



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 333 259**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/716 (2006.01)

A61K 31/737 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

A61K 36/03 (2006.01)

A61K 36/02 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 1/12 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **06809743 .5**

(96) Fecha de presentación : **21.11.2006**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1965809**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **10.09.2008**

(54) Título: **Composiciones destinadas a mejorar la salud intestinal y el rendimiento en animales que comprenden β -glucanos y α -fucanos.**

(30) Prioridad: **21.11.2005 IE 2005/0772**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.02.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.02.2010

(73) Titular/es: **Bioatlantis Limited**
Baylands Ballyard
Tralee, County Kerry, IE

(72) Inventor/es: **O'Doherty, John;**
O'Sullivan, John, T. y
Julka, Aditya

(74) Agente: **Trullols Durán, María del Carmen**

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

Composiciones destinadas a mejorar la salud intestinal y el rendimiento en animales que comprenden β -glucanos y α -fucanos.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a formulaciones nutracéuticas y a los procedimientos de extracción utilizados para obtener las mismas. En otro aspecto, la presente invención se refiere al efecto prebiótico de los β -glucanos y/o los α -fucanos y al potencial de los mismos para actuar como sustitutos de los antibióticos ingeridos. La presente invención puede tener como resultado asimismo un aumento de los niveles de microbios beneficiosos y una reducción correspondiente del nivel de microbios nocivos en los intestinos. Otros aspectos de la presente invención se refieren al aumento de la digestibilidad de los nutrientes y una mayor absorción de minerales y de micronutrientes en el hospedador, y una mejora del rendimiento de los animales desde el punto de vista de un incremento en el aumento de peso, unas mejores proporciones de conversión de los alimentos y una mayor ingestión diaria.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a productos prebióticos para seres humanos y al desarrollo de una nueva composición para administrar a seres humanos a fin de aumentar los niveles de bacterias beneficiosas en los intestinos del ser humano. La presente invención proporciona asimismo una composición simbiótica (que consiste en un producto prebiótico junto con uno probiótico) que cuando se administra a los seres humanos contribuya a restablecer las bacterias beneficiosas y estimular su crecimiento en el intestino humano.

Antecedentes de la invención

Desde la década de los años 40 se conocen los efectos de provocar un crecimiento beneficioso de antibióticos en el pienso para animales a fin de minimizar sus enfermedades. Sin embargo, el informe Swann (1969) solicitó un control gubernamental más estricto de la utilización de antibióticos en el pienso. A partir del informe Swann, se ha producido un interés creciente sobre la transmisión de bacterias resistentes y ello ha tenido como resultado la prohibición en la UE de los activadores del crecimiento de antibióticos siendo efectiva a partir del 1 de enero de 2006. Dicha prohibición de los activadores del crecimiento de antibióticos afectará sin duda alguna al control de las enfermedades en las granjas así como al rendimiento animal y necesita alternativas efectivas. La eliminación de los antibióticos del pienso animal tendrá asimismo como resultado un aumento de la proporción de microbios nocivos tales como *E. coli* y *Salmonella* en la microflora intestinal de los animales de granja.

Incluso en la situación actual, el número de casos de intoxicación alimentaria en los países desarrollados tales como Irlanda ha aumentado durante la última década, siendo las infecciones por *Campylobacter spp.* la causa más común de enfermedades y las infecciones por *Salmonella spp.* la segunda causa más común de enfermedades. En Irlanda, se están incorporando nuevas medidas de control de la salmonela y dichas medidas de control provocarán grandes dificultades a los productores de reses, ganado bovino, aves de corral y cerdos.

Las técnicas ganaderas intensivas actuales han provocado asimismo un aumento de trastornos relacionados con el estrés en los animales de granja, entre ellos una salud intestinal deficiente y una incidencia elevada de enfermedades tales como el síndrome de desmedro multisistémico postdestete (PMWS). El destete constituye una de las situaciones más estresantes de la vida de un cerdo (Melin *et al.*, 2004). El lechón se ve sometido a una multitud de factores estresantes (Pluske *et al.*, 1997) que provocan un deterioro función inmunitaria y un aumento de la susceptibilidad con respecto a las infecciones (Hiss *et al.*, 2003). La utilización de antibióticos ha reducido dichos problemas debido a la disminución de la población microbiana en el tracto gastrointestinal, así como a un cambio de bacterias patógenas a bacterias beneficiosas. Ello tiene como resultado una mejor absorción de los nutrientes, una menor cantidad de sustrato para la proliferación de organismos patógenos y una mejora del estado de salud y la integridad del tracto gastrointestinal (Close, 2000). Sin embargo, como consecuencia de varias alarmas sanitarias relacionadas con el consumo de productos animales está aumentando la presión de los consumidores con respecto a la reducción de la utilización de antibióticos (Williams *et al.*, 2001). Por lo tanto, existe una necesidad urgente de encontrar alternativas a los antibióticos alimentarios que puedan proporcionar las ventajas mencionadas anteriormente sin que afecten negativamente a la salud humana.

Considerando las presiones económicas en el campo de la ganadería intensiva, el rendimiento de los animales, en particular en las primeras etapas del crecimiento, resulta de una importancia crucial para el ganadero. En este sentido, los parámetros clave a considerar comprenden las ganancias medias diarias (aumento de peso por lechón por día), el índice de conversión alimentaria (una medida de la eficiencia del rendimiento del lechón), la ingesta media diaria (gramos de ingesta alimentaria/día) y una reducción del estreñimiento (una medida de la consistencia de las heces y un indicador de diarrea en los lechones). Cualquier composición que pretenda mejorar el rendimiento ha de tener un efecto en el aumento de las ganancias medias diarias (ADG), una mejora del índice de conversión alimentaria (FCR) (que se indica mediante la reducción de su valor) y una reducción del estreñimiento (que se indica mediante unas heces más sólidas).

De un modo similar, unos hábitos alimentarios poco saludables en los seres humanos tienen un gran impacto en la salud intestinal. En un estudio reciente por parte de productores europeos (Leatherhead R. A. Survey), el 21% afirmó que la salud intestinal tendría una gran influencia en el mercado de los alimentos funcionales. Por lo tanto, existe la

necesidad de una composición que mejore la salud intestinal de los seres humanos y actúe como probiótico para las bacterias beneficiosas.

Sustitución de antibióticos: Existen diversas estrategias alternativas que se encuentran disponibles como productos sustitutivos de antibióticos alimentarios y para el control de la salmonela, que comprenden la acidificación de la dieta, la incorporación de diversos productos probióticos en la dieta, fructooligosacáridos, enzimas y plantas.

La acidificación de la dieta utilizando ácidos orgánicos constituye la estrategia más habitual que se utiliza actualmente. Se considera que éstos desempeñan una función importante mejorando la digestión y contribuyendo al equilibrio microbiano del tracto intestinal. Los efectos beneficiosos de los mismos varían en función del tipo, siendo el más fuerte el ácido fórmico. Se requiere un pH bajo para activar enzimas digestivos críticos del estómago por porcino. Asimismo, una de las mayores barreras ante la invasión del tracto intestinal por parte de bacterias patógenas es un pH ácido. Sin embargo, los ácidos tienen un uso limitado excepto si se protegen en el estómago ya que de otro modo probablemente quedarán neutralizados por los enzimas del tracto digestivo superior. Además, a medida que crece el cerdo, aumenta su capacidad para producir de un modo natural una cantidad de ácido suficiente para la digestión, reduciendo de este modo las ventajas de un producto acidificante. De este modo, se pueden considerar los ácidos como unos aditivos útiles únicamente en las dietas de los lechones y en el caso de cerdos alimentados con dietas con poca cantidad de pienso.

Asimismo, cuando se han utilizado con una densidad elevada en ingredientes obtenidos a partir de la leche, la respuesta a la adición de ácido ha resultado muy inferior. Ello se debe a que la lactosa de la leche se convierte en ácido láctico provocando unos cambios ventajosos en el ambiente gástrico, reduciendo de este modo la necesidad de una acidificación adicional. Sin embargo, la lactosa es un componente dietético costoso, y existe la necesidad de descubrir componentes que puedan limitar la cantidad de lactosa requerida en la dieta, al mismo tiempo que potencia sus efectos beneficiosos. Además, unos niveles elevados de lactosa hacen que las dietas resulten más difíciles de preparar, ya que la lactosa es higroscópica y difícil de manipular, especialmente en niveles elevados.

Otra estrategia habitual que se ha utilizado es la introducción de probióticos (o microbios alimentados directamente) en la dieta de los animales. Sin embargo, el desarrollo de probióticos se encuentra limitado por determinados factores inhibidores que comprenden la estricta legislación europea sobre la utilización de probióticos y una amplia gama de ingredientes alternativos. Además, los productos alimentarios animales se tratan habitualmente a temperaturas elevadas y los probióticos (que son microbios en la naturaleza) no pueden sobrevivir dichas temperaturas.

Los oligosacáridos de fructosa (FOS), prebióticos que se comercializan actualmente en el mercado porcino, presentan varias ventajas. Sin embargo, algunos investigadores (Jaskari *et al*, 1998) han puesto en cuestión la selectividad de los FOS como sustrato para las bacterias beneficiosas fermentadoras de los hidratos de carbono. En los ensayos *in vivo* se ha descubierto un aumento del crecimiento de todas las bacterias (entre ellas las bactericidas naturales intestinales así como la *E. coli*), surgiendo dudas acerca de su selectividad. Por lo tanto, los FOS por sí mismos pueden no constituir una solución ideal.

Ninguna de dichas estrategias equivale a los antibióticos desde el punto de vista del rendimiento y todos ellos proporcionan unos resultados muy variables. Existe, por lo tanto, la necesidad de proporcionar un complemento alimentario que pueda actuar como alternativa a los antibióticos y mejorar el rendimiento animal.

Impacto de las dietas poco saludables en los seres humanos: en los últimos años ha existido una tendencia cada vez mayor de aumentar los niveles proteicos de las dietas para seres humanos. Dicha tendencia se agrava por la existencia de dietas ricas en proteínas, tal como la dieta Atkins, que aumenta los niveles de proteínas en la dieta al mismo tiempo que disminuye los niveles de hidratos de carbono. Dichas dietas tienen una gran influencia en la microflora intestinal y aumentan los niveles de bacterias fermentadoras de las proteínas tales como *E. coli* y *Salmonella*, al mismo tiempo que se reducen los niveles de bacterias beneficiosas fermentadoras de los hidratos de carbono tales como los lactobacilos y las bifidobacterias (Lynch *et al.*, sin publicar). Por lo tanto, existe la necesidad de composiciones que restablezcan el equilibrio de la microflora intestinal puedan estimular la incidencia de las bacterias beneficiosas. La estrategia clave que se ha venido utilizando actualmente es la utilización de probióticos, que consisten en cepas particulares microbios que se administran directamente al individuo. Sin embargo, la flora intestinal humana consiste en más de 400 especies de bacterias y los probióticos pueden pretender únicamente reintroducir algunas de dichas especies. Los prebióticos actuales, tales como la inulina, no son específicos y pueden, de hecho, estimular los niveles de bacterias perjudiciales tales como *E. coli* (Jaskari *et al.*, 1998, Pierce *et al.*, 2005), al mismo tiempo que aumentan los niveles de bacterias beneficiosas tales como las bifidobacterias. Por lo tanto, existe la necesidad de una composición prebiótica que puede estimular selectivamente los niveles de bacterias fermentadoras de los hidratos de carbono tales como las bifidobacterias al mismo tiempo que reducen los niveles de *E. coli* y *Salmonella*.

Descripción de las técnicas relacionadas

Definiciones

Se define un prebiótico como un ingrediente alimentario no digerible que afecta beneficiosamente al hospedador estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o más bacterias. La no digestibilidad de los pre-

bióticos garantizan que pueden alcanzar el colon y actuar como fuente de energía para bacterias, a diferencia de los glúcidos habituales, que son digeridas directamente por el hospedador (Gibson *et al.*, 1995).

Los β -glucanos son homopolisacáridos lineales o ramificados constituidos por residuos de glucosa. Los β -(1,3) glucanos son una clase de polisacáridos naturales que se encuentran en muchas especies de levaduras (entre ellas la levadura de Baker o *S. cerevisiae*), hongos, vegetales (comprendiendo los cereales) y algunas bacterias, líquenes y especies de algas (en particular algas pardas o las familias *Ascophyllum* y *Laminaria*). Sin embargo, la estructura y las propiedades fisiológicas de los glucanos que se encuentran en dichas fuentes es bastante distinta de la de los β -glucanos aislados a partir de fuentes vegetales (tales como el trigo, la cebada y la avena) que son homopolisacáridos lineales (de glucosa) con aproximadamente un 70% de enlaces (1,4) y un 30% de enlaces (1,3) (Cui *et al.*, 2000 y MacGregor & Rattan, 1993), mientras que los glucanos aislados a partir de las levaduras consisten sobre todo en cadenas de β -(1,3) glucanos con ramificaciones β -(1,6) así como unas pocas cadenas unidas con un enlace β -(1,6) (Magnelli *et al.*, 2002).

Los β -glucanos de las algas, denominados laminarina, consisten en β -(1,3) glucanos con algunas ramificaciones unidas con un enlace β -(1,6). La laminarina de la *Laminaria digitata* se presenta como dos series homólogas de moléculas, una serie G menor que contiene entre 22 y 28 residuos glucosilo y una serie M más abundante que contiene entre 20 y 30 residuos glucosilo enlazados con un residuo de manitol. La laminarina de muchas especies de *Laminaria* (entre ellas la *Laminaria hyperborea*) es insoluble y consiste sobre todo en cadenas β -(1,3) mientras que la laminarina de la *Laminaria digitata* es soluble y consiste en unos niveles reducidos pero significativos de ramas unidas mediante enlaces β -(1,6). (Read *et al.*, 1996).

Los β -glucanos que se encuentran en las levaduras son cadenas lineales largas de hasta 1300 a 1500 residuos de moléculas de glucano unidas mediante un enlace β -(1,3) con algunas cadenas unidas mediante un enlace β -(1,6) (que tienen un tamaño mucho menor y que presentan únicamente aproximadamente 140 residuos). Por otro lado, los β -glucanos de las algas (denominados también laminarina) presentan unas longitudes de cadena muy inferiores (un número medio de residuos de únicamente 24 residuos) con algunas ramificaciones β -(1,6) en función de la especie. La *Laminaria digitata* presenta la ramificación 1,6 que convierte a los glucanos obtenidos a partir de la misma en hidrosolubles. Otras especies de laminaria como la *hyperborea* no presentan dicha ramificación lo que provoca que las cadenas lineales se agrupen y como consecuencia de ello los glucanos extraídos de la misma son sustancialmente insolubles.

Los polisacáridos naturales constituidos sustancialmente por residuos de α -L-fucosa sulfatada se conocen como fucoidanos (o α -fucanos). Se encuentran presentes en las algas pardas, en algunos equinodermos y constituyen los polisacáridos predominantes en las algas marinas pardas, tales como *Ascophyllum nodosum* y *Laminaria spp.* Los fucoidanos (α -fucanos) se han estudiado exhaustivamente debido a sus propiedades biológicas, ya que constituyen unos potentes agentes anticoagulantes, antineoplásicos y antivíricos.

Descripción de las técnicas anteriores

El documento US n.º 4.891.220 da a conocer unos procedimientos y composiciones para disminuir los niveles séricos de lípidos utilizando glucanos de levaduras que actúan como agente reductor de los niveles de colesterol. De un modo similar, el documento US n.º 6.143.731 describe la capacidad de los glucanos de levaduras para actuar como fuente de fibra, reducir los niveles séricos de colesterol aumentar los niveles de colesterol HDL y actuar como materia no digerible en seres humanos y en animales. De un modo similar, Hogberg *et al.* (2005) describen la alteración de las proporciones molares de diversos ácidos grasos de cadena corta y del ácido láctico en cerdos alimentados con β -glucanos de cereales y otros polisacáridos distintos al almidón. Sin embargo, no existe descripción alguna sobre la influencia de dichos polisacáridos distintos al almidón (NSP) en la absorción de minerales o en cualquiera de los parámetros sobre el rendimiento y los productos prebióticos mencionados anteriormente. Asimismo, se analizó en dicho estudio una mezcla de diversos polisacáridos distintos almidón, a diferencia de la investigación que se da a conocer en el presente documento, en el que se analizan dos NSP específicos.

Muchos investigadores han indicado asimismo el efecto prebiótico de los β -glucanos de cereales (por ejemplo β -glucanos 1,3-1,4 enlazados mezclados) como sustratos selectivos para las bacterias beneficiosas, en particular *Lactobacillus spp.* Jaskari *et al.* (1998) indican cómo las dietas basadas en distintos cereales aportan distintos sustratos para la fermentación microbiana *in vitro*. Charalampopoulos *et al.* (2002) describen la aplicación de los cereales y de los componentes cereales (entre ellos los β -glucanos de cereales) en los alimentos medicinales. Martensson *et al.* (2005) describen la capacidad de los productos basados en la avena fermentada que contienen β -glucanos naturales y glucanos obtenidos a partir de *Pediococcus damnosus* para reducir los niveles de colesterol en los seres humanos y asimismo estimular la flora de bifidobacterias. El *Pediococcus sp.* produce un exopolisacárido de glucanos que contiene una unidad repetida de trisacárido β -(1,3) (1,2) (Llauberes *et al.*, 1990). Sin embargo, ninguno de dichos investigadores ha indicado un efecto prebiótico por parte de los β -(1,3) (1,6) glucanos o la capacidad de dichos glucanos para actuar como sustrato selectivo de las bacterias beneficiosas, sustancialmente de las *bifidobacteria spp.*

Diversos investigadores han observado asimismo el efecto de los β -glucanos administrados a los animales en el rendimiento de dichos animales. El documento US n.º 20050020490 describe la capacidad de los glucanos de levaduras para mejorar el índice de crecimiento durante una prueba de provocación del sistema inmunitario. El documento US n.º 20030219468 describe los efectos beneficiosos de los β -glucanos, combinados con ácido sórbico, en el estado higiénico del pienso así como en el rendimiento del crecimiento de los animales por parte de la combinación para

pienso. El documento US n.º 6.939.864 describe los efectos sinérgicos de los β -glucanos de levadura y el ácido ascórbico en el crecimiento y la salud de los animales. El documento US n.º 6.214.337 se refiere a los efectos beneficiosos de los glucanos de levadura en el rendimiento de los cerdos, cuando se administran junto con un antibiótico. Ninguno de los investigadores anteriores ha observado los efectos de los polisacáridos de las algas, laminarina y fucoidano en el rendimiento de los animales o el efecto de una combinación de dichos glucanos en el rendimiento de los animales (ya que la combinación puede tener unos efectos bastante distintos de los que presentan los componentes administrados por separado).

La mayoría de investigadores indica una correlación negativa entre los niveles elevados de NSP en la dieta y el rendimiento de los animales. Hogberg *et al.* (2005) describen un índice de crecimiento superior a los cerdos alimentados con cantidades inferiores de NSP. Bergh *et al.* (1999) describen asimismo un efecto antinutritivo de los β -glucanos en la nutrición de las aves de corral. Por lo tanto, no quedan claros los efectos beneficiosos de los β -glucanos de los cereales en el rendimiento de los animales. Los efectos de los β -glucanos y de los NSP pueden depender de la solubilidad y la biodisponibilidad de los polisacáridos distintos del almidón. Los presentes inventores han descubierto que los polisacáridos de las algas, cuando se administran en combinación, sorprendentemente, estimulan el rendimiento de los animales en vez de reducirlo, lo que constituye una mejora con respecto a las técnicas anteriores.

Otros investigadores (Petersson & Lindberg, 1997) han observado también la digestibilidad de los cereales, en particular de la cebada y de los β -glucanos que contienen los mismos. Hogberg *et al.* (2005) describen un coeficiente inferior de la digestibilidad de la materia orgánica en el tracto cecal y total en las dietas que contienen unas cantidades elevadas de polisacáridos distintos al almidón que en las dietas que contienen unas cantidades inferiores de los mismos. Bergh *et al.* (1999) describen asimismo una mayor digestibilidad en el íleo de los nutrientes de dietas basadas en la avena cuando se hidrolizan los β -glucanos con un enzima glucanasa. Por lo tanto, las investigaciones parecen indicar una correlación negativa entre la cantidad de polisacáridos distintos del almidón (comprendiendo los β -glucanos) en la digestibilidad de las dietas y de los nutrientes. Sin embargo, nunca se ha esclarecido el impacto directo de los β -glucanos (1,3) (1,6) y otros polisacáridos de las algas tales como el fucoidano en la digestibilidad. De nuevo, la composición de la presente patente mejora la digestibilidad y significa una mejora con respecto a las técnicas anteriores en este sentido.

Hayen *et al.* en el documento US n.º 6.214.337 se refieren a la adición de glucanos de levadura al pienso para animales a fin de mejorar el crecimiento animal, los glucanos utilizados son β -(1,3)- y β -(1,6)-glucanos obtenidos a partir de levaduras tales como, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*. Determinan los efectos de dichos glucanos, cuando se utilizan sinérgicamente con los antibióticos, y no proponen los glucanos como sustitutos de los antibióticos.

Un punto importante de la diferencia entre las técnicas anteriores y el presente trabajo es que muchos de los ensayos de las técnicas anteriores se realizaron en presencia de antibióticos y harina de plasma/sangre administrados en las dietas. Los resultados obtenidos con dichas dietas serán probablemente sustancialmente distintos a los resultados obtenidos sin las mismas. De hecho, la presente invención está motivada por la necesidad de encontrar sustitutos para los antibióticos y no se refiere a los efectos fisiológicos observados en presencia de otros compuestos.

Otras patentes y solicitudes de patente que en líneas generales se refieren a este campo son US n.º 5.591.428, US n.º 6.841.181, US n.º 5.622.939, US n.º 20040253253, US n.º 20010016220, US n.º 20030124170, US n.º 20040138172, US n.º 20040058889, US n.º 20050058671, US n.º 20050118326, US n.º 20050020490 y US n.º 200201 46484.

Extractos de algas marinas

Existe un interés considerable en la sociedad occidental sobre los posibles efectos beneficiosos para la salud de la alimentación con algas marinas y extractos de algas marinas (véase por ejemplo <http://www.whfoods.com>). Se ha publicado que un cierto número de compuestos obtenidos a partir de las algas marinas, tales como la carragenina, la quitina y el agar, que mejoran la salud intestinal en los seres humanos y que actúan sinérgicamente con un prebiótico. Por ejemplo, la patente US n.º 20040086491 se refiere a un prebiótico humano y a una mezcla probiótica que consiste asimismo en los oligosacáridos carragenina, quitina y agar así como en un polisacárido distinto del almidón, la inulina, un compuesto prebiótico muy conocido. Se ha descrito que el alginato, otro polisacárido procedente de las algas, presenta diversas ventajas, entre ellas unos efectos positivos en la salud gastrointestinal y cardiovascular, y puede actuar como fibra dietética (Brownlee *et al.*, 2005). Sin embargo, los niveles de alginato analizados son muy superiores a los contenidos en la composición actual. Además, los estudios realizados sobre un efecto prebiótico potencial han resultado poco concluyentes.

Sin embargo, nunca se han investigado los efectos prebióticos de los polisacáridos obtenidos a partir de las algas pardas, en particular la laminarina y el fucoidano, en sistemas *in vivo*. C. Michel *et al.*, 1996, se refieren a la degradación de las fibras de las algas por parte de las bacterias fecales humanas. Sin embargo, dicha respuesta *in vitro* no se puede extrapolar para indicar un efecto prebiótico en los mamíferos por diversos motivos. En primer lugar, el experimento realizado por el grupo no simuló los enzimas ni las condiciones del aparato digestivo, que pueden alterar las fibras de tal modo que se conviertan en más o menos susceptibles a la fermentación bacteriana. En segundo lugar, las bacterias fecales no representan la composición total de las bacterias festivas humanas. Además, las fibras se pueden degradar en el tracto digestivo superior y puede ser que nunca alcancen la población microbiana objetivo en el tracto digestivo inferior. Asimismo, el papel mencionado anteriormente no hace frente a las bacterias intestinales porcinas, a diferencia de la presente investigación.

Las algas marinas constituyen una fuente apropiada de principios activos de la presente solicitud, en particular las algas pardas. Las patentes US n.º 2003119780, US n.º 200500651 14 y US n.º 20050095250 describen unos procedimientos de producción de laminarina con aplicaciones antineoplásicas, tanto extrayendo la laminarina de las algas marinas como sintetizando pequeñas moléculas análogas a la laminarina. El procedimiento utilizado para extraer la laminarina consiste habitualmente en una etapa de hidrólisis ácida, seguida por centrifugación y a continuación ultrafiltración para obtener la laminarina con el tamaño molecular pretendido. La laminarina procedente en determinadas algas marinas tales como la *Laminaria digitata* presenta la ventaja de que es hidrosoluble, reduciendo la necesidad de una etapa adicional de solubilización en el proceso.

Para los propósitos de la presente invención, no se requiere una conformación específica de la laminarina/glucano ya que la acción periódica o antibiótica no viene determinada por su conformación tridimensional sino por la naturaleza del enlace y la longitud de la cadena. No resulta necesario que la laminarina se encuentre separada de glúcidos adicionales procedentes de las algas tales como el fucoidano o alcoholes glucídicos tales como el manitol, ya que reducen a la mitad las acciones biológicas beneficiosas de los mismos y que actúan sinérgicamente con la laminarina para mejorar la salud intestinal.

La singularidad nutritiva de las algas marinas implica asimismo a una categoría de nutrientes denominada polisacáridos sulfatados. Dichos nutrientes relacionados con los hidratos de carbono, denominados asimismo fucanos, se han estudiado con respecto a sus propiedades antiinflamatorias, y se ha descubierto que los extractos de fucano procedentes de algas marinas pardas comestibles inhiben la activación del complemento humano *in vitro* (Blonden *et al.*, 1995).

Las laminarinas, tanto las extraídas de un modo natural como las obtenidas sintéticamente, se han investigado también con respecto a sus propiedades inmunitarias y la patente US n.º 20050208079 describe dichos efectos así como unos procedimientos de preparación de dichos extractos biológicamente activos. La patente US n.º 2005095250 describe el efecto antineoplásico de la laminarina, cuando se aplica junto con un anticuerpo monoclonal mientras que la patente US n.º 20030119780 describe dichos efectos para la laminarina sola. La patente US n.º 20050065114 describe los efectos antineoplásicos de análogos de la laminarina de cadena y unos procedimientos de preparación de los mismos. La patente US 20040127457 describe la acción antiinflamatoria de la laminarina. Todas estas aplicaciones se basan en las propiedades inmunoestimulantes de la laminarina para su acción.

Turner *et al.*, 2002, descubrieron una pequeña mejora en el rendimiento del crecimiento y la ausencia de respuesta inmunitaria en los cerdos alimentados con extracto de *Ascophyllum nodosum*. Sin embargo no mencionan la naturaleza del extracto (ácido o alcalino) o la composición del extracto. De este modo, resulta difícil especular qué componentes del extracto eran los responsables de los resultados. Tal como se indica en otros sitios del presente documento, el procedimiento de extracción resulta muy importante en la composición del extracto resultante.

Ninguna de las composiciones de las técnicas anteriores describen la utilización de β -glucanos o de α -fucanos, por separado o combinados, para mejorar la absorción de minerales y micronutrientes. Además, ninguno de los anteriores hacen referencia a la utilización de los β (1,3) (1,6) glucanos o α -fucanos, por separado o juntos como prebióticos en los mamíferos, como medios para reducir el riesgo de infección *E. coli* y *Salmonella* (en particular en cerdos que han terminado la lactancia) y como medios para mejorar la digestibilidad de los nutrientes ileal y aparente. Tampoco hacen referencia alguna a las ventajas de los β -glucanos y los α -fucanos, en particular aquellos obtenidos a partir de las algas marinas, como medios para mejorar el rendimiento de los cerdos y actuar como sustitutos de los antibióticos ingeridos en los cerdos.

Existen diversos informes publicados de procedimientos para obtener extractos de algas marinas. Por ejemplo, el documento GB 727013 da a conocer un procedimiento para extraer laminarina, manitol, y ácido algínico a partir de diversos tipos de algas marinas. Mabeau *et al.*, 1987, hacen referencia a un procedimiento de extracción de polisacáridos a partir de las algas marinas, especialmente fucanos tales como el fucoidano. S. Collic *et al.*, 1994, proporcionan asimismo un procedimiento para extraer fucoidano en bruto a partir de las algas marinas mediante un tratamiento ácido. Zvyagintseva *et al.*, 1999, describen un procedimiento para obtener polisacáridos hidrosolubles a partir de algas marinas utilizando cromatografía hidrófoba. Sin embargo, la mayor parte de dichos procedimientos resultan demasiado costosos para realizarlos a escala comercial (por ejemplo, los procedimientos que implican la cromatografía) o presentan unos rendimientos que son poco rentables a gran escala.

Por lo tanto, existe también la necesidad de una composición prebiótica que se pueda extraer de un modo económico y que resulte biológicamente activa como prebiótico en los seres humanos o en los animales. Existe asimismo la necesidad de una composición periódica con unos niveles elevados de β -(1,3) (1,6)-glucano y/o α -fucanos, y de un procedimiento para obtener la misma.

Objetivo de la invención

Constituye un objetivo de la presente invención proporcionar una nueva composición que pueda actuar como complemento alimentario prebiótico y mejorar la salud intestinal de los seres humanos y de los animales. Un objetivo adicional consiste en la extracción de nuevas composiciones que se puedan utilizar como complementos alimentarios a partir del grupo que consiste en las algas marinas, la cebada, las levaduras, la avena, las setas, y otros hongos/microbios.

Constituye un objetivo adicional de la presente invención el hecho de que el complemento alimentario proporcione unos medios de regulación de la microflora intestinal para ayudar al crecimiento de los microbios beneficiosos; y/o unos medios de acidificación del intestino que provocan una mejora de la salud intestinal y/o una reducción del crecimiento de las bacterias patógenas (en particular en los cerdos pequeños). Otros aspectos de la presente invención se refieren a una mejora de la absorción de minerales del intestino posterior así como una mejora del rendimiento de los animales. Los aspectos de la presente invención resultan particularmente útiles para mejorar la cría del ganado porcino, del ganado bovino y de las aves de corral.

Otros objetivos de la presente invención se refieren al efecto beneficioso de los β -glucanos y/o de los α -fucanos obtenidos a partir de materiales naturales y a su potencial como sustitutos de los antibióticos ingeridos.

Constituye asimismo un objetivo de la presente intención proporcionar prebióticos humanos y nuevas composiciones para seres humanos destinadas a aumentar los niveles de bacterias beneficiosas en el intestino humano. La presente invención proporciona asimismo un simbiótico (que consiste en un prebiótico junto con un probiótico) que se administra a los seres humanos para restablecer las bacterias beneficiosas y estimular su crecimiento en el intestino.

Constituye asimismo un objetivo de la presente invención proporcionar un nuevo procedimiento de extracción para obtener un complemento alimentario prebiótico obtenido a partir de algas marinas de un modo económico que se pueda realizar fácilmente a gran escala. Constituye asimismo un objetivo proporcionar un método de obtención de dicha composición que consiste en una nueva etapa de nanofiltración.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han descubierto que una composición particular, que consiste en una proporción elevada de β -glucanos y de α -fucanos, puede actuar como antibiótico, en particular en mamíferos jóvenes (reduciendo el riesgo de infecciones por *E. coli* y *Salmonella*) y mejorar el rendimiento de los animales. Dicha composición actúa asimismo como prebiótico en los seres humanos y en otros mamíferos grandes y estimula selectivamente el crecimiento de los microbios beneficiosos. Asimismo, mejorar la absorción de los minerales en el intestino posterior y aumenta la digestibilidad de los nutrientes. Ello significa una gran mejora con respecto a las técnicas anteriores, ya que actualmente no existe una composición simple que permita alcanzar simultáneamente todos estos objetivos.

Composición

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende por lo menos aproximadamente un 8% en peso de β -glucanos o por lo menos aproximadamente un 8% de α -fucanos o una mezcla de los mismos. Preferentemente, los β -glucanos se encuentran presentes en una cantidad comprendida entre aproximadamente el 8% y aproximadamente el 30% en peso. De un modo ideal, para algunas aplicaciones, los β -glucanos comprenden β -(1,3) (1,6)-glucanos. Ventajosamente, éstos se obtienen a partir de algas marinas y/o de levaduras. En las formas de realización preferidas de la presente invención el β -glucano presente es la laminarina, aunque la presente intención prevé β -glucanos alternativos tales como el escleorglucano y el PSAT. La laminarina es el polisacárido de reserva de la *Laminaria* y otras algas pardas; está constituido principalmente de β -(1-3)-glucano con algunos enlaces β -(1-6). Otras fuentes de β -glucanos comprenden extracto de levaduras, setas, cebada y avena.

Preferentemente, los α -fucanos se encuentran presentes en una cantidad comprendida entre aproximadamente el 8% y aproximadamente el 30% en peso. La presente invención prevé la utilización de diversos α -fucanos y, en particular, los fucanos presentes en muchas plantas marinas (tales como las algas marinas) y vegetales marinos, tales como en las paredes del cuerpo de las holoturias; en particular, el α -fucano presente en las paredes celulares de las algas marinas pardas, y en el revestimiento gelatinoso de las huevas de los erizos de mar. De un modo ideal, la presente invención utiliza el fucoidano, el α -fucano presente en las algas marinas pardas.

Preferentemente, la composición contiene una proporción elevada de β -glucanos y/o α -fucanos y minerales naturales, y una proporción correspondientemente reducida de alginato y polifenoles. En algunos aspectos preferidos de la presente invención, la composición prebiótica comprende una mezcla de por lo menos aproximadamente el 8% en peso de β -glucanos y por lo menos aproximadamente el 8% de α -fucanos. Preferentemente, la composición comprende entre aproximadamente el 8% y el 30% de β -glucanos y entre aproximadamente el 8% y el 30% de α -fucanos. La cantidad combinada de β -glucanos y α -fucanos puede llegar hasta aproximadamente el 60% (p/p) de dicha composición; preferentemente los β -glucanos y/o los α -fucanos se encuentran en una cantidad combinada comprendida entre aproximadamente el 20% y aproximadamente el 30% de la composición. Algunas formas de realización de la presente invención pueden proporcionar unas proporciones distintas en función de la utilización pretendida, por ejemplo, algunas formas de realización pueden proporcionar una mayor proporción de α -fucano para proporcionar un mayor éxito como sustituto antibiótico. Otras aplicaciones de proporciones no equivalentes resultan fácilmente evidentes para los expertos en la materia, tomando en consideración las calidades relativas distintas de los β -glucanos y los α -fucanos y la utilización pretendida de los mismos.

Las composiciones de la presente invención pueden comprender además manitol. Aunque no se pretenda circunscribirse a la teoría, se considera que el manitol, cuando se utiliza junto con uno o más de entre los β -glucanos y los α -fucanos, proporciona un efecto cooperativo aumentando la eficacia global; debido en parte a que el manitol aumenta la dulzura del complemento alimentario o a que el manitol interviene en la translocación de minerales y/u oligoele-

mentos en el tracto digestivo debido a su tamaño molecular más reducido. Preferentemente, el manitol se encuentra presente en una cantidad comprendida entre aproximadamente el 5% y aproximadamente el 25% (p/p) de la composición. Además, se puede proporcionar asimismo lactosa (pura o en forma sérica) con las composiciones de la presente invención. Preferentemente, la lactosa se encuentra presente en una cantidad comprendida entre aproximadamente el 5% y aproximadamente el 30% (p/p) de la composición. La composición puede comprender asimismo minerales y oligoelementos. Los niveles de minerales pueden estar comprendidos entre el 5 y el 40% en función de la aplicación. Ventajosamente, las composiciones de la presente invención se pueden utilizar junto con el pienso animal. De un modo ideal, las composiciones de la presente invención se pueden utilizar con el pienso animal en una cantidad comprendida entre aproximadamente el 0,1 y aproximadamente el 10% en peso. En unas formas de realización alternativas, el pienso animal puede comprender asimismo hasta un 30% de lactosa. La lactosa puede actuar sinérgicamente con los otros componentes de la composición.

En unas formas de realización preferidas, los β -glucanos y/o α -fucanos se obtienen a partir de materiales naturales tales como las algas marinas, la cebada, las setas, la avena, las levaduras y otras fuentes microbianas. Las algas marinas pueden ser una o más seleccionadas de entre el grupo que consiste en las *Laminariaceae*, *Fucaceae*, *Gigartiniaceae*, *Ascophyllum*, *Laminaria*, *Durvillea*, *Macrocystis*, *Chondrus* y *Ecklonia*. Resulta particularmente referida la *Laminaria* y/o el *Ascophyllum*. Los β -glucanos y/o los α -fucanos se pueden obtener a partir de más de una fuente. Otros componentes de la presente invención se pueden obtener a partir de las mismas fuentes o de alternativas.

La composición se puede proporcionar en forma pulverulenta. El contenido sólido total puede ser superior a aproximadamente el 90% del peso total. A continuación se muestran unos ejemplos de intervalos ideales en peso de algunos de los constituyentes habituales de la composición:

el contenido total en cenizas puede ser inferior a aproximadamente el 40%;

el contenido total en proteínas se puede encontrar comprendido entre aproximadamente el 3 y aproximadamente 7%;

el contenido total en líquidos puede ser aproximadamente del 4%;

el contenido total en hidratos de carbono puede ser aproximadamente del 50%;

el contenido de glúcidos reductores se puede encontrar comprendido entre aproximadamente el 1 y aproximadamente 5%;

la concentración total de β -glucanos y/o α -fucanos se puede encontrar comprendida entre aproximadamente el 20% y aproximadamente el 25%;

el contenido en fibra insoluble (no dietética) se puede encontrar comprendida entre aproximadamente el 2 y aproximadamente el 6%;

el contenido en metilpentosano se puede encontrar comprendido entre aproximadamente el 2 y aproximadamente el 6%;

el contenido total en fenoles puede ser inferior a aproximadamente el 5%, y de un modo ideal inferior al 2%;

el contenido total de antioxidantes (comprendiendo BHA, BHT, etoxiquina, vitamina C, tocoferoles) puede alcanzar aproximadamente el 5%;

el contenido total de alginato puede ser inferior a aproximadamente el 5% y de un modo ideal inferior a aproximadamente el 2%.

La composición puede comprender asimismo pequeñas cantidades (inferiores a aproximadamente 500 ppm) de hormonas vegetales tales como fitocininas, auxinas, giberelina y betaínas. La composición prebiótica puede comprender asimismo una cantidad apropiada de un conservante de calidad alimentaria con un pH reducido, tal como el benzoato sódico, aunque resulta apta una gran variedad de conservantes alimentarios.

En unas formas de realización alternativas de la presente invención, la composición prebiótica se puede proporcionar en forma líquida de tal modo que contenga entre aproximadamente el 10 y aproximadamente el 50% (p/p) del polvo tal como se ha descrito anteriormente. A continuación el extracto líquido se puede deshidratar por aspersión para obtener un extracto en forma pulverulenta, que puede presentar, por ejemplo, un color crema.

La presente invención se puede proporcionar asimismo en forma de una composición de pienso animal que comprenda el pienso para animales y la composición prebiótica de la presente invención, encontrándose dicha composición presente entre aproximadamente el 0,001 y el 10% en peso, siendo dicha cantidad suficiente para efectuar la acción prebiótica y la acción reductora del pH en un animal, y que se administra por vía oral como parte de dicha composición.

de pienso para animales. Las composiciones de pienso para animales y/o las composiciones prebióticas de la presente invención se pueden administrar por separado a los animales o junto con un excipiente seleccionado de entre un grupo que consiste en, pero sin limitarse a los mismos, agua, aceite, leche y mezclas de los mismos.

5 La composición prebiótica se puede mezclar junto con uno o más cultivos probióticos, ventajosamente en forma de comprimido o de cápsula. Algunas formas de realización pueden contener un 10% o más de cultivo probiótico, mientras que en otras formas de realización, la proporción entre el prebiótico y el cultivo probiótico es de 1:3. Una amplia gama de cultivos probióticos resulta apta para utilizar en las diversas formas de realización de la presente invención, tales como *Bifidobacteria Lactobacilli*, *leichmannii*, *L. plantarum*, *L. cellobiosius*, *B. adolescentis* y/o *L. acidophilus*. En las formas de realización preferidas el cultivo probiótico es de *Lactobacilli* o de *Bifidobacteria*.
10

La presente invención proporciona asimismo una preparación farmacéutica que comprende un excipiente farmacéutico apropiado y una o más composiciones de la presente invención.

15 La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento para obtener dicha composición a partir de algas marinas que consiste en una nueva etapa de extracción ácida combinada con una etapa de nanofiltración. Los presentes inventores han descubierto que sometiendo el extracto ácido de una alga marina tal como la *laminaria spp* a una etapa de nanofiltración tiene como resultado una separación clara de las sales, produciéndose un líquido de color verde claro que se puede secar para formar un polvo de color crema que resulta ideal para los propósitos de la presente invención. El líquido se puede utilizar asimismo por separado. Dicha etapa adicional en la que se combina una etapa de extracción ácida con una etapa de nanofiltración es nueva. Un aspecto adicional de la presente invención es un procedimiento para la extracción de β -glucanos, α -fucanos y manitol a partir de las algas marinas. Las algas marinas pueden ser de especies distintas, por ejemplo: *Ascophyllum nodosum*, *Fucus*, *Laminarin digitata*, *Laminaria saccharina*, *Laminaria hyperborea*.
20

25 La presente invención proporciona un procedimiento para obtener una composición a partir de algas marinas que comprende;

(i) Mantener la temperatura de una disolución de algas marinas a una temperatura comprendida entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 80°C;
30

(ii) Mantener el pH de la disolución a un pH ácido;

(iii) Decantar la disolución;
35

(iv) Depurar la disolución;

para obtener un extracto de algas marinas claro.

40 En lo que se refiere al procedimiento, muchos investigadores de la especialidad se han centrado en la extracción de β -(1,3) (1,6) glucanos en su estado conformacional natural como si ello resultara necesario para que los mismos presentaran su actividad inmunitaria. Se ha demostrado que los β -glucanos de las levaduras ejercen efectos inmunitarios en los seres humanos y en los animales y la mayor parte de patentes sobre el tema se han centrado en la extracción de dichos glucanos, habitualmente en forma de micropartículas, solubilizándose a continuación los mismos para convertirlos en seguros para una administración intravenosa. Se alcanza la hidrosolubilidad tanto mediante la escisión de la forma de glucanos con micropartículas grandes en moléculas más pequeñas utilizando procedimientos tales como una digestión enzimática o unos ajustes potentes del pH, o mediante la formación de complejos con sales tales como aminos (US n.º 4.761.042), sulfatos y fosfatos (US n.º 4.739.046). La principal ventaja de una forma hidrosoluble más pequeña con respecto a la forma en micropartículas más grandes es que resulta más segura cuando se administra por vías parenterales, tales como la intravenosa. Asimismo, resulta más probable que las moléculas con un tamaño inferior se encuentren más biodisponibles desde un punto de vista molar.
50

En diversas publicaciones se describe un procedimiento de extracción de glucanos activos desde un punto de vista inmunológico que comprenden Freimund *et al.*, (2003) que utilizan un procedimiento enzimático para la extracción de β -glucanos solubles puros y Muller *et al.*, (1997), que han estudiado la influencia de diversos ácidos próticos utilizados en la extracción sobre la integridad y la actividad biológica de los glucanos extraídos. De un modo similar, los documentos US n.º 5.633.369 y US n.º 5.705.184, US n.º 2004008253, US n.º 20020143174 (glucanos con un peso molecular muy elevado) y US n.º 20020032170 describen un procedimiento para producir glucanos solubles con una actividad biológica directa obtenidos a partir de levaduras. Un subconjunto de cualquiera de dichos procedimientos se puede utilizar para realizar, por ejemplo, los β -(1,3) (1,6) glucanos a partir de levaduras para algunos aspectos ventajosos de la presente invención. En la presente invención, no resulta esencial separar las manoproteínas y los lípidos de la pared celular, ya que realizan unos efectos biológicos beneficiosos propios cuando se aplican a los animales.
60

65 La presente invención supone una mejora significativa con respecto a los desarrollos dados a conocer en las técnicas anteriores. Se sabe que los procedimientos de extracción ácida conocidos, por ejemplo el documento GB 727.013, resultan de algún modo costosos y obtienen un rendimiento en nutrientes relativamente bajo. Principalmente por dicho motivo, la tendencia ha sido utilizar un procedimiento de extracción alcalino ya que con el mismo se obtienen

unos rendimientos superiores en nutrientes que con los procedimientos de extracción ácida conocidos anteriormente. Sin embargo, las investigaciones han demostrado que, de un modo sorprendente, la utilización de extractos de algas marinas extraídos de un modo alcalino tienen como resultado una tendencia a reducir el incremento de peso en los animales analizados (Pierce, A, 2002).

Por lo tanto, existe la necesidad de un procedimiento de extracción ácida que se pueda realizar de un modo económico a gran escala y que proporcione unos rendimientos que lo conviertan en viable comercialmente. El procedimiento anterior es un procedimiento de extracción de este tipo y se puede utilizar para producir la composición a gran escala.

Gore Vivian *et al.* en los documentos US n.º 6.342.242, US n.º 6.432.443, US n.º 6.338.856, US n.º 6.312.709, US n.º 6.270.812, US n.º 6.383.538, US n.º 6.391.331 y US n.º 20030003134 y US n.º 20020022049 se refieren a la utilización de extracto de algas marinas procedente de *Ascophyllum nodosum* y harina en la dieta animal. Se descubrió que las algas marinas potencian la respuesta inmunitaria en los mamíferos y las aves de corral, reducen el contenido de *E. coli* en el ganado vacuno y aumentan el tiempo de conservación de los cuerpos de los animales muertos. Dichos documentos describen un extracto de algas marinas obtenido mediante hidrólisis alcalina. El procedimiento alcalino de extracción proporciona una proporción superior de nutrientes totales, aunque una proporción inferior de β -glucanos, no superior al 8% y habitualmente comprendida entre el 6% y el 7,5%, y de α -fucanos, habitualmente comprendida entre 6% y el 8%, aunque los rendimientos de hasta el 9% son potencialmente posibles. Los extractos alcalinos comprenderán habitualmente un 25% de alginato y un 7% de polifenoles. Los procedimientos de extracción ácida de la presente invención producen una cantidad de alginatos y polifenoles un 80% inferior que en el caso de las extracciones alcalinas normales, por ejemplo, produciendo hasta aproximadamente el 5% de alginatos y hasta aproximadamente entre un 1 y un 2% de polifenoles. En cambio, la presente invención proporciona unos componentes particulares del extracto de algas marinas (α -fucanos y/o β -glucanos), obtenidos a partir de unos nuevos procedimientos de extracción que resultan beneficiosos para la salud de los animales y de los seres humanos. Además, el modo de acción que se formula en dichos documentos, es decir, mediante la estimulación del sistema inmunitario es bastante distinto del modo de acción de nuestra composición, que actúa como prebiótico en los mamíferos mayores y como antibiótico en los mamíferos jóvenes.

Ventajas potenciales de la composición

Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que la presente invención proporciona unas composiciones y procedimientos con varios usos. Las composiciones de la presente invención pueden actuar como prebiótico, es decir, actuar selectivamente como sustrato para, y estimular el crecimiento de microbios beneficiosos tales como las *bifidobacteria* en los mamíferos mayores. En particular, las composiciones que comprenden β -(1,3)(1,6) glucanos, (por ejemplo, las obtenidas a partir de levaduras o de algas marinas) son adecuadas con composiciones que comprenden β -(1,3)(1,6) glucanos obtenidos a partir de algas marinas, siendo particularmente ventajosas. Dicho efecto se ve aumentado cuando los glucanos se administran junto con fucoidano y manitol.

Las bacterias beneficiosas, mediante la exclusión competitiva y mediante la secreción de metabolitos específicos (bacteriocinas), disminuyen el crecimiento de bacterias perjudiciales tales como *E. coli* y *Salmonella*. Por lo tanto, la presente invención proporciona unos procedimientos para reducir el crecimiento de las bacterias perjudiciales en los intestinos de los mamíferos. La composición ejerce asimismo una acción antibiótica directa en los mamíferos jóvenes, cuyos aparatos digestivos pueden no estar desarrollados para descomponer los constituyentes en una forma prebiótica. De este modo, la composición actúa como sustituto excelente de los antibióticos ingeridos y aumenta el rendimiento de los animales para alcanzar e incluso superar los efectos de dichos antibióticos.

Las composiciones de la presente invención proporcionan asimismo unos medios de acidificación del intestino grueso que resultan beneficiosos para los animales y para la eficiencia de la ganadería en ausencia de activadores del crecimiento de antibióticos ingeridos. Esta disminución del pH reduce el crecimiento de microbios perjudiciales tales como la *E. coli* y aumenta la acción prebiótica de dichos hidratos de carbono. Las composiciones de la presente invención se pueden utilizar como sustitutos de los antibióticos ingeridos.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un simbiótico para humanos o animales destinado a restablecer las bacterias beneficiosas y a potenciar su crecimiento en los intestinos.

Además, se ha descrito que uno de los componentes de dicha composición, el fucoidano (α -fucano), tiene efectos antineoplásicos, antitrombóticos y antivíricos en los seres humanos, además de estimular la utilización de la composición.

La presente invención proporciona un procedimiento para mejorar la salud intestinal de los seres humanos o de animales que comprende el tratamiento del ser humano o animal con una o más composiciones de la presente invención, y en particular, los β -(1,3) (1,6) glucanos obtenidos a partir de levaduras y de fuentes vegetales, fúngicas y algales. Habitualmente, los NSP, en particular los NSP insolubles, se han relacionado con una reducción del rendimiento y de la digestibilidad. Ello se debe a que los elevados niveles de NSP en la dieta aumentan el tamaño del intestino (en particular la longitud del intestino delgado), lo que significa una demanda superior de energía por parte del animal. Sin embargo, si las composiciones de la presente invención se administran por separado con las dosis recomendadas, mejoran realmente el rendimiento. En conjunto, una composición específica de polisacáridos algales, en particular la laminarina y el fucoidano tiene unos efectos beneficiosos en los rendimientos porcinos tal como se puede determi-

nar mediante las ingestas alimentarias, el aumento diario y las proporciones de conversión de alimentos. La presente invención proporciona la utilización de polisacáridos algales, en particular la laminarina y el fucoidano, en los complementos alimentarios, ya que tendrán efectos beneficiosos en el rendimiento de los cerdos tal como se puede determinar mediante los índices de crecimiento, el aumento diario y las proporciones de conversión de alimentos. Dichos efectos

5 variarán en función de la fuente algal y de las solubilidades de los polisacáridos resultantes.

La presente invención proporciona asimismo unos procedimientos para mejorar la digestibilidad de los nutrientes en animales grandes o en seres humanos que comprende administrar a los animales o a los seres humanos las composiciones de la presente invención. En particular, los β -(1,3) (1,6) glucanos obtenidos a partir de levaduras y de fuentes

10 vegetales, fúngicas y algales aumentarán la digestibilidad de los nutrientes en los mamíferos. Éstos aumentarán asimismo la absorción de minerales y de micronutrientes por parte de los mamíferos. Ello se debe a una estructura mejorada del intestino (una mayor área de absorción de nutrientes), y al aumento de las bacterias productoras de ácido láctico, en particular en los mamíferos grandes.

15 En conjunto, los usos de la presente invención favorecen en líneas generales la utilización de los β -glucanos obtenidos a partir de las algas marinas, ya que éstos son más pequeños y más solubles que incluso los β -glucanos obtenidos en las levaduras.

Naturalmente, cuando las utilizaciones y los procedimientos descritos en la presente memoria se refieren a las

20 composiciones de la presente invención, dichas composiciones se refieren asimismo a preparaciones farmacéuticas y a alimentos para el ganado.

Los aspectos de la presente invención proporcionan asimismo la utilización de una composición que comprende una o más composiciones de la presente invención destinadas a unos o más de entre el grupo que consiste en: mejorar la

25 salud intestinal en los seres humanos o en animales, estimular el crecimiento de bacterias beneficiosas en los intestinos de seres humanos o de animales o, reducir los niveles de microbios perjudiciales tales como *E. coli* y *Salmonella* en los intestinos de animales o de seres humanos, mejorar el rendimiento de los animales y actuar como sustitutos de antibióticos ingeridos y mejorar la absorción de minerales y la digestibilidad de nutrientes.

30 Los aspectos adicionales proporcionan la utilización de una composición que comprende β -glucanos) y/o α -fucanos en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de uno o más de entre el grupo de trastornos que consiste en las inflamaciones intestinales y las infecciones intestinales.

La preparación farmacéutica comprende una o más de las composiciones descritas anteriormente y un excipiente farmacéuticamente apto. Los excipientes aptos resultan muy conocidos en la técnica y comprenden liposomas,

35 emulsiones, agentes tensioactivos, aceites vegetales, aceites vegetales total o parcialmente hidrogenados, lecitinas, fosfátidos vegetales y ceras naturales, aceite de soja, aceite de soja total o parcialmente hidrogenado, aceite de colza, aceite de cacahuete, lecitina de soja, fosfátidos de soja, lecitina de berenjena y cera de abejas. La preparación farmacéutica puede asimismo comprender además uno o más productos seleccionados de entre el grupo que consiste en un revestimiento entérico, L- y D-aminoácidos, vitaminas, oligoelementos, aceites naturales, antioxidantes, sales y

40 disolventes.

Ejemplos

45 Ejemplo 1

Producción de la composición

50 5000 kg de materia prima (*Ascophyllum nodosum*, aunque la materia prima podría ser cualquier alga marina seleccionada de entre el grupo mencionado anteriormente) húmeda se lavó, se trituró hasta aproximadamente 10 mm y se volvió a lavar. 5000 l de agua se añadieron a un recipiente de 15.000 l y se calentaron hasta los 80°C. se añadieron 10 l de ácido clorhídrico al 36% y a continuación se añadió el forraje triturado. Se ajustó la temperatura entre 75 y 80°C mediante la adición de vapor directo y se ajustó el pH a un pH de 4 con HCl adicional. A continuación se agitó el

55 recipiente durante tres horas seguido por un enfriamiento hasta 50 grados. Tras ello se bombeó la mezcla del recipiente hacia una prensa. Los sólidos retenidos en la prensa se reciclaron y se repitió el procedimiento descrito anteriormente. A continuación se depuró el líquido de la prensa, se evaporó y se deshidrató. Se obtuvo un producto de color crema con la siguiente composición.

- 60 1. Sólidos totales. 96,335% en peso.
2. Contenido cenizas. 33,210% en peso.
3. Contenido total en proteínas. 5,775% en peso.
- 65 4. Contenido total en lípidos. 2,876% en peso.
5. Fenoles totales. 37,500 mg/kg.

ES 2 333 259 T3

6. Contenido total en alginatos. < 5%

7. Contenido en laminarina. 9,850% en peso.

8. Manitol total. 4,175% en peso.

9. Contenido fucoidina. 12,936% en peso.

10. Contenido total en hidratos de carbono. 59,335% en peso.

11. Contenido total en glúcidos reductores. 3,500% en peso.

12. Contenido en fibra. 4,580% en peso.

13. Metilpentosanos. 4,775% en peso.

14. Análisis de antioxidantes

BHA 3,558 mg/kg

BHT 5,195 mg/kg

Etoxiquina 1,886 mg/kg

Vitamina C 14,505 mg/kg

Tocoferoles Vitamina E 2 mg/mg/kg

15. Hormonas el crecimiento

Contenido en fitocinina. 16,500 ppm.

Contenido en auxina. 10,176 ppm.

Contenido en giberelina. 5,800 ppm.

Contenido en betaína. 26,555 ppm.

Se añadió asimismo una pequeña cantidad de conservante, el benzoato sódico, a la composición anterior para mantener la integridad de la composición, a la que de ahora en adelante se denominará *GutCare*. *GutCare* es una marca registrada.

Ejemplo 2

Digestibilidad

Dietas experimentales

Se diseñó el experimento como un factorial del 3 x 2 (3 niveles de lactosa x 2 niveles de GutCare) que consistían en 6 tratamientos dietéticos. Los tratamientos fueron tal como se indica a continuación (T1) 65 g/kg de lactosa sin complemento, (T2) 170 g/kg de lactosa sin complemento, (T3) 275 g/kg de lactosa sin complemento, (T4) 65 g/kg de lactosa + 5 g/kg de GutCare, (T5) 170 g/kg de lactosa + 5 g/kg de GutCare y (T6) 275 g/kg de lactosa + 5 g/kg de GutCare. Se administraron las dietas iniciales en forma de harina durante 27 días. Las composiciones y los análisis químicos de las dietas experimentales se representan en la Tabla 1. Se formularon las dietas para que presentasen una energía digerible idéntica (16 MJ/kg) y los contenidos totales en lisina (16 g/kg) ajustando el aceite de soja y los aminoácidos sintéticos. Los requisitos de aminoácidos se satisficieron con respecto a la lisina (Close, 1994). Se trituraron todas las dietas *in situ*. Se añadió óxido crómico (Cr₂O₃) durante la trituración de la dieta a una concentración de 150 ppm para determinar la digestibilidad de los nutrientes.

Animales y gestión

Se destetaron 165 lechones (descendencia de la línea Large White X (línea materna Large White X Landrace)) a los 24 días de edad y presentaron un peso *en vivo* inicial de 5,90 kg. Se agruparon los lechones basándose en el peso *en vivo* y dentro de cada grupo se asignaron al azar a uno de los seis tratamientos dietéticos. Se alojaron los cerdos en rediles con vallas completamente entablilladas (1,68 m x 1,22 m). Se realizaron seis repeticiones/tratamiento. Las temperaturas de los alojamientos se mantuvieron a 30°C, durante la primera semana y posteriormente se redujeron a una razón de 2°C por semana. Se pesó cada cerdo al inicio y en el día 8, el día 15, el día 21, el día 27. Se alimentaron

ES 2 333 259 T3

los cerdos a discreción y se prestó atención para evitar posibles pérdidas. El pienso se encontraba disponible hasta el momento del pesaje pero, tras el pesaje, todo el pienso restante en las artesas se volvió a pesar. Durante todo el experimento se fueron tomando muestras del pienso para su análisis químico. Se recogieron diariamente muestras fecales recientes de cada redil desde los días 10 a 14 para determinar las digestibilidades. Se recogieron asimismo muestras de heces de cada redil cada segunda semana para determinar el pH fecal.

Clasificación de las heces

Se realizó un seguimiento detallado de los cerdos con respecto a cualquier signo de diarrea y se utilizó un sistema de clasificación para indicar la presencia y la intensidad de la misma. La clasificación de las heces o se realizó en el día 0 y se continuó hasta el día 27. La clasificación de las heces aplicada fue la siguiente: 1 = heces líquidas, 2 = heces semilíquidas, 3 = heces blandas pero parcialmente sólidas, 4 = heces ligeramente blandas, 5 = heces sólidas.

Análisis en el laboratorio

Se analizaron tanto los concentrados como las heces con respecto a las concentraciones de nitrógeno, de materia seca, de cenizas, de energía bruta, de fibra detergente neutra y de cromo. Tras la recogida, se secaron las heces a 100°C durante 72 horas. A continuación se trituraron los concentrados y las heces secas mediante hasta un tamaño de tamiz de 1 mm (con una trituradora de martillos Christy and Norris). Se realizó la determinación de la materia seca tras proceder al secado durante la noche (mínimo 16 horas) a 103°C. Se realizó la determinación de las cenizas tras la ignición de un peso conocido en un horno de mufla (Nabertherm, Bremen, Alemania) a 550° durante 4 horas. Se determinó la proteína bruta por el método de medición de N Kjeldahl x 6,25 utilizando tanto una unidad de destilación Buchi 323 como una unidad de digestión Buchi 435 5 (Buchi, Flawil/Schweiz, Suiza) según la AOAC (Asociación de Químicos Analíticos Oficiales) (1980). Se determinaron la fibra detergente neutra y la fibra bruta utilizando una unidad de extracción Fibertec (Tecator, Hoganans, Suecia). Se determinó la fibra detergente neutra según Van Soest (1976).

Se determinó la energía bruta de tanto el pienso como de las muestras fecales utilizando un calorímetro con bomba de oxígeno Parr 1201 (Parr, Moline, Illinois, EE.UU.). La concentración de cromo se determinó según Williams *et al.* (1962).

Análisis estadísticos

Se analizaron los datos experimentales como un factorial 3 x 2 utilizando el procedimiento del modelo lineal general del Instituto de Sistema de Análisis Estadísticos (1985). Los modelos para el análisis del rendimiento y la digestibilidad comprendían los efectos principales del nivel de lactosa, la composición de la presente invención o GutCare y la interacción entre el nivel de lactosa y la composición de la presente invención o GutCare. El peso *en vivo* inicial en el momento del destete se incorporó al modelo como covariable.

Resultados

Digestibilidad de los nutrientes y análisis fecal

Los efectos del tratamiento dietético en la MD fecal, el pH fecal, la clasificación fecal y la digestibilidad aparente de los nutrientes de las dietas se representan en la Tabla 2. Los cerdos a los que se administraron dietas que contenían GutCare presentaron unas heces más duras entre los días 15 a 21 que los cerdos a los que se administraron dietas sin GutCare. Se produjo una interacción significativa entre el nivel de lactosa y de GutCare por lo que respecta a las heces durante los días 15 a 21. Los cerdos a los que se administraron dietas que contenían 275 g/kg de lactosa con GutCare presentaron unas heces más blandas en comparación con los cerdos a los que se administraron dietas que contenían 275 g/kg sin GutCare. Ello se debe probablemente al efecto de sobrecarga de un exceso de hidratos de carbono en el intestino posterior. Los cerdos a los que se administraron dietas que contenían GutCare presentaron unas heces más sólidas entre los días 21 a 27 que los cerdos a los que se administraron dietas sin GutCare. Los cerdos a los que se administraron dietas que contenían GutCare presentaron un pH en las heces significativamente inferior en comparación con los cerdos a los que se administraron dietas sin GutCare. Se produjo una interacción significativa entre el nivel de lactosa y de GutCare en las digestibilidades de la materia seca (DMD) ($P < 0,01$), la materia orgánica (OMD) ($P < 0,01$), la fibra detergente neutra (NDF) ($P < 0,05$), el nitrógeno ($P < 0,001$) y la energía bruta (GE) ($P < 0,001$). La inclusión de extracto de GutCare a los 275 g/kg de lactosa redujo significativamente las digestibilidades aparentes de los nutrientes de la DMD, la OMD, la NDF, el nitrógeno y la energía bruta en comparación con los cerdos a los que se administraron 275 g/kg de lactosa sin GutCare. Sin embargo, la incorporación de GutCare a 65 g/kg de lactosa aumentó significativamente las digestibilidades aparentes de la DMD, la OMD, la NDF, el nitrógeno y la energía bruta en comparación con los cerdos a los que se administraron 65 g/kg de lactosa sin GutCare.

Análisis del Ejemplo 2

Los resultados demuestran que la incorporación de GutCare reduce los requisitos de un nivel elevado de lactosa en las dietas sin antibióticos para lechones, y aumenta la digestibilidad de las dietas con un bajo contenido en lactosa. Se producen una interacción significativa entre la lactosa y el GutCare por lo que se refiere a la digestibilidad de la DMD,

la NDF, la OMD, el nitrógeno y la GE. Los cerdos a los que se administraron unos niveles bajos de lactosa con el GutCare presentaron unas mejoras significativas en la digestibilidad de la DMD, la NDF, la OMD, el nitrógeno y los digestibles del 0,02, 0,06, 0,02, 0,03 y 0,03 respectivamente en comparación con los cerdos a los que se administraron unas dietas que contenían un nivel bajo de lactosa sin GutCare.

Sin embargo, la incorporación de GutCare a las dietas con un contenido elevado en lactosa tuvo como resultado un descenso en la digestibilidad de la DMD, la NDF, la OMD, el nitrógeno y la GE de 0,02, 0,12, 0,02, 0,05 y 0,03 respectivamente en comparación con los cerdos a los que se administraron unas dietas que contenían un nivel elevado de lactosa sin enriquecer con GutCare. La combinación de un nivel elevado de lactosa y el GutCare tuvo como resultado una cantidad excesiva de hidratos de carbono que entraban en el colon y que superaban la capacidad fermentativa del lechón. Mul & Perry (1994) demostraron que una ingesta excesiva de oligosacáridos podría tener como resultado una fermentación excesiva lo que podría provocar trastornos no deseables en el intestino grueso.

La interacción significativa entre el nivel de lactosa y el GutCare en la consistencia fecal cuando a los cerdos se les administraron unas dietas que contenían un nivel elevado de lactosa enriquecida con GutCare tuvo como resultado una heces más blandas que en los cerdos a los que se administraron unas dietas que contenían un nivel elevado de lactosa sin enriquecer con GutCare lo que indica dicha sobrecarga.

La incorporación del GutCare a las dietas con un contenido bajo, medio y elevado en lactosa tuvo como resultado una reducción significativa del pH fecal. Dicha disminución del pH se debe al aumento en la producción de VFA en el intestino posterior indica un efecto prebiótico del GutCare.

En definitiva, la incorporación del GutCare a las dietas con un contenido bajo en lactosa mejoró la digestibilidad de los nutrientes, sin embargo, la incorporación del GutCare a las dietas con un contenido elevado en lactosa redujo la digestibilidad de los nutrientes debido a una sobrecarga intestinal tal como se ha descrito anteriormente. No obstante, la incorporación del GutCare en la dieta disminuyó el pH de las heces, lo que indica un efecto prebiótico.

Ejemplo 3

Un procedimiento para producir la composición a partir de algas comprende las siguientes etapas:

1) Lavar la arena y gravas del forraje húmedo, trocear el forraje húmedo, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 10 mm y a continuación separar la arena.

2) Extraer el forraje troceado en agua a una temperatura que de un modo ideal se encuentra comprendida entre 70 y 80°C durante un período comprendido entre aproximadamente 2 y 3 horas, a un pH comprendido entre aproximadamente 3,5 y aproximadamente 4,5, preferentemente un pH de aproximadamente 4. Las algas marinas se combinan preferentemente con agua. La temperatura del agua se puede desplazar a, o encontrar a, una temperatura comprendida entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 100°C, preferentemente entre aproximadamente 37°C y 95°C, más preferentemente entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 80°C, prefiriéndose aproximadamente 75°C.

El procedimiento de la presente invención se realiza de un modo ideal a un pH comprendido entre 1 y 7, más preferentemente a un pH comprendido entre 1 y 6, más preferentemente a un pH comprendido entre aproximadamente 4 y aproximadamente 5 y más preferentemente a un pH de aproximadamente 4,5. En una forma de realización el pH de la disolución se puede ajustar a aproximadamente un pH de 4,5 antes de la etapa de agitación. Aunque no se pretenda limitarse a la teoría, se considera que un pH comprendido entre aproximadamente 4 y aproximadamente 5 optimiza el rendimiento, al mismo tiempo que disminuye los requisitos de adición de ácidos, minimizando los efectos hidrolíticos y los perjuicios de los mismos. De un modo ideal, el ácido utilizado se selecciona de entre un grupo que consiste en ácidos inorgánicos tales como el ácido clorhídrico, el ácido fosfórico y el ácido sulfúrico y ácidos orgánicos tales como el ácido láctico, el ácido fórmico y el ácido propiónico, o cualquier ácido inorgánico u orgánico soluble.

3) Se contribuye al procedimiento de extracción mediante agitación continua. De un modo ideal, la mezcla se agita durante un período de tiempo comprendido preferentemente entre aproximadamente 1 y 10 horas, y más preferentemente de aproximadamente tres horas. La agitación crea una suspensión acuosa espesa.

4) A continuación se puede enfriar el material procesado hasta una temperatura comprendida entre 10 y 50°C protegiendo de este modo los compuestos sensibles y/o haciendo que el material sea seguro para la prensa.

5) De un modo ideal, a continuación se puede decantar o prensar la mezcla.

6) El material insoluble se puede recoger y volver a procesar utilizando el mismo procedimiento indicado anteriormente.

7) El líquido junto con el residuo insoluble pequeño se bombea hacia un equipo de depuración en el que se retiran las fracciones insolubles restantes. Se puede depurar el producto para proporcionar una composición líquida.

8) Se puede bombear el líquido depurado hasta un depósito de almacenamiento (dirigido a una unidad de nanofiltración o un evaporador) desde donde se puede bombear hacia un evaporador para su concentración o hacia una planta de nanofiltración (NF) en la que se retira hasta un 70% de las sales de cloro y se retira hasta un 30% de las sales de sodio y de potasio. Dicha desalinización contribuye a eliminar el sabor salado del producto. La presión de funcionamiento la etapa NF se encuentra comprendida entre 20 y 40 bar, preferentemente es de 25 bar y el tamaño de poro de la membrana se encuentra comprendido entre 10^{-3} y 10^{-2} μm .

9) Si la aplicación requiere un grado elevado de desalinización, el producto se puede procesar tanto mediante electrodiálisis o intercambio de iones.

10) El producto concentrado, nanofiltrado o desmineralizado se puede evaporar y se le puede añadir, si se requiere, un conservante tal como el benzoato sódico, en forma líquida.

11) Como forma de realización adicional para realizar un producto evaporado de β -glucano y α -fucano purificados, el producto se puede cristalizar en unos depósitos de cristalización en los que el manitol se convierte en cristales y se retira por centrifugación. Ello implica obtener un líquido muy concentrado, seguido por la transferencia a los depósitos de cristalización, a continuación la germinación, seguido por un enfriamiento durante un período y a una temperatura predeterminados. Cuando se forman los cristales, el producto se centrifuga en un procedimiento de separación de dos etapas separándose los cristales para secar en un equipo de secado de lecho fluido, obteniéndose un equilibrio del producto que presenta un nivel elevado en β -glucanos y α -fucanos disponibles para deshidratar por aspersión.

12) El producto evaporado se puede deshidratar por aspersión. El polvo resultante presenta un color crema.

13) La solubilización de la laminarina puede resultar necesaria si la materia prima inicial es la *Laminaria hyperborea*. En este caso, el producto, tras su depuración, se somete a una modificación del pH mediante el procedimiento descrito para los glucanos de las levaduras en la patente US n.º 20040082539.

Ejemplo 4

Rendimiento

Dietas

El experimento se dispuso como un factorial de 4 x 3 (4 niveles de GutCare y 3 niveles de lactosa), durante cuatro recorridos consecutivos. Se seleccionaron 384 lechones (descendencia de la línea Large White X (línea materna Large White X Landrace)) tras del destete a los 21 días con un peso *en vivo* inicial de 7,43 kg. Los cerdos de los recorridos 1, 2, 3 y 4 presentaron un peso *en vivo* inicial de 7,88 kg, 7,57 kg, 6,56 kg y 7,72 kg, respectivamente. Se agruparon los cerdos basándose en el peso *en vivo* y en cada grupo se asignaron a uno de doce tratamientos dietéticos. Los tratamientos dietéticos consistían en (T1) 24,3 g/kg de lactosa con 0 g/kg de GutCare, (T2) 24,3 g/kg de lactosa con 3 g/kg de GutCare, (T3) 24,3 g/kg de lactosa con 6 g/kg de GutCare, (T4) 24,3 g/kg de lactosa con 12 g/kg de GutCare, (T5) 15,3 g/kg de lactosa con 0 g/kg de GutCare, (T6) 15,3 g/kg de lactosa con 3 g/kg de GutCare, (T7) 15,3 g/kg de lactosa con 6 g/kg de GutCare, (T8) 15,3 g/kg de lactosa con 12 g/kg de GutCare, (T9) 6,3 g/kg de lactosa con 0 g/kg de GutCare, (T10) 6,3 g/kg de lactosa con 3 g/kg de GutCare, (T11) 6,3 g/kg de lactosa con 6 g/kg de GutCare, (T12) 6,3 g/kg de lactosa con 12 g/kg de GutCare. Se trituraron las dietas iniciales *in situ* y se administraron en forma de harina durante 21 días tras el destete. Se formularon las dietas tal como se describe en el Ejemplo 2 excepto en lo que se refiere al óxido de cromo cuya concentración era de 200 ppm. La composición del ingrediente y el análisis químico de los tratamientos dietéticos se presentan en la Tabla 3. La composición de la presente invención utilizada en este ejemplo se trataba de una muestra líquida con un 33% de sólidos.

Gestión

Se alojaron los cerdos en grupos de cuatro (ocho repeticiones por tratamientos) Tal como se describe en el Ejemplo 2. Se pesaron los cerdos en el inicio y en los días 7, 14 y 21. Se recogieron muestras fecales recientes una vez cada día de todos los rediles en los días 10 a 15.

Análisis estadístico

Los datos experimentales se analizaron como un factorial de 4 x 3 tal como se describe en el Ejemplo 2.

Resultados

Rendimiento

Los efectos del nivel de lactosa y la concentración de GutCare en el aumento diario medio (ADG), la ingesta alimentaria y la proporción de conversión alimentaria (FCR) se representan en la Tabla 4. Se produjo una interacción significativa entre la lactosa y el GutCare ($P < 0,05$) en el aumento diario medio (ADG) entre los días 0 y 7. Se administraron a los cerdos unas dietas que no contenían un complemento de GutCare y unos niveles bajos de lactosa

provocaron unos ADG inferiores a los de los cerdos a los que se administraron unas dietas que contenían GutCare y un nivel elevado de lactosa. Se produjo una interacción significativa entre la lactosa y el GutCare en el ADG del período global de crecimiento (días 0 a 21). Los cerdos a los que se administraron unas dietas que contenían GutCare y unos niveles bajos de lactosa presentaron unos ADG inferiores a los cerdos a los que se administraron unas dietas que contenían GutCare y un nivel elevado de lactosa. El GutCare presentó asimismo un efecto lineal independiente significativo sobre el aumento diario ($P < 0,01$) y supuso una mejora en el aumento diario, con todos los niveles de lactosa.

Se produjo una interacción significativa entre la lactosa y el GutCare ($P < 0,05$) durante el período inicial (días 0 a 7) sobre la ingesta alimentaria diaria media (ADFI). Los cerdos a los que se administraron unas dietas con un nivel elevado de lactosa y 3 g/kg de GutCare presentaron una ADFI global superior. La incorporación de 6 g/kg y de 12 g/kg de GutCare a los niveles elevados de lactosa disminuyó la ADFI. Sin embargo, los cerdos a los que administraron unos niveles medios de lactosa y 12 g/kg de GutCare y los cerdos a los que se administraron unas dietas con un nivel bajo de lactosa y 6 g/kg de GutCare presentaron unas ADFI superiores a los cerdos a los que se administraron los mismos niveles de lactosa pero sin GutCare.

Se produjo asimismo un incremento lineal de la ADFI, ($P < 0,05$) ya que el nivel de GutCare aumentó entre los días 7 y 14 y de nuevo entre los días 14 a 21. Se produjo un incremento lineal tanto del nivel de lactosa ($P < 0,05$) como del complemento de GutCare ($P < 0,05$) en la ADFI durante el período inicial global (0 a 21) ya que aumento del nivel de ambos.

Se produjo una interacción significativa entre la lactosa y el GutCare ($P < 0,05$) en la proporción de conversión alimentaria (FCR) durante los días 0 a 7. Se produjo una mejora de la FCR ya que el nivel de GutCare aumentó tanto con un nivel medio como con un nivel bajo de lactosa. Sin embargo, con unos niveles medios de lactosa se produjo una mejora de la FCR de hasta 6 g/kg de GutCare aunque a continuación se produjo un deterioro. Se produjo un descenso lineal ($P < 0,05$) de la FCR, representativo de una mayor eficiencia alimentaria, durante el período inicial global (días 0 a 21) y a que aumentó del nivel de GutCare. Probablemente se trató de una tendencia de una interacción significativa de la lactosa por parte del GutCare ($P < 0,09$) durante los días 0 a 21. El GutCare total mejoró la proporción de conversión alimentaria en la mayor parte de las dietas. Además, el GutCare tuvo como resultado asimismo unas heces más sólidas, en particular durante los días 0 a 7, tal como se representa en la Tabla 9.

Se produjo asimismo una tendencia numérica ($p = 0,13$) de un descenso del pH fecal con la adición de GutCare a unos niveles bajos de lactosa, lo que indica un efecto prebiótico.

35 *Análisis*

Los experimentos anteriores demuestran las ventajas del GutCare en el rendimiento animal en ausencia de antibióticos ingeridos. El efecto es tan potente como el efecto de los antibióticos que la formulación pretende sustituir. Se produce una mejora en el aumento diario, la ingesta así como en la proporción de conversión alimentaria, que constituyen los parámetros clave del rendimiento. La composición interactúa con la lactosa, algo que era de esperar, ya que ambos consisten principalmente en hidratos de carbono, y al considerar que un exceso de los dos podría tener como resultado un efecto de sobrecarga en el aparato digestivo. Esto se analiza con un mayor detalle en el Ejemplo 2. GutCare funciona mejor con unos niveles bajos y medios de lactosa, proporcionando unos medios efectivos para reducir el nivel de lactosa (un componente caro) necesario en las dietas de los animales. Las heces más duras que se observaron en los días 0 a 7 son representativas de una reducción del estreñimiento, lo que constituye un parámetro clave para la salud de los lechones, que resultan especialmente susceptibles de padecer diarrea.

50 Experimento 5

Antimicrobiano

55 *Animales y dietas experimentales*

Se diseñó el experimento como un factorial de 2 x 1. Se seleccionaron diez lechones de 24 días de edad (descendencia de la línea Large White X (línea materna Large White X Landrace)) que procedían de cuatro cerdas muy emparentadas. Los lechones presentaron un peso en el destete de 7,8 (d.t. 0,83) kg. Se agruparon basándose en la camada, el peso y el sexo, y en cada grupo se asignaron al azar a uno de dos tratamientos dietéticos. Los tratamientos dietéticos fueron los siguientes: T1) dieta estándar; T2) dieta estándar + 1.8 g/kg de GutCare. Se formularon las dietas tal como se describe en el Experimento 2.

Gestión

65 Se alojaron los cerdos por separado tal como se describe en el Experimento 2.

Microbiología

El efecto del GutCare en las poblaciones microbianas seleccionadas del ciego y del colon se representa en la Tabla 5. El GutCare tuvo un efecto significativo sobre las poblaciones microbianas del ciego con una disminución de las poblaciones de *E. coli* ($P < 0,01$), *Bifidobacteria* ($P < 0,05$) y *Lactobacilli* ($P < 0,05$). El GutCare tuvo un efecto significativo en la población de *E. coli* ($P < 0,01$) y la población de *Lactobacilli* ($P < 0,001$) del colon, provocando un descenso.

Análisis

La composición desempeñó una marcada acción antimicrobiana, similar a la de los antibióticos ingeridos en los lechones. Ello resulta ventajoso desde el punto de vista del rendimiento, ya que una carga microbiana inferior tendrá como resultado un menor coste energético para el cerdo. Asimismo, la eliminación de bacterias nocivas tales como *E. coli* contribuye al control del índice de enfermedades entre los lechones.

Tal como se ha mencionado anteriormente, la composición desempeña un papel similar al de los antibióticos en los lechones, actuando como sustituto de los mismos. Este comportamiento es distinto al comportamiento que se produce en los cerdos adultos en los que la formulación desempeña más de un papel prebiótico. El motivo de dicha diferencia podría ser la incapacidad de los lechones para descomponer algunos de los componentes de la composición en una forma en la que actúen como prebióticos. Ello concuerda con los objetivos de la formulación de actuar como sustituto de los antibióticos en los lechones.

*Ejemplo 6**Absorción de prebióticos y minerales**Diseño experimental y dietas*

Se diseñó el experimento como un estudio totalmente aleatorizado que comprendía cinco tratamientos dietéticos. Se formularon todas las dietas para que presentasen unas concentraciones idénticas de energía neta (9,8 MJ/kg) y de lisina total (10,0 g/kg). Los requisitos de aminoácidos se alcanzaron con respecto a la lisina (Close, 1994). Se administraron todas las dietas en forma de harina. El GutCare fue suministrado por BioAtlantis Ltd. (Kerry Technology Park, Tralee, Irlanda). La composición dietética y los análisis se presentan en la Tabla 6.

Los tratamientos experimentales fueron los siguientes:

(1) 0 g/kg de GutCare (control)

(2) 0,7 g/kg de GutCare

(3) 1,4 g/kg de GutCare

(4) 2,8 g/kg de GutCare,

(5) 5,6 g/kg de GutCare

Animales y gestión

Se utilizaron en este experimento dieciséis verracos (descendencia de la línea de verracos Meat x (línea materna Large White X Landrace)) con un peso inicial *en vivo* de 51 kg (d.t. = 3,4 kg). Se agruparon los cerdos basándose en el peso *en vivo* y se alojaron al azar con uno de los cinco tratamientos dietéticos. Se dejaron los cerdos en un período de adaptación dietética de 14 días. A continuación se pesaron y se trasladaron a jaulas metabólicas individuales. Se dejaron a los cerdos 5 días adicionales de adaptación a las jaulas metabólicas antes de iniciar las recogidas. Se subdividió el período de recogida en dos partes a fin de facilitar el análisis de la digestibilidad aparente (días 3 a 7). La ración alimentaria diaria (ingesta DE = $3,44 \times (\text{peso en vivo}) 0,54$ (Close, 1994) se dividió en dos sesiones de alimentación. Se proporcionó agua con las comidas en una proporción de 1:1 ratio. Entre las comidas, se proporcionó agua potable a discreción. Las jaulas metabólicas se dispusieron en recintos con un ambiente controlado, que se mantenían a una temperatura constante de 22°C ($\pm 1,5^\circ\text{C}$).

Estudio de la digestibilidad aparente

Durante las recogidas, se recogió la orina en un recipiente de plástico, mediante un embudo dispuesto debajo de la jaula, que contenía 20 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4 al 25%). Se registró diariamente el volumen de orina y se recogió una muestra de 50 ml y se congeló para su análisis en el laboratorio. Se registró diariamente el peso total de las heces y se secaron al horno a 100°C. Al final del período de recogida, se agruparon las muestras fecales y se conservó una submuestra para su análisis en el laboratorio. Se recogieron muestras de pienso cada día y se conservaron para su análisis químico.

Microbiología

5 Todos los animales permanecieron con sus tratamientos dietéticos respectivos hasta que se sacrificaron. Se retiraron asépticamente muestras digeridas (aproximadamente 10 g \pm 1 g) del colon de cada animal inmediatamente después de sacrificarlo, se almacenaron en recipientes estériles (Sarstedt, Wexford, Irlanda) con hielo y se transportaron al laboratorio antes de 7 h. Se aislaron *Bifidobacteria spp.* y *E. coli*, y se procedió al recuento según el procedimiento descrito por O'Connell *et al.*, (2005). Se eligió la *Bifidobacteria spp.* debido a su efecto positivo en la salud intestinal mientras que la especie *E. coli* se erigió debido a su efecto negativo en la salud intestinal (De Lange, 2000).

10 *Análisis de las muestras en el laboratorio*

Los análisis inmediatos de las dietas en relación con la materia seca (DM) y con las cenizas se realizó según la Asociación de Químicos Analíticos, (1980). La materia seca de pienso se determinó tras secar durante la noche a 103°C. Se determinaron las cenizas tras la ignición de un peso conocido de concentrados o heces o en un horno de mufla (Nabertherm, Bremen, Alemania) a 500°C durante cuatro horas. La energía bruta (GE) de las muestras de pienso de heces se determinó utilizando un calorímetro de bomba adiabática (Parr Instruments, II, EE.UU.).

*Resultados*20 *Estudio microbiológico*

El efecto del tratamiento dietético sobre las poblaciones microbianas y el pH del colon se representa en la Tabla 7.

Se produjo una respuesta significativa al GutCare en las poblaciones de *E. coli* del colon y de bifidobacterias (P cuadrática<0,05). Se produjo un descenso significativo (cuadrático) en la población de *E. coli* al mismo tiempo que se produjo un aumento en las poblaciones de bifidobacterias, hasta un nivel determinado. Con unas concentraciones elevadas, dichas poblaciones disminuyeron, lo que indicaba una sobrecarga intestinal.

30 *Digestibilidad total en el tracto*

El efecto del tratamiento dietético en la digestibilidad total de las cenizas en el tracto se representa en la Tabla 8. Se produjo un aumento lineal significativo ($P<0,01$) en la digestibilidad total de las cenizas en el tracto al aumentar la concentración del extracto.

35 *Análisis*

Este experimento demuestra el efecto del GutCare en la microflora intestinal y en la absorción de minerales de las crías (que se representa como digestibilidad de las cenizas). Tal como se puede observar a partir de los resultados, la composición provocó un aumento en los niveles de bacterias beneficiosas de una disminución de los niveles de microbios nocivos. Esta respuesta es habitual en las formulaciones prebióticas. Con unas dosis más elevadas, cambiaron los niveles de todos los microbios, lo que indica una sobrecarga intestinal, de nuevo una respuesta habitual de las formulaciones prebióticas. Además, el aumento de la digestibilidad de las cenizas (que consiste en micronutrientes y macronutrientes) indica una mayor absorción de dichos nutrientes en el intestino.

45 **Referencias**

Association of Analytical Chemists 1995. Official methods of Analysis, 16th edition, *Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA*.

50 **Autio, K., Mannonen, I., Pierila, K., Kosinken, M., Siika-aho, M., Linko, M.** 1996 *Journal of the Institute of Brewing* 102, 427-432.

Adams, C.A., 2001. In: Total Nutrition: Feeding animals for health and growth (ed. C.A. Adams), *Nottingham University Press, Nottingham, United Kingdom*, pp 157-161.

55 **Bach Knudsen, K.E.** 1991. In: Digestive Physiology in Pigs, Proceedings of the Vth international symposium on digestive physiology in pigs. (ed. M. W.A. Verstegen, J. Huisman and L.A. den Hartog) pp 428-434. *Purdac Wageningen, Wageningen, The Netherlands*.

60 **Bach Knudsen, K.E. and Hansen, I.** 1991. *British Journal of Nutrition* 65: 217-232.

Bedford, M.R. 2000. *Animal Feed Science and Technology* 86: 1-13.

Bergh M.O., Razdan A. and Aman P *Animal Feed Science and Technology* 201 (1999) 215-226.

65 **Brownlee I.A, Allen A, Pearson J.P., Dettmar P.W, Havler M.R, Atherton M.E, and Onsoyen E,** 2005, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45: 497-510.

- Burtin, P.**, 2003. Electronic Journal of Environmental Agriculture and Food Chemistry. Volume 2, Issue 4.
- Campbell, G.L. and Bedford, M.R** 1992. *Canadian Journal of Animal Science* 72: 449-466.
- 5 **Canh, T.T., Sutton, A.L., Aarnink, A.J.A., Verstegen, M.W.A., Schrama, J.W. and Bakker, G.C.M.** 1998. *Journal of Animal Science* 76: 1887-1895
- Blonden C, Chaubet F, Nardella, A, Siquin C, Jozefonvicz, J**, *Biomaterials*, 17 (1996), 597-603.
- 10 **Charalampopoulos, D., Wang, R, Pandiella, S.S. and Webb, C.** 2002. *International Journal of Food Microbiology* 79: 131-141.
- Close, W.H.**, 2000. *Advances in pork production* 11: 47-56.
- 15 **Cole, D.J.A., Beal, RM. and Luscombe, J.R,** 1968. *Veterinary Record* 83: 459-464.
- Cueno, RP., Morillo, T.B., Carter, S.D., Lachmann, M.S., Park, J.S. and Schneider, J.D.,** 2004. www.ansi.os-tate.edu/research/2004rr/32/32.htm.
- 20 **Choct, M.** 1997. *Feed Milling International* June 1997: 13-26.
- Close, W.H.** 1994. In: *Principals of Pig Science* pp 123-140. (ed. D.J.A. Cole, J. Wiseman and M.A. Varley), *Nottingham University Press, UK*.
- 25 **Conway, E.J.** 1957. *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error*. *Crosby Lockwood and Son, London*, 465 pps.
- Cui, W., Wood, P. J., Blackwell, B., & Nikiforuk, J.** (2000). *Carbohydrate Polymers*, 41 (3), 249-258.
- De **Lange, C.F.M.** 2000. In: *feed evaluation-principals and practice* (ed. P.J. Moughan, M.W.A. Verstegen and M.I. Visser-Reyneveld) pp 77-92. *Wageningen Pers, Wageningen, The Netherlands*.
- 30 **Derikx, P.J.L. and Aarnink, A.J.A.** 1993. In: *Nitrogen Flow in Pig Production and Environmental Consequences* (ed. M.W.A. Verstegen, L.A. den Hartog, G.J.M. van Kempen and J.H.M. Metz) pp 344-349. *EAAP Publication No. 69, Purdoc, Wageningen, The Netherlands*.
- 35 **Dierick, N. and Decuyper, J.** 1996. *Pig News Information* 17, 41N-48N.
- Drew, M.D., A.G. van Kessel, A.E. Estrada, E.D. Ekpe and R.T. Zijlstra.** 2003. *Canadian Journal of Animal Science* 82: 607-609.
- 40 **Etheridge, R. D.; Seerley, R. W.; Wyatt, R. D.,** *JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE*, Vol. 58, No. 6, 1984, 1396-1402
- European Council, 2001. Commission regulation (EC) no. 418/2001 of 1 March 2001 concerning the authorisation of new additives and uses of additives in feedingstuffs. *Official Journal of the European Communities* L 62,2.1.2001
- 45 **Gao, Y., Lackeyram, D., Rideout, T., Archbold, T., Duns, G., Fan, M.Z., Squires, E.J., De Lange, C.F.M. and Smith, T.K.** 2001. In: *Digestive Physiology in Pigs, Proceedings of the 8th symposium on digestive physiology in pigs*, (ed. J.E. Lindberg and B. Ogle) pp 338-340. *CAB International, Wallingford, UK*.
- 50 **Darcy-Vrillon, B., Vaugelade, P., Bernard, F., Hoebler, C., Guillon, F., Mabeau, S. and Duee, P-H.,** 1996 *Reproduction Nutrition Development* 36: 425.
- De **Mitchell, I., and R. Kenworthy.** 1976. *Journal of Applied Bacteriology* 41: 163-174
- 55 **Drochner, W., Kerler, A. and Zacharias, B.,** 2004 *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 88: 367-380.
- Estrada, A, Drew, M.D. and Van Kessel.,** 2001. *Canadian Journal of Animal Science* 81: 141-148.
- 60 **Freimund S, Sauter M, Kappeli O, Dutler H,** *Carbohydrate Polymers* 54 (2003) 159-171
- Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B.,** 1995. *Journal of Nutrition* 125: 1401-1412.
- Glisto, L.V., Brunsgaard, G., Hojsgaard, S., Sandstrom, B. and Bach Knudsen, K.E.,** 1998 *British Journal of*
- 65 *Nutrition* 80: 457-468.
- Gray, J.,** 2003. Carbohydrates: Nutritional and health aspects. *International Life Science Institute*. ¿Necesitamos una referencia completa para éste?

Graham, H. and Pettersson, D. 1992. *Swedish Journal of Agricultural Research*, 22: 39-42.

Havenaar R, Huis In't Veld MJH. Probiotics: a general view. In: Lactic acid bacteria in health and disease. Vol 1. Amsterdam: *Elsevier Applied Science Publishers*, 1992.

Hayes, E.T., Leek, A.B.G., Curren, T.P., Dodd, V.A., Carton, O.T., Beattie, V.E. and O'Doherty, J.V., 2004. *Bioresource Technology* 91: 309-315.

Hobbs, P.J., Misslebrook, T.H. and Pain, B.F. 1995. *Journal of Agricultural Engineering Research* 60: 137-144.

Heo, S-J., Park, E-J., Lee, K-W. and Jeon, Y-J., 2005. *Bioresource Technology* 96: 1613-1623.

Hiss, S., Sauerwein, H., 2003. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 87: 2-11.

Hogberg A and Lindberg JE, *Animal Feed Science and Technology*, 2005

Houdijk, J.G.M., Bosch, M.W., Verstegen, M.W.A., Berenpas, H.J., 1998. *Animal Feed Science and Technology* 71: 35-48.

Ito, K. and Hori, K. 1989. *Food Reviews International*, 5, 101-144.

Itoh, Hiroko, et al., *Anticancer Research*, vol. 13, pp. 2045-2052 (1993).

Jamroz, D., Wiliczekiewicz, A., Skorupinska, J., 1992. *J. Anim. Feed Sci.* 1, 37-50.

Jamroz, D., Wiliczekiewicz, A., Orda, J., Skorupinska, J., 1996. *Wien. Tierarztl. Mschr.* 83, 165-177.

Jaskari, J., Salovaara, H., Mattila-Sandholm, T. and Putanen, K. 1993. In: Proceedings of the 25th Nordic cereal congress, (ed T. Aalto-Kaarlehto and H. Salovaara) *University of Helsinki, Helsinki*, pp 242-244.

Jaskari, J., P. Kontula, A. Siitonen, H. Jousimeies-Somer, T. Mattila-Sandholm and K. Poutanen. 1998. *Applied Microbiology Biotechnology* 49: 175-181.

Jensen, B.B. and H. JØrgensen. 1994. *Applied Environ. Microbiol.* 60: 1897-1904

Kenworthy, R., and W. E. Crabb. 1963. *Journal of Comparative Pathology* 73: 215-228.

Kim, Il., Jewell, D.E., Benevenga, N.J. and Grummer, R.H. 1978. *Journal of Animal Science* 46: 1658-1665.

Llaube'res, R.M., Richard, B., Lonvaud, A., Dubourdieu, D. and Fournet, B. (1990) *Carbohydrate Research* 203, 103-107.

Leek, A.B.G. 2003 Ph.D. Thesis, National University of Ireland, University College Dublin, Ireland.

Leek, A.B.G., Beattie, V.E., O'Doherty, J.V. 2004. *Animal Science* 79: 155-164.

Mabeau, S.; Kloareg, B. J. Exp. Bot. 1987, 38, 1573-1580.

Pereira, Mariana S., et al., J. Biol. Chem., vol. 274, No. 12, pp. 7656-7667 (1999).

MacGregor, A. W. a. B., & Rattan, S. (1993). Barley chemistry and technology. St. Paul, USA: American Association of Cereal Chemists Inc.

Mackie, R.I., Stroot, P.G. and Varel, V.H. 1998. *Journal of Animal Science* 76: 1331-1342.

Magnelli P, Cipollo J.F. and Abeijon C., *Analytical Biochemistry*, 301 (2002), 136-150.

Mahan, D.C., 1992. *Journal of Animal Science* 70: 2182-2187.

Mahan, D.C., 1993. *Journal of Animal Science* 71: 2860-2866.

Mahan, D.C and Newton, E.A., 1993. *Journal of Animal Science* 71: 3376-3382

Mathers, J.C and Annison E.F., 1993. Stoichiometry of polysaccharide fermentation in the large intestine. In Dietary Fibre and Beyond-Australian Perspectives, volume 1, pp 123-135.

Martensson O, Biorklund M, Lambo M A, Duenas-Chasco M, Irastorza Am Holst O, Norin E, Welling G, Oste R, Onning G, *Nutrition Research* 25 (2005), 429-442.

Mathers, J.C. and Annison, E.F. 1993. Stoichiometry of polysaccharide fermentation in the large intestine. In: Dietary fibre and beyond-Australian perspectives, (ed. S. Samman and G. Annison) pp 123-125, Nutrition society of Australia occasional publications, Perth, Australia.

5 **Mc Cracken, B.A., Spurlock, M.E., Roos, M.A., Zuckermann, F.A. and Gaskins, H.R., 1999.** *Journal of Nutrition* 129: 613-619.

Melin, L., Mattisson, S., Katouli, M and Wallgren, P., 2004. *Journal of Veterinary Medicine* B51: 12-22.

10 **Catherine Michel, Marc Lahaye, Christian Bonnett, Serge Mabeau And Jean-Luc Berry, 1996,** *British Journal of Nutrition*, 75, 263-280.

Mikkelsen, L.L., Jensen, B.B., 1997. Effect of fructo-oligosaccharide (FO) on the intestinal microbiota of rats and determination of the fermentative transformation and energy transmission of FO. In: Hartemink, R. (Ed.), Proceedings of the International Symposium Non-digestible Oligosaccharides: Healthy food for the colon? 4-5 December, Wageningen, The Netherlands, p 158 (abstract).

20 **Ministry of Agriculture, Fisheries and Food 1991.** The Feedingstuffs Regulations 1991. Statutory instrument no. 2840, 9.76. Her Majesty's Stationary Office, London.

Mroz, Z., Moeser, A.J., Vreman, K., van Diepen, J.T.M., van Kempen, T., Canh, T.T., Jongbloed, A.W. 2000. *Journal of Animal Science* 78: 3096-3106.

25 **Muller A, Ensley H, Pretus H, McNamee R, Jones E, McLaughlin E, Chandley W, Browder W, Lowman D and Williams D, Carbohydrate Research 299 (1997) 203-208.**

Montagne, L., Pluske, J.R. and Hampson, D.J. 2003. *Animal Feed Science and Technology* 108: 95-117.

30 **Mortensen, P.B., Hove, H., Clausen, M.R., Holtug, K., 1991** *Scandinavian Journal of Gastroenterology* Dec; 26 (12): 1285-1294.

Mul, A.J and Perry, F.G., 1994. In: Garnsworthy, P.C and Cole, D.J.A (eds). Recent Advances in Animal Nutrition 1994. Nottingham University Press, Nottingham, 57-79.

35 **Muralidhara, K. S., G. G. Sheggeby, P. R. Elliker, D. C. England, and W. E. Sandine. 1977.** *Journal of Food Protection* 40: 288-295.

Nahm, K.H. 2003 *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 30(2): 165-186.

40 **Nessmith Jr, W.B., Nelssen, J.L., Tokach, M.D., Goodband, R.D and Bergstrom, J.R. 1997**13. *Journal of Animal Science* 75: 3222-3228.

O'Doherty, J.V., Nolan, C.S, Callan, J.J and McCarthy, P., 2004. *Animal Science* 78: 419-428.

45 **Onning, G., and Asp, N.G., 1995.** *British Journal of Nutrition* 74: 229-237.

Owsley, W.F., Orr, D.E. and Tribble, L.F., 1986. *Journal of Animal Science* 63: 492-496.

50 **Pacheco-Delayaye, E., 1995.** *Food Chemistry* 65: 433-437.

Partridge, G.G and Gill, B.P., 1993. In: Wiseman, J and Garnsworthy, P.C. (eds) Recent Developments in Pig Nutrition 3. Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp 205-237.

55 **Pettersson A and Lindberg JE, Animal Feed Science Technology 66 (1997) 97-109 Pettersson, D., and P. Aman. 1989.** *British journal of Nutrition.* 62: 139-149.

Pierce, Aileen, MsC Thesis (2002), "The use of seaweed extract in animal nutrition" National University of Ireland, Dublin, University College Dublin, Ireland.

60 **Pierce, K.M., Callan, J.J., Brophy, P.O., McCarthy, P., Sweeney, T., Fitzpatrick, E., Byrne, C., Ni Cheallaigh, S. and O'Doherty, J.V. 2004a.** *Journal of Animal Science* 82, Supplement 1: 138-139.

Pitcairn, C.E.R., Skiba, U.M., Sutton, M.A., Fowler, D., Munro, R. and Kennedy, V. 2002. *Environmental Pollution* 119: 9-21.

65 **Pluske, J.R., Williams, I.H. and Aherne, F.A., 1995.** Nutrition of the neonatal pig. In: M.A. Varley (ed.) The neonatal pigs: development and survival. CAB International, Wallingford, UK.

Pluske, J.R., Hampson, D.J and Williams I.H. 1997 *Livestock Production Science* 51: 215-236.

Pluske, J.R., Kim, J.C., McDonald, D.E., Pethick, D.W. and Hampson, D.J. 2001. In: The weaner pig: Nutrition and Management. (ed. M.A. Varley and J. Wiseman) pp 81-111. *CAB International*, Wallingford, Oxon, UK.

Porter, M.G. and Murray, R.S., 2001. *Grass and Forage Science* 56: 405-411.

Read S, Currie G and Bacic A., *Carbohydrate Research*, 281 (1996) 187-210.

Riou, D., et al., *Anticancer Research*, vol. 16, pp. 1213-1218 (1996).

SAS. 1985. Statistical Analysis Systems. SAS Institute Inc., North Carolina, USA.

Sauer, W.C., Just, A., Jorgensen, H.H., Fekadu, M. and Eggum, B.O. 1980. *Journal of Animal Science* 69: 4070-4079.

Schmitz, W. 1995. In: Proceedings of the second European symposium on feed enzymes. (ed. W. van Hartingsveld, M. Hessing, J.P. van der Lugt and W.A.C. Somers) pp 95-101. TNO Nutrition and Food Research Institute, Zeist, The Netherlands.

S. Collicie et al *Phytochemistry*, 35, pp. 697-700, (1994).

Shibata, Hideyuki, et al *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, vol. 45, pp. 325-336 (1999).

Smith, E.A. and MacFarlane, G.T. 1997. *Anaerobe* 3: 327-337.

Soergel, K.H., 1994. *Clinical Investigations* 72: 742-748.

Spreeuwenberg, M.A.M., Verdonk, J.M.A.J., Gaskins, J.H. and Verstegen, M.W.A. 2001. *Journal of Nutrition* 131: 1520-1527.

Stanogias, G., and Pearce G.R. 1985. *British Journal of Nutrition* 53, 537-548 537.

Statistics Analysis Systems Institute 1985. Stastical Analysis Systems version 6.12, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Somogyi, M. 1960. *Clinical Chemistry* 6: 23-35.

Theander O, Westerlund E, Åman P & Graham H (1989) *Animal Feed Science and Technology* 23, 205-225.

Thomlinson, J.R. 1981. *The Veterinary record* 109: 120-122.

Tokach, M.D., Nelssen, J.L. and Allee, G.L., 1989. *Journal of Animal Science* 67: 1307-1312.

Turner, J.L., Dritz, J.J., Higgins and Minton, J.E., 2002. *Journal of Animal Science* 80: 1947-1953.

van **Soest, P.J.** 1976. *Journal of the Association of Agricultural Chemists* 46: 829-834.

Van **Soest, P.J., Robertson, J.B. and Lewis, B.A.** 1991. *Journal of Dairy Science* 74: 3583-3597.

Varel, V.H. 1987. *Journal of Animal Science* 65: 488-496.

Verstegen, M.W. and B.A. Williams, 2002. *Journal of Animal Biotechnology* 13: 113-127.

Wilczkiewicz, A., Jamroz, D., Skorupinska, J., Orda, J., 1995. *Wien. Tierarztl. Mschr.* 82, 239-244.

Williams, C.H., David, D.J. and Iismaa, O., 1962. *Journal of Animal Science* 59: 381-385.

Williams, B.A., Martin, W.A., Verstegen and Tamminga S. 2001 *Nutrition Research Reviews* 14: 207-227.

Zijlstra, R.T., Whang, K-Y., Easter, R.A. and Odle, J., 1996. *Journal of Animal Science* 74: 2948-2959.

Zvyagintseva et al *Carbohydrate research*, 322, 32 – 29, 1999.

Referencias citadas en la descripción

La presente lista de referencias citadas por el solicitante se proporciona únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido mucho cuidado al compilar las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la Oficina Europea de Patentes declina toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 4891220 A [0019]
- US 6143731 A [0019]
- US 20050020490 A [0021] [0026]
- US 20030219468 A [0021]
- US 6939864 B [0021]
- US 6214337 B [0021] [0024]
- US 5591428 A [0026]
- US 6841181 B [0026]
- US 5622939 A [0026]
- US 20040253253 A [0026]
- US 20010016220 A [0026]
- US 20030124170 A [0026]
- US 20040138172 A [0026]
- US 20040058889 A [0026]
- US 20050058671 A [0026]
- US 20050118326 A [0026]
- US 20020146484 A [0026]
- US 20040086491 A [0027]
- US 2003119780 A [0029]
- US 20050065114 A [0029] [0032]
- US 20050095250 A [0029]
- US 20050208079 A [0032]
- US 2005095250 A [0032]
- US 20030119780 A [0032]
- US 20040127457 A [0032]
- GB 727013 A [0035] [0058]
- US 4761042 A [0056]
- US 4739046 A [0056]
- US 5633369 A [0057]
- US 5705184 A [0057]

ES 2 333 259 T3

- US 2004008253 A [0057]
- US 20020143174 A [0057]
- 5 - US 20020032170 A [0057]
- US 6342242 B, Gore Vivian [0060]
- US 6432443 B [0060]
- 10 - US 6338856 B [0060]
- US 6312709 B [0060]
- 15 - US 6270812 B [0060]
- US 6383538 B [0060]
- US 6391331 B [0060]
- 20 - US 20030003134 A [0060]
- US 20020022049 A [0060]
- 25 - US 20040082539 A [0087]

Publicaciones que no corresponden a patentes citadas en la descripción

- 30 - Association of Analytical Chemists 1995. Official methods of Analysis, 16th edition, Association of Official Analytical Chemists, 1995 [0112]
- **Autio, K., Mannonen, I., Pierila, K., Kosinken, M., Siika-aho, M., Linko, M.** *Journal of the Institute of Brewing* 1996 vol. 102, 427-432. [0112]
- 35 - **Adams, C.A.**, Total Nutrition: Feeding animals for health and growth. *Nottingham University Press, Nottingham, United Kingdom*, 2001. 157-161. [0112]
- Bach **Knudsen, K. E.** Digestive Physiology in Pigs, Proceedings of the Vth international symposium on digestive physiology in pigs. 428-434. [0112]
- 40 - Bach **Knudsen, K.E.; Hansen, I.** *British Journal of Nutrition*, 1991, vol. 65: 217-232. [0112]
- **Bedford, M.R.** *Animal Feed Science and Technology*, 2000 vol. 86: 1-13. [0112]
- 45 - **Bergh M.O.; Razdan A.; Aman P.** *Animal Feed Science and Technology*, 1999 vol. 201 215-226. [0112]
- **Brownlee I.A.; Allen A.; Pearson J.P.; Dettmar P.W.; Havler M.R.; Atherton M.E.; Onsoyen E.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2005, Vol. 45, 497-510 [0112]
- 50 - **Burtin, P.** *Electronic Journal of Environmental Agriculture and Food Chemistry*, 2003, vol. 2 (4 [0112]
- **Campbell, G.L.; Bedford, M.R.** *Canadian Journal of Animal Science*, 1992, vol. 72, 449-466 [0112]
- 55 - **Canh, T.T.; Sutton, A.L.; Aarnink, A.J.A.; Verstegen, M.W.A.; Schrama, J.W.; Bakker, G.C.M.** *Journal of Animal Science*, 1998, vol. 76, 1887-1895 [0112]
- **Blonden C; Chaubet F; Nardella, A; Sinquin C; Jozefonvize, J.** *Biomaterials*, 1996, vol. 17, 597-603 [0112]
- **Charalampopoulos, D.; Wang, R; Pandiella, S.S.; Webb, C.** *International Journal of Food Microbiology*, 2002,
60 vol. 79, 131-141 [0112]
- **Close, W.H.** *Advances in pork production*, 2000, vol. 11, 47-56 [0112]
- **Cole, D.J.A.; Beal, RM; Luscombe, J.R.** *Veterinary Record*, 1968, vol. 83, 459-464 [0112]
- 65 - **Choct, M.** *Feed Milling International*, June 1997, 13-26 [0112]
- **Close, W.H.** *Principals of Pig Science. Nottingham University Press*, 1994, 123-140 [0112]

- **Conway**, E.J. Microdiffusion Analysis and Volumetric Error. *Crosby Lockwood and Son*, 1957, 465 [0112]
- **Cui**, W.; **Wood**, P. J.; **Blackwell**, B.; **Nikiforuk**, J. *Carbohydrate Polymers*, 2000, vol. 41 (3), 249 - 258 [0112]
- 5 - **De Lange**, C.F.M. feed evaluation-principals and practice. 2000, 77-92 [0112]
- **Derikx**, P.J.L.; **Aarnink**, A.J.A. Nitrogen Flow in Pig Production and Environmental Consequences. EAAP Publication No. 69, 1993, 344-349 [0112]
- 10 - **Dierick**, N.; **Decuypere**, J. *Pig News Information*, 1996, Vol. 17, 41N-48N [0112]
- **Drew**, M.D.; **A.G. van Kessel**; **A.E. Estrada**; **E.D. Ekpe**; **R.T. Zijlstra**. *Canadian Journal of Animal Science*, 2003, vol. 82, 607-609 [0112]
- 15 - **Etheridge**, R. D.; **Seerley**, R. W.; **Wyatt**, R. D. *JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE*, 1984, vol. 58 (6), 1396-1402 [0112]
- European Council, 2001. Commission regulation (EC) no. 418/2001 of 1 March 2001 concerning the authorisation of new additives and uses of additives in feedingstuffs. *Official Journal of the European Communities*, 2001, vol. 20 62 [0112]
- **Gao**, Y.; **Lackeyram**, D.; **Rideout**, T.; **Archbold**, T.; **Duns**, G.; **Fan**, M.Z.; **Squires**, E.J.; **De Lange**, C.F.M.; **Smith**, T.K. Digestive Physiology in Pigs, Proceedings of the 8th symposium on digestive physiology in pigs. 2001, 25 338-340 [0112]
- **Darcy-Vrillon**, B.; **Vaugelade**, P.; **Bernard**, F.; **Hoebler**, C.; **Guillon**, F.; **Mabeau**, S.; **Duce**, P-H. *Reproduction Nutrition Development*, 1996, vol. 36, 425 [0112]
- **De Mitchell**, I.; **R. Kenworthy**. *Journal of Applied Bacteriology*, 1976, vol. 41, 163-174 [0112]
- 30 - **Drochner**, W.; **Kerler**, A.; **Zacharias**, B. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2004, vol. 88, 367-380 [0112]
- **Estrada**, A.; **Drew**, M.D.; **Van Kessel**. *Canadian Journal of Animal Science*, 2001, vol. 81, 141-148 [0112]
- 35 - **Freimund S**; **Sauter M**; **Kappeli O**; **Dutler H**. *Carbohydrate Polymers*, 2003, vol. 54, 159-171 [0112]
- **Gibson**, G.R.; **Roberfroid**, M.B. *Journal of Nutrition*, 1995, vol. 125, 1401-1412 [0112]
- 40 - **Glisto**, L.V.; **Brunsgaard**, G.; **Hojsgaard**, S.; **Sandstrom**, B.; **Bach Knudsen**, K.E. *British Journal of Nutrition*, 1998, vol. 80, 457-468 [0112]
- **Gray**, J. Carbohydrates: Nutritional and health aspects. *International Life Science Institute*, 2003 [0112]
- 45 - **Graham**, H.; **Pettersson**, D. *Swedish Journal of Agricultural Research*, 1992, vol. 22, 39-42 [0112]
- Probiotics: a general view. **Havenaar R**; **Huis In't Veld MJH**. Lactic acid bacteria in health and disease. Elsevier Applied Science Publishers, 1992, vol. 1 [0112]
- 50 - **Hayes**, E.T.; **Leek**, A.B.G.; **Curren**, T.P.; **Dodd**, V.A.; **Carton**, O.T.; **Beattie**, V.E.; **O'Doherty**, J.V. *Bioresource Technology*, 2004, vol. 91, 309-315 [0112]
- **Hobbs**, P.J.; **Misslebrook**, T.H.; **Pain**, B.F. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 1995, vol. 60, 137-144 [0112]
- 55 - **Heo**, S-J.; **Park**, E-J.; **Lee**, K-W.; **Jeon**, Y-J. *Bioresource Technology*, 2005, vol. 96, 1613-1623 [0112]
- **Hiss**, S.; **Sauerwein**, H. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2003, vol. 87, 2-11 [0112]
- 60 - **Hogberg A**; **Lindberg JE**. *Animal Feed Science and Technology*, 2005 [0112]
- **Houdijk**, J.G.M.; **Bosch**, M.W.; **Verstegen**, M.W.A.; **Berenpas**, H.J. *Animal Feed Science and Technology*, 1998, vol. 71, 35-48 [0112]
- 65 - **Ito**, K.; **Hori**, K. *Food Reviews International*, 1989, Vol. 5, 101-144 [0112]
- **Itoh**, **Hiroko et al.** *Anticancer Research*, 1993, vol. 13, 2045-2052 [0112]

- **Jamroz, D.; Wiliczekiewicz, A.; Skorupinska, J.** *J. Anim. Feed Sci.*, 1992, vol. 1, 37-50 [0112]
- **Jamroz, D.; Wiliczekiewicz, A.; Orda, J.; Skorupinska, J.** *Wien. Tierarztl. Mschr.*, 1996, vol. 83, 165-177 [0112]
- 5 - **Jaskari, J.; Salovaara, H.; Mattila-Sandholm, T.; Putanen, K.** Proceedings of the 25th Nordic cereal congress. 1993, 242-244 [0112]
- **Jaskari, J.; P. Kontula; A. Siitonen; H. Jousimeies-Somer; T. Mattila-Sandholm; K. Poutanen.** *Applied Microbiology Biotechnology*, 1998, Vol. 49, 175-181 [0112]
- 10 - **Jensen, B.B.; H. JØrgensen.** *Applied Environ. Microbiol.*, 1994, vol. 60, 1897-1904 [0112]
- **Kenworthy, R.; W. E. Crabb.** *Journal of Comparative Pathology*, 1963, vol. 73, 215-228 [0112]
- 15 - **Kim, Il.; Jewell, D.E.; Benevenga, N.J.; Grummer, R.H.** *Journal of Animal Science*, 1978, vol. 46, 1658-1665 [0112]
- **Llaube' res, R.M.; Richard, B.; Lonvaud, A.; Dubourdieu, D.; Fournet, B.** *Carbohydrate Research*, 1990, Vol. 203, 103-107 [0112]
- 20 - **Leek, A.B.G.** 2003 Ph. D. Thesis, National University of Ireland, 2003 [0112]
- **Leek, A.B.G.; Beattie, V.E.; O'Doherty, J.V.** *Animal Science*, 2004, vol. 79, 155-164 [0112]
- 25 - **Mabeau, S.; Kloareg, B.** *J. Exp. Bot.*, 1987, vol. 38, 1573-1580 [0112]
- **Pereira, Mariana S. et al.** *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274 (12), 7656-667 [0112]
- **MacGregor, A. W. a. B.; Rattan, S.** Barley chemistry and technology. American Association of Cereal Chemists Inc, 1993 [0112]
- 30 - **Mackie, R.I.; Stroot, P.G.; Varel, V.H.** *Journal of Animal Science*, 1998, vol. 76, 1331-1342 [0112]
- **Magnelli P; Cipollo J.F.; Abeijon C.** *Analytical Biochemistry*, 2002, vol. 301, 136-150 [0112]
- 35 - **Mahan, D.C.** *Journal of Animal Science*, 1992, vol. 70, 2182-2187 [0112]
- **Mahan, D.C.** *Journal of Animal Science*, 1993, vol. 71, 2860-2866 [0112]
- 40 - **Mahan, D.C; Newton, E.A.** *Journal of Animal Science*, 1993, vol. 71, 3376-3382 [0112]
- **Mathers, J.C; Annison E.F.** Stoichiometry of polysaccharide fermentation in the large intestine. *Dietary Fibre and Beyond-Australian Perspectives*, 1993, Vol. 1, 123-135 [0112]
- 45 - **Martensson O; Biorklund M; Lambo M A; Duenas-Chasco M; Irastorza Am Holst O; Norin E; Welling G; Oste R; Onning G.** *Nutrition Research*, 2005, Vol. 25, 429-442 [0112]
- Stoichiometry of polysaccharide fermentation in the large intestine. **Mathers, J.C.; Annison, E.F.** Dietary fibre and beyond-Australian perspectives. 1993, 123-125 [0112]
- 50 - **Mc Cracken, B.A; Spurlock, M.E.; Roos, M.A.; Zuckermann, F.A.; Gaskins, H.R.** *Journal of Nutrition*, 1999, vol. 129, 613-619 [0112]
- **Melin, L.; Mattisson, S.; Katouli, M; Wallgren, P.** *Journal of Veterinary Medicine*, 2004, vol. B51, 12-22 [0112]
- 55 - Catherine **Michel; Marc Lahaye; Christian Bonnett; Serge Mabeau; Jean-Luc Berry.** *British Journal of Nutrition*, 1996, vol. 75, 263-280 [0112]
- Effect of fructo-oligosaccharide (FO) on the intestinal microbiota of rats and determination of the fermentative transformation and energy transmission of FO. **Mikkelsen, L.L.; Jensen, B.B.** Proceedings of the International Symposium Non-digestible Oligosaccharides:Healthy food for the colon?. 04 December 1997 [0112]
- Ministry of Agriculture, Fisheries and Food 1991. The *Feedingstuffs Regulations* 1991, 1991 [0112]
- 65 - **Mroz, Z.; Moeser, A.J.; Vreman, K.; van Diepen, J.T.M.; van Kempen, T.; Canh, T.T.; Jongbloed, A.W.** *Journal of Animal Science*, 2000, vol. 78, 3096-3106 [0112]

- **Muller A; Ensley H; Pretus H; McNamee R; Jones E; McLaughlin E; Chandley W; Browder W; Lowman D; Williams D.** *Carbohydrate Research*, 1997, vol. 299, 203-208 [0112]
- **Montagne, L.; Pluske, J.R.; Hampson, D.J.** *Animal Feed Science and Technology*, 2003, vol. 108, 95- 117 [0112]
- **Mortensen, P.B.; Hove, H.; Clausen, M.R.; Holtug, K.** *Scandanavian Journal of Gastroenterology*, December 1991, vol. 26 (1 2), 1285-1294 [0112]
- **Mul, A.J; Perry, F.G.** Recent Advances in Animal Nutrition. *Nottingham University Press*, 1994, 57-79 [0112]
- **Muralidhara, K. S.; G. G. Sheggeby; P. R. Elliker; D. C. England; W. E. Sandine.** *Journal of Food Protection*, 1977, vol. 40, 288-295 [0112]
- **Na hm, K. H.** *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2003, vol. 30 (2), 165-186 [0112]
- **Nessmith Jr, W.B.; Nelssen, J.L.; Tokach, M.D.; Goodband, R.D; Bergstrom, J.R.** *Journal of Animal Science*, 1997, vol. 75, 3222-3228 [0112]
- **O' Doherty, J.V.; Nolan, C.S; Callan, J.J; McCarthy, P.** *Animal Science*, 2004, vol. 78, 419-428 [0112]
- **Onning, G.; Asp, N.G.** *British Journal of Nutrition*, 1995, Vol. 74, 229-237 [0112]
- **Owsley, W.F.; Orr, D.E.; Tribble, L.F.** *Journal of Animal Science*, 1986, vol. 63, 492-496 [0112]
- **Pacheco-Delayaye, E.** *Food Chemistry*, 1995, vol. 65, 433-437 [0112]
- **Partridge, G.G; Gill, B.P.** Recent Developments in Pig Nutrition 3. *Nottingham University Press*, 1993, 205 - 237 [0112]
- **Pettersson A; Lindberg JE.** *Animal Feed Science Technology*, 1997, vol. 66, 97-109 [0112]
- **Pettersson, D.; P. Aman.** *British journal of Nutrition*, 1989, vol. 62, 139-149 [0112]
- **Pierce; Aileen; MsC Thesis.** *The use of seaweed extract in animal nutrition*, 2002 [0112]
- **Pierce, K.M.; Callan, J.J.; Brophy, P.O.; McCarthy, P.; Sweeney, T.; Fitzpatrick, E.; Byrne, C.; Ni Cheallaigh, S.; O' Doherty, J.V.** *Journal of Animal Science*, 2004, vol. 82 (I), 138-139 [0112]
- **Pitcairn, C.E.R.; Skiba, U.M.; Sutton, M.A.; Fowler, D.; Munro, R.; Kennedy, V.** *Environmental Pollution*, 2002, vol. 119, 9-21 [0112]
- Nutrition ofthe neonatal pig. **Pluske, J.R.; Williams, I.H.; Aherne, F.A.** The neonatal pigs: development and survival. *CAB International*. 1995 [0112]
- **Pluske, J.R.; Hampson, D.J; Williams I.H.** *Livestock Production Science*, 1997, vol. 51, 215-236 [0112]
- **Pluske, J.R.; Kim, J.C.; McDonald, D.E.; Pethick, D.W.; Hampson, D.J.** The weanerpig: Nutrition and Management. 2001, 81-111 [0112]
- **Porter, M.G.; Murray, R.S.** *Grass and Forage Science*, 2001, vol. 56, 405-411 [0112]
- **Read S; Currie G; Bacic A.** *Carbohydrate Research*, 1996, vol. 281, 187-210 [0112]
- **Riou, D. et al.** *Anticancer Research*, 1996, vol. 16, 1213-1218 [0112]
- **SAS.** 1985. Statistical Analysis Systems. *SAS Institute Inc*, 1985 [0112]
- **Sauer, W.C.; Just, A.; Jorgensen, H.H.; Fekadu, M.; Eggum, B.O.** *Journal of Animal Science*, 1980, Vol. 69, 4070-4079 [0112]
- **Schmitz, W.** Proceedings of the second European symposium on feed enzymes. 1995, 95-101 [0112]
- **S. Collicec et al.** *Phytochemistry*, 1994, vol. 35, 697-700 [0112]
- **Shibata, Hideyuki et al.** *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 1999, Vol. 45, 325-336 [0112]
- **Smith, E.A.; MacFarlane, G.T.** *Anaerobe*, 1997, Vol. 3, 327-337 [0112]

ES 2 333 259 T3

- **Soergel**, K.H. *Clinical Investigations*, 1994, vol. 72, 742-748 [0112]

- **Spreeuwenberg**, M.A.M.; **Verdonk**, J.M.A.J.; **Gaskins**, J.H.; **Verstegen**, M.W.A. *Journal of Nutrition*, 2001, vol. 131, 1520-1527 [0112]

- **Stanogias**, G.; **Pearce** G.R. *British Journal of Nutrition*, 1985, vol. 53 (537-548), 537 [0112]

- Statistics Analysis Systems Institute. Stastical Analysis Systems version 6.12. *SAS Institute Inc*, 1985 [0112]

- **Somogyi**, M. *Clinical Chemistry*, 1960, vol. 6, 23-35 [0112]

- **Theander** O; **Westerlund** E; **man** P; **Graham** H. *Animal Feed Science and Technology*, 1989, vol. 23, 205 - 225 [0112]

- **Thomlinson**, J.R. *The Veterinary record*, 1981, vol. 109, 120-122 [0112]

- **Tokach**, M.D.; **Nelssen**, J.L.; **Allee**, G.L. *Journal of Animal Science*, 1989, vol. 67, 1307-1312 [0112]

- **Turner**, J.L.; **Dritz**, J.J.; **Higgins** and **Minton**, J.E. *Journal of Animal Science*, 2002, vol. 80, 1947 - 1953 [0112]

- van **Soest**, P.J. *Journal of the Association of Agricultural Chemists*, 1976, vol. 46, 829-834 [0112]

- Van **Soest**, P.J.; **Robertson**, J.B.; **Lewis**, B.A. *Journal of Dairy Science*, 1991, vol. 74, 3583-3597 [0112]

- **Varel**, V.H. *Journal of Animal Science*, 1987, vol. 65, 488-496 [0112]

- **Verstegen**, M.W.; **B.A. Williams**. *Journal of Animal Biotechnology*, 2002, vol. 13, 113-127 [0112]

- **Wiliczkieicz**, A.; **Jamroz**, D.; **Skorupinska**, J.; **Orda**, J.,. *Wien. Tierarztl. Mschr.*, 1995, vol. 82, 239-244 [0112]

- **Williams**, C.H.; **David**, D.J.; **lismaa**, O. *Journal of Animal Science*, 1962, vol. 59, 381-385 [0112]

- **Williams**, B.A.; **Martin**, W.A.; **Verstegen** and **Tamminga** S. *Nutrition Research Reviews*, 2001, Vol. 14, 207-227 [0112]

- **Zijlstra**, R.T.; **Whang**, K-Y.; **Easter**, R.A.; **Odle**, J. *Journal of Animal Science*, 1996, vol. 74, 2948 - 2959 [0112]

- **Zvyagintseva et al.** *Carbohydrate research*, 1999, Vol. 322, 32-29 [0112]

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende por lo menos un 8% en peso de β -glucanos y por lo menos un 8% en peso de α -fucanos o una mezcla de los mismos.

2. Composición según la reivindicación 1, en la que los β -glucanos se encuentran presentes en una cantidad comprendida entre el 8% y el 30% en peso.

3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que los α -fucanos se encuentran presentes en una cantidad comprendida entre el 8% y el 30% en peso.

4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que los β -glucanos comprenden lamina-rina y/o los α -fucanos comprenden fucoidano.

5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además uno o ambos elemen-tos de entre el manitol y la lactosa.

6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende uno o más cultivos probióticos.

7. Procedimiento para obtener una composición según la reivindicación 1, a partir de algas marinas, que compren-de:

(i) Mantener la temperatura de una disolución de algas marinas a una temperatura comprendida entre 50°C y 80°C, preferentemente a 75°C.

(ii) Mantener el pH de la disolución a un pH comprendido entre 4 y 5, preferentemente a un pH de aproximada-mente 4,5.

(iii) Decantar la disolución por centrifugación.

(iv) Depurar la disolución por centrifugación,

para proporcionar un extracto depurado de algas marinas.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, en la que la disolución de algas marinas se agita para crear una sus-pensión acuosa espesa, durante un máximo de aproximadamente diez horas, preferentemente 3 horas.

9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 ó 8, en la que la disolución se comprime mecánica-mente.

10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en la que la mezcla se filtra a continuación a través de un nanofiltro que presenta un tamaño de poro de membrana comprendido entre 10^{-3} y 10^{-2} μm .

11. Pienso que comprende ingredientes alimentarios y una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, preferentemente presente en una cantidad comprendida entre el 0,001 y el 10% en peso del pienso.

12. Preparación farmacéutica que comprende la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y un excipiente farmacéuticamente apto.

13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, pienso según la reivindicación 11 o preparación farmacéutica según la reivindicación 12, para utilizar en una o más de las aplicaciones siguientes: mejorar la salud intestinal en los seres humanos o animales, estimular el crecimiento de bacterias beneficiosas en los intestinos de los seres humanos o de los animales, reducir los niveles de microbios nocivos tales como la *E. coli* y la *Salmonella*, mejorar el rendimiento de los animales, comprendiendo un incremento en el aumento medio diario, una reducción del estregamiento y aumentar la proporción de conversión alimentaria y la ingesta diaria, para reducir la cantidad de lactosa requerida en las dietas de los mamíferos jóvenes, aumentar la absorción de los minerales y de los micronutrientes y aumentar la digestibilidad de los nutrientes de los animales o los seres humanos.

14. Utilización de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la preparación de un medi-camento para utilizar en el tratamiento o la prevención en animales y/o seres humanos.

15. Utilización de una composición que comprende β -glucanos y α -fucanos en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una inflamación intestinal o de una infección intestinal.

Table 1. Composition and chemical analysis of starter diets.

Diet	Starter					
Treatment	1	2	3	4	5	6
Composition (g/kg)						
Lactofeed ^a	0	150	300	0	150	300
OutCare ⁺	0	0	0	5	5	5
Wheat	572	427	287	567	422	282
Soya bean meal	150	150	150	150	150	150
Whey protein	125	125	125	125	125	125
Full Fat Soya	75	75	75	75	75	75
Soya Oil	65	60.3	50	65	60.3	50
Minerals & Vitamins	5	5	5	5	5	5
Lysine	4.5	4.5	4.05	4.5	4.5	4.05
Methionine	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9
Threonine	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
Analysis (g/kg)						
Dry Matter	897.7	913.0	906.8	901.9	907.6	918.3
Crude Protein (N x 6.25)	235.6	235.3	239.1	241.1	244.4	236.5
Gross Energy (MJ/kg)	17.96	18.30	17.58	17.99	17.93	17.77
Ash	40.02	50.00	56.65	39.57	49.50	58.89
Neutral Detergent Fibre	131.32	103.01	96.02	127.72	108.69	83.44
Lysine ^a	16	16	16	16	16	16
Methionine and cysteine ^a	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6
Threonine ^a	12	12	12	12	12	12
Tryptophan ^a	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8
Calcium ^a	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0

Tabla 1. Composición y análisis químico de las dietas iniciales.

Dieta Inicio

Tratamiento

Composición (g/kg)

Lactofeed *

GutCare ♦

Trigo

Harina de soja

Proteína de suero

Soja con grasa completa

Aceite de soja

Minerales y Vitaminas

Lisina

Metionina

Treonina

Análisis (g/kg)

Materia seca

Proteína bruta (N x 6,25)

Energía bruta (MJ/kg)

Cenizas

Fibra detergente neutra

Lisina •

Metionina y cisteína •

Treonina •

Triptófano •

Calcio •

Fósforo •

* Lactofeed 70 (Volac International Ltd.) contiene 860 g/kg de filtrado de suero y 140 g/kg de harina de soja. Lactofeed consiste en 955 g/kg de materia seca (DM); 700 g/kg de lactosa; 125 g/kg de proteína cruda; 90 g/kg de cenizas; 50 g/kg de aceite y 10 g/kg de fibra en bruto

♦ BioAtlantis Co. Kerry.

• Calculado a partir del análisis inmediato (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1991).

Table 2. The effect of dietary treatment on faecal DM, faecal pH, faecal score, apparent digestibility coefficients and digestible energy content of starter diets (L.S.M +/- S.E.M)

Lactose (g/kg)		Significance						SEM	Lactose		GutCare	Lactose x GutCare	
		65	170	275	65	170	275		+	+			
Seaweed		-	-	-	+	+	+						
n		6	6	6	6	6	6						
Faeces pH													
Days 0-15		6.75	6.17	6.08	6.51	6.13	5.97						
Days 15-27		6.79	5.96	6.08	6.41	5.87	6.03						
Days 0-27		6.77	6.07	6.08	6.46	6.00	6.00	0.068	***	*		ns	
Faeces Score													
Days 0-8		3.00	2.77	2.71	2.79	2.75	2.68			ns		ns	
Days 8-15		2.52	2.66	2.35	2.11	2.88	2.47			ns		ns	
Days 15-21		1.90	1.94	2.05	2.03	2.00	1.74			ns	*	ns	
Days 21-27		2.02	1.90	1.80	1.99	2.40	2.12			*		*	
Days 0-27		2.36	2.32	2.23	2.23	2.51	2.25			ns		ns	
Digestibility (%)													
Dry Matter		0.834	0.850	0.865	0.854	0.836	0.840			ns		ns	**
Organic Matter		0.848	0.863	0.877	0.867	0.850	0.855			ns		ns	**
Protein		0.804	0.796	0.809	0.838	0.783	0.753			ns		ns	***
Energy		0.802	0.827	0.842	0.823	0.810	0.806			ns		ns	***
Neutral Detergent Fibre		0.478	0.457	0.503	0.543	0.419	0.383			0.0064		ns	*
Digestible Energy (MJ/kg)		14.40	13.13	14.80	14.80	14.52	14.32			0.0299		ns	*

Probability of significance; *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001

Tabla 2. El efecto del tratamiento dietético en la DM fecal, el pH fecal, la clasificación fecal, los coeficientes de digestibilidad aparente y el contenido en energía digerible de las dietas iniciales (L.S.M \pm S.E.M)

Lactosa (g/kg)	SEM	Lactosa	GutCare	Lactosa x Gutcare
Algas marinas				

n

pH heces

Días 0-15

Días 15-27

Días 0-27

Clasificación de las heces

Días 0-8

Días 8-15

Días 15-21

Días 21-27

Días 0-27

Digestibilidad (%)

Materia seca

Materia orgánica

Proteínas

Energía

Fibra detergente neutra

Energía digerible (MJ/Kg)

Probabilidad de significación *, P < 0,05; **, P < 0,01; ***, P < 0,001

Table 3 Composition and chemical analysis of starter diets (as fed)

Composition g/kg	Treatment											
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
Lactofeed ¹	250	250	250	250	125	125	125	125	0	0	0	0
Wheat	326	326	326	326	432	432	432	432	538	538	538	538
Soya Bean Meal	150	150	150	150	167.5	167.5	167.5	167.5	185	185	185	185
Whey protein	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125
Full Fat Soya Bean	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
Soya Oil	70	70	70	70	72.5	72.5	72.5	72.5	75	75	75	75
Vitamins and Minerals ²	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Methionine †	1.8	1.8	1.8	1.8	1.65	1.65	1.65	1.65	1.5	1.5	1.5	1.5
Lysine †	5.5	5.5	5.5	5.5	4.95	4.95	4.95	4.95	4.4	4.4	4.4	4.4
Threonine †	0.8	0.8	0.8	0.8	0.55	0.55	0.55	0.55	0.3	0.3	0.3	0.3
Cholesterol	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
GuiCare	0	3	8	12	0	3	6	12	0	3	6	12
Analysis g/kg												
Dry Matter	873.8	898	895.9	899.1	907.2	893.7	897.9	892.5	888.3	985.4	890.3	887.9
Crude Protein (N x 6.25)	194.7	198.2	201.8	196.8	199.5	204.5	202.7	201.5	205.7	209.9	212.9	213.9
Gross Energy (MJ/kg)												
Ash	48.44	48.46	48.98	49.33	43.48	43.78	43.57	44.82	36.23	37.89	38.42	38.9
Neutral-Detergent Fibre	64.62	66.4	67.3	68.95	73.75	70.13	75.09	72.57	78.78	79.43	89.84	81.54
Lactose ³	243	243	243	243	153	153	153	153	83	83	83	83
Lysine												

¹The lactofeed was manufactured by Volac International Ltd, Orwell, United Kingdom. The chemical analysis is as follows: (g/kg) dry matter 955, crude protein 125, oil 50, ash 90, fibre 10, gross energy content 15.3 MJ/kg and a pH of 6.5-7.

²Provided (mg/kg completed diet): Cu 175, Fe 140, Mn 47, Zn 120, I 6, Se 0.3, retinol 1.8, cholecalciferol 0.025, alpha-tocopherol 67, phytylmenasquinone 4, cyanocobalamin 0.01, riboflavin 2, nicotinic acid 12, pantothenic acid 10, choline chloride 250, thiamine 2, pyridoxine 0.015. Chromium III oxide included at 200 mg/kg complete diet.

³ Calculated concentration of Lactose.

† Calculated from proximate analysis. (Ministry of Agriculture, 1991)

Tabla 3. Composición y análisis químico de las dietas iniciales (tal como se han administrado)

Tratamiento

Composición g/kg

Lactofeed ¹

Trigo

Harina de soja

Proteína de suero

Harina de soja con grasas completas

Aceite de soja

Vitaminas y minerales ²

Metionina †

Lisina †

Treonina †

Cromo

Análisis de GutCare g/kg

Materia seca

Proteína bruta (N x 6,25)

Energía bruta (MJ/kg)

Cenizas

Fibra detergente neutra

Lactosa ³

¹ Lactofeed se fabricó en by Volac International Ltd, Orwell, Reino Unido. El análisis químico es el siguiente: (g/kg) materia seca 955, proteína bruta 125, aceite 50, ceniza 90, fibra 10, contenido en energía bruta 15,5 MJ/kg y un pH de 6,5 a 7.

² Proporcionado (dieta completa mg/kg): Cu 175, Fe 140, Mn 47, Zn 120, I 0,6, Se 0,3, retinol 1,8, colecalciferol 0,025, α -tocopherol 67, fitilmenaquinona 4, cianocobalamina 0,01, riboflavina 2, ácido nicotínico 12, ácido pantoténico 10, cloruro de colina 250, tiamina 2, piridoxina 0,015. óxido de cromo III oxide incluido en una dieta compleja de 200 mg/kg.

³ Concentración calculada de lactosa

† Calculado a partir del análisis inmediato (Ministerio de Agricultura, 1991)

Table 4 The effect of lactose level and GutCare concentration on pig performance after weaning (day 0) (least square means and s.e.)

GutCare (g/kg)	Lactose Level (g/kg)												Significance	
	0	3	6	12	0	3	6	12	0	3	6	12	GutCare	Lactose x β-Glucan
No. of pens	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	s.e.	
Food Intake (g/day)														
Days 0-7	263	301	268	226	255	236	242	265	213	200	257	207	19	ns
Days 7-14	476	541	589	494	488	547	503	581	438	420	508	454	24	*
Days 14-21	743	836	901	827	788	818	790	871	733	723	814	738	48	ns
Days 0-21	494	550	586	516	510	533	512	573	461	447	526	467	25	ns
Daily Gain (g/day)														
Days 0-7	176	246	214	182	163	141	187	188	91	141	181	159	32	*
Days 7-14	326	387	392	369	278	366	378	370	255	240	288	288	26	ns
Days 14-21	467	515	510	489	506	503	519	523	401	440	460	451	28	ns
Days 0-21	323	383	372	347	316	337	361	360	249	274	313	303	23	**
Food conversion ratio														
Days 0-7	1.58	1.2	1.52	1.27	1.94	2.18	1.28	1.85	2.52	2.21	1.56	1.28	0.333	*
Days 7-14	1.51	1.46	1.56	1.34	1.6	1.55	1.37	1.69	1.81	1.93	1.69	1.6	0.138	ns
Days 14-21	1.6	1.63	1.75	1.7	1.56	1.65	1.51	1.73	1.85	1.69	1.78	1.98	0.121	ns
Days 0-21	1.57	1.46	1.61	1.45	1.76	1.79	1.4	1.78	2.05	1.85	1.69	1.54	0.138	*

† = (P<0.1), * = (P<0.05), ** = (P<0.01), *** = (P<0.001), ns = Non significant (P>0.05).

Tabla 4. El efecto del nivel de lactosa y la concentración del GutCare en el rendimiento de los cerdos tras el destete (día 0) (medias de los mínimos cuadrados y error estándar [s.e.]

GutCar (g/kg)	Significación	
Nivel de lactosa (g/kg)	GutCare	Lactosa x β -Glucano
N.º de rediles		
Ingesta alimentaria (g/día)		
Días 0-7		
Días 7-14		
Días 14-21		
Días 0-21		
Aumento diario (g/día)		
Días 0-7		
Días 7-14		
Días 14-21		
Días 0-21		
Proporción de conversión alimentaria		
Días 0-7		
Días 7-14		
Días 14-21		
Días 0-21		
t = (P < 0,1), • = (P < 0,05), ** = (P < 0,01), *** = (P < 0,001), ns = No significativo (P > 0,05).		

Table 5 The effect of GutCare on selected microbial populations in the caecum and colon of the piglet (LSM \pm s.e.m)

GutCare	None	GutCare	s.e.
Caecum			
Bifidobacteria	7.541	6.450	0.315
E.coli	4.628	1.211	0.867
Lactobacilli	7.293	6.305	0.308
Colon			
Bifidobacteria	7.670	6.900	0.346
E.coli	5.235	1.835	0.814
Lactobacilli	7.837	6.786	0.213

Tabla 5. El efecto del GutCare en poblaciones microbianas seleccionadas del ciego y el colon del lechón (LSM \pm s.e.m.)

GutCare	Ninguno	GutCare	s.s.
---------	---------	---------	------

Ciego

Bifidobacterias

E. coli

Lactobacilos

Colon

Bifidobacterias

E. coli

Lactobacilos

Table 6: Composition and analysis of experimental diets.

Treatment	1	2	3	4	5
Composition (g/kg)					
OutCare	0	0.7	1.4	2.8	5.6
Wheat	704.3	704.3	704.3	704.3	704.3
Soya Bean Meal	264.7	264.7	264.7	264.7	264.7
Soya oil	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7
Limestone flour	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
Dicalcium Phosphate	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
Minerals & Vitamins [†]	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0
Analysis (g/kg)					
Total β -glucan	0	0.089	0.178	0.356	0.712
Dry Matter	869.1	871.8	886.5	884.4	878.2
Crude protein	215.7	203.2	199.5	200.8	195.1
Neutral Detergent Fibre	119.7	97.8	91.8	96.4	98.0
Acid Detergent fibre	39.0	35.2	30.7	32.7	35.7
Hemi cellulose	80.7	62.6	61.1	63.7	62.3
Crude Ash	45.7	48.4	47.7	51.2	52.6
Gross Energy (MJ/kg)					
Lysine [†]	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Methionine and cysteine [†]	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0

Threonine †	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8
Tryptophan †	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8

† Calculated from Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (1991).

† Provided per kg of complete diet: 3 mg retinol, 0.05 mg cholecalciferol, 40 mg alpha-tocopherol, 90 mg copper as copper II sulphate, 100 mg iron as iron II sulphate, 100 mg zinc as zinc oxide, 0.3 mg selenium as sodium selenite, 25 mg manganese as manganous oxide and 0.2 mg iodine as calcium iodate on a calcium sulphate/ calcium carbonate carrier

Tabla 6. Composición y análisis de las dietas experimentales

Tratamiento

Composición (g/kg)

GutCare

Trigo

Harina de Soja

Aceite de Soja

Harina calcárea

Fosfato dicálcico

Minerales y vitaminas †

Análisis (g/kg)

Total β -glucanos

Materia seca

Proteína bruta

Fibra detergente neutra

Fibra detergente ácida

Hemicelulosa

Cenizas brutas

Energía bruta (MJ/kg)

Lisina ‡

Metionina y cisteína ‡

Treonina ‡

Triptófano ‡

‡ Calculado a partir del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (1991).

† Proporcionado por kg de dieta completa: 3 mg de retinol, 0,05 mg colecalciferol, 40 mg de α -tocoferol, 90 mg de cobre como sulfato de cobre II, 100 mg de hierro como sulfato de hierro II, 100 mg de cinc como óxido de cinc, 0,3 mg de selenio como selenito sódico, 25 mg de manganeso como óxido manganoso y 0,2 mg de yodo como yoduro cálcico en un excipiente de sulfato cálcico / carbonato cálcico

Table 7: Effect of GutCare concentration on microbial ecology in the colon, cfu (LSM \pm s.e.m.)

Treatment	1	2	3	4	5	Significance	
GutCare (g/kg)	0	0.7	1.4	2.8	5.6	s.e.m.	Linear ^b Quadratic ^c
Colon Bacterial Populations							
<i>Enterobacteria</i>	6.95	6.72	6.34	6.49	6.85	0.245	ns *
<i>Bifidobacteria</i>	8.37	8.62	8.69	8.80	8.16	0.110	ns ***

* = (P<0.05), ** = (P<0.01), *** = (P<0.001), ns = non significant (P>0.05)

^b Linear: linear response to GutCare^c Quadratic response to GutCare

Tabla 7. Efecto de la concentración de GutCare en la ecología microbiana del colon, cfu (LSM \pm s.e.m.)

Tratamiento	Significación	
GutCare (g/kg)	Lineal ^b	Cuadrática ^c

Poblaciones bacterianas del colon

Enterobacterias

Bifidobacterias

* = (P < 0,05), = (P < 0,01), *** = (P < 0,001), ns = no significativo (P > 0,05)

^b Lineal: respuesta lineal al GutCare

^c Respuesta cuadrática al GutCare

Table 8: Effect of GutCare concentration on total tract digestibility coefficients (LSM \pm s.e.m.)

Treatment	1	2	3	4	5	Significance		
GutCare (g/kg)	0	0.7	1.4	2.8	5.6	s.e.m.	Linear ^b	Quadratic ^c
Total Tract Digestibility								
Ash	0.57	0.62	0.56	0.62	0.62	0.010	**	ns

* = (P<0.05), ** = (P<0.01), *** = (P<0.001), ns = non significant (P>0.05)

^b Linear: linear response to GutCare^c Quadratic response to GutCare

Tabla 8. Efecto de la concentración de GutCare en los coeficientes de digestibilidad del tracto total (LSM \pm s.e.m.)

Tratamiento		Significación	
GutCare (g/kg)	s.e.m.	Lineal ^b	Cuadrática ^c
Digestibilidad del tracto total			
Cenizas			

* = (P < 0,05), = (P < 0,01), *** = (P < 0,001), ns = no significativo (P > 0,05)

^b Lineal: respuesta lineal al GutCare

^c Respuesta cuadrática al GutCare

Tabla 9. Los efectos del tratamiento dietético en la materia seca (DM) fecal, el pH fecal y la clasificación fecal en los lechones (medias de los mínimos cuadrados y error estándar [s.e.]

GutCar (g/kg)	Significación	
Nivel de lactosa (g/kg)	Lactosa	GutCare
N.º de rediles		
DM fecal (G/kg)		
pH fecal		
Clasificación fecal ‡		
Días 0-7		
Días 7-14		
Días 14-21		
Días 0-21		
† = (P < 0,1), • = (P < 0,05), ** = (P < 0,01), *** = (P < 0,001), ns = No significativo (P > 0,05).		
‡ 1 = heces duras y 5 = heces líquidas, de tipo mucoso.		