

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 947**

51 Int. Cl.:

<b>A23N 17/00</b>	(2006.01)
<b>G01N 21/359</b>	(2014.01)
<b>A23K 10/14</b>	(2006.01)
<b>A23K 50/75</b>	(2006.01)
<b>A23K 50/30</b>	(2006.01)
<b>G16H 50/50</b>	(2008.01)
<b>G16C 20/30</b>	(2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2014 PCT/US2014/015740**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15094391**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2014 E 14873058 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2024 EP 3082477**

54 Título: **Sistemas y métodos para modelos informáticos de alimentación animal**

30 Prioridad:

**17.12.2013 US 201314109926**

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

**03.10.2024**

73 Titular/es:

**ALLTECH, INC. (100.0%)  
3031 Catnip Hill Pike  
Nicholasville, KY 40356, US**

72 Inventor/es:

**MCKINNEY, KYLE;  
LOVELL, ALLYSON;  
HENRY, BENJAMIN;  
BECKER, PATRICK y  
TIMMONS, REBECCA, A.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 980 947 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**

Sistemas y métodos para modelos informáticos de alimentación animal

**5 Antecedentes**

Los nutrientes de la alimentación animal se ponen a disposición del animal mediante la digestión del pienso en el tracto gastrointestinal del animal. Los nutrientes que se digieren son absorbidos y utilizados por el animal para obtener energía, crecimiento y desarrollo. Los nutrientes que no se digieren, en su mayor parte, pasan por el tracto intestinal del animal disminuyendo el valor nutricional del alimento. La digestibilidad de los alimentos para animales se puede evaluar mediante el uso de modelos de digestión *in vitro* o *in vivo* y análisis de los nutrientes restantes en el pienso digerido mediante métodos analíticos de química húmeda. Un inconveniente de los métodos existentes es que son específicos de un pienso en particular, caro y que requiere mucho tiempo. Sería, por lo tanto, beneficioso proporcionar una forma de aplicación más amplia, menos costosa y que requiera menos tiempo para analizar la digestibilidad de los piensos para animales.

Corson, D.C. *et al.*, "NIRS: Forage analysis and livestock feeding", Proceedings of the New Zealand Grassland Association, 1999, vol. 61, en las páginas 127 - 132 se describe el análisis de piensos para animales mediante espectroscopia de reflectancia del infrarrojo cercano (NIRS) y demuestran la capacidad de esta tecnología para proporcionar estimaciones rápidas, precisas y de bajo costo de la composición del pienso.

Foster, J.G. *et al.*, "Quantification of Fatty Acids in Forages by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, vol. 54, n.º 9, páginas 3186 - 3192 estudiaron la espectroscopia de reflectancia del infrarrojo cercano (NIRS) como una posible alternativa a la cromatografía de gases (GC) para el análisis cuantitativo de ácidos grasos en forrajes.

El documento US 2012/271449 se refiere a sistemas y métodos para medir fracciones de fibra ruminal no digerida en un alimento.

El documento US 2003/028328 divulga un método y sistema para predecir el nivel de contenido de componentes en materiales basándose en la respuesta de los materiales a la radiación infrarroja cercana.

Dowman, M.G. *et al.*, "The use of enzymes to predict the digestibility of animal feeds", Journal of the Science of Food and Agriculture, 1982, vol. 33, n.º 8, en las páginas 689 - 696 estudiaron diferentes técnicas para un método de laboratorio fiable para la predicción de la digestibilidad *in vivo* de piensos para animales. El documento US6008053 A se refiere a la determinación del valor nutritivo *in vivo* del pienso en rumiantes.

**Sumario**

La presente solicitud se refiere a métodos para desarrollar un modelo informático para analizar piensos. En particular, la presente solicitud se refiere a la digestión *in vitro* de una muestra de pienso para animales y análisis NIR, como se define en el presente documento, de la muestra de pienso digerido para determinar la digestibilidad de los componentes del pienso para animales. En realizaciones de la presente solicitud, se digiere una muestra de pienso para animales utilizando un *in vitro* procedimiento que ha sido diseñado para ser similar a la digestión animal *in vivo*. La muestra de pienso para animales digerido se escanea usando espectroscopia NIR para generar datos espectrales que se comparan con un modelo informático para proporcionar una concentración prevista de al menos un componente residual en la muestra de pienso para animales digerido. La predicción de la concentración de al menos un componente residual permite determinar la digestibilidad de ese componente en la composición de pienso para animales. Por ejemplo, la proteína es un componente de las composiciones de piensos para animales y, después de la digestión, se determinan las cantidades residuales de proteína y proporcionan una medida de la digestibilidad de la proteína en la muestra de pienso para animales. Las composiciones de piensos para animales se pueden seleccionar y/o ajustar para mejorar la digestibilidad de componentes tales como proteínas, fósforo, hidratos de carbono, grasas, energía bruta o fibra. Ajustar las composiciones de piensos para animales comprende añadir uno o más aditivos posteriores. Se pueden probar varios postaditivos para determinar si dichos postaditivos mejoran la digestibilidad de los componentes del pienso para animales.

La presente solicitud incluye un método para desarrollar un modelo informático para analizar piensos que comprende las etapas de:

(a) digerir *in vitro* una pluralidad de muestras de pienso para animales, teniendo cada una una composición de pienso para animales para generar una pluralidad de muestras de pienso para animales digerido, en donde cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido comprende al menos un componente residual, en donde el al menos un componente residual se selecciona entre el grupo que consiste en proteína, fósforo, grasas, energía bruta e hidratos de carbono, en donde cada composición de pienso para animales comprende maíz, soja, grano(s), grano(s) de destilería, legumbres o melaza, en donde la digestión comprende dos fases, en donde una fase se lleva a cabo a un pH de menos de 7 e incluye el uso de al menos una enzima que comprende pepsina y en donde otra fase se lleva

a cabo a un pH de al menos 6 e incluye al menos una enzima que comprende pancreatina;

(b) separar cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido obtenidas en la etapa (a) en un componente sólido y un componente líquido,

5 (c) escanear el componente sólido de cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido obtenidas en la etapa (b) usando espectroscopia NIR para generar datos espectrales para cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido;

10 (d) determinar la concentración de al menos un componente residual en cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido usando un método de química húmeda; y

(e) generar un modelo informático estableciendo una relación predictiva entre la concentración de al menos un componente residual de cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido y los datos espectrales de una muestra correspondiente de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido, en donde generar un modelo informático comprende un método implementado por ordenador que comprende las etapas de:

i) recibir datos espectrales para cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido;

20 ii) relacionar los datos espectrales para cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido con la concentración de al menos un componente residual en una muestra correspondiente de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido; y

25 iii) establecer una relación predictiva basada en los datos espectrales y la concentración de al menos un componente residual de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido para generar el modelo informático.

Los métodos como se describen en el presente documento son métodos de uso de modelos informáticos NIR para predecir el tipo y la cantidad de componentes residuales de muestra de pienso para animales digerido *in vitro*. En realizaciones, tales métodos son útiles para seleccionar una composición de pienso y/o ajustar la composición de pienso para mejorar la digestibilidad de los componentes del pienso.

En algunas realizaciones de la presente solicitud, la etapa de escanear cada una de la pluralidad de muestras de pienso digerido comprende además la etapa de manipular matemáticamente los datos espectrales de cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido.

En la presente solicitud, digerir la pluralidad de muestras de pienso para animales comprende usar pepsina y pancreatina. En la presente invención, digerir una muestra de pienso para animales comprende además separar la muestra digerida en un componente sólido y un componente líquido y escanear el pienso para animales digerido comprende escanear el componente sólido. En la presente invención, el al menos un componente residual se selecciona entre el grupo que consiste en proteína, fósforo, grasas, energía bruta e hidratos de carbono. En una realización preferida, el al menos un componente residual se selecciona entre el grupo que consiste en proteína, fósforo, grasa y energía bruta, más preferentemente proteína, grasa y energía bruta.

En realizaciones de la presente solicitud, el método de química húmeda comprende analizar cada muestra de la pluralidad de muestras de pienso digerido para determinar la concentración del al menos un componente residual seleccionado entre el grupo que consiste en proteína, fósforo, grasas, energía bruta e hidratos de carbono. En otras realizaciones, el método de química húmeda comprende mezclar el componente sólido con un líquido para formar una mezcla; y analizar la composición de la mezcla para determinar la concentración del al menos un componente residual seleccionado entre el grupo que consiste en proteína, fósforo, grasas, energía bruta, hidratos de carbono y fibra en cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido.

En una realización preferida de la presente invención, cada una de las muestras de pienso para animales es pienso para cerdos. En otra realización preferida de la presente invención, cada una de las muestras de pienso para animales es pienso para cerdos, en donde la fase se lleva a cabo durante de 1 a 6 horas a un pH inferior a aproximadamente 7 y la otra fase se lleva a cabo durante de 18 horas a 48 horas a un pH de al menos 6,0, para generar el pienso para animales digerido.

En una realización preferida adicional de la presente invención, cada una de las muestras de piensos para animales es pienso para aves, más preferentemente, en donde la fase que incluye pepsina se realiza a un pH inferior a aproximadamente 7 durante de 30 minutos a 2 horas y la otra fase que incluye pancreatina se realiza a un pH de al menos 6,0 durante de 30 minutos a 2 horas, para generar el pienso para animales digerido.

En una realización preferente, el método comprende además: (f) determinar un coeficiente de determinación, el valor de  $R^2$ , que refleje el poder predictivo del modelo informático y (g) determinar si el valor de  $R^2$  determinado en la etapa (f) es al menos 50. Más preferentemente, el valor de  $R^2$  en la etapa (g) es al menos 70.

En una realización preferida, la separación en la etapa (b) comprende centrifugación o filtración. Más preferentemente, la determinación usando química húmeda en la etapa (d) se realiza en el componente sólido de cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido.

## 5 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un esquema de realizaciones de métodos de la presente solicitud.

10 La Figura 2 muestra datos espectrales NIR a modo de ejemplo de muestras de pienso para aves procesadas según una realización de la presente solicitud.

La Figura 3 muestra un modelo NIR para proteína en pienso para aves procesado según una realización de la presente solicitud.

15 La Figura 4 muestra un modelo NIR para fósforo en pienso para aves procesado según una realización de la presente solicitud.

20 La Figura 5 muestra un modelo NIR para energía bruta en pienso para aves procesado según una realización de la presente solicitud.

La Figura 6 muestra datos espectrales NIR a modo de ejemplo para muestras de pienso para cerdos procesadas según una realización de la presente solicitud.

25 La Figura 7 muestra un modelo NIR para proteína en pienso para cerdos procesado según una realización de la presente solicitud.

La Figura 8 muestra un modelo NIR para energía bruta en pienso para cerdos procesado según una realización de la presente solicitud.

## 30 Descripción detallada

### Definiciones

35 Los artículos "un" y "uno/a" se usan en la presente memoria para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

40 Como se usa en la presente solicitud, el término "aditivo(s)" se refiere a una sustancia añadida a otra sustancia. Por ejemplo, se puede añadir un aditivo al pienso para animales para mejorar la digestibilidad de uno o más componentes del pienso. Un aditivo comprende una enzima, una mezcla de enzimas, una proteína, una vitamina, un mineral, cereales, maltodextrina, un suplemento, y combinaciones de los mismos. Un "preaditivo(s)" es una sustancia que está presente como componente de una muestra de pienso para animales y no se añade a la muestra de pienso en el momento del análisis o justo antes. Por lo general, un preaditivo ya está presente en el pienso para animales utilizado en el campo e incluye una enzima o una mezcla de enzimas. Un "postaditivo" es una sustancia que se añade a la muestra de la composición de pienso para animales en el momento del análisis o justo antes. Por lo general, se añade un postaditivo a la muestra de pienso para determinar si el postaditivo altera la digestibilidad de un componente del pienso e incluye una enzima o una mezcla de enzimas.

50 Como se usa en la presente solicitud, el término "analito(s)" se refiere a un constituyente químico, cuyas propiedades (por ejemplo, la concentración) deben determinarse mediante un procedimiento analítico.

55 Como se usa en la presente solicitud, el término "animal(es)" se refiere a animales no humanos criados o utilizados como fuente de alimento. Por ejemplo, los animales incluyen ganado domesticado tal como ganado vacuno, cabras, ovejas, caballos, aves de corral, búfalos, alpacas, llamas, burros, mulas, conejos, pollos, gansos, pavos o cerdos.

60 Como se usa en la presente solicitud, la expresión "modelo(s) informático(s)" se refiere a un modelo que predice la concentración de un componente de una mezcla (por ejemplo, pienso) basándose en los datos espectrales obtenidos, por ejemplo, por NIR. En realizaciones de la presente solicitud, los datos espectrales de cada muestra de una pluralidad de muestras se refieren a una concentración de un componente residual determinada mediante métodos químicos analíticos de química húmeda para cada muestra. El modelo se puede utilizar para proporcionar una estimación de la cantidad (por ejemplo, concentración) de un constituyente de una muestra desconocida comparando el espectro de la muestra desconocida con el modelo.

65 Como se usa en la presente solicitud, los términos "digerir", "digerido" y "digestión" se refieren a cambiar un material rompiendo o descomponiendo sus componentes. En algunas realizaciones, digerir es un proceso *in vitro* que usa, por ejemplo, calor, productos químicos y/o enzimas para descomponer los componentes del material.

Como se usa en la presente solicitud, la expresión "pienso(s)" o "pienso(s) para animales" se refiere a los materiales que consumen los animales y que aportan energía y/o nutrientes a la dieta de un animal. Los piensos para animales suelen incluir una serie de componentes diferentes que pueden estar presentes en formas tales como concentrado(s), premezcla(s), coproducto(s) o gránulos. Ejemplos de piensos y componentes de piensos incluyen la Ración Mixta Total (RMT), maíz, soja, forraje(s), grano(s), grano(s) de destilería, granos germinados, legumbres, vitaminas, aminoácidos, minerales, melazas, fibra(s), pienso(s), hierba(s), heno, paja, ensilaje, hueso(s), hojas, sémola, soluble(s) y suplemento(s). Algunos componentes o constituyentes de componentes del pienso para animales son detectables mediante espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR). Otros componentes de los piensos para animales no son detectables o pueden ser poco detectables por NIR debido a su baja concentración, presencia en un complejo que enmascara el componente o porque las características físicas o químicas del componente no se prestan a la detección NIR.

Como se usa en la presente solicitud, la expresión "*in vivo*" se refiere a los procesos que ocurren dentro de un organismo biológico vivo.

Como se usa en la presente solicitud, la expresión "*in vitro*" se refiere a los procesos que ocurren en un ambiente artificial fuera del organismo vivo y a los procesos o reacciones biológicas que normalmente ocurrirían dentro de un organismo pero que están hechos para ocurrir en un ambiente artificial. Los entornos *in vitro* pueden incluir tubos de ensayo y cultivos celulares.

Como se usa en la presente solicitud, el término "nutriente(s)" se refiere a una sustancia que es necesaria para que un organismo viva y/o crezca. Los nutrientes incluyen compuestos tales como proteínas, grasas, carbohidratos (por ejemplo, azúcares), fibra, vitaminas, calcio, hierro, niacina, nitrógeno, oxígeno, carbono, fósforo, potasio, alginato de sodio y mezclas de los mismos.

Como se usa en la presente solicitud, la expresión "espectroscopia NIR" o "NIR" se refiere al escaneo y medición de la absorbancia de muestras utilizando radiación infrarroja cercana con longitudes de onda en el intervalo de 800-2500 nm para crear un espectro de absorbancia. NIR se utiliza para medir la absorbancia de los enlaces químicos causados por vibraciones armónicas y combinadas y es más útil como método de análisis cuantitativo indirecto. La espectroscopia NIR se utiliza para predecir la cantidad o el tipo de un componente químico de una sustancia comparando el espectro obtenido al escanear la muestra con una calibración (por ejemplo, un modelo informático). Los espectros se pueden manipular aún más matemáticamente, por ejemplo, mediante transformación de Fourier. Los espectrómetros NIR se pueden configurar para funcionar en modo de reflectancia o transmitancia. Ejemplos específicos de equipos NIR incluyen Bruker MPA FT-NIR (disponible en Bruker Optics, Inc., Billerica, MA) y el analizador FT-NIR Antaris™ (disponible en Thermo Scientific en Waltham, MA).

Como se usa en la presente solicitud, un(os) "perfil(es) nutricional(es) predeterminado(s)" se refiere a una cantidad deseada de un componente o componentes de un pienso para animales para los cuales la digestibilidad es una característica relevante. Un nutricionista o un granjero puede establecer la cantidad deseada de un componente en un pienso en particular. Por ejemplo, es posible que sea necesario ajustar la cantidad de proteína o aditivo en el pienso para animales para tener en cuenta la digestibilidad de la proteína en el pienso para animales determinada utilizando los métodos descritos en el presente documento. Un pienso para animales con proteína que se encuentra en una forma menos digerible puede requerir un aumento de proteína en el pienso para animales y/o la adición de un aditivo posterior que aumente la digestibilidad de la proteína en ese pienso para animales para lograr la cantidad deseada.

Como se usa en la presente solicitud, una(s) "concentración(es) prevista(s)" se refiere a una cantidad de un nutriente o componente residual detectada en una muestra de pienso digerido usando espectroscopia NIR y un modelo informático. En realizaciones de la presente solicitud, el pienso para animales digerido se escanea mediante espectroscopia NIR para generar datos espectrales; y los datos espectrales se comparan con un modelo informático del al menos un componente residual para generar una concentración prevista de al menos un componente residual del pienso para animales digerido. La concentración prevista es una estimación de la concentración real de al menos un componente residual en la muestra.

Como se usa en la presente solicitud, la expresión "componente(s) residual(es)" se refiere a un componente que permanece en una mezcla después de que uno o más componentes se han eliminado y/o cambiado en la mezcla. En realizaciones de la presente solicitud, un componente residual es un componente individual que incluye proteínas, fósforo, grasas e hidratos de carbono. En otras realizaciones, un componente residual es una característica de la muestra digerida que incluye el contenido de humedad, energía bruta y contenido de cenizas.

Como se usa en la presente solicitud, la expresión "muestra(s) de pienso para animales" se refiere a una porción representativa de un pienso para animales. En realizaciones de la presente solicitud, una porción representativa de un pienso para animales contiene los mismos componentes en proporciones similares a las del pienso para animales. Una muestra representativa es, preferentemente, homogénea o sustancialmente homogénea.

Como se usa en la presente solicitud, la expresión "datos espectrales" se refiere a los datos obtenidos cuando la

radiación interactúa con un material. Por ejemplo, los datos espectrales se obtienen cuando la radiación en longitudes de onda del infrarrojo cercano interactúa con un material y es absorbida por las vibraciones de los enlaces químicos del material. La intensidad de la absorbancia se puede medir midiendo la cantidad de radiación reflejada o transmitida a través del material en una longitud de onda determinada. La intensidad de absorción a una longitud de onda determinada responde a la cantidad y tipos de enlaces químicos del material.

### Descripción detallada

La presente solicitud se refiere a métodos para desarrollar un modelo informático para analizar piensos para animales. En particular, la presente solicitud se refiere a métodos para desarrollar un modelo informático para analizar la digestibilidad de los componentes del pienso en piensos para animales. Además, los métodos de la presente solicitud se utilizan para determinar el efecto de un preaditivo y/o un postaditivo sobre la digestibilidad de un componente del alimento.

Los métodos de análisis de alimentos para animales en busca de componentes implican procedimientos (por ejemplo, métodos de digestión y métodos de química húmeda) que son costosos y requieren mucho tiempo, a menudo requieren múltiples equipos de laboratorio y múltiples ensayos para diferentes componentes. Un análisis único que utiliza métodos químicos húmedos implica dividir una muestra en diferentes porciones para el análisis de componentes residuales tales como proteínas, azúcares, fósforo, energía bruta y grasas. Este análisis destruye la muestra.

En cambio, los métodos proporcionados en la presente solicitud proporcionan la concentración prevista de múltiples componentes usando una sola muestra, son rápidos, disminuyen el tiempo y el coste del análisis y permiten ajustar la composición del alimento para mejorar la digestibilidad de los componentes del alimento en la composición del pienso para animales.

### Métodos para desarrollar un modelo informático

La presente solicitud se refiere a un método para desarrollar un modelo informático para analizar piensos que comprende las etapas de: (a) digerir *in vitro* una pluralidad de muestras de pienso para animales, teniendo cada una una composición de pienso para animales para generar una pluralidad de muestras de pienso para animales digerido, en donde cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido comprende al menos un componente residual, en donde el al menos un componente residual se selecciona entre el grupo que consiste en proteína, fósforo, grasas, energía bruta e hidratos de carbono, en donde cada composición de pienso para animales comprende maíz, soja, grano(s), grano(s) de destilería, legumbres o melaza, en donde la digestión comprende dos fases, en donde una fase se lleva a cabo a un pH de menos de 7 e incluye el uso de al menos una enzima que comprende pepsina y en donde otra fase se lleva a cabo a un pH de al menos 6 e incluye al menos una enzima que comprende pancreatina; (b) separar cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido obtenidas en la etapa (a) en un componente sólido y un componente líquido; (c) escanear el componente sólido de cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido obtenidas en la etapa (b) usando espectroscopia NIR para generar datos espectrales para cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido; (d) determinar la concentración de al menos un componente residual en cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido usando un método de química húmeda; y (e) generar un modelo informático estableciendo una relación predictiva entre la concentración de al menos un componente residual de cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido y los datos espectrales de una muestra correspondiente de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido, en donde generar un modelo informático comprende un método implementado por ordenador que comprende las etapas de: i) recibir datos espectrales para cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido; ii) relacionar los datos espectrales para cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido con la concentración de al menos un componente residual en una muestra correspondiente de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido; y iii) establecer una relación predictiva basada en los datos espectrales y la concentración de al menos un componente residual de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido para generar el modelo informático.

### Ensayo de digestión *in vitro*

Para desarrollar el modelo informático, se genera y analiza una pluralidad de muestras de pienso digerido. Se digieren muestras de piensos para animales *in vitro* usando al menos una enzima que comprende pepsina y al menos una enzima que comprende pancreatina.

Los componentes de las muestras de pienso para animales varían según la fuente de la muestra de pienso. Por ejemplo, las granjas ubicadas en diferentes regiones geográficas y/o que tienen diferentes razas de animales pueden tener un alimento con diferentes componentes. Además, un nutricionista o un granjero puede establecer una cantidad deseada de un componente en un pienso particular o seleccionar un pienso particular basándose en la cantidad deseada del componente. Ejemplos de piensos y componentes de piensos incluyen la Ración Mixta Total (RMT), maíz, soja, forraje(s), grano(s), grano(s) de destilería, granos germinados, legumbres, vitaminas, aminoácidos, minerales, melazas, fibra(s), pienso(s), hierba(s), heno, paja, ensilaje, hueso(s), hojas, sémola, soluble(s) y suplemento(s).

En realizaciones de la presente solicitud, se digiere una pluralidad de muestras diferentes de pienso para animales para un animal particular tal como aves de corral o cerdos. La pluralidad de muestras tiene un número suficiente de muestras para proporcionar un modelo informático con un valor del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de al menos 50, 60, 70, 80, 90 o 100, o cualquier número entre 50 y 100. En realizaciones de la presente solicitud, una pluralidad de muestras incluye al menos 25, 35, 50 o 100 o más muestras. En realizaciones específicas, una pluralidad de muestras incluye al menos 50 muestras únicas.

En la presente solicitud, cada muestra es digerida *in vitro* con al menos una enzima que comprende pepsina y al menos una enzima que comprende pancreatina. En realizaciones de la presente solicitud, la enzima y las condiciones de digestión se seleccionan para que sean similares a la digestión *in vivo* del tipo de animal. En realizaciones, el animal es un animal monogástrico. En realizaciones, el animal es un cerdo o un ave de corral. Por ejemplo, una enzima que participa en la digestión del estómago es la pepsina y una enzima involucrada en la digestión intestinal es la pancreatina. Ambas enzimas se emplean en el ensayo de digestión *in vitro*.

En realizaciones de la presente solicitud, la pepsina se usa a un pH ácido de menos de 7, 6, 5, 4, 3, 2 o cualquier número intermedio. En algunas realizaciones, la digestión con pepsina se realiza durante un tiempo que corresponde a la digestión *in vivo* en el estómago del animal, por ejemplo, al menos de 1 a 6 horas para un cerdo. Por ejemplo, de aproximadamente 30 minutos a 2 horas para las aves. Las condiciones de pH, temperatura y tiempo se pueden ajustar según el tipo de animal.

En la presente solicitud, una muestra se digiere con pancreatina. La digestión se realiza a un pH de al menos 6,0. En algunas realizaciones, la digestión con pancreatina se realiza durante un tiempo que corresponde a la digestión *in vivo* en el intestino del animal, por ejemplo, al menos de 18 a 48 horas para un cerdo. Por ejemplo, de aproximadamente 30 minutos a 2 horas para las aves. Las condiciones de pH, temperatura y tiempo se pueden ajustar según el tipo de animal.

En algunas realizaciones, la muestra de pienso para animales se digiere con pepsina seguida de digestión con pancreatina en condiciones similares a la digestión *in vivo* de la muestra en la especie animal. Los animales incluyen animales criados o utilizados como fuente de alimento, incluido ganado vacuno, cabras, ovejas, caballos, aves de corral, búfalos, alpacas, llamas, burros, mulas, conejos, pollos, gansos, pavos o cerdos.

En algunas realizaciones de la presente solicitud, más o menos etapas pueden estar presentes en el ensayo *in vitro* de digestión dependiendo del proceso de digestión *in vivo* del animal. Por ejemplo, para cerdos, un ensayo de digestión *in vitro* incluye una fase estomacal y una fase intestinal. Por ejemplo, para aves de corral, un ensayo de digestión *in vitro* incluye una fase de cultivo, una fase de molleja y una fase de intestino delgado. En las fases de estómago o molleja, la digestión se realiza a un pH ácido e incluye una enzima como la pepsina. En la fase intestinal, la digestión se lleva a cabo a un pH de neutro a ligeramente ácido e incluye una enzima como la pancreatina. Se pueden utilizar otras enzimas digestivas. Se emplean una o más enzimas digestivas en cualquiera de las fases o en cualquier combinación de ellas.

Las muestras de pienso para animales digerido comprenden al menos un componente residual. Un componente residual es un componente que puede permanecer después de la digestión de un componente del alimento en la muestra de pienso. Por ejemplo, un componente del pienso en una muestra de proteína, pero no toda la proteína puede ser digerida *in vivo* o en el ensayo *in vitro* de modo que quede un componente proteico residual después de la digestión. Otros componentes residuales incluyen fósforo, grasas, energía bruta, carbohidratos o fibra.

En realizaciones de la presente solicitud, un método para digerir una pluralidad de muestras comprende separar cada muestra en un componente líquido y un componente sólido. Normalmente, dicha separación se produce mediante centrifugación o filtración.

Cada una de la pluralidad de muestras digeridas se analiza mediante espectroscopia NIR y métodos de química húmeda.

### Espectroscopia NIR

Cada una de la pluralidad de muestras digeridas de pienso para animales se escanea usando espectroscopia NIR para generar datos espectrales. La espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR, también conocida como NIRS) es una tecnología espectroscópica que se utiliza para producir una concentración prevista de al menos un componente residual de la muestra (por ejemplo, la concentración de un analito). La NIR se basa en longitudes de onda en el intervalo de 800-2500 nm y es más útil para medir vibraciones armónicas y combinadas en moléculas. Debido a que las mediciones NIR generalmente requieren poca o ninguna preparación de la muestra, la mayoría de las muestras se pueden medir sin pretratamiento, manipulación o destrucción.

Un instrumento NIR típico normalmente escanea la muestra varias veces a lo largo de un rango de longitud de onda seleccionado y promedia los escaneos para producir un espectro. Los instrumentos NIR se pueden configurar para medir la transmitancia de muestras transparentes o la reflectancia de muestras opacas. Debido a la considerable

superposición en bandas de moléculas armónicas y combinadas, Las tecnologías NIR normalmente se basan en técnicas de calibración multivariada. Los modelos informáticos NIR pueden comprender modelos (por ejemplo, calibraciones) para múltiples analitos y pueden incluir decenas, cientos o incluso miles de muestras.

5 En realizaciones de la presente solicitud, los datos espectrales se procesan para colocarlos en una forma útil para generar un modelo. En realizaciones de la presente solicitud, los datos espectrales se manipulan matemáticamente para minimizar el ruido, extraer componentes principales y/o restar antecedentes.

10 En la presente solicitud, las muestras digeridas se separan en un componente líquido y un componente sólido y se escanea el componente sólido. El componente sólido comprende al menos un componente residual. Los escaneos NIR pueden identificar más de un componente de una mezcla y también proporcionar una concentración prevista de cada uno de los componentes de una mezcla. Los escaneos NIR generan datos espectrales que se utilizan para desarrollar un modelo informático para cada uno de los componentes residuales.

### 15 **Análisis químico**

Las muestras que se escanean en la NIR también se analizan utilizando métodos analíticos primarios, es decir, métodos de química húmeda. Los métodos de química húmeda incluyen métodos de referencia primarios utilizados para el análisis de componentes tales como proteínas, fósforo, grasas, energía bruta, carbohidratos o fibra. Tales ensayos son conocidos para los expertos en la materia. Para las proteínas, los métodos de análisis incluyen la determinación de nitrógeno y el análisis mediante espectroscopia ultravioleta visible. Para el fósforo, los métodos de análisis incluyen la determinación de fósforo mediante un sistema de plasma acoplado inductivamente. La energía bruta se puede determinar en una bomba calorimétrica.

25 Los métodos químicos analíticos se pueden utilizar en muestras líquidas o secas. En realizaciones de la presente solicitud, una muestra digerida se separa en un componente líquido y un componente sólido. Ambos componentes se pueden analizar mediante métodos de química húmeda. Por ejemplo, el fósforo liberado se puede determinar en el componente líquido y el fósforo residual se puede determinar en el componente sólido. En algunas realizaciones, el componente sólido se mezcla con un líquido para facilitar el análisis químico húmedo de al menos un componente residual en el componente sólido.

El análisis de química húmeda proporciona una concentración de al menos un componente residual en cada una de las muestras digeridas. En realizaciones de la presente solicitud, se miden múltiples componentes residuales.

### 35 **Generación de un modelo informático**

En realizaciones de la presente solicitud, un método comprender generar un modelo informático estableciendo una relación predictiva entre la concentración de al menos un componente residual de cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido y los datos espectrales de una muestra correspondiente de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido.

45 Los espectros de varias muestras se relacionan con los resultados de la química húmeda mediante la manipulación matemática de datos a través de un método implementado por ordenador para producir la calibración. En realizaciones de la presente solicitud, un método implementado por ordenador comprende las etapas de: recibir datos espectrales para cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido; relacionar los datos espectrales para cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido con la concentración de al menos un componente residual en una muestra correspondiente de cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido; y establecer una relación predictiva basada en los datos espectrales y la concentración de al menos un componente residual en cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido para generar el modelo informático.

50 Los datos espectrales se generan al escanear las muestras digeridas. Los datos espectrales se pueden procesar matemáticamente para colocarlos en una forma útil para generar un modelo. En realizaciones de la presente solicitud, los datos espectrales se manipulan matemáticamente para minimizar el ruido, extraer componentes principales y/o restar antecedentes.

60 Los datos espectrales de cada muestra se relacionan luego con la concentración de al menos un componente residual de la muestra correspondiente según lo determinado por los métodos de química húmeda. La relación de los datos espectrales con la concentración de al menos un componente residual se produce cuando la concentración de al menos un componente residual para la muestra particular se introduce en el espectrómetro NIR.

65 La relación entre la concentración de al menos un componente residual en cada una de la pluralidad de muestras se usa para generar un modelo usando uno o más métodos estadísticos para establecer una relación predicha entre la concentración de al menos un componente residual en una muestra y la datos espectrales para esos datos. Los métodos estadísticos incluyen análisis de componentes principales, análisis de regresión lineal o análisis de mínimos cuadrados parciales. Se puede utilizar cualquier número de métodos estadísticos para construir un modelo informático

para ese componente residual.

En realizaciones de la presente solicitud, los modelos NIR se caracterizan por el coeficiente de determinación, el valor de  $R^2$ , que refleja el poder predictivo del modelo informático. En realizaciones de la presente solicitud, los valores de  $R^2$  del modelo informático son al menos 50, 60, 70, 80, 90 o 100, o cualquier número entre 50 y 100.

Un modelo informático normalmente se valida mediante un método de validación. En realizaciones de la presente solicitud, un método de validación es un método implementado por ordenador en el que la pluralidad de muestras se divide en un conjunto de construcción de modelos y un conjunto de validación. La asignación de muestras a un conjunto normalmente se realiza de forma aleatoria. Los datos del conjunto de construcción de modelos se utilizan para construir un modelo como se describe en el presente documento. Los datos del conjunto de validación se utilizan para probar el poder predictivo del modelo. Las muestras del conjunto de validación se prueban frente al modelo para generar una concentración prevista de al menos un componente residual. Luego, esta concentración prevista se compara con la concentración real de la muestra determinada por química húmeda. Esta comparación permite una determinación del valor  $R^2$  y/o error estándar. También se pueden emplear otros tipos de validación, como el método de validación de dejar uno fuera.

Una vez generado el modelo informático, se almacena en el espectrómetro NIR. En realizaciones de la presente solicitud, el espectrómetro NIR incluye un microprocesador y una memoria que tienen instrucciones para implementar la generación de un modelo informático implementado por ordenador o validar un modelo informático como se describe en el presente documento. En realizaciones de la presente solicitud, la memoria sirve para almacenar modelos informáticos para cada componente residual, y/o una base de datos de datos espectrales para cada muestra. El modelo informático es útil para proporcionar una concentración prevista de al menos un componente residual de una muestra con una concentración desconocida de al menos un componente residual.

Los sistemas que no forman parte de la presente invención incluyen sistemas y equipos adecuados para realizar la digestión *in vitro* de muestras de pienso y análisis NIR de muestras digeridas. Los sistemas también incluyen sistemas y equipos adecuados para realizar análisis de química húmeda de muestras digeridas. El sistema puede comprender equipos y cristalería típicos de laboratorio, tales como matraces, vasos de precipitados, tubos de ensayo, cochinillas, pipetas, incubadoras, batidoras, agitadores, baños de agua. El sistema también puede comprender analizadores, tales como un ICP, un analizador de nitrógeno y una bomba calorimétrica.

El sistema comprende además un analizador NIR equipado con un ordenador y software adecuado para operar el NIR y para desarrollar y usar un modelo informático (por ejemplo, calibración). El modelo informático puede almacenarse en un ordenador remoto, accedido por el ordenador a través de la infraestructura de comunicaciones, tal como internet. Por ejemplo, el NIR está configurado con un conjunto de copa de muestra giratoria para escanear muestras de pienso.

Los métodos de la presente solicitud se pueden implementar como una combinación de hardware y software. El software puede implementarse como un programa de aplicación materializado de forma tangible en un dispositivo de almacenamiento de programas, o diferentes partes del software implementadas en el entorno informático del usuario (por ejemplo, un subprograma) y en el entorno informático de un revisor, donde el revisor puede estar ubicado en un sitio remoto (por ejemplo, en las instalaciones de un proveedor de servicios).

En las realizaciones, el ordenador incluye una unidad procesadora. La unidad procesadora funciona para recibir información, que generalmente incluye datos espectrales (por ejemplo, espectros NIR) y una base de datos de datos conocidos (por ejemplo, información determinada experimentalmente (por ejemplo, resultados de química húmeda) de una pluralidad de muestras). Esta información recibida puede almacenarse al menos temporalmente en una base de datos y analizarse los datos.

Por ejemplo, durante o después de la introducción de datos por parte del usuario, partes del procesamiento de datos se pueden realizar en el entorno informático del lado del usuario. Por ejemplo, el entorno informático del lado del usuario se puede programar para proporcionar códigos de prueba definidos para indicar la plataforma, prueba de portador/diagnóstico, o ambas; procesamiento de datos utilizando banderas definidas y/o generación de configuraciones de banderas, donde las respuestas se transmiten como respuestas procesadas o parcialmente procesadas al entorno informático del revisor en forma de código de prueba y configuraciones de banderas para la ejecución posterior de uno o más algoritmos para proporcionar resultados y/o generar un informe en el entorno informático del revisor.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar e ilustrar mejor ciertas realizaciones y aspectos preferidos de la presente invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Modelos NIR

Se crearon modelos NIR para muestras digeridas de piensos para cerdos y aves de corral. Los modelos se pueden

utilizar junto con un ensayo de digestión para evaluar la digestibilidad de muestras de alimento estimando el contenido de componentes residuales en las muestras digeridas.

5 La Figura 1 muestra un esquema ilustrativo para métodos de digestión y análisis de una muestra de alimento como se describe en el presente documento. La figura muestra que una muestra de pienso inicial fue sometida a digestión *in vitro* y el resumen se analizó para determinar las cantidades residuales de energía bruta, proteína, fósforo y azúcar mediante NIR y química húmeda.

10 Se digirieron muestras de pienso para aves y cerdos mediante un ensayo de digestión similar a la digestión de nutrientes *in vitro*. El ensayo fue modificado de Boisen S., A multienzyme assay for pigs, Capítulo 10, A Model for Feed Evaluation Based on *In vitro* Digestible Dry Matter and Protein, *In vitro* Digestion for Pig and Poultry, 1990, M.F. Fuller.

15 Las muestras digeridas se analizaron utilizando métodos de química húmeda para proteínas, energía bruta y fósforo. Una masa final que consistía en pienso digerido y líquido se separó en un componente sólido y un componente líquido. El componente sólido se secó y los sólidos secos se escanearon usando un espectrómetro NIR. Se crearon modelos NIR para proteínas, fósforo y energía bruta en pienso para aves digerido, y para proteínas y energía bruta en alimentos digeridos para cerdos.

### 20 Ensayo de digestión

Se digirieron muestras de pienso para cerdos y aves de corral utilizando el siguiente ensayo de digestión. Algunas muestras se modificaron añadiendo un postaditivo (Allzyme SSF) durante el ensayo.

### 25 Materiales de partida:

Se utilizaron muestras de piensos de aves y cerdos de diversos orígenes. Tanto las muestras de piensos para aves como para cerdos estaban compuestas principalmente de maíz y harina de soja.

30 Aditivo alimentario Allzyme SSF, disponible en Alltech, Nicholasville, KY se usó como fuente de enzimas añadidas (por ejemplo, postaditivo) al pienso. Allzyme SSF contiene un complejo enzimático que incluye al menos 300 U de fitasa.

### Reactivos:

- 35 A. HCl: 0,2 M, 1M, 2M y 4M
- B. NaOH 0,6 M
- C. NaHCO<sub>3</sub> 1 M
- D. Pepsina de Sigma (P7012); 10 mg de pepsina/ml de agua desionizada o 2,25 mg de pepsina/ml de agua desionizada
- 40 E. Pancreatina de Sigma (P3292); 50 mg de pancreatina/ml de agua desionizada o 2,315 mg de pancreatina/ml de agua desionizada
- F. 15 % de ácido tricloroacético (TCA)
- G. Tampón acetato: 0,1 M (pH 6,0) y 0,2 M (pH 6,8)
- H. Solución de cloranfenicol; 5 mg de cloranfenicol/1 ml de alcohol
- I. Solución de parada de TCA
- 45 J. Reactivo de color preparado a partir de 3 volúmenes de ácido sulfúrico 1 M, 1 volumen de molibdato de amonio al 2,5 % (p/v) y 1 volumen de ácido ascórbico al 10 % (p/v)
- K. Solución DNS (almacenada en una botella oscura), preparada a partir de ácido dinitrosalisílico, NaOH, tartrato de potasio y sodio tetrahidrato y agua desionizada
- 50 L. Patrones de dextrosa: 0 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,6 mg/ml; 0,8 mg/ml; y 1,0 mg/ml
- Patrones de fosfato: 0 µM; 5,625 µM; 11,25 µM; 22,5 µM; 45 µM; y fosfato de potasio 90 µM en agua.

### Procedimiento

#### Aditivo enzimático

55 Para producir un producto enzimático líquido que se utilizará en el experimento como postaditivo, las enzimas se extrajeron de Allzyme SSF con agua desionizada y se diluyeron 1:2.500.000 con tampón acetato de sodio 0,1 M.

#### Ensayo de digestión porcina

60 Digestión Primaria - Estómago

65 Se mezclaron dos gramos de una muestra de alimento para cerdos molida con 49 ml de tampón de acetato de sodio 0,1 M. Algunas muestras se alteraron añadiendo un postaditivo mezclándolo con 1 ml del postaditivo líquido preparado a partir del producto Allzyme SFF descrito anteriormente. El pH de la solución se ajustó a 2 con HCl. Se añadieron 2,0 ml de solución de pepsina (10 mg de pepsina/ml de agua desionizada) y 1,0 ml de soluciones de cloranfenicol. La

## ES 2 980 947 T3

solución se agitó y se colocó en un baño de agua con agitación a 39 °C a 55 RPM durante 6 horas. La solución se agitó cada hora.

### Digestión secundaria - intestino delgado

5 Después de la digestión primaria, las muestras se mezclaron con 20 ml de tampón acetato de sodio 0,2 M y 10 ml de NaOH 0,6 M. El pH de la solución se ajustó a 6,8 con NaOH 0,6 M. Se añadieron 2,0 ml de solución de pancreatina (50 mg de pancreatina/ml de agua desionizada). La solución se agitó y se colocó en un baño de agua con agitación a 39 °C (55 RPM) durante 18 horas. La solución se agitó y se centrifugó a 14.000 g durante 20 minutos.

10

### **Ensayo de digestión de aves de corral**

#### Fase de cultivo

15 Se mezclaron dos gramos y medio de una muestra de alimento molido para aves con 6 ml de agua destilada. Algunas muestras se alteraron añadiendo un postaditivo mezclándolo con 1 ml del postaditivo líquido preparado a partir del producto Allzyme SFF descrito anteriormente con 7 ml de agua destilada. Se incubaron todas las muestras a 40 °C durante 30 minutos.

#### Fase de molleja

20 Después de la incubación en la fase de cultivo, las muestras se ajustaron a pH 3,0 con HCl 1 M. A cada muestra se añadieron 2,0 ml de solución de pepsina (2,25 mg de pepsina/ml de agua desionizada) y 1,0 ml de soluciones de cloranfenicol. La solución se agitó y se colocó en un baño de agua a 40 °C durante 45 minutos.

25

#### Intestino delgado

30 Después de la fase de molleja, las muestras se mezclaron con 1 ml de NaHCO<sub>3</sub> para obtener un pH de 6,5. Se añadieron 2,0 ml de solución de pancreatina (2,315 mg de pancreatina/ml de agua desionizada). La solución se agitó y se colocó en un baño de agua a 40 °C durante 60 minutos. La solución se agitó y se centrifugó a 14.000 g durante 20 minutos.

### **Análisis de química húmeda**

35 El procedimiento de digestión *in vitro* dejó una masa final compuesta por una porción sólida de pienso digerido y una porción líquida. La muestra se separó para su posterior análisis en un componente sólido y un componente líquido (es decir, sobrenadante). El componente sólido se liofilizó para dar una porción final de materia seca.

#### Equipo:

40

Varian 720-ES ICP para análisis de fósforo

Leco TruSpec CHN para análisis de nitrógeno (proteínas)

45 Bomba calorimétrica Parr 6100 para análisis de energía bruta

#### Proteína, fósforo y energía bruta

50 La porción final de materia seca de la muestra digerida se analizó en busca de proteínas, fósforo y energía bruta. El contenido de proteína se determinó usando un analizador de combustión de nitrógeno y convirtiendo el contenido de nitrógeno en proteína. El contenido de fósforo se determinó utilizando un sistema ICP (plasma acoplado inductivamente). El contenido de energía bruta se determinó utilizando una bomba calorimétrica.

### **Modelo NIR**

55

La porción final de materia seca de la muestra digerida se escaneó utilizando un conjunto de copa giratoria NIR para recopilar datos de reflectancia NIR. Se registraron los escaneos NIR de varias muestras y se correlacionaron con los resultados de la química húmeda de cada muestra para crear un modelo informático para cada componente (proteína, fósforo y energía bruta) de las muestras digeridas.

60

#### Equipo:

Bruker MPA FT-NIR, número de modelo 122000 con conjunto de copa giratoria, disponible en Bruker Optics, Inc., Billerica, MA.

65

## Configuraciones:

Resolución 16 cm<sup>-1</sup>

5 Escaneos 32: el instrumento se configuró para escanear cada muestra 32 veces y promediar los escaneos en un único archivo de escaneo para cada muestra

Intervalo de número de onda 10000 cm<sup>-1</sup> -4000 cm<sup>-1</sup>

10 La absorbancia se midió utilizando el compartimento de "macromuestra de esfera"

## **Resultados: ensayo de digestión del pienso para aves**

15 Las muestras de pienso para aves se digirieron según el ensayo de digestión. Las porciones finales de materia seca de las muestras digeridas se escanearon en el NIR. En la Figura 2 se muestra un escaneo NIR ilustrativo de las muestras de pienso para aves digeridas.

20 Las muestras digeridas se analizaron mediante métodos de química húmeda para detectar proteínas, fósforo y energía bruta. El contenido de proteína de las muestras digeridas estuvo en el intervalo del 13-34 %; el contenido de fósforo estaba en el intervalo de 750-5900 ppm; y energía bruta en el intervalo de 3300-5200 cal/g. La proteína, el contenido de fósforo y energía bruta de cada muestra se correlacionó con los escaneos NIR para desarrollar modelos NIR para cada componente.

25 En la Figura 3 se muestra una validación cruzada generada por computadora del modelo de proteína NIR para alimentos para aves. El modelo incluía 29 muestras. El R<sup>2</sup> para el modelo fue 86,66 y el RMSECV (error cuadrático medio de validación cruzada) fue 2,68. El valor de R<sup>2</sup> indica qué tan bien se ajustan los datos al modelo y lo bien que el modelo predice los resultados observados. El RMSECV es una medida de la variación de los datos.

30 En la Figura 4 se muestra una validación cruzada generada por ordenador del modelo de fósforo NIR para pienso para aves. El modelo incluía 24 muestras. El R<sup>2</sup> para el modelo fue 75,94 y el RMSECV fue 554.

En la Figura 5 se muestra una validación cruzada generada por ordenador del modelo de energía bruta NIR para pienso para aves. El modelo incluía 18 muestras. El R<sup>2</sup> para el modelo fue 87,72 y el RMSECV fue 148. Se espera que R<sup>2</sup> y RMSEV de los modelos se puedan mejorar aumentando el número de muestras en el modelo.

## **Resultados: ensayo de digestión del alimento para cerdos**

40 Las muestras de pienso para cerdos se digirieron según el ensayo de digestión. Las porciones finales de materia seca de las muestras digeridas se escanearon utilizando el conjunto de copa giratoria NIR para recopilar datos de reflectancia NIR. En la Figura 6 se muestra un escaneo ilustrativo de las muestras de pienso para cerdo digeridas.

45 Las muestras digeridas se analizaron mediante métodos de química húmeda para proteínas y energía bruta. El contenido de proteína de las muestras digeridas estuvo en el intervalo de 6-47 % y la energía bruta en el intervalo de 3900-5300 cal/g. Luego, el contenido de proteína y energía bruta de cada muestra se correlacionó con las exploraciones NIR para desarrollar modelos NIR para cada componente.

En la Figura 7 se muestra una validación cruzada generada por computadora del modelo de proteína NIR para pienso para cerdos. El R<sup>2</sup> para el modelo fue 98,86 y el RMSECV fue 0,708.

50 En la Figura 8 se muestra una validación cruzada generada por ordenador del modelo de energía bruta NIR para pienso para cerdos. El R<sup>2</sup> para el modelo fue 80,5 y el RMSECV fue 141.

## Análisis

55 Los resultados muestran varios modelos NIR que se pueden desarrollar para su uso junto con un ensayo de digestión para predecir el contenido de componentes no digeridos (es decir, residuales) en muestras de pienso digerido. El modelo proteico para el pienso para cerdos fue particularmente exitoso (R<sup>2</sup> de 98,86), incluso con un número relativamente bajo de muestras utilizadas en el modelo ilustrativo. Se demostró que el modelo es altamente predecible del contenido real de proteína en muestras de alimento digerido y puede usarse en lugar de realizar métodos de química húmeda costosos y que consumen mucho tiempo. La precisión de los modelos se puede aumentar con un mayor número de muestras. En particular, se espera que la previsibilidad de los modelos de fósforo y energía bruta pueda mejorarse incluyendo más muestras en los modelos.

60

**Ejemplo 2****Validación del modelo de proteína residual para cerdos.**

5 Se validó la previsibilidad del modelo de proteína residual para la digestión de piensos para cerdos. El método de validación refleja cómo se utilizan los métodos descritos en el presente documento para analizar una muestra de pienso con características desconocidas.

10 Se digirió un conjunto de muestras de pienso para cerdos como se describe en el Ejemplo 1 y se escanearon usando NIR. Cada muestra también se caracterizó por su contenido de proteínas mediante química húmeda. Las muestras se dividieron en un conjunto de validación y un conjunto de construcción de modelos. Las muestras del conjunto de construcción de modelos se utilizaron para crear un modelo como se describe en el presente documento. El conjunto de validación se probó en el modelo para generar una concentración prevista de proteína residual para cada muestra. La concentración prevista para cada muestra se comparó con la concentración de proteína residual en la muestra determinada mediante química húmeda (Verdadero). Los resultados se muestran en la tabla 1:

Tabla 1

Nombre del archivo	Verdadero	Predicción	Diferencia
Matraz de cerda de Rusia 8.2	8,84625	8,64	0,205
Matraz de cerda de Rusia 8.1	8,84625	8,798	0,0478
Matraz de cerda de Rusia 8.0	8,84625	8,691	0,155
Matraz de cerda de Rusia 7.2	8,5775	8,841	-0,263
Matraz de cerda de Rusia 7.1	8,5775	8,922	-0,345
Matraz de cerda de Rusia 7.0	8,5775	8,965	-0,387
Matraz de cerda de Rusia 6.2	10,0781	9,498	0,58
Matraz de cerda de Rusia 6.1	10,0781	9,513	0,565
Matraz de cerda de Rusia 6.0	10,0781	9,522	0,556
Matraz de cerda de Rusia 5.2	8,51	8,502	0,00811
Matraz de cerda de Rusia 5.1	8,51	8,567	-0,0568
Matraz de cerda de Rusia 5.0	8,51	8,646	-0,136
Matraz de cerda de Rusia 4.2	8,44	8,314	0,126
Matraz de cerda de Rusia 4.1	8,44	8,303	0,137
Matraz de cerda de Rusia 4.0	8,44	8,446	-0,00599
Matraz de cerda de Rusia 3.2	8,495	8,738	-0,243
Matraz de cerda de Rusia 3.1	8,495	8,871	-0,376

Estos resultados muestran que el modelo tenía un alto grado de previsibilidad de la concentración de proteína residual en las muestras.

REIVINDICACIONES

1. Un método para desarrollar un modelo informático para analizar piensos que comprende las etapas de:
  - 5 (a) digerir *in vitro* una pluralidad de muestras de pienso para animales, teniendo cada una una composición de pienso para animales para generar una pluralidad de muestras de pienso para animales digerido, en donde cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido comprende al menos un componente residual, en donde el al menos un componente residual se selecciona entre el grupo que consiste en proteína, fósforo, grasas, energía bruta e hidratos de carbono, en donde cada composición de pienso para animales comprende maíz, soja, grano(s), grano(s)
    - 10 de destilería, legumbres o melaza, en donde la digestión comprende dos fases, en donde una fase se lleva a cabo a un pH de menos de 7 e incluye el uso de al menos una enzima que comprende pepsina y en donde otra fase se lleva a cabo a un pH de al menos 6 e incluye al menos una enzima que comprende pancreatina;
    - (b) separar cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido obtenidas en la etapa (a) en un
      - 15 componente sólido y un componente líquido,
      - (c) escanear el componente sólido de cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido obtenidas en la etapa (b) usando espectroscopia NIR para generar datos espectrales para cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido;
      - 20 (d) determinar la concentración de al menos un componente residual en cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido usando un método de química húmeda; y
      - (e) generar un modelo informático estableciendo una relación predictiva entre la concentración de al menos un componente residual de cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido y los datos espectrales de una muestra correspondiente de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido, en donde generar un modelo informático comprende un método implementado por ordenador que comprende las etapas de:
        - 25 i) recibir datos espectrales para cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido;
        - 30 ii) relacionar los datos espectrales para cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido con la concentración de al menos un componente residual en una muestra correspondiente de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido; y
        - 35 iii) establecer una relación predictiva basada en los datos espectrales y la concentración de al menos un componente residual de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido para generar el modelo informático.
  2. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de escanear el componente sólido cada una de la pluralidad de muestras de pienso digerido comprende además la etapa de manipular matemáticamente los datos espectrales de
    - 40 cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido.
  3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el método de química húmeda comprende analizar cada muestra del pienso digerido para determinar la concentración del al menos un componente residual seleccionado entre el grupo que consiste en proteína, fósforo, grasas, energía bruta y carbohidratos.
    - 45
  4. El método de la reivindicación 1, en donde cada una de las muestras de pienso para animales es pienso para cerdos.
  5. El método de la reivindicación 1, en donde cada una de las muestras de pienso para animales es pienso para cerdos, en donde la fase se lleva a cabo durante de 1 a 6 horas a un pH inferior a aproximadamente 7 y la otra fase se lleva a cabo durante de 18 horas a 48 horas a un pH de al menos 6,0, para generar el pienso para animales digerido.
    - 50
  6. El método de la reivindicación 1, en donde la composición animal comprende maíz.
  7. El método de la reivindicación 1, en donde cada una de las muestras de pienso para animales es pienso para aves.
    - 55
  8. El método de la reivindicación 7, en donde la fase que incluye pepsina se realiza a un pH inferior a aproximadamente 7 durante de 30 minutos a 2 horas y la otra fase que incluye pancreatina se realiza a un pH de al menos 6,0 durante de 30 minutos a 2 horas, para generar el pienso para animales digerido.
    - 60
  9. El método de la reivindicación 1, en donde el al menos un componente residual se selecciona entre el grupo que consiste en proteína, fósforo, grasa y energía bruta.
  10. El método de la reivindicación 1, en donde el al menos un componente residual se selecciona entre el grupo que consiste en proteína, grasa y energía bruta.
    - 65

11. El método de la reivindicación 1, que además comprende:

(f) determinar un coeficiente de determinación, el valor de  $R^2$ , que refleja el poder predictivo del modelo informático, y

5 (g) determinar si el valor de  $R^2$  determinado en la etapa (f) es al menos 50.

12. El método de la reivindicación 11, en donde el valor de  $R^2$  en la etapa (g) es al menos 70.

13. El método de la reivindicación 1, en donde la separación en la etapa (b) comprende centrifugación o filtración.

10

14. El método de la reivindicación 13, en donde la determinación usando química húmeda en la etapa (d) se realiza en el componente sólido de cada una de la pluralidad de muestras de pienso para animales digerido.

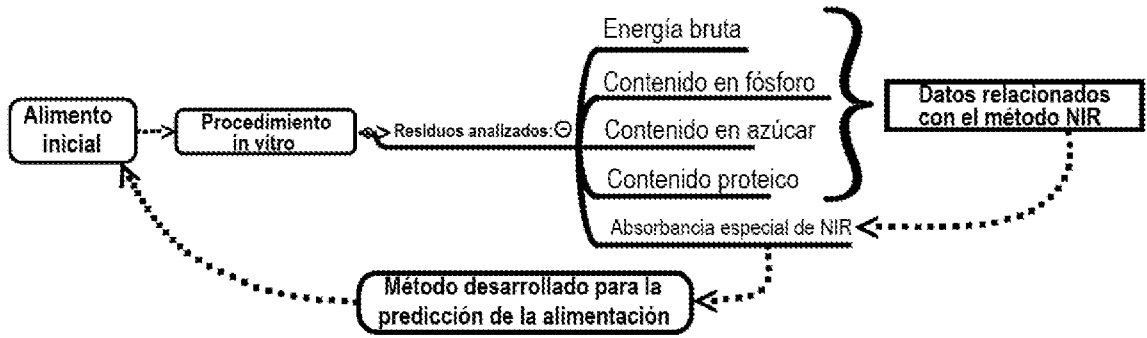


FIG. 1

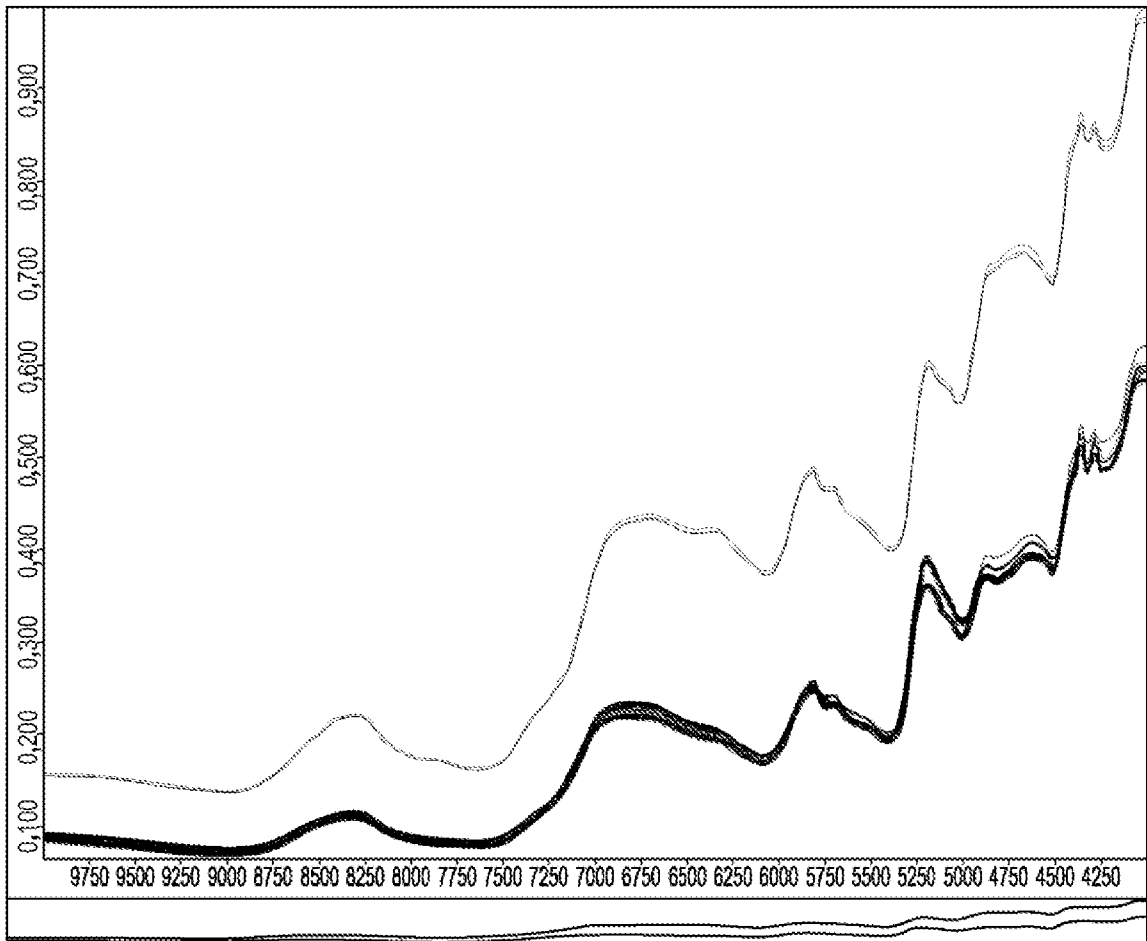
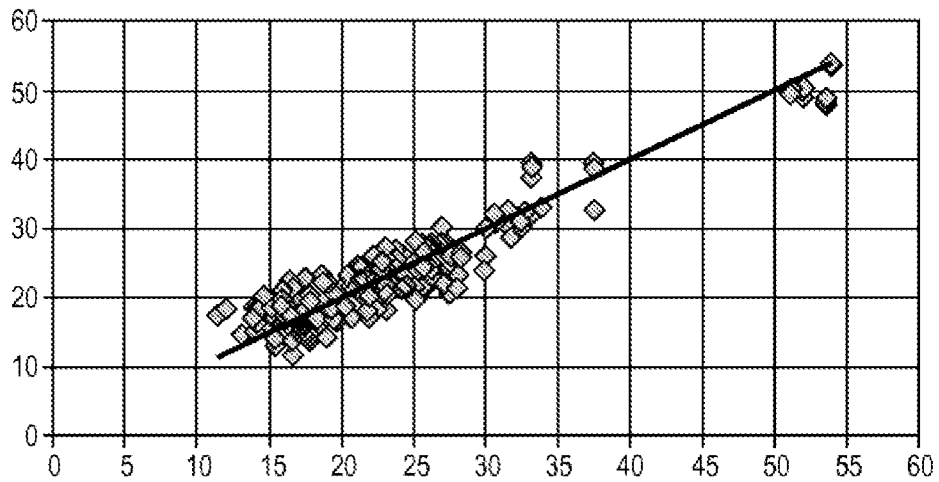


FIG. 2

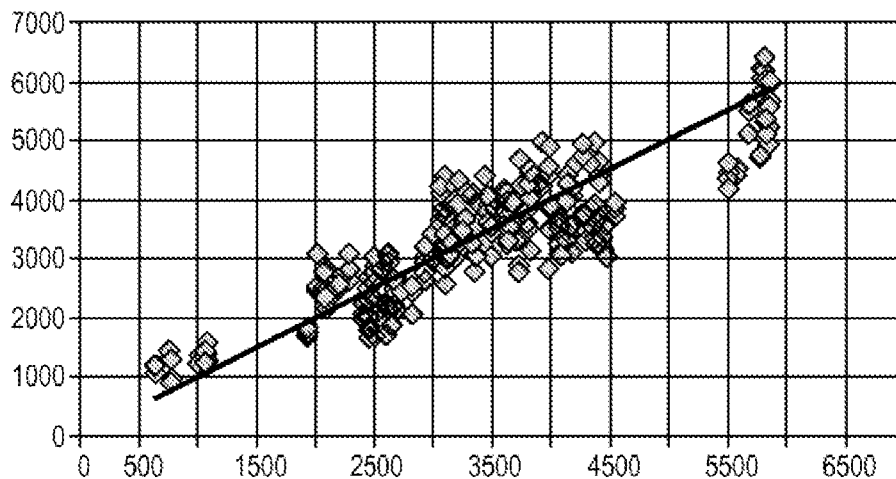
Predicción frente a proteína/verdadera [%]/Validación cruzada



Rango:10  $R^2 = 86,66$  RMSECV = 2,68 Sesgo:0,056 RPD: 2,74  
 Validación N.º 8 + proteína de pollo.q2

**FIG. 3**

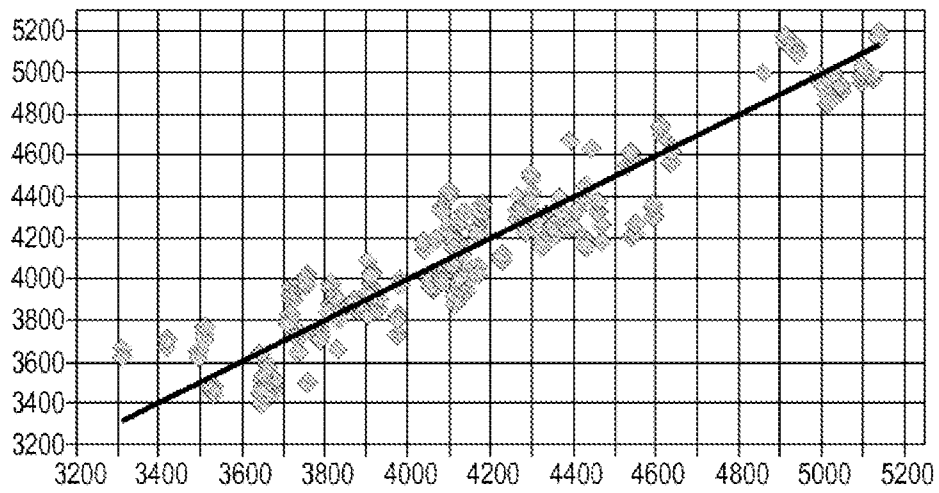
Predicción frente a fosforoso/verdadero [%]/Validación cruzada



Rango:10  $R^2 = 75,94$  RMSECV = 554 Sesgo:11,5 RPD: 2,04  
 Validación N.º 6 ++ proteína de pollo.q2

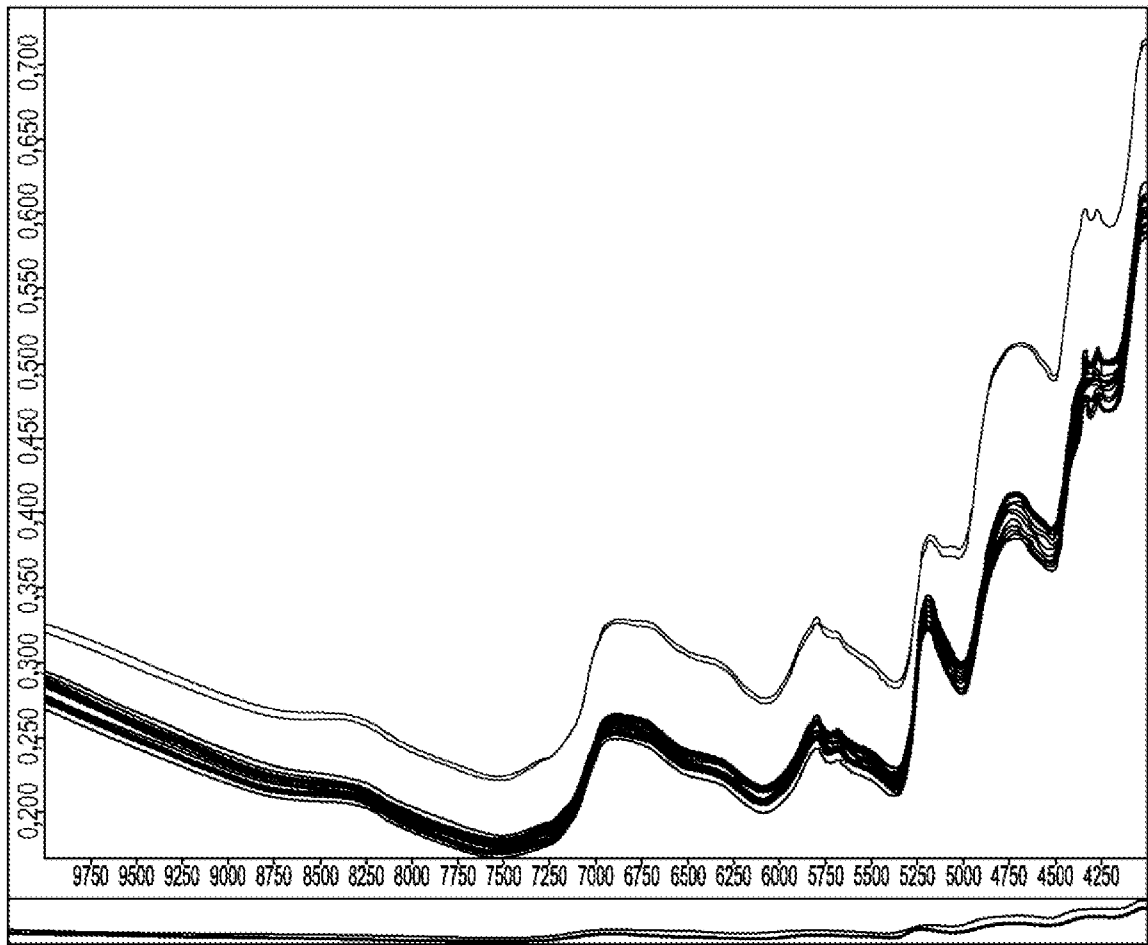
**FIG.4**

Predicción frente a energía bruta/verdadera [cal/g]/Validación cruzada



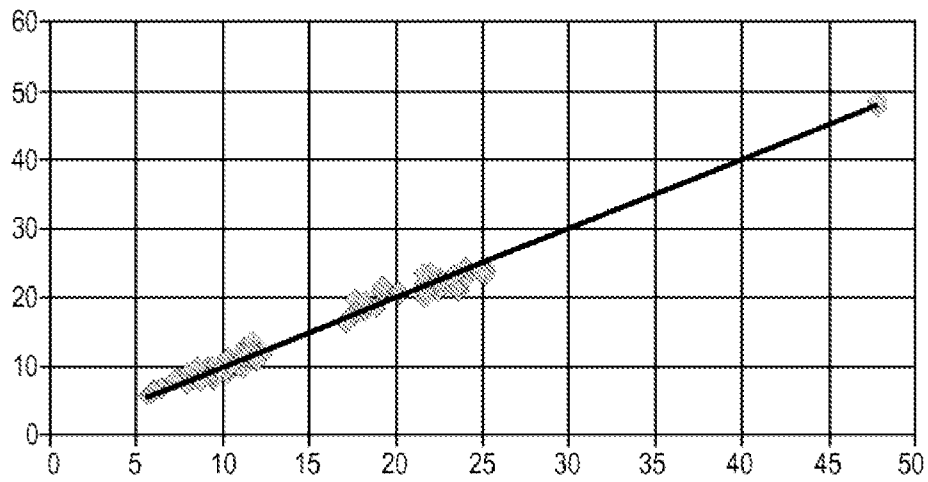
Rango: 10  $R^2 = 87,72$  RMSECV = 148 Sesgo: 0,269 RPD: 2,85  
Validación N.º 9 Energía bruta de pollo.q2

**FIG. 5**



**FIG. 6**

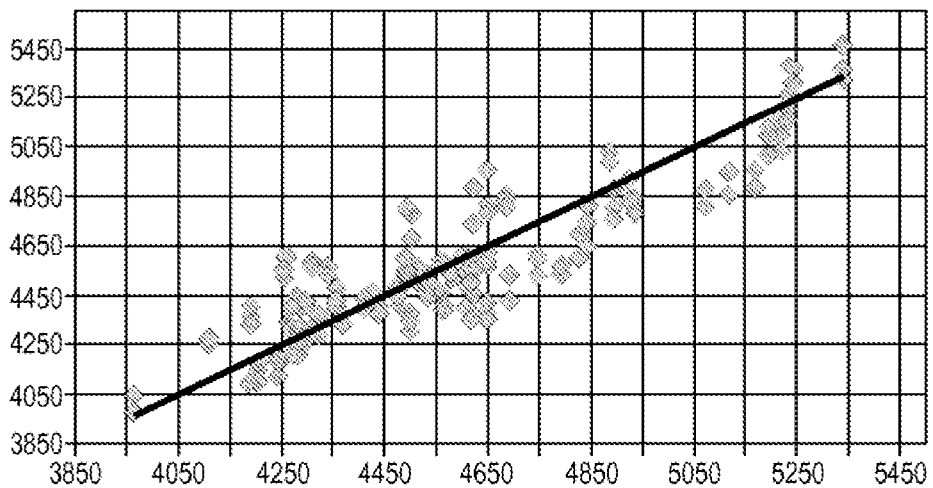
Predicción frente a proteína/verdadera [%]/Validación cruzada



Rango: 10  $R^2 = 98,86$  RMSECV = 0,708 Sesgo: -0,0125 RPD: 9,37  
Validación N.º 3 + proteína de cerdo 3-12.q2

**FIG. 7**

Predicción frente a energía bruta/verdadera [cal/g]/Validación cruzada



Rango: 9  $R^2 = 80,5$  RMSECV = 141 Sesgo: 1,39 , RPD: 2,26  
Validación N.º 4 Energía bruta de cerdo 3-21.q2

**FIG. 8**