Este efecto secundario es ciertamente indeseable en lechones.

También es indeseable el efecto depresor sobre la ingesta voluntaria de pienso, por la activación de CCK. También es indeseable (por el productor y/o el animal) el fuerte olor desagradable de los AGCM libres que se evaporan con relativa facilidad.

Para obtener los efectos positivos y para evitar las características negativas de los AGCM, los inventores tuvieron la original idea de usar una combinación de un TG que contiene suficiente AGCM junto con una enzima lipolítica como suplemento alimentario, con la intención de que se pudiera liberar suficiente AGCM en el estómago para tener un efecto esterilizante, dando como resultado una carga bacteriana menor en el intestino delgado y previniendo molestias digestivas. Este efecto, combinado con la energía extra fácilmente disponible de los AGCM, y el suplemento de actividad lipasa natural en el estómago y el intestino superior por la(s) enzima(s) lipolítica(s) exógena(s), daba como resultado inesperadamente un estímulo del crecimiento que hacía innecesario el uso de antibióticos. La liberación y absorción graduales esperadas de los AGCM libres evitaba inesperadamente los efectos secundarios indeseados.

En resumen, la invención describe la composición de un suplemento alimentario natural promotora del crecimiento para uso en animales.

Los siguientes ejemplos y dibujos sirven para ilustrar la presente invención.

Ejemplos

Material

A modo de ejemplo, se eligieron las siguientes grasas (TG) para ilustrar la presente invención: grasa láctea, aceite de coco y dos fuentes comercialmente disponibles de TGCM: TGCM1 (Aldo MCT Kosher Food Grade) y TGCM2 (Stabilox-860), comercializados por LONZA Inc. (Fair Lawn, NJ 070410, EE.UU.) y LODERS-CROKLAAN BV (NL-1521 AZ Wormerveer) respectivamente. A modo de ejemplo, se eligieron las siguientes enzimas lipolíticas para ilustrar la presente invención: L1: lipozima 10.000L, NOVO Nordisk A/S, 2880 Bagsvaerd, Dinamarca; L2: lipasa 10.000P, Biocatalysts Ltd., CF37 5UT Pontypridd, Gales, R.U.; L3: TP 516P, Biocatalysts Ltd., CF37 5UT Pontypridd, Gales, R.U. L4: LIPOMOD 224P, Biocatalysts Ltd., CF37 5UT Pontypridd, Gales, R.U.; L5: lipasa de SAIKEN, NAGASE & Co, Chuo-ku, 103 Tokio, Japón; L6: lipasa de ITALASE C, SBI, Systems Bio-Industries, Inc., WI 53187-1609 Waukesha, EE.UU. Los códigos L1 a L6 se usarán en adelante. La selección de TG y enzimas lipolíticas descrita en estos ejemplos no excluye la utilidad potencial de otros TG y enzimas lipolíticas y combinaciones de los mismos con los fines descritos en esta invención.

ES 2 319 095 T3

Procedimientos para extracción y análisis de diferentes compuestos lipídicos

Se usó un procedimiento de extracción de lípido usando hexano/isopropanol (3/2, v/v) evitando cualquier etapa de evaporación de disolvente para prevenir cualquier pérdida de AGCM debida a su gran volatilidad.

Se usó la esterificación de AG catalizada por ácido (H_2SO_4) en el mismo medio de extracción con formación de ésteres de isopropilo (FAIPE) sin pérdida de ésteres más cortos o alteración de los AG poliinsaturados superiores. Los FAIPE aparecen en la fase superior del hexano.

Para el cálculo de la concentración, se usó cromatografía de GLC en una columna capilar cuantitativa (DB-225, 30 m, DI 0,25 mm, película de 0,25 μm) de FAIPE individuales usando 2 patrones internos (C9 usado para ácidos C4 a C12 y C17 usado para ácidos C14 a C18:3). Los coeficientes de variación de los factores de respuesta ascendían a 0,94% para C9 y a 2,51% para C17.

Se extrajo el AG libre individual del extracto lipídico con una resina de intercambio aniónico fuerte Amberlyst 26 antes de la esterificación en el mismo medio, y se analizó mediante GLC capilar. La recuperación media de AG libre añadido ascendía a 101,9%.

Ejemplo 1

Cribado in vitro de TG que contienen AGCM y enzimas lipolíticas para lipólisis a diferentes pH (simulación de las condiciones gástricas)

Se preparó una selección de las enzimas lipolíticas a ensayar, codificadas L1 a L6, que estaba basada en su disponibilidad comercial y un precio factible en establecimientos comerciales. Se seleccionaron los TG que contenían AGCM basándose en su contenido de AGCM específico en la grasa como se especifica en la Tabla 1.

TABLA 1

Concentración de AGCM (g/100 g de AG) en los TG seleccionados

	C4	C6	C8	C10	C12
Grasa láctea	3,4	2,1	1,2	2,6	3,0
Aceite de coco	0	0,7	8,5	6,2	48,8
TGCM1	0	2,8	69,1	27,7	0,4
TGCM2	0	0,2	57,5	42,3	0,0

Se realizaron incubaciones *in vitro* en condiciones tamponadas a diferentes pH: se usó un tampón de glicina para incubaciones a pH 2 y pH 3; se usó un tampón de acetato para incubaciones a pH 4 y pH 5. Se realizaron incubaciones durante 180 min a 37°C en un baño de agua agitado. Los parámetros usados para las incubaciones se eligieron para simular lo más estrechamente posible las condiciones *in vivo* en los contenidos gástricos. El medio usado para las incubaciones estaba compuesto por los siguientes ingredientes: 0,250 g del TG seleccionado + 2,250 g de un pienso sintético (basado en almidón, dextrosa, caseína y una premezcla de vitamina-mineral) + 10 de disolución tampón + 0,5 ml de disolución de pepsina (50 mg en 100 ml de agua destilada) + 10.000 mg/kg de grasa (=ppm) de la preparación de enzima lipolítica comercial seleccionada. En caso necesario, se fundió la grasa, de otro modo, no hubo preparaciones especiales (dispersión o emulsión) de la grasa.

Se dan los resultados de las incubaciones en las figuras 1a a 1d, que presentan el AGCM liberado en g/100 g de TG para los diferentes TG examinados. La actividad hidrolítica era máxima a pH 3 a 5 con cada una de las enzimas, lo que se ajusta bien al pH existente normalmente *in vivo* en el estómago de cerdos. La cantidad de AGCM libre liberado parece depender de la cantidad presente en la fuente original de TG. La cantidad de ACGM liberado era de $\pm 3,5\%$ con aceite de coco, 10-15% con los dos TGCM y de $\pm 0,5\%$ con grasa láctea.

Ejemplo 2

Experimento in vivo con cerdos con canulación gástrica para el estudio de la liberación in situ de AGCM por enzimas lipolíticas endógenas y exógenas

Se prepararon tres cerdos (Belgian Landrace, de estrés negativo, hembras) con un peso inicial de $\pm 8,5$ kg con una cánula gástrica usando la técnica de DECUYPERE y col. (1977). Se dispusieron las cánulas a la mitad de la curvatura mayor de la región fúndica.

ES 2 319 095 T3

Se seleccionaron 3 TG (aceite de coco, TGCM1 y grasa láctea cada uno) y 2 lipasas (L2 y L5) para el presente experimento.

Se prepararon 9 piensos usando un 95% de pienso comercial para lechones y 5% de los TG seleccionados (dado el caso fundidos) suplementados o no con las lipasas seleccionadas (véase la Tabla 2 para los códigos usados en adelante). Se vertieron simplemente las grasas sobre la comida y se mezclaron concienzudamente en un mezclador horizontal. La concentración de las lipasas era de 1.000 ppm de la preparación comercial en el pienso.

TABLA 2

Piensos usados en el experimento 2

Aceite de coco:

V1: 95% de pienso de lechón + 5% de aceite de coco

V2: ídem + 1000 ppm de L2

V3: ídem + 1000 ppm de L5

TGCM1:

V1: 95% de pienso de lechón + 5% de TGCM1

V2: ídem + 1000 ppm de L2

V3: ídem + 1000 ppm de L5

Grasa láctea:

V1: 95% de pienso de lechón + 5% de grasa láctea

V2: ídem + 1000 ppm de L2

V3: ídem + 1000 ppm de L5

La composición del pienso de lechones estaba basada en maíz, cebada, suero ácido seco, mandioca, harina de arenque, aceite de soja y se suplementó con una premezcla de vitamina-mineral. El pienso no contenía suplementos estimulantes del crecimiento. El análisis aproximado de los piensos (V1, V4 y V7) en % de lo dado era: DM: 90,6, 90,7 y 90,8; cenizas totales: 7,8, 7,9 y 8,5; proteína bruta: 15,1, 15,4 y 14,8; grasa bruta: 8,5, 8,3 y 8,3.

Se dio el pienso seco, en tres comidas iguales (a las 9, 13 y 17 h), al 85% de la ingesta voluntaria de cerdos con un peso comparable.

El experimento tenía un diseño de cuadrado latino de 3 x 3.

El experimento tuvo un transcurso exitoso. No hubo problemas de salud ni rechazos del pienso. Se hicieron las estadísticas usando ANOVA (1997), las diferencias eran de $p < 0,01$ a $p < 0,05$ (**) o $p < 0,1$ (*).

Se realizó el muestreo de los contenidos gástricos para análisis químico dos días consecutivos, dos veces al día, 30 min después de la comida de las 9 h y de las 13 h. Se midió directamente el pH, después de ello se almacenaron las muestras a -20°C hasta análisis adicional.

Se realizó el muestreo de los contenidos gástricos para análisis bacteriológico durante 1 día, 90 min después de la comida de las 9 h y las 13 h. Se hicieron los recuentos bacterianos usando la técnica de VAN DER HEYDE y col. (1964). Los medios usados (todos de OXOID, R.U.) eran agar de RCM + hemina para recuento total (48 h, anaeróbico), agar de Rogosa para lactobacilos (48 h, anaeróbico), agar de Slanetz & Bartley para estreptococos fecales (24 h, aeróbico) y agar de EMB para *E. coli* (24 h, aeróbico). Todas las incubaciones fueron a 37°C. Los resultados se expresan como log₁₀ de UFC/g de contenidos recientes (unidades formadoras de colonias).

ES 2 319 095 T3

Los resultados del experimento pueden resumirse como sigue:

El pH de los contenidos del estómago medido a los 30 y 90 min después de la alimentación no difería entre los tratamientos (piensos) y estaba en el intervalo entre 4,2 y 5,01. Ésto está dentro del intervalo óptimo de actividad lipolítica de L2 y L5, como se encontró en el primer experimento.

Se presentan en la Tabla 3 y la Fig. 2 los resultados de los recuentos bacteriológicos.

TABLA 3

Recuentos bacteriológicos en los contenidos gástricos de lechones alimentados con las dietas 1 a 9 ($\log_{10}$ de UFC/g de contenidos recientes: media $\pm$ de) (n = 6)

	Total	Lacto- bacilos	Estrepto-cocos	<i>E. coli</i>
Aceite de coco				
V1	6,4 $\pm$ 0,8	6,0 $\pm$ 0,8	4,3 $\pm$ 1,0	2,3 $\pm$ 1,2
V2	5,2 $\pm$ 0,3**	5,0 $\pm$ 0,3**	4,1 $\pm$ 0,6	2,4 $\pm$ 1,4
V3	5,3 $\pm$ 0,6**	4,9 $\pm$ 0,7**	2,7 $\pm$ 1,6*	2,6 $\pm$ 2,1
TGCM1				
V4	6,1 $\pm$ 0,2	5,7 $\pm$ 0,5	5,2 $\pm$ 0,4	2,9 $\pm$ 1,6
V5	4,2 $\pm$ 0,5**	3,7 $\pm$ 0,5**	0,0**	1,0 $\pm$ 1,5**
V6	3,4 $\pm$ 1,7**	2,7 $\pm$ 1,4**	0,5 $\pm$ 1,2**	0,5 $\pm$ 1,2**
Grasa láctea				
V7	6,4 $\pm$ 0,4	5,7 $\pm$ 0,8	5,0 $\pm$ 0,6	4,1 $\pm$ 0,5
V8	5,6 $\pm$ 0,9*	5,5 $\pm$ 0,3	4,0 $\pm$ 0,7*	3,4 $\pm$ 0,1*
V9	5,7 $\pm$ 0,5*	5,5 $\pm$ 0,5	4,0 $\pm$ 0,7*	4,5 $\pm$ 1,4
*, **: diferencias por TG en la columna				

Los resultados más importantes son:

- con aceite de coco, tanto L2 como L5 redujeron 10 veces el recuento total y el número de lactobacilos,

- con TGCM1, ambas enzimas tenían un efecto muy pronunciado (en general $p < 0,001$) y reducían el recuento total y de lactobacilos por un factor de 100 a 1.000; los estreptococos y *E. coli* se reducían en general a niveles no detectables,

- con grasa láctea, había una reducción de 10 veces del recuento total y del número de estreptococos.

Los resultados permiten la conclusión de que la combinación de un TG que contiene AGCM y una enzima lipolítica en el pienso es capaz de suprimir el recuento bacteriano total y la flora dominante. Este efecto es debido lo más probablemente a la liberación de AGCM libres de los TG usados.

Se confirmó esta afirmación mediante el análisis químico de las diferentes fracciones de grasa en los contenidos gástricos recogidos durante el presente experimento. Se dan los resultados de los análisis en la Fig. 3, en la que se presentan la cantidad de AG totales y libres por 100 g de contenidos gástricos recientes.

Se dan en la Tabla 4 los resultados expresados como g de AG libre por 100 g de AG total en los contenidos del estómago, o en otras palabras el grado (%) de hidrólisis del TG.

ES 2 319 095 T3

TABLA 4

Grado de hidrólisis (g de AG libre/100 g de AG totales en contenidos gástricos recientes) de los diferentes TG usados en el presente experimento influido por L2 o L5

5

	Control	+L2	+L5
Aceite de coco	V1	V2	V3
10	16,5	43,2	44,8
TGCM1	V4	V5	V6
	18,9	58,5	60,9
15	Grasa láctea	V7	V8
	16,8	46,8	45,8

20

Los resultados para los AG individuales (no dados aquí) indicaron que no había una liberación preferida de AG específicos; en otras palabras, la liberación de AG individuales es aproximadamente proporcional a su contenido en el TG usado. A partir de los resultados presentados en la Fig. 3 y la Tabla 1, puede concluirse que la actividad lipolítica endógena en el estómago de los lechones hidroliza ~16-19% de los TG. La adición de enzimas lipolíticas exógenas aumenta la hidrólisis aproximadamente tres veces.

25

Es sorprendente e inesperado que la liberación de AGCM vaya paralela con el grado de supresión de la carga bacteriana en el estómago: se observó la supresión más eficaz con la combinación TGCM1 + L5, que causaba un 60,9% de hidrólisis del TG en el estómago (correspondiente a una concentración de ~1% de AG libre y 0,6% de AGCM), seguido de aceite de coco + L5 (0,8% de ácidos AG y 0,3% de AGCM) y grasa láctea + L5 (0,8% de AG libres y 0,06% de AGCM).

30

Ejemplo 3

35

Experimento zootécnico en establecimientos comerciales: rendimiento de crecimiento combinado con observaciones ex vivo de los contenidos gástricos

40

El objetivo de este experimento era comprobar si el concepto anteriormente mencionado era aplicable y adecuado en instalaciones comerciales y comprobar, cuando se obtenía un estímulo del crecimiento, si ésta era comparable con el estímulo del crecimiento obtenida en lechones destetados tempranamente con antibióticos o una combinación de ácidos orgánicos de eficacia probada.

45

Para este experimento, se dividieron 244 lechones recién destetados (híbrido Seghers F1, peso inicial $\pm 6,5$ kg) según la camada, sexo y peso en 4 grupos: A: 68; B = 61; C = 60 y D = 55 lechones. Se realizó el experimento en establecimientos comerciales en instalaciones de temperatura controlada.

50

La composición de los piensos estaba basada en cebada, trigo, copos de maíz, maíz extrudido, soja extrudida, harina de soja, harina de arenque, 2,5% de TG y una premezcla comercial (basada principalmente en productos lácteos, vitaminas + minerales) para lechones destetados tempranamente (12,5%). Los tratamientos (A a D) diferían en los TG usados y en los aditivos usados (véase la Tabla 5). Los piensos no contenían antibióticos estimulantes del crecimiento. El pienso A era un control negativo, el pienso D un control positivo que contenía una mezcla de ácidos orgánicos usados habitualmente. Se normalizó el análisis aproximado calculado de los piensos usados. Los contenidos formulados eran (% de reciente): DM: 900 a 88,8, proteína bruta: 18,7 a 18,9, grasa bruta: 6,9, cenizas totales: 5,1-5,3. El contenido de energía era (Nef97): 2463-2475 kcal/kg, los aminoácidos digeribles en el íleon se fijaron a: Lys: 1,07%, Met + Cys: 0,65, Thr: 0,66, Trp 0,19.

55

60

65

ES 2 319 095 T3

TABLA 5

Tratamientos usados en el experimento zootécnico

5	Tratamiento	A	B	C	D
	TG (2,5%)	Aceite de soja	TGCM2*	TGCM2	Aceite de soja
10	Lipasa (L5)	-	-	1000 ppm**	-
	Suplemento de ácidos orgánicos***	-	-	-	1,5%
15	* Se seleccionó el TGCM2 según la disponibilidad comercial				
	** Basado en pienso reciente				
20	*** 0,25% de ácido cítrico + 0,75% de ácido fumárico, 0,5% de formiato de sodio (como se especifica por el fabricante del pienso)				

Se preparó el pienso por una compañía de piensos comerciales, que usó un equipamiento de pulverización para grasas y otros suplementos líquidos. Se ofreció seco el pienso, a voluntad; el agua estaba continuamente disponible a través de una tetilla. El experimento duró 3 semanas. Se pesaron individualmente los lechones al inicio del experimento y semanalmente después de ello; se registró diariamente la ingesta de pienso para dos corrales (tolva de alimentación conjunta de dos corrales con ± 15 lechones cada uno). Por lo tanto, sólo pudieron hacerse estadísticas de los pesos. Se comprobó diariamente la condición sanitaria visual de los cerdos por corral y se codificó en una escala de 0 (extremadamente mala) a 10 (excelente).

Se presentan en la Tabla 6 los resultados zootécnicos semanalmente.

TABLA 6

Rendimientos zootécnicos de los lechones influidos por los tratamientos (media $\pm$ de)

35	Tratamiento	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 1 a 3	% del control
40	Ingesta de pienso (g/d)					
	Pienso A	156	365	472	331	100
	Pienso B	191	376	536	368	111
	Pienso C	180	391	533	361	110
45	Pienso D	189	355	469	338	102
	Crecimiento diario (g/d)					
	Pienso A	127 $\pm$ 57	127 $\pm$ 57	300 $\pm$ 133	185 $\pm$ 81	100
50	Pienso B	164 $\pm$ 73**	160 $\pm$ 70**	301 $\pm$ 144	208 $\pm$ 95*	111
	Pienso C	165 $\pm$ 90**	161 $\pm$ 88**	297 $\pm$ 173	207 $\pm$ 116*	111
	Pienso D	141 $\pm$ 81**	123 $\pm$ 73	280 $\pm$ 111	181 $\pm$ 71	98
55	Conversión de pienso (kg de pienso/kg de crecimiento)					
	Pienso A	1,23	2,88	1,57	1,79	100
	Pienso B	1,16	2,35	1,78	1,77	99
	Pienso C	1,09	2,43	1,79	1,74	97
60	Pienso D	1,34	2,89	1,68	1,87	104

La puntuación sanitaria visual (no dada en detalle) estaba en el intervalo entre 4 y 9 en el tratamiento A; para los otros tratamientos, el intervalo era de 8 a 9 sin diferencias marcadas.

65 El crecimiento diario no difería entre el tratamiento A y D y entre B y C. Se obtuvieron las diferencias más pronunciadas en las primeras dos semanas después del destete, durante las cuales se obtuvo el mejor rendimiento de crecimiento (más de $\pm 30\%$ por encima del control) con el tratamiento B y C. Los mejores resultados obtenidos con los piensos B y C (TGCM2 con o sin lipasa) son debidos a un aumento de la ingesta de pienso. Sin embargo, la mejor

ES 2 319 095 T3

conversión de pienso se obtuvo con el pienso que contenía TGCM2 + lipasa. La mejora del crecimiento usando una combinación de TG de AGCM (TGCM2) y una lipasa era del mismo orden que la obtenida con quinoxalinas (aditivos con espectro tanto grampositivo como gramnegativo) (Decuypere, metanálisis de los datos bibliográficos, resultados no publicados).

Dos semanas después del destete, se sacrificaron 5 cerdos castrados. Debido a que los cerdos se alimentaron a voluntad, no había control de la ingesta de pienso. Después de la disección del tracto gastrointestinal, se tomaron muestras del estómago y del intestino delgado superior (duodeno). Se analizaron química y bacteriológicamente las muestras del mismo modo que se explicaba en el experimento anterior. Sólo se reseña aquí el recuento anaeróbico total.

El pH de los contenidos gástricos era de $\pm 3,5$ y $\pm 5,7$ en el duodeno; no había diferencias entre los tratamientos. Se reseñan los recuentos anaeróbicos totales en la Tabla 7.

TABLA 7

Recuento anaeróbico total ($\log_{10}$ de UFC/g contenidos recientes $\pm$ de) en el estómago e intestino delgado superior de lechones, dos semanas después del destete, influido por los diferentes tratamientos (n = 5)

Tratamiento	Estómago	Duodeno
A	7,0 $\pm$ 0,2	6,4 $\pm$ 0,5
B	7,0 $\pm$ 0,2	6,1 $\pm$ 0,8
C	5,9 $\pm$ 0,5**	5,6 $\pm$ 0,5**
D	6,9 $\pm$ 0,2	5,9 $\pm$ 0,4

Los resultados indican que el pienso con la combinación de TG de AGCM (TGCM2) y lipasa (L5) causaba una supresión significativa de ± 10 veces de la carga bacteriológica, tanto en el estómago como en el intestino superior. Que el efecto fuera algo menor que en el experimento previo con los cerdos con canulación gástrica podría deberse a la menor cantidad de TGCM usada en el presente experimento (2,5% frente a 5%) y/o a procedimientos de alimentación y muestreo diferentes. No obstante, el presente experimento confirmó los resultados obtenidos en el cerdo canulado reseñados en el ejemplo 3. Lo mismo puede afirmarse para los resultados de los análisis de las diferentes fracciones de grasa (g/100 g de contenidos recientes) y del grado de hidrólisis (g de AG libre/100 g de AG totales) en los contenidos gástricos que se dan en la Tabla 8.

TABLA 8

Concentraciones de AG libres y AG totales en los contenidos gástricos (g/ 100 g de contenidos recientes, media $\pm$ de) y grado de hidrólisis (AG libres/AG totales en %) influidas por los tratamientos en cerdos dos semanas después del destete (n = 5)

Tratamiento	A	B	C	D
AG libres	0,28 $\pm$ 0,06	0,44 $\pm$ 0,10	0,95 $\pm$ 0,22	0,31 $\pm$ 0,09
AG totales	1,05 $\pm$ 0,08	1,25 $\pm$ 0,22	1,35 $\pm$ 0,28	1,07 $\pm$ 0,17
% de hidrólisis	26,7	35,2	70,4	28,9

A partir de los resultados para el % de hidrólisis puede calcularse que, para el pienso B (TGCM2) y C (TGCM2 + L5) respectivamente, están presentes 0,3 y 0,4% de AGCM libres en el estómago. En el experimento con los cerdos canulados, se obtuvieron las mayores concentraciones de AGCM libres (y la inhibición más fuerte de la carga bacteriana, ± 100 veces) con TGCM1 + L5 y aceite de coco + L5, 0,60 y 0,30%, respectivamente.

Los resultados combinados del experimento 2 y 3 indican claramente que existe una correlación entre la cantidad de AGCM libres liberados y el efecto inhibidor sobre la flora gástrica.

Ejemplo 4

Evaluación in vitro de la combinación óptima de diferentes concentraciones de TGCM con diferentes dosis de una enzima lipolítica seleccionada

Se estableció el siguiente experimento *in vitro* debido a que en opinión de los inventores el estímulo del crecimiento está relacionado con y es proporcional a la inhibición de la carga bacteriana total en el intestino delgado, en el que se usó una combinación aproximadamente óptima del contenido de un TG que contiene AGCM (TGCM1, TGCM2 y aceite de coco) y una lipasa eficaz probada (L5).

ES 2 319 095 T3

Se usaron 4 concentraciones de TG: 0, 2,5, 5 y 10%; para cada concentración de TG, se incorporó la lipasa (L5) a 10.000, 1.000 o 100 ppm. El medio contenía también 2,5 g por matraz de incubación del mismo pienso sintético (basado en almidón, dextrosa, caseína y una premezcla de vitamina-mineral) que se usó en el experimento 1. Sin embargo, en el presente experimento, se dispersó el TG (usando goma arábica y goma de tragacanto) antes de añadir al medio. Se realizaron las incubaciones a pH 5 usando un tampón acetato apropiado. Finalmente, se inoculó el medio (15 ml) con 1 ml de una suspensión de bacterias originadas en los contenidos ileales de dos cerdos canulados alimentados con una dieta sin aditivos estimulantes del crecimiento. Se realizaron las incubaciones durante 180 min a 37°C en un baño de agua agitada. Todas las incubaciones se realizaron por duplicado.

Los procedimientos para el análisis de grasas y recuentos bacterianos fueron los mismos que se usaron en experimentos anteriores. Sólo se reseña aquí el recuento anaeróbico total. Debido a que se esperaba una relación entre la actividad antibacteriana y el peso molecular del AG, los resultados de los ácidos grasos libres se expresaron también en moles. Los resultados se dan en la Tabla 9.

TABLA 9

Relación entre la liberación in vitro de ácidos grasos libres (% en g o moles en el medio) y el recuento anaeróbico total (log₁₀ de UFC/ml de medio) con diferentes TG (TGCM1, TGCM2 y aceite de coco) y diferentes dosis (10.000, 1.000 y 100 ppm) de una enzima lipolítica (L5)

	AG libres	AG totales	Recuento total
	% en g	M	log ₁₀ UFC/ml
TGCM1			
Inicio	0	0	6,2
180 min, control	0	0	6,8
180 min, 10.000 ppm L5			
2,5% de TGCM1	0,17	0,012	5,9
5% de TGCM1	0,34	0,024	<1
10% de TGCM1	0,63	0,044	<1
180 min, 1.000 ppm L5			
2,5% de TGCM1	0,11	0,008	6,1
5% de TGCM1	0,20	0,014	4,8
10% de TGCM1	0,39	0,027	3,8
180 min, 100 ppm L5			
TGCM1			
2,5% de TGCM1	0,09	0,006	6,5
5% de TGCM1	0,13	0,009	6,5
10% de TGCM1	0,22	0,015	6,2
TGCM2			
Inicio	0	0	6,3
180 min, control	0	0	7,0
180 min, 10.000 ppm L5			
2,5% de TGCM2	0,17	0,012	5,5
5% de TGCM2	0,30	0,021	3,4
10% de TGCM2	0,58	0,040	1,8

ES 2 319 095 T3

		AG libres % en g	AG totales M	Recuento total log ₁₀ UFC/ml
5	180 min, 1.000 ppm	L5		
	2,5% de TGCM2	0,13	0,009	6,3
	5% de TGCM2	0,21	0,015	6,3
10	10% de TGCM2	0,36	0,025	5,6
	180 min, 100 ppm	L5		
	2,5% de TGCM2	0,11	0,008	6,5
15	5% de TGCM2	0,16	0,011	6,6
	10% de TGCM2	0,23	0,016	6,7
	Aceite de coco			
20	Inicio	0	0	7,1
	180 min, control	0	0	7,1
25	180 min, 10.000 ppm	L5		
	2,5% aceite de coco	0,10	0,007	7,2
	5% aceite de coco	0,16	0,011	6,2
30	10% aceite de coco	0,36	0,025	6,2
	180 min, 1.000 ppm	L5		
	2,5% aceite de coco	0,07	0,005	6,4
35	5% aceite de coco	0,13	0,009	6,5
	10% aceite de coco	0,22	0,015	6,4
	180 min, 100 ppm	L5		
40	2,5% aceite de coco	0,05	0,003	6,9
	5% aceite de coco	0,08	0,006	7,0
	10% aceite de coco	0,13	0,009	7,0

Los resultados pueden resumirse como sigue:

- La cantidad de AG liberado es casi proporcional a la concentración de TG, mientras que un aumento de 10 veces de la dosis de enzima lipolítica usada duplicaba sólo la concentración de AG libres. Para cada combinación de % de TG y ppm de una enzima lipolítica dada, la liberación de AG sigue el orden: TGCM1 > TGCM2 > aceite de coco.
- Cuanto mayor es la concentración de AG libre, más pronunciada es la supresión del número de bacterias. Una concentración mínima de $\pm 0,35\%$ en g de AG en el medio parece necesaria para una supresión significativa de la flora; ésto corresponde a 0,025 M/l. El orden TGCM1 > TGCM2 > aceite de coco corresponde a un aumento del peso molecular del AGCM cuantitativamente más importante en el TG: TGCM1 = C8, TGCM2 = C10, aceite de coco = C12.
- El protocolo *in vitro* usado ofrece una excelente herramienta para el cribado de las numerosas combinaciones de TG que contienen AGCM y enzimas lipolíticas disponibles por su utilidad como suplementos alimentarios con un efecto estabilizante o supresor sobre la microflora gastrointestinal. Este efecto es generalmente aceptado como la base de la obtención de un estímulo del crecimiento.

ES 2 319 095 T3

TABLA 10

Ejemplos de fuentes comerciales de lípidos estructurados sintetizados químicamente (1)

Producto	Composición	Compañía
Aldo MCT	C8, C10	Lonza Inc., Fair Lawn, EE.UU.
Stabilox-860	C8, C10	Loders-Croklaan BV, Wormerveer, Holanda
Caprenina	C6:0, C8:0, C22:0	Procter & Gamble, Cincinnati, OH
Salatrima	C3:0, C4:0, C18:0	Nabisco Foods Group, East Hanover, NJ
Captex	C8:0, C10:0, C18:2	Abitec, Columbus, OH
Captex 300	C8, C10	Capital City Products, Columbus, OH
Captex 810B	C8, C18	Capital City Products, Columbus, OH
Tripelar-gonato	C9	Capital City Products, Columbus, OH
Cadena impar mixta	C7, C9	Abbott Laboratories, North, Chicago, IL
Neobee	C8:0, C10:0, AGCL	Stepan Co, Maywood, NJ
Neobee M5	C8:0, C10:0	Stepan Co, Maywood, NJ
Neobee 1095	C10:0	Stepan Co, Maywood, NJ
Coconado	C8:0	Kao Co, Wakayama, Japón
Coconard-RK	C8, C10, C12	Kao Co, Wakayama, Japón
TGCM	C4, C5, C6, C7, C8, C10	Karlshamns Lipid Specialties, Columbus, OH
TGCM	C8, C10	Mead Johnson & Co, Evansville, IN
(1) fuente: productos ensayados + recopilación bibliográfica		

ES 2 319 095 T3

TABLA 11

Ejemplos de lipasas microbianas experimentales o comercialmente disponibles (1)

5	Origen	Organismo	Compañía
	Levadura	<i>Candida sp.</i>	
10		<i>Candida rugosa*</i>	Amano, Biocatalysts, Boehringer Mannheim Fluka, Genzyme, Sigma, Meito Sankyo
15		<i>Candida antartica A/B</i>	Boehringer Mannheim, Novo
		<i>Candida lipolytica</i>	Nordisk
20		<i>Candida paralipolytica</i>	
		<i>Saccharomyces lipolytica</i>	
	Fúngica	<i>Thermomyces lanuginosus**</i>	Novo Nordisk, Boehringer Mannheim, Amano
25		<i>Rhizomucor miehei</i>	Novo Nordisk, Biocatalysts, Amano
30		<i>Rhizopus sp.</i>	Nagase, Tokyo, Japan
		<i>Rhizopus delegar</i>	
		<i>Rhizopus niveus</i>	Alltech
35		<i>Rhizopus arrhizus</i>	Sigma
		<i>Rhizopus javanicus</i>	Amano
		<i>Aspergillus sp.</i>	
40		<i>Aspergillus niger</i>	Finnfeeds International,
		<i>Aspergillus usamii</i>	Amano
		<i>Aspergillus oryzae</i>	Novo Nordisk
45		<i>Mucor sp.</i>	
		<i>Mucor javanicus</i>	
50		<i>Mucor lipolyticus</i>	

ES 2 319 095 T3

	<i>Penicillium</i> sp.	
	<i>Penicillium roquefortii</i>	Amano
5	<i>Penicillium cyclopium</i>	Amano
	<i>Penicillium simplissimum</i>	
	<i>Penicillium camembertii</i>	
10	<i>Geotrichum candidum</i>	Amano
	<i>Neurospora crassa</i>	
	<i>Ustilago maydis</i>	
15	<i>Fusarium solana</i>	
Bacte-	<i>Burkholderia cepacia</i> ***	Amano, Fluka, Boehringer
riana		Mannheim
20	<i>Pseudomonas</i> sp.	
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Genencor
25	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Genencor
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Amano
30	<i>Pseudomonas</i> spp.	Finnfeeds International; Karlan, CA, EE.UU.
35	<i>Chromobacterium viscosum</i> ****	Asahi, Tokio, Japón; Biocatalysts; Karlan, CA, EE.UU.; Toyo Jozo Shizuoka, Japón
40	<i>Staphylococcus</i> sp.	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	
45	<i>Staphylococcus carnosus</i>	
	<i>Staphylococcus hyicus</i>	
	<i>Achromobacter lipolyticum</i>	
50	<i>Acinetobacter</i>	
	<i>Propionibacterium acnes</i>	
55	<i>Bacillus</i> sp.	
	* antiguamente denominada <i>Candida cylindracea</i>	
	** antiguamente denominada <i>Humicola lanuginosus</i>	
60	*** antiguamente denominada <i>Pseudomas cepacia</i>	
	**** <i>C. viscosum</i> es idéntica a <i>Burkholderia glumae</i>	
	(1) fuente: productos ensayados + recopilación bibliográfica	

Referencias

Bach, A.C. y Babayan, V.K., 1982, "Medium-chain Triglycerides: an Update", *The American Journal of Clinical Nutrition*, 36: 950-962;

Cera, K.R. y col., 1989, "Postweaning Swine Performance and Serum Profile Responses to Supplemented Medium-chain Free Fatty Acids and Tallow", *Journal of Animal Science*, 67, 2048-2055;

Chesson, A., 1994, "Probiotics and other Intestinal Mediators", en: "Principles of Pig Science", D.J.A. Cole, J. Wiseman & M.A. Varley, editores, Nottingham University Press, R.U., pág 197-214;

Corpet, D.E., 1996, "Microbial Hazards for Humans of Antimicrobial Growth Promotor Use in Animal Production", *Revue Médecine Vétérinaire*, 147: 851-862;

Decuypere, J.A. y col., 1977, "Gastro-intestinal Cannulation in Pigs: a Simple Technique allowing multiple Replacements", *Journal of Animal Science*, 46, 463-468;

Kabara, J.J., 1978, "Fatty Acids and Derivates as Antimicrobial Agents - a Review", en: "The Pharmacological Effects of Lipids", J.J. Kabara, editor, The American Oil Chemists Association, Champaign, IL, EE.UU, pág. 1-14;

Odle, J., 1999, "Medium-chain Triglycerides: a Unique Energy Source for Neonatal Pigs, Pig News and Information", 20: 25N-32N;

Lepine, A.J. y col., 1989, "Effect of Colostrum or Medium-chain Triglyceride Supplementation on the Pattern of Plasma Glucose, Non-esterified Fatty Acids and Survival of Neonatal Pigs", *Journal of Animal Science*, 67, 983-990;

Moreau, H. y col., 1988, "Screening of Preduodenal Lipases in several Mammals", *Biochemica Et Biophysica Acta*, 959, 247-252;

Partridge, G.G., 1993, "New Approaches with Pig Weaner Diets", en: "Recent Advances in Animal Nutrition", P.C. Gansworthy & Cole, J.A., editores, Nottingham University Press, R.U. pág. 221-248;

Roth, F.X. y Kirchgessner, 1998, "Organic Acids as Feed Additives for young Pigs: Nutritional and Gastrointestinal Effects", *Journal of Animal and Feed Sciences*, 7: 23-33;

SPSS para WINDOWS, 1997, Guía del usuario (versión 7.5), SPSS Inc., Chicago, IL 60611;

Van der Heyde, H. y Henderickx, H., 1963, "Zur Vereinfachung der quantitativen und qualitativen Bestimmung der Bakterien unter Verwendung von "Ringplatten"", *Zentralblatt Für Bakteriologie*, I Orig., 189, 224-228;

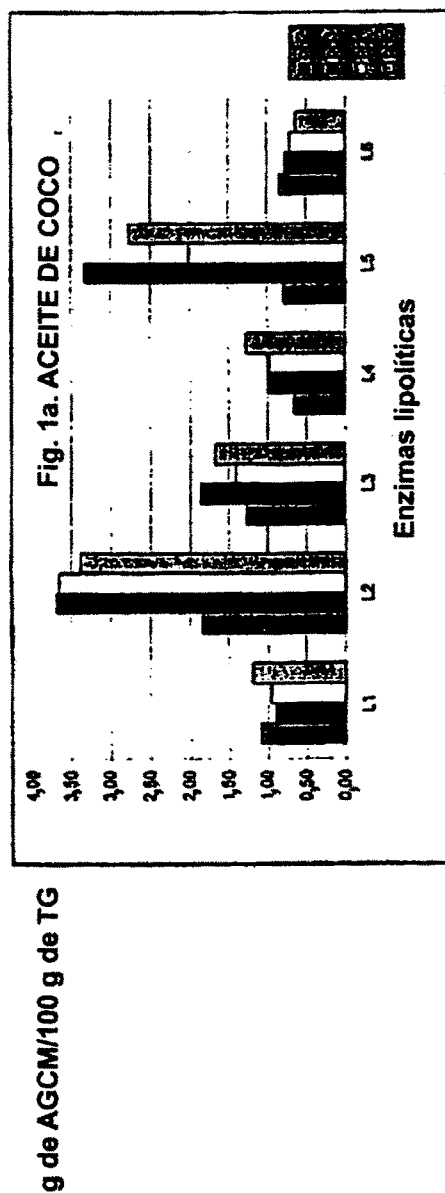
Van der Peet, G.F.V., 1992, "Voeding van jonge Biggen", CVB-Documentatierapport N°5;

Wegener, H.C. y col., 1998, "The Association between the Use of Antimicrobial Growth Promoters and Development of Resistance in Pathogenic Bacteria towards Growth Promoting and Therapeutic Antimicrobials", *Journal of Animal and Feed Science*, 7: 7-14.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Suplemento alimentario o composición alimentaria que comprende al menos un triglicérido que contiene ácidos grasos de cadena media y al menos una enzima lipolítica exógena, en el que dicho componente triglicérido se añade a una concentración de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 20% al pienso y dicho componente enzimático lipolítico se añade a una concentración de aproximadamente 5 a 10.000 ppm al pienso.
- 10 2. Suplemento alimentario o composición alimentaria según la reivindicación 1, en el que dicho triglicérido contiene un ácido graso de cadena media C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11 y/o C12.
3. Suplemento alimentario o composición alimentaria según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho triglicérido es un triglicérido de origen natural, tal como grasa láctea y aceite de coco.
- 15 4. Suplemento alimentario o composición alimentaria según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho triglicérido es una composición de triglicérido preparada.
5. Suplemento alimentario o composición alimentaria según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho triglicérido se prepara mediante interesterificación de ácidos grasos de cadena C4 a C12.
- 20 6. Suplemento alimentario o composición alimentaria según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha enzima lipolítica exógena es una lipasa.
7. Suplemento alimentario o composición alimentaria según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha enzima lipolítica exógena es una esterasa.
- 25 8. Suplemento alimentario o composición alimentaria según las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho triglicérido está presente en una composición de triglicérido que contiene ácidos grasos de cadena media naturales o preparados y dicha enzima lipolítica exógena está presente en una composición enzimática lipolítica comercialmente disponible.
- 30 9. Suplemento alimentario o composición alimentaria según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso como medicamento.
10. Suplemento alimentario o composición alimentaria según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso como agente antimicrobiano.
- 35 11. Suplemento alimentario o composición alimentaria según las reivindicaciones 1 a 8 para uso como promotor del crecimiento.
- 40 12. Uso de un suplemento alimentario o composición alimentaria para animales según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la preparación de un medicamento para lipólisis controlada en el tracto gastrointestinal para una estabilización, activación selectiva y/o supresión de la microflora gastrointestinal.
13. Uso de un suplemento alimentario o composición alimentaria para animales según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la preparación de un medicamento para el estímulo del crecimiento.
- 45 14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13 para animales de producción y compañía.
15. Uso según la reivindicación 14, en el que los animales son lechones destetados tempranamente.
- 50 16. Fórmula alimentaria que comprende la composición alimentaria según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

Fig. 1. Liberación in vitro de AGCM (g/100 g de TG) a diferentes pH de los diferentes triglicéridos ensayados



g de AGCM/100 g de TG

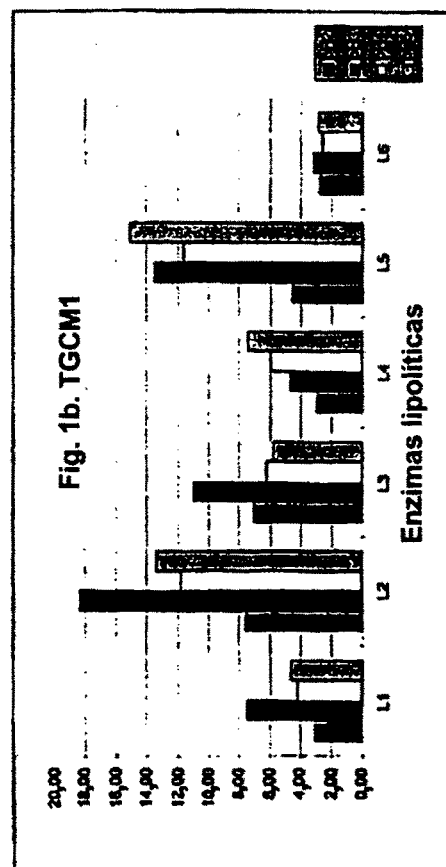


Fig. 1. (continuación) Liberación in vitro de AGCM (g/100 g de TG) a diferentes pH de los diferentes triglicéridos ensayados

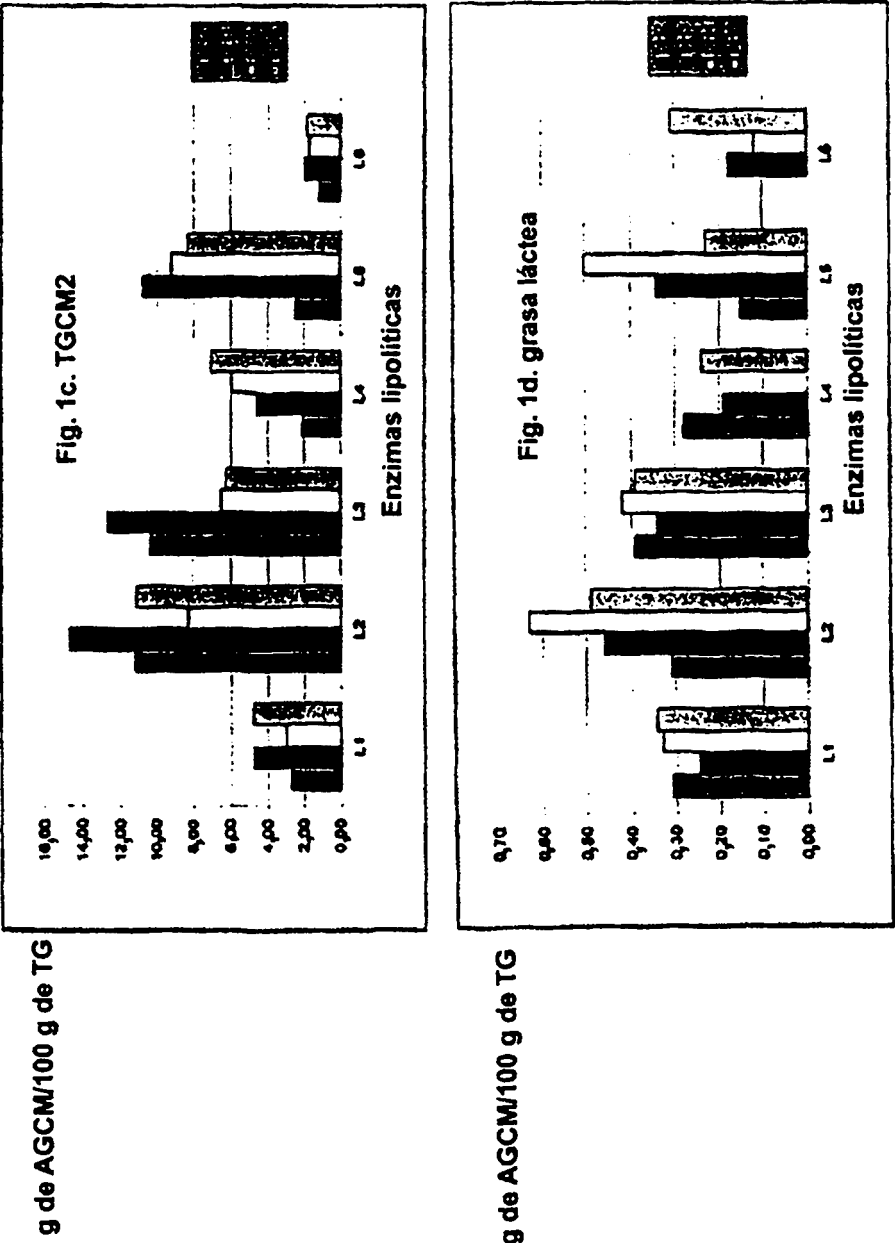


Fig. 2. Recuentos bacterianos in vivo en los contenidos del estómago de lechones canulados alimentados con 3 TG diferentes y 2 lipasas

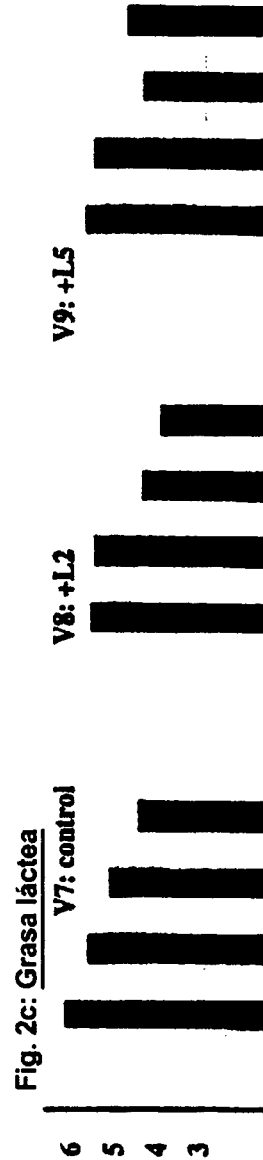
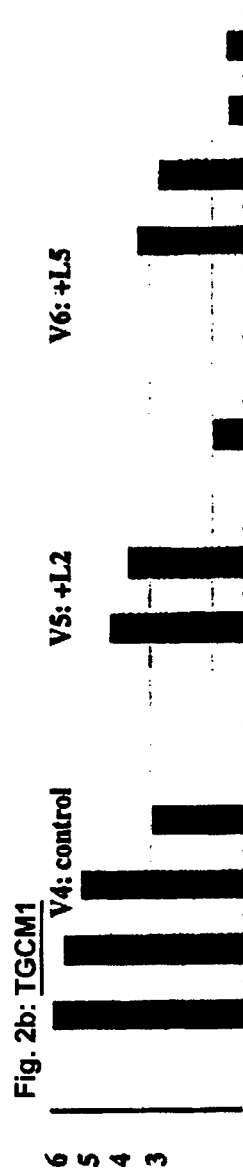
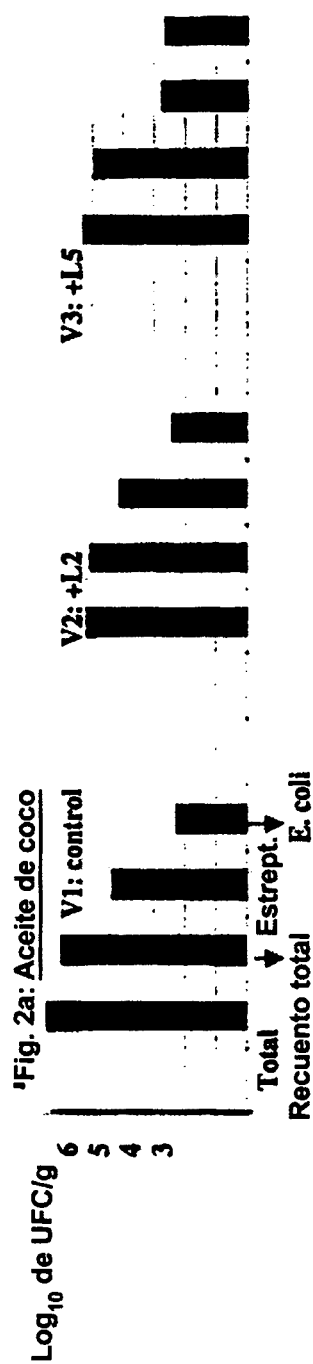


Fig. 3. Concentración in vivo de ácidos grasos totales, unidos a TG y libres (AGL) en contenidos de estómagos de cerdos canulados alimentados con 3 TG y 2 lipasas

