

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 007 620**

51 Int. Cl.:

A23K 10/16 (2006.01)
A61K 31/716 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A23K 10/12 (2006.01)
A23K 20/20 (2006.01)
A23K 20/163 (2006.01)
A23K 50/10 (2006.01)
A23K 50/60 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.02.2013** **PCT/US2013/027282**
87 Fecha y número de publicación internacional: **29.08.2013** **WO13126669**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2013** **E 13751435 (2)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2024** **EP 2817012**

54 Título: **Composiciones de pienso para animales y métodos de utilización de los mismos**

30 Prioridad:

22.02.2012 US 201261601891 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
20.03.2025

73 Titular/es:

KEMIN INDUSTRIES, INC. (100.00%)
2100 Maury Street
Des Moines, Iowa 50317, US

72 Inventor/es:

LE BRUN, JEFFREY, RICHARD;
LEVINE, ROBERT y
HORST, GEOFFREY, PAUL

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 3 007 620 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones de pienso para animales y métodos de utilización de los mismos

Campo

- 5 La presente tecnología se relaciona con beta glucano, metales traza y complejos de beta glucano y metales traza, y usos de los mismos para modular la función inmunitaria, incluyendo proporcionar dichas composiciones como suplementos orales o mezclados con pienso animal.

Introducción

Esta sección proporciona información de fondo relacionada con la presente divulgación que no es necesariamente técnica anterior.

- 10 Los animales están expuestos a numeroso estrés durante sus vidas que se ha demostrado que afectan la salud, crecimiento, mortalidad, salud del sistema inmunológico y bienestar general del animal. Actualmente, se utilizan antibióticos y otros tratamientos para mejorar la capacidad de un animal para resistir enfermedades y como tratamiento para una enfermedad. La dependencia excesiva de los antibióticos en la agricultura moderna y en la salud humana ha provocado una resistencia generalizada a los antibióticos y un deseo de encontrar formas más naturales de promover una función inmunológica saludable.

- 15 Se podrían utilizar alternativas naturales a los antibióticos para combatir enfermedades infecciosas. Actualmente, las enfermedades infecciosas son una de las principales causas de mortalidad en el mundo. En Estados Unidos, sólo el cáncer y las enfermedades cardíacas provocan más muertes en humanos que las enfermedades infecciosas. Los antibióticos a menudo son necesarios para tratar enfermedades infecciosas en humanos y animales. Sin embargo, cuando se utilizan antibióticos de forma continuada pueden aparecer cepas bacterianas resistentes. Esta resistencia a los antibióticos es un grave problema de salud humana y ha contribuido al aumento de muertes por cepas bacterianas resistentes a los antibióticos, como el *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA). Por ejemplo, ahora se citan cepas bacterianas resistentes a los antibióticos como causa de más muertes en Estados Unidos que el VIH/SIDA.

- 25 A pesar de la necesidad de preservar la integridad de los antibióticos para aplicaciones humanas, el uso de antibióticos en aplicaciones animales comprende más del 80 % del uso total de antibióticos en los Estados Unidos. Entre 1985 y 2003, el uso subterapéutico de antibióticos en aplicaciones de pienso animal se ha multiplicado por diez veces. El desarrollo de un ingrediente no antibiótico para pienso animal que promueva la salud del sistema inmunológico podría ayudar a reducir la prevalencia de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos que también son dañinas para los seres humanos. Este ingrediente puede ser más beneficioso cuando se utiliza en condiciones de crecimiento del ganado libres de antibióticos. Varios países, aparte de los Estados Unidos, no permiten el uso subterapéutico de antibióticos en el pienso animal, e incluso pueden prohibir la importación de productos cárnicos criados con antibióticos desde los Estados Unidos. Para que sea comercialmente eficaz, un ingrediente de este tipo debe ser rentable, confiable, seguro y poder incluirse en la infraestructura existente de agua o pienso.

- 30 Un ejemplo de un compuesto utilizado para estimular la actividad del sistema inmunológico es el beta glucano. Los beta glucanos son polisacáridos conectados por enlaces beta glicosídicos que se pueden encontrar en diversos organismos, como levaduras, hongos, granos de cereales y otros. El beta glucano se utiliza como suplemento dietético y sus diversos efectos beneficiosos son objeto de diversos ensayos clínicos. En la actualidad, los productos de beta glucano se derivan principalmente de la levadura, donde se extraen de la pared celular de la levadura mediante diversos procesos. Se describen ejemplos de estos productos y procesos en las Patentes de Estados Unidos Número 5,082,936; 5,633,369; 6,444,448; 7,981,447; y Publicación de Estados Unidos Número, 2008/0108114; y 2004/0082539. Existen otros productos de beta glucano, incluidos los derivados de hongos, avena, cebada y laminaria. Aunque estos productos demuestran efectos beneficiosos en algunos casos, estos productos de beta glucano generalmente se consideran demasiado costosos para la mayoría de las aplicaciones de pienso animal. Los beta glucanos más eficaces producidos utilizando estos medios, por ejemplo, se valoraron comercialmente entre 50 y 100 dólares estadounidenses por kg de beta glucano en 2011, un precio prohibitivo para la mayoría de las personas y los criadores de animales.

- 40 Una razón del alto coste es que los beta glucanos contenidos en estos productos se derivan de la pared celular del organismo. Como tal, el contenido de beta glucano resultante de la biomasa total utilizada para producir el beta glucano es generalmente inferior al diez o quince por ciento. Además, los beta glucanos contenidos en la pared celular de un organismo generalmente deben someterse a costosos procesos de extracción de múltiples etapas para separar el beta glucano de otros materiales celulares.

- 55 La estructura del beta glucano también es compleja. Las variaciones en la estructura de ramificación, peso molecular, organismo de origen y método de producción y extracción pueden afectar la eficacia e idoneidad de diferentes productos de beta glucano. Por ejemplo, los beta-1,3;1,6-glucanos derivados de levadura constituyen la mayoría de los productos comerciales de beta glucano destinados a estimular la actividad del sistema

inmunológico. Se ha demostrado que los beta-1,3;1,4-glucanos de la avena son útiles para reducir el colesterol, y solo estos tipos de beta glucanos pueden etiquetarse como tales de acuerdo con las regulaciones de la FDA. Muchos organismos producen diferentes estructuras de beta glucano y no todos los beta glucanos son igualmente efectivos. Aunque existen investigaciones sobre la utilidad o eficacia de los beta glucanos derivados de la levadura (por ejemplo, Patente de Estados Unidos No. 6,939,864), champiñones o avena (por ejemplo, Publicación de Estados Unidos No. 2011/0123677), hay menos investigaciones sobre los beta glucanos derivados de algas o fuentes derivadas de protistas. Además, las algas y protistas no se producen en cantidades comerciales que sean beneficiosas por su contenido de beta glucano. Se describen composiciones de pienso para animales que comprenden beta-(1,3)-glucano útil en la estimulación inmunológica en los documentos JP2004008063A y WO 2004/105775. El documento US2011/29383A describe una composición nutricional pediátrica que comprende una fuente de beta-(1,3)-glucano. Las propiedades inmunoestimulantes del beta-(1,3)-glucano, obtenido a partir de *Euglena* se mencionan en los documentos DE 1973438A1 y WO 2011/111707. Sonck et al. (Veterinary Immunology and Immunopathology, 135 (2010), 199-207) describe un estudio del efecto de diversos beta glucanos sobre las células mononucleares de la sangre periférica y los neutrófilos del cerdo.

Los beta glucanos producidos por diferentes organismos y extraídos con diferentes técnicas pueden tener efectos muy diferentes cuando se administran a animales como componente de una composición de pienso animal, y esto también puede afectar la dosificación del beta glucano. En el documento, "Effects of beta-glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, and immunological and somatotrophic responses of pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide", publicado en el Journal of Animal Science, Li et al. escribieron: "los resultados del estudio actual indican que la adición de β -glucano a las dietas de cerdos destetados puede ofrecer algunos beneficios en el rendimiento del crecimiento y la respuesta inmune a una exposición de lipopolisacáridos. Sin embargo, los β -glucanos producidos por diferentes métodos de producción pueden tener diferentes efectos sobre el rendimiento del crecimiento y la función inmune en lechones destetados. La fuente de β -glucano producida por diferentes métodos puede variar en su estructura, composición química o ambas, lo que puede influir en su actividad y la cantidad que se debe agregar para obtener una respuesta de crecimiento. Por lo tanto, se justifican más investigaciones para discernir mejor el rendimiento y la respuesta inmune del β -glucano producido por diferentes métodos cuando se suplementa en dietas porcinas".

Aunque los beta glucanos producidos por un alga o un protista como *Euglena gracilis* pueden ser similares a los beta glucanos de otras fuentes, estos beta glucanos también son únicos en varios aspectos. Por ejemplo, la diferente historia evolutiva que tienen las algas y los protistas en comparación con los hongos, plantas o bacterias los lleva a producir cientos de compuestos únicos, algunos de los cuales pueden actuar como cofactores aún por determinar del beta glucano. El uso de beta glucanos derivados de algas o protistas como suplemento nutricional de alimentos y piensos puede proporcionar suplementos inmunomoduladores de menor coste y potencialmente de mayor pureza para aplicaciones de suplementos alimentarios humanos y animales. Además, la inclusión de beta glucanos en forma de harina o suplemento de algas o protistas eliminaría la necesidad de procesos de extracción a base de disolventes potencialmente dañinos o de alto coste, como los procesos que se utilizan para extraer beta glucanos de las paredes celulares de levaduras u hongos, y puede permitir la inclusión de cofactores y nutrientes adicionales que son suministrados por las algas o protistas, como vitamina E, zinc, ácidos grasos Omega 3 y otras moléculas nutricionalmente beneficiosas conocidas o desconocidas.

Además de los aspectos inmunológicos beneficiosos relacionados con el beta-glucano, la presencia en los piensos para animales de ciertos metales traza en cantidades suficientes y en formas biológicamente disponibles es importante para mantener el bienestar de los animales. Debido a que los metales traza esenciales suelen ser deficientes en los ingredientes de los piensos básicos, a menudo se agregan cantidades suplementarias de estos nutrientes al pienso.

También se ha demostrado que los metales traza afectan el rendimiento general del sistema inmunológico. Las sales inorgánicas como el óxido de zinc y sulfato de zinc se proporcionan a menudo como suplemento de minerales traza. Sin embargo, puede haber una absorción incompleta de estas fuentes inorgánicas. Es probable que la porción del metal traza que no se absorbe pase a través del tracto digestivo del animal hasta las heces, donde puede acumularse. Por ejemplo, los desechos animales que contienen concentraciones muy altas de zinc pueden considerarse tóxicos y la acumulación de metales traza puede causar daños ambientales si se esparcen excesivamente en los campos como fuente de fertilizantes, como es una práctica común.

Existen muchos productos comerciales en los que la biodisponibilidad de los elementos traza aumenta en comparación con una fuente inorgánica del mismo metal. La mayor biodisponibilidad puede deberse a la asociación de una molécula orgánica, que puede ser una proteína, un aminoácido o un polisacárido, donde la molécula orgánica generalmente se denomina ligando. Existen diferentes explicaciones de por qué los metales traza enlazados orgánicamente tienen una mayor biodisponibilidad. Una explicación es que el enlace a una molécula orgánica proporciona una mayor estabilidad en el intestino, reduciendo la probabilidad de que un agonista más fuerte que evitaría la absorción en el cuerpo se enlace al metal traza. Otra explicación es que el

complejo metálico orgánico se absorbe a través del revestimiento del intestino. En la Tabla 1 se resumen algunos ejemplos de clasificaciones de productos de metales traza y ligandos.

Tabla 1. Ejemplos de complejos metálicos orgánicos.

Descripción	Ejemplos (Números de Patente de Estados Unidos, a menos que se indique lo contrario)
proteinato de metal	3,440,054; 3,463,858; 3,775,132; 3,969,540; 4,020,158; 4,076,803; 4,103,003; 4,172,072; 5,698,724
Complejo de metal y aminoácido o quelato	3,941,818; 3,950,372; 4,067,994; 4,863,898; 4,900,561; 4,948,594; 4,956,188; 5,061,815; 5,278,329; 5,583,243; 6,166,071; 3,950,372; 4,021,569; 4,039,681; 4,067,994; 5,278,329; 4,900,561; 4,948,594; 4,956,188; 5,583,243; 7,129,375
propionato de metal	5,591,878; 5,707,679; 5,795,615; 5,846,581
complejo metal y polisacárido	8,273,393; 4,661,358; Documento EP 0712581

- 5 La figura 1 proporciona representaciones visuales de estos diversos complejos metálicos orgánicos. Los diferentes tipos de productos que contienen elementos traza asociados con un ligando orgánico pueden clasificarse además en diferentes grupos según el ligando utilizado para producir el producto.

Es deseable encontrar formas de mejorar la eficacia del sistema inmunológico de un animal contra enfermedades infecciosas sin depender de antibióticos.

10 Resumen

La invención se describe en el conjunto de reivindicaciones adjunto. La presente tecnología incluye sistemas, procesos, artículos de fabricación y composiciones relacionados con la modulación de la función del sistema inmunológico mediante la administración de un beta glucano a un animal.

- 15 El beta glucano se deriva de *Euglena*, puede formar complejos con un metal traza y forma parte del pienso animal. El bienestar de un animal se puede mejorar mediante la administración de beta glucano, donde "bienestar" incluye la mejora de uno o más de los siguientes aspectos: aumento de peso, eficiencia de conversión de alimento en peso vivo, comportamiento, resistencia a enfermedades, tolerancia al estrés, reducción de las tasas de mortalidad y mejora de la función inmunológica. La fuente de beta glucano es un alga o protista no tóxico y no patógeno de *Euglena gracilis*.

- 20 En ciertos aspectos, se proporciona una composición de pienso para animales para uso en un método para mejorar la función inmunológica de un animal, donde el método incluye administrar al animal una composición que comprende beta glucano, comprendiendo el beta glucano beta-(1,3)-glucano lineal, no ramificado. El beta glucano se deriva de cultivos heterotróficos de *Euglena gracilis*. El beta glucano también puede consistir esencialmente en beta-(1,3)-glucano no ramificado y puede tener un peso molecular promedio de
- 25 aproximadamente 200-500 kDa. El beta glucano comprende más de aproximadamente el 90 % de beta-(1,3)-glucano no ramificado. El beta glucano puede estar en la forma nativa de paramilo, que es un gránulo insoluble en agua, o puede ser soluble en agua. La composición comprende harina de algas, donde la harina de algas incluye el beta glucano. La composición puede incluir además un metal, tal como hierro, magnesio, litio, zinc, cobre, cromo, níquel, cobalto, vanadio, molibdeno, manganeso, selenio, yodo y combinaciones de los mismos.
- 30 El beta glucano y el metal pueden formar un complejo y en una determinada realización comprende un complejo de beta glucano y zinc.

La administración de la composición puede incluir agregar la composición a la dieta o al agua potable del animal. La composición incluye un componente de pienso animal.

- 35 En diversos aspectos, se proporciona una composición de pienso para animales que incluye un beta-(1,3)-glucano lineal, no ramificado y un componente de pienso para animales.

En algunos aspectos, se proporciona una composición que incluye un complejo de un metal y un beta glucano.

- 40 La tecnología actual demuestra que los beta glucanos se pueden producir a bajo coste utilizando un alga o un protista como *Euglena sp.* utilizando métodos de crecimiento controlado. La estructura de estos beta glucanos es diferente de la de los beta glucanos producidos por otros organismos. Una diferencia importante es que mientras otros organismos producen beta glucanos incorporados a su pared celular, el género de protistas conocido como *Euglena* puede producir beta glucano, incluida una forma en partículas de beta glucano, conocida como paramilon, que no se incorpora a la estructura de la pared celular. Más bien, *Euglena* acumula

beta glucano como un gránulo insoluble en agua en el citoplasma y utiliza esta forma de beta glucano como una forma de almacenamiento de energía de carbohidratos.

5 Bajo condiciones de crecimiento optimizadas, es posible lograr concentraciones de beta glucano donde el peso neto de beta glucano es mayor que el 20 % al 80 % de la proporción de peso seco total de la biomasa. Lograr estos niveles de eficiencia productiva puede resultar complicado por el hecho de que el crecimiento de la *Euglena* se logra en condiciones selectivas que compensan las tasas de crecimiento más rápidas de levaduras, hongos y otros microorganismos que pueden estar compitiendo por la misma fuente de carbono que *Euglena*. La tecnología actual proporciona medios para maximizar el crecimiento de *Euglena* mientras se minimiza el crecimiento de microorganismos competidores. Los compuestos de beta glucano producidos por *Euglena* no son iguales a otros productos que se producen utilizando levadura y otros organismos, pero los beta glucanos de *Euglena* son eficaces para mejorar la función inmunológica. Un beneficio adicional es que el coste de producción de beta glucano puede ser entre 1/2 y 1/5 parte del coste de producción de los beta glucanos que se producen con levadura.

15 En otras realizaciones, la presente tecnología incluye una composición que comprende una cantidad efectiva de beta glucano producido por un alga o protista tal como *Euglena*, donde la composición se utiliza para mejorar el bienestar de un animal. Por lo tanto, los aditivos para pienso de beta glucano de menor coste producidos a partir de algas brindan alternativas asequibles y naturales a los antibióticos y otras sustancias que mejoran el sistema inmunológico para uso en animales y que pueden beneficiar la cría de animales, acuicultura e incluso aplicaciones de salud humana.

20 Otras áreas de aplicabilidad se harán evidentes a partir de la descripción proporcionada aquí. La descripción y los ejemplos específicos de este resumen tienen únicamente fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente divulgación.

Dibujos

25 Los dibujos descritos aquí son solo para fines ilustrativos de realizaciones seleccionadas y no de todas las implementaciones posibles, y no pretenden limitar el alcance de la presente divulgación.

La figura 1 muestra representaciones de diversos complejos metálicos orgánicos.

La figura 2 muestra una cadena de beta-1,3 glucano con otras ubicaciones de ramificación indicadas. Paramilo, una forma de beta glucano de *Euglena*, es único porque se compone casi en su totalidad de ramas lineales beta-1,3.

30 La figura 3 ilustra una pared celular de levadura que contiene beta glucano incrustado en la pared celular. A diferencia de *Euglena gracilis*, los procesos de extracción y separación son necesarios para que el beta-1,3;1,6-glucano de la levadura esté completamente biodisponible para los receptores de las células inmunes.

35 La figura 4 ilustra las diferencias de enlace entre las estructuras de ramificación del beta glucano según la fuente del beta glucano. *Euglena* produce beta-1,3 glucanos llamados "Paramilo". Los productos derivados de la levadura consisten en ramificaciones beta-1,3;1,6 que se extraen de las paredes celulares de la levadura. Los beta-1,3; 1,4-glucanos se derivan más comúnmente de avena o cebada y se ha demostrado que reducen el colesterol.

La figura 5 es un esquema de una realización de un proceso de fermentación de acuerdo con la presente tecnología.

40 La figura 6 es un esquema de otra realización de un proceso de fermentación de acuerdo con la presente tecnología.

La figura 7 representa gráficamente la masa en peso seco por litro de *Euglena* y beta glucano cultivado en un medio de control y un medio que tiene un tratamiento complementario de carbono.

45 La figura 8 representa gráficamente el porcentaje de beta glucano por peso seco de *Euglena* cultivados en el medio de control y en el medio que tiene el tratamiento de carbón suplementario.

50 La figura 9 representa gráficamente el índice de fagocitosis de los neutrófilos de ratón extraídos de sangre periférica 48 horas después de haber sido alimentados con paramilo cultivado heterotróficamente. Se compararon productos de beta glucano de levadura comercial, es decir, Fibosel (Trouw Nutrition, Highland, IL) y Macrogard (Orffa Inc., Henderson, NV), con células secas de *Euglena* producidas heterotróficamente (WBG50) y paramilo extraído de dichas células. Las barras representan medias ($\pm$ SE), (n = 3 ratones).

La figura 10 representa gráficamente la actividad de las células asesinas naturales (NK) de las células del bazo recolectadas 48 horas después de haber sido alimentadas con paramilo cultivado heterotróficamente. Se compararon productos de beta glucano de levadura comercial (Fibosel, Macrogard) con levaduras secas

producidas heterotróficamente. Células de *Euglena* (WBG50) y paramilo extraído de las células. Las barras representan medias ($\pm$ SE), ($n = 3$ ratones).

La figura 11 representa gráficamente la formación de IL-2 (citoquina) (mediante ELISA) en ratones 48 horas después de haber sido alimentados con paramilo cultivado heterotróficamente. Se compararon productos de beta glucano de levadura comercial (Fibosel, Macrogard) con células secas de *Euglena* producidas heterotróficamente (WBG50) y paramilo extraído de dichas células. Las barras representan medias ($\pm$ SE), ($n = 3$ ratones).

La figura 12 representa gráficamente la formación de anticuerpos después de la inyección de ovoalbúmina y la dosificación diaria de paramilo cultivado heterotróficamente. Se compararon productos de beta glucano de levadura comercial (Fibosel, Macrogard) con células secas de *Euglena* producidas heterotróficamente (WBG50) y paramilo extraído de dichas células. Las barras representan medias ($\pm$ SE), ($n = 3$ ratones).

La figura 13 representa gráficamente la supervivencia de los ratones después de una inyección de *E. coli* el día 0. Se administraron por sonda por vía oral harina de algas, beta glucano de algas purificado y extracto de beta glucano de levadura Macrogard durante 5 días en una dosis equivalente al 0.01 % de la ración diaria de pienso comenzando 2 días antes de la inyección de *E. coli* (día -2). Al grupo de control con PBS se le administró únicamente una sonda de PBS, mientras que al grupo de tratamiento con antibióticos se le administraron 13 mg/kg de ampicilina por vía oral los días 0 a 4. ($n=10$ ratones por grupo de tratamiento).

La figura 14 representa gráficamente la formación de anticuerpos después de la inyección de ovoalbúmina (día 3 y 16) y la dosificación diaria de tratamientos con beta glucano durante 23 días. Las barras representan medias $\pm$ error estándar. $n = 3$ ratones por grupo de tratamiento.

La figura 15 representa gráficamente la actividad de las células asesinas naturales (NK) de las células del bazo recolectadas el día 14. Las barras representan medias $\pm$ error estándar. $n = 3$ ratones por grupo de tratamiento.

La figura 16 representa gráficamente el índice de fagocitosis de los neutrófilos de ratón extraídos de la sangre periférica el día 14. Las barras representan medias $\pm$ error estándar. $n = 3$ ratones por grupo de tratamiento.

Descripción detallada

La siguiente descripción de tecnología es meramente de ejemplo en cuanto al objeto, fabricación y uso de una o más invenciones, y no pretende limitar el alcance, aplicación o usos de ninguna invención específica reivindicada en esta solicitud o en otras solicitudes que puedan presentarse reclamando prioridad a esta solicitud, o patentes emitidas a partir de ella. Respecto a los métodos descritos, el orden de las etapas presentadas es de carácter de ejemplo y, por lo tanto, el orden de las etapas puede ser diferente en diversas realizaciones. Salvo en los ejemplos, o cuando se indique expresamente lo contrario, todas las cantidades numéricas en esta descripción que indiquen cantidades de material o condiciones de reacción y/o uso deben entenderse modificadas por la palabra "aproximadamente" al describir el alcance más amplio de la tecnología.

La presente tecnología se relaciona con beta glucano derivado de *Euglena*, y usos del mismo. Composiciones que contienen beta-1,3-glucano lineal derivado de *Euglena* se puede administrar por vía oral para promover la salud del sistema inmunológico, prevenir enfermedades, reducir la mortalidad, reducir los efectos del estrés, aumentar las tasas de crecimiento o mejorar la eficiencia de conversión de pienso en los animales. Se pueden tratar diversos animales criados comercialmente, como mamíferos, peces, aves y crustáceos. Las dosificaciones o tasas de inclusión en el pienso pueden variar dependiendo de la especie animal a la que se le administra el beta glucano. El beta-1,3-glucano constituye menos del 1 % del pienso total. Los animales también pueden ser tratados en cualquier etapa de su vida, aunque los animales que se crían con fines reproductivos suelen considerarse más valiosos y, por lo tanto, puede considerarse más económico tratarlos. La presente tecnología pretende incluir composiciones, el uso de las composiciones y diversos métodos como se describe en este documento para mejorar el bienestar de los animales. Los métodos utilizados para preparar dichas composiciones también se incluyen en la presente tecnología.

Estructura de ramificación de carbohidratos

Con referencia a las Figs. 2, 3 y 4 se muestran aspectos de diversos beta glucanos de diversas fuentes. El beta glucano producido por los euglenoides es único en sus características físicas y a menudo se lo denomina "paramilo". El paramilo consiste en un polímero lineal que es casi exclusivamente beta-1,3 glucano con muy pocas ramificaciones laterales. Esta estructura difiere significativamente de los beta glucanos derivados de la levadura que se han estudiado más intensivamente y se han comercializado para aplicaciones de apoyo inmunológico. Los beta glucanos de levadura contienen un esqueleto principal de beta-1,3 glucano que se sustituye por cadenas laterales beta-1,6 (de 2-3 unidades de glucosa de largo) cada 10-30 unidades de glucosa. La naturaleza no ramificada del paramilo es una distinción importante en comparación con otras fuentes de beta glucanos cuando se considera su uso en aplicaciones de apoyo inmunológico.

Después de aislar el paramilo de células *Euglena* completas, se realizó un análisis de enlace para determinar las cantidades relativas de cada tipo de enlace entre monómeros de glucosa. Para el análisis de enlace de glicosilo, la muestra fue permetilada, despolimerizada, reducida y acetilada; y los acetatos de alditol parcialmente metilados (PMAA) resultantes se analizaron mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) como se describe en York et al. (1985) Methods Enzymol. 118:3-40. Inicialmente, la muestra seca se suspendió en aproximadamente 300 µl de dimetilsulfóxido y se colocó en un agitador magnético durante 1-2 semanas. Luego la muestra fue permetilada mediante el método de Ciukanu and Kerek (1984) Carbohydr. Res. 131:209-217 (tratamiento con hidróxido de sodio y yoduro de metilo en DMSO seco). La muestra se sometió a la base de NaOH durante 10 minutos, luego se agregó yoduro de metilo y se dejó durante 40 minutos. Luego se añadió la base durante 10 minutos y finalmente se añadió más yoduro de metilo durante 40 minutos. Esta adición de más yoduro de metilo y base NaOH fue para asegurar la metilación completa del polímero. Después del procesamiento de la muestra, el material permetilado se hidrolizó utilizando ácido trifluoroacético 2 M (2 horas en un tubo sellado a 121 ° C), reducido con NaBD₄ y acetilado utilizando ácido anhídrido acético/trifluoroacético. Los PMAA resultantes se analizaron en un GC Hewlett Packard 5975C conectado por interfaz a un 7890A MSD (detector selectivo de masas, modo de ionización por impacto de electrones); la separación se realizó en una columna capilar de sílice fundida en fase enlazada Supelco 2330 de 30 m.

Tabla 2. Análisis de enlace de 2 muestras de paramilon extraídas de *Euglena gracilis*.

RESIDUO DE GLICÓSILO	Muestra 1	Muestra 2
residuo de glucopiranosilo con enlace terminal (t-glc)	0.34	0.3
Residuo de glucopiranosilo con enlace en 3 (3-glc)	93.03	94.1
Residuo de glucopiranosilo con enlace en 4 (4-glc)	2.25	2.4
Residuo de glucopiranosilo con enlace en 2,3 (2,3-glc)	3.47	2.3
Residuo de glucopiranosilo con enlace en 3,6 (3,6-glc)	0.36	0.8
Residuo de glucopiranosilo con enlace en 2,3,4 (2,3,4-glc)	0.55	0.1
Total	100.0	100.0

Este análisis de enlace indica que ambas muestras de paramilo están compuestas principalmente por residuos de glucopiranosilo con enlace en 3. Por ejemplo, el beta glucano puede ser más de aproximadamente el 90 % de beta-(1,3)-glucano no ramificado, y en algunos casos puede ser más de aproximadamente el 93 % de beta-(1,3)-glucano no ramificado o más de aproximadamente el 94 % de beta-(1,3)-glucano no ramificado. Se encontraron cantidades menores de residuos de glucopiranosilo con enlace en 4 y enlace en 2,3, junto con cantidades insignificantes de residuos de glucopiranosilo enlace en 3,6, terminales y enlace en 2,3,4. Estos datos confirman que el paramilo está compuesto principalmente de un beta 1,3 glucano lineal y no ramificado. De acuerdo con varios estudios, el beta-1,3 glucano es la forma de beta glucano que realmente se enlaza a los receptores en la superficie de las células del sistema inmune, como Dectina-1 (un receptor importante en las células del sistema inmune como los macrófagos) y el receptor del complemento 3. Tras la absorción de paramilo en partículas y su digestión en fragmentos más pequeños por los macrófagos, la alta proporción de beta-1,3 glucano en el paramilo en relación con los beta glucanos derivados de la levadura puede resultar en una mejor modulación del sistema inmunológico. Por ejemplo, la activación del sistema inmunológico puede mejorarse con dosis crecientes de paramilo, mientras que la eficacia puede disminuir con dosis más altas de beta-glucanos con base de levadura, posiblemente debido a la presencia de cadenas laterales beta-1,6 que interfieren estereométricamente entre sí y dificultan el acceso al receptor Dectina-1.

Estructura tridimensional

La estructura tridimensional y el plegamiento del beta-1,3-glucano pueden afectar la biodisponibilidad, área de superficie y eficacia general en aplicaciones de estimulación inmunológica. En las cadenas lineales de beta-1,3-glucano, la estructura está gobernada por el patrón de enlace glucosídico. Debido a que el anillo en forma de silla del glucopiranosilo es bastante rígido, la mayor parte de la flexibilidad de la cadena de glucano surge de las rotaciones alrededor de los enlaces de los enlaces glucosídicos. Las técnicas de cristalografía y espectroscopia de rayos X indican que los glucanos lineales tienen una esqueleto principal de triple hélice en estado sólido. El paramilo que es producido por *Euglena* es considerado como uno de los beta glucanos estructuralmente más simples, con pocas cadenas laterales de glicosilo. Esto está en contraste directo con el laminarano, lentinano, escleroglucano, esquizopilano y los beta glucanos derivados de levadura que tienen cadenas laterales con enlace en 1,4 o en 1,6 expuestas hacia el exterior de la estructura helicoidal.

La estructura de triple hélice del beta-1,3-glucano lineal está estabilizada por tres tipos de enlaces de hidrógeno:

1. Enlace de hidrógeno intermolecular formado entre las diferentes cadenas en el mismo plano x-y;
2. Enlace de hidrógeno intramolecular formado entre átomos de O adyacentes en la misma cadena; y
3. Enlace de hidrógeno intermolecular formado entre diferentes cadenas en un plano x-y diferente.

- 5 La estructura de triple hélice es estable en un amplio intervalo de temperaturas a un pH neutro, lo que da como resultado un polímero insoluble en agua. Sin embargo, los enlaces de hidrógeno pueden desestabilizarse por diversos medios para cambiar la conformación del polímero de paramilo. Por ejemplo, el paramilo se puede disolver en soluciones alcalinas (normalmente NaOH 0.2 M o más), disolventes polares apróticos como DMSO, en presencia de agentes caotrópicos fuertes (por ejemplo, urea) o aumentando las temperaturas por encima de las temperaturas de fusión de la triple hélice (~135 ° C). Se pueden obtener diferentes efectos inmunológicos que están relacionados con la conformación del beta-1,3-glucano, ya sea el estado nativo, desnaturalizado o desnaturalizado y renaturalizado. El beta-1,3-glucano en cualquiera de estas tres conformaciones puede servir como bloque de construcción para reacciones adicionales que agregan o mejoran su funcionalidad. Aquí se analizan varias de estas modificaciones para producir beta-1,3-glucanos funcionalizados y algunas de sus respectivas aplicaciones. La conformación del beta glucano y su solubilidad resultante también pueden afectar la forma en que se administra; por ejemplo, el beta-1,3-glucano soluble en agua se puede inyectar directamente, mientras que el beta glucano en partículas es más adecuado para la administración oral.

Tamaño de partícula. Peso molecular y área de superficie

- 20 El tamaño de partícula, peso molecular y superficie son todos factores que afectan la función y biodisponibilidad de la partícula de beta-1,3-glucano. En general, puede ser preferible tener una partícula de beta-1,3-glucano entre 0.2 y 5 micrones de diámetro con una gran área de superficie para maximizar las interacciones con las células inmunes. Después de la absorción en el tejido linfoide asociado al intestino (GALT) o después de la inyección, la partícula de beta-1,3-glucano es ingerida y escindida por células macrófagos. El tamaño de las células de los macrófagos varía entre especies. Por ejemplo, los diámetros de los macrófagos alveolares de hámster y rata promedian aproximadamente 13.6 y 13.1 micrones, respectivamente, mientras que los macrófagos de los monos promedian 15.3 micrones y los macrófagos de los humanos promedian 21.2 micrones. El tamaño de partícula de la molécula de beta-1,3-glucano debe ser el tamaño apropiado para maximizar la captación en el GALT y también en los macrófagos. El tamaño de partícula ideal puede variar entre especies. Las células de macrófagos pueden variar de tamaño entre diferentes organismos, lo que puede explicar una parte de la variabilidad entre los tamaños óptimos de partículas de beta-1,3-glucano.

Se sabe que el peso molecular de una sustancia beta glucano afecta la eficacia del compuesto en aplicaciones de estimulación inmunológica. Los beta-1,3-glucanos producidos por euglenoides normalmente pueden tener un peso molecular de aproximadamente 200-500 kDa.

Tabla 3. Fuentes de beta glucanos, estructuras y pesos moleculares aproximados.

Nombre	Fuente	Solubilidad de la forma nativa	Estructura	Peso molecular (kDa)
Glucano de euglenoides	Algas	En partículas	β -(1,3) no ramificado	200-500
Glucano de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levadura	En partículas	β -(1,3) β -(1,6) ramificado (30:1)	200
Curdian	Bacterias gram negativas	En partículas	β -(1,3) no ramificado	50-200
Laminarin	Algas marinas pardas	Soluble	β -(1,3) con alguna ramificación β -(1,6) (30:1). Las cadenas laterales β -(1,6) están compuestas por dos unidades de glucosa.	7.7
Escleroglucano	Hongo	Soluble	β -(1,3) β -(1,6) ramificado (6:1). Las cadenas laterales β -(1,6) están compuestas por dos unidades de glucosa.	1020

Nivel de pureza del beta-1,3-glucano

Se ha determinado que el nivel de pureza de un compuesto de beta glucano tiene un efecto sobre la eficacia, posiblemente debido a otro material presente que inhibe la interacción entre el beta glucano y las células inmunes. Utilizando los métodos descritos aquí, el paramilo se puede aislar fácilmente en forma de gránulos a partir de células euglenoides. Como resultado, la pureza del paramilo es muy alta en relación con las preparaciones comunes de beta glucanos de levadura y otros organismos. Utilizando los métodos aquí descritos, se pueden obtener niveles de pureza superiores al 98 % (medidos mediante un ensayo enzimático que detecta beta glucano, Megazyme). En comparación, los beta glucanos derivados de levadura de mayor calidad rara vez pueden alcanzar una pureza superior al 90 % y varios productos comerciales en la industria de alimentos para animales especifican solo una pureza de aproximadamente 35-60 %. Además, se puede lograr un beta-1,3-glucano de alta pureza de manera más rentable que con los glucanos derivados de la levadura debido a la facilidad de separación resultante de la falta de una pared celular en los euglenoides y la fácil recuperación de los gránulos de paramilo. Finalmente, dado que no se requieren productos químicos agresivos (por ejemplo, ácidos y bases fuertes) para recuperar los gránulos de paramilo, el beta glucano se puede recuperar en su forma nativa sin modificar su composición química y configuración. En algunos casos, el uso de paramilo puro y sin modificar puede ser ventajoso en comparación con el paramilo solubilizado y modificado o los beta glucanos obtenidos de otros organismos que se modifican durante el proceso de extracción.

Método para la producción de paramilo en *Euglena gracilis*

La *Euglena sp.* puede cultivarse en un ambiente controlado, de modo que *Euglena* seguirá siendo el microorganismo dominante en el medio ambiente. Esto no es fácil de lograr, ya que otros organismos normalmente son capaces de competir por los mismos recursos biológicos (por ejemplo, nutrientes, micronutrientes, minerales, energía orgánica y/o luz). Muchos de estos microorganismos suelen tener una tasa de crecimiento más rápida y son capaces de dejar fuera de competencia a *Euglena* ausente de varios mecanismos de crecimiento controlado que favorezcan a *Euglena sp.* Estos mecanismos de crecimiento pueden incluir uno o más métodos, como el empleo de medios de crecimiento que favorezcan a *Euglena*, funcionamiento a una temperatura que favorezca a *Euglena*, adición de ácidos y bases que favorecen a *Euglena*, adición de compuestos que son tóxicos para organismos competidores distintos de *Euglena*, filtración selectiva o separación de *Euglena*, y la adición de microdepredadores o virus que controlan las poblaciones de organismos que no son *Euglena*. Todos estos métodos afectan la tasa de crecimiento y la capacidad de *Euglena* para convertir energía en beta glucano.

Para lograr una población suficiente de algas o protistas, el organismo también se puede cultivar en grandes recipientes de fermentación aeróbica que son similares a los recipientes utilizados para cultivar levadura. En algunas realizaciones, estos recipientes pueden ser recipientes de grado no farmacéutico utilizados en la producción comercial de lisina u otros aminoácidos o proteínas utilizando *Saccharomyces sp.*, *Eschericia coli*, u otros microorganismos.

La conversión de energía en beta glucano biodisponible puede mejorarse mediante la adición de una fuente de carbono orgánico a los medios de cultivo para *Euglena*, mediante la adición selectiva de luz o mediante ambos. Nuevamente, estos aspectos afectan la capacidad de *Euglena* para competir con otros organismos. En general, la *Euglena* que se cultiva en un entorno no controlado no mostrará las mismas propiedades beneficiosas de alta concentración de beta glucano, tasas de crecimiento rápidas y producción eficiente de beta glucanos que mostrará la *Euglena* producida en un entorno de crecimiento más controlado.

El cultivo de altas concentraciones de *Euglena* que contiene beta glucano reduce el coste de producción de beta glucano de varias maneras, incluidas las siguientes. En primer lugar, los compuestos que contienen beta glucano no están contenidos en la pared celular de los organismos y no requieren métodos de fraccionamiento ni procesos de extracción elaborados y/o costosos. En segundo lugar, los organismos de *Euglena* son relativamente grandes y pueden separarse del agua con relativa rapidez mediante una centrifuga, un filtro u otro dispositivo de separación. En tercer lugar, las células individuales de *Euglena* están compuestas de un mayor porcentaje de beta glucano (como porcentaje de la masa celular total) en comparación con otros organismos, lo que resulta en altas tasas de conversión de azúcares orgánicos en beta glucano y una recuperación más fácil del beta glucano. Cuarto, *Euglena* es capaz de metabolismos heterotróficos y fotosintéticos y, por lo tanto, pueden convertir energía libre, en forma de luz, en valiosos beta glucanos. En quinto lugar, los beta glucanos producidos a partir de *Euglena* no son totalmente idénticos a otros beta glucanos. Sin embargo, en algunas realizaciones, los beta glucanos derivados de *Euglena* se pueden utilizar en combinación con otros beta glucanos (por ejemplo, beta glucanos derivados de levadura) para proporcionar propiedades de modulación inmunitaria.

Los beta glucanos de *Euglena* no se han estudiado tan a fondo como los de la levadura. La medida en que los beta glucanos derivados de *Euglena* modulan el sistema inmunológico puede compararse con los beta

glucanos derivados de la levadura. Experimentos comparando los beta glucanos derivados de *Euglena* y los beta glucanos derivados de levadura se describen en los Ejemplos contenidos aquí.

En su estado nativo, los glucanos derivados de la levadura están presentes en composiciones de menor pureza y también están enlazados a la pared celular a otras moléculas que pueden tener un efecto estimulante o inhibidor. Los beta glucanos derivados de la levadura también contienen ramificaciones 1,3;1,6 que no están presentes en glucanos derivados de *Euglena*. Debido a que los beta glucanos derivados de levadura requieren extracción, es probable que la extracción pueda resultar en modificaciones adicionales a la estructura tridimensional de los beta glucanos, como por ejemplo escindiendo porciones de los beta glucanos o enrollando o desenrollando espirales helicoidales u otras estructuras.

Los beta glucanos de diferentes fuentes pueden variar en términos de estructura de esqueleto principal, enlaces de ramificación, frecuencia y longitud, peso molecular y otras características. La investigación presentada en la Conferencia del Instituto Nacional del Cáncer demostró que incluso ligeras variaciones en estas características pueden afectar la bioactividad (consulte el documento en línea disponible en: www.immunehealthbasics.com/GlucanStructureNR.html). Por ejemplo, en un estudio antitumoral *in vivo*, se combinaron beta-1,3;1,6-glucanos de tres fuentes separadas con estructuras primarias similares con un anticuerpo monoclonal en un modelo de linfoma.

Una forma de beta glucano que está disponible comercialmente es WellMune™ (Biothera Corporation, Eagan, Minnesota), que se deriva de la levadura. Otra forma de beta-glucano también producida con levadura está disponible en BioTec Pharmacon (Noruega), comercializada como Macrogard por Immunocorp (Noruega).

Extracción de Beta Glucanos de *Euglena gracilis*

El beta glucano se puede extraer de las algas o células protistas mediante una separación líquido-sólido, un método de separación física u otro método. El compuesto beta glucano purificado resultante puede sufrir reacciones adicionales para mejorar la afinidad de enlace o para alterar la afinidad de enlace para un propósito específico. Por ejemplo, los polisacáridos sulfatados han demostrado ser eficaces en el tratamiento del VIH (Damonte, Elsa B, Matulewicz, Maria C, Cerezo, Alberto S; Current Medial Chemistry; 2004). Los beta glucanos sulfatados procedentes de algas o de fuentes protistas pueden demostrar una eficacia similar. Otros procesos que pueden utilizarse para alterar la estructura del compuesto beta glucano con el fin de aumentar o alterar la eficacia de la estimulación del sistema inmunológico son fosforilación, acetilación y animación.

Método de administración oral

Los beta glucanos de *Euglena* también puede añadirse a la dieta de los animales después del aislamiento de las células de *Euglena*. Procedimientos sencillos para lisar las células de *Euglena* y concentrar el beta glucano pueden lograr un producto que puede superar el 75 % de pureza de beta glucano. Este producto aislado tiene el beneficio de ser más concentrado, tener menor contenido de proteína para reducir las reacciones alérgicas y también permite una vida útil más larga. Este producto aislado se puede incorporar a las dietas de los animales para lograr una dosificación objetivo de beta glucano o, en el caso de diversas aplicaciones de acuicultura, el beta glucano se puede agregar al agua directamente en forma de partículas o pellas de pienso donde es ingerido por la especie de acuicultura objetivo.

En algunas realizaciones, la presente tecnología puede estimular una respuesta de macrófagos utilizando beta glucanos derivados de *Euglena*. Se sabe que la estimulación de la respuesta de los macrófagos activa una vía de citoquinas que promueve una mayor actividad del sistema inmunológico general. Una respuesta de este tipo puede ser deseable para la prevención de infecciones, tratamiento de tumores y cánceres, o para apoyar un sistema inmunológico comprometido, como sería de esperar en un síndrome de inmunodeficiencia, un paciente sometido a cirugía o quimioterapia, o un paciente con quemaduras graves. Los beta glucanos pueden administrarse por vía oral, inyectados, mediante un aspersor nasal o como ungüento o crema tópica. El beta glucano se puede administrar de forma continua o durante momentos específicos en los que el sistema inmunitario puede verse comprometido, como cuando un organismo es joven, está estresado o está a punto de someterse a una cirugía u otra operación. Un período de estrés puede ocurrir durante una transferencia a un nuevo entorno, la inclusión en una población de organismos más grande o nueva, o cuando un organismo está a punto de someterse a algo que podría suponer un desafío para su sistema inmunológico.

Composiciones de piensos:

Las composiciones de los piensos suelen variar entre especies. También se administran diferentes composiciones de pienso a las mismas especies para diferentes propósitos y en diferentes etapas de la vida.

Dosificación:

La cantidad de beta glucano que se debe agregar como suplemento para pienso puede oscilar entre 0.001 % y 1 % de la masa total del pienso, medida mediante análisis de peso seco.

Tabla 4. Ejemplos de porcentajes de dosificación de beta glucano (BG).

	Bajo	Preferido	Alto
Porcentaje de pienso (% de pienso diario que es BG)	0.01 %	0.10 %	1 %
Consumo diario de alimentos, como % de la masa corporal	0.50 %	2.00 %	5 %
Consumo diario de BG, como % de la masa corporal	0.00005 %	0.00200 %	0.0500 %

Los niveles de dosificación exactos de beta glucanos derivados de algas o protistas en la composición de un alimento animal pueden depender del porcentaje y eficacia del beta glucano, el organismo y el programa de dosificación.

Un ejemplo de una aplicación para pienso para animales es alimentar beta-glucano derivado de *Euglena* a cerdos. En este ejemplo, *Euglena gracilis* puede cultivarse heterotróficamente en un entorno controlado (mediante la manipulación de la fuente de carbono, niveles de nutrientes, pH, temperatura y otros factores), centrifugarse o filtrarse para eliminarlo del agua y secarse. Las condiciones exactas de crecimiento, así como factores adicionales como la luz y la adición o eliminación de moléculas pueden afectar la composición final del beta glucano, estructura y abundancia relativa (en masa). La harina de algas resultante se puede mezclar directamente en una composición de alimento animal para alimentar a los cerdos. El suplemento de beta glucano puede incorporarse a la composición del pienso y administrarse a los cerdos varias veces al día, diariamente o con menor frecuencia.

Como se describe, *Euglena gracilis* que se cultiva de forma heterotrófica se puede añadir a la composición del pienso para cerdos. Cuando se dosifica adecuadamente y se administra de acuerdo con un cronograma apropiado, esto puede tener un efecto beneficioso en el bienestar general del animal, como se puede medir por mayores tasas de supervivencia, mayores tasas de crecimiento y mayor eficiencia de conversión de pienso. Alternativamente, los efectos sobre el sistema inmunológico pueden medirse directamente midiendo factores indicadores como ADG, ADFI, G:F, el índice de proliferación de linfocitos, niveles de citoquinas, niveles de cortisol, factor de necrosis tumoral alfa o IL-10. En un experimento controlado, la adición de harina de algas o protistas que contenga β -1,3 glucanos activos puede demostrar diferencias estadísticamente significativas en uno o más de estos factores entre los grupos de control o experimentales. En los ejemplos proporcionados aquí se encuentran experimentos que ilustran dichas mediciones. La adición de *Euglena gracilis* a la composición del alimento animal en los niveles de dosificación correctos puede afectar a estos indicadores bioquímicos y proporcionar un efecto beneficioso sobre el bienestar del organismo.

Otras aplicaciones incluyen agregar el beta glucano derivado de *Euglena* a una composición de pienso que se administra a aves de corral, vacas, peces, camarones, caballos, perros, gatos, reptiles, pájaros y otros animales, incluidos animales valiosos o exóticos que se mantienen en zoológicos o acuarios.

Ejemplos de combinaciones de ingredientes para aplicaciones seleccionadas:

Cuando se combina con pienso para animales, el beta glucano derivado de *Euglena* se puede combinar en una variedad de niveles de dosificación, pero generalmente este nivel puede estar entre 1:10,000 y 1:500 en peso seco. Las combinaciones específicas de ingredientes pueden diferir entre organismos, etapas de vida y resultados deseados. Además, los beta glucanos derivados de *Euglena* se pueden combinar con otros ingredientes inmunoestimulantes para proporcionar los máximos beneficios de estimulación inmunológica. A continuación, se enumeran ejemplos de combinaciones de ingredientes para aplicaciones en aves de corral, cerdos y caninos. Los derivados de algas o de protistas se pueden combinar con cualquier combinación de (pero no limitado a) estos ingredientes para elaborar un producto de pienso animal.

Hay muchos ingredientes para piensos para animales que también pueden beneficiarse de la combinación con beta glucano. Los componentes comunes de los piensos para animales, por ejemplo, pueden incluir uno o más de los siguientes ingredientes: harina de maíz, harina de soja descascarada, salvado de trigo, piedra caliza, fosfato monocalcico-dicálcico, sal, óxido manganoso, sulfato de manganeso, óxido de zinc, sulfato ferroso, sulfato de cobre, carbonato de cobalto, yodato de calcio, selenito de sodio, vitamina A, vitamina D, vitamina E, complejo de bisulfato sódico de menadioano (fuente de complejo de vitamina K), suplemento de riboflavina, suplemento de niacina, pantotenato de calcio, vitamina B12, d-biotina, mononitrato de tiamina, clorhidrato de piridoxina, ácido fólico, metionina, aceite de soja, aceite mineral, aminoácidos, pollo, calcio, fósforo, condroitina, glucosamina, Omega 3 y Omega 6, pulpa de remolacha, DHA (de aceite de pescado), betacaroteno, harina de pescado, mezcla de vitaminas, ácido alfa-linoléico, aminoácidos, ácido araquidónico, ácido ascórbico, carne de res, biotina, levadura de cerveza (seca), carbonato de calcio, celulosa, minerales quelados, sulfato de condroitina, cobalto, cobre, harina de maíz, aceite de maíz, fosfato dicálcico, DL-metionina, ácido docosahexaenoico, producto de huevo seco, harina de trigo duro, etoxiquina, grasa, carbohidratos, sulfato ferroso, fibra, harina de pescado, aceite de pescado, harina de lino, ácido fólico, fructooligosacáridos, gelatina,

clorhidrato de glucosamina, glicerina, cebada molida, maíz molido, sorgo molido, goma guar, inositol, yodo, hierro, canguro, cordero, 1-carnitina, ácido linoleico, luteína, magnesio, óxido de magnesio, manganeso, extracto de caléndula, mananoligosacáridos, minerales, tocoferoles mixtos, fosfato monosódico, niacina, extracto de caléndula, arándanos, algas secas, fósforo, potasio, cloruro de potasio, potasio yoduro, sorbato de potasio, proteína, clorhidrato de piridoxina, riboflavina, arroz, harina de arroz, romero, extracto de romero, almidón de tapioca, taurina, mononitrato de tiamina, dióxido de titanio, vitamina A, vitamina B-1, vitamina B12, vitamina B-2, vitamina B-6, vitamina C, vitamina D3, vitamina E, vitamina K, agua, trigo, gluten de trigo, goma xantana, zinc, óxido de zinc, sulfato de zinc, cualquiera de los ingredientes actualmente enumerados por la Association of American Feed Control Officials, y combinaciones de los mismos.

10 Ingredientes adicionales para mejorar la actividad del sistema inmunológico:

Los siguientes ingredientes están relacionados con el rendimiento mejorado del sistema inmunológico y se pueden combinar con beta glucanos derivados de *Euglena* o harina para lograr los efectos de una mejor actividad del sistema inmunológico: vitamina C, alfalfa, semilla de lino, perejil, arándanos, espirulina, clorella, vitamina A, vitamina E, cobre, zinc, cromo, hierro, arginina, alquil glicerol, coenzima Q10, dimetilglicina, fitonutrientes, beta caroteno, aceites esenciales, aceites de pescado, especias y sus derivados, y combinaciones de los mismos.

Los ingredientes anteriores pueden usarse en diversas aplicaciones y para alimentar diversos organismos. Por ejemplo, los ingredientes enumerados aquí como componentes de pienso para animales también pueden combinarse con beta glucanos derivados de algas o protistas para aplicaciones de pienso para perros, gatos, aves de corral, acuicultura y otras. Además de los beneficios de estimulación inmunológica de los beta glucanos derivados de *Euglena*, se puede incorporar biomasa de algas adicional. En particular, *Euglena gracilis* u otra especie se puede cultivar de manera que también se agreguen a la composición del pienso concentraciones relativamente altas de DHA valioso, ácido graso Omega 3, ácido graso Omega 6 y tocoferoles.

Composiciones adicionales

Aunque el beta glucano puede ser beneficioso cuando se incluye con uno o más ingredientes del pienso, puede haber ciertos efectos sinérgicos cuando el beta glucano se administra en combinación con una o más sustancias adicionales. Por ejemplo, el beta glucano se puede administrar en combinación con probióticos como *Bacillus licheniformis* o *Bacillus subtilis* para proporcionar un efecto sinérgico. En esta realización, la sobrerregulación del sistema inmunológico puede ayudar al cuerpo a combatir de manera natural los patógenos invasivos, mientras que los probióticos mantienen una flora intestinal saludable que es más estable a revertirse. El beta glucano que se administra en combinación con otros tipos de fibras no digestibles (por ejemplo, prebióticos) también puede exhibir un efecto sinérgico. Los ejemplos de prebióticos que pueden combinarse beneficiosamente con beta glucano incluyen, pero no se limitan a, fructooligosacáridos (FOS), lactulosa y manano oligosacáridos (MOS). Los prebióticos combinados con beta glucano pueden derivarse de levaduras, microalgas, granos, algas marinas, otras plantas terrestres y otras fuentes. Otras sustancias que pueden ser beneficiosas en combinación con beta glucano incluyen vitamina C, vitamina E (específicamente RRR alfa tocoferol), carotenoides (astaxantina, betacaroteno, luteína, zeaxantina), ácidos grasos DHA o EPA, metales traza (hierro, magnesio, litio, zinc, cobre, cromo, níquel, cobalto, vanadio, molibdeno, manganeso, selenio, yodo), halquinol, ME Detoxizyme, vitamina D3, ácido ascórbico y minerales dietéticos (calcio, fósforo, potasio, azufre, sodio, cloro, magnesio, boro, cromo). El beta glucano también puede administrarse en combinación con otras enzimas, lo que puede mejorar la biodisponibilidad o digestibilidad de una o más fuentes de nutrientes en el pienso. En algunos casos, se puede proporcionar beta glucanasa como enzima en el alimento para escindir el beta glucano en fragmentos más pequeños y más digeribles o para liberar el metal de un complejo metálico de beta glucano. En algunas realizaciones, una o más de estas sustancias adicionales se pueden incluir en la harina de algas residuales, que se puede cultivar con la intención de aumentar la concentración de las sustancias sinérgicas.

Se pueden combinar otros ingredientes con beta glucano y las diversas composiciones de beta glucano descritas aquí. Estos incluyen un modulador inmunológico adicional, reductor del estrés u otro ingrediente estimulante seleccionado del grupo que consiste en alfa tocoferol, colecalciferol, zinc, cromo, selenio, arginina, ácido ascórbico, alquilglicerol, cafeína, kava kava, *Curcuma longa*, espirulina, D-glucarato de calcio, coenzima Q10, péptidos, dimetoglicina, ácido docosahexaenoico, ácido ecosapentaenoico, ácido alfa-lineolénico, astaxantina, betacaroteno, luteína, probióticos de lactobacillus, probióticos de bifidobacterium, mananoligosacárido, fructooligosacáridos, astrágalo, equinácea, Esberitox, ajo, glutatión, algas marinas, L-arginina, L-ornitina, gránulos de lecitina, extractos de hongos maiitake, reishi o shiitake, manganeso, quercetina, bromelina, hoja de olivo, Sambucus, Umcka, ácido pantoténico, quercetina, ácido alfa lipoico, aceites esenciales, aceites de pescado, especias y sus derivados, pterostilbeno y combinaciones de los mismos.

Complejos con metales traza

En algunas realizaciones, el beta glucano puede formar complejos con un metal traza para crear un complejo que se pueda utilizar simultáneamente para mejorar la biodisponibilidad del metal traza y, al mismo tiempo, promover la actividad general del sistema inmunológico. Los metales traza incluyen cobre, zinc, hierro, cobalto, magnesio, molibdeno, manganeso y combinaciones de los mismos. El complejo de beta glucano y metal traza puede ser el resultado de la formación de complejos de una sal de metal traza inorgánica soluble con un beta glucano en solución.

El polisacárido beta glucano puede comprender una forma biodisponible de beta glucano, como los gránulos de paramilo que están presentes en una suspensión de algas de células enteras secas o húmedas. El polisacárido puede estar compuesto por una suspensión o pasta de *Euglena gracilis* que ha sido cultivado heterotróficamente en uno o más biorreactores estériles. *Euglena* se cultiva de manera óptima de modo que la porción de beta glucano del producto de algas comprenda más del 20 % de la biomasa de algas, medida en base al peso seco. En las figs. 5 y 6 se ilustran ejemplos de procesos para el cultivo y creación de dichos productos.

Con referencia a la Fig. 5, se muestra una realización de un proceso de fermentación. La biomasa de algas se produce en un fermentador (1) bajo condiciones estériles en medios químicamente definidos. Después del tiempo deseado en el fermentador (1), el caldo del fermentador se transfiere a una centrífuga (2) que deshidrata el caldo para producir dos corrientes de proceso: una harina de algas húmeda que contiene aproximadamente un 75 % de humedad; y medios usados. La harina de algas húmeda contiene una mezcla de células de algas enteras, fragmentos de células de algas y gránulos de polisacáridos. La harina de algas húmeda puede ser una solución de polisacárido que contiene más del 50 % en peso seco de beta glucano, un polisacárido no digestible. La harina de algas húmeda se transfiere a un mezclador (3), como un tanque de mezcla o cualquier pieza del equipo capaz de mezclar (por ejemplo, una mezcladora de cinta). Opcionalmente, el pH de la solución de polisacárido se puede ajustar mediante la adición de ácido o base (A).

Una solución concentrada de una sal metálica soluble (B), como $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, se puede agregar al mezclador (3) y mezclar vigorosamente con la solución de polisacárido durante 1-120 minutos. Se puede utilizar cualquier sal metálica soluble en agua (B). Por ejemplo, la sal metálica (B) se puede mezclar con el beta glucano de modo que el producto final puede ser un complejo de polisacárido de cobre, un complejo de polisacárido de zinc, un complejo de polisacárido de hierro, un complejo de polisacárido de cobalto, un complejo de polisacárido de magnesio, un complejo de polisacárido de manganeso y combinaciones de los mismos. La preparación de la solución (B) de sal metálica soluble puede implicar calentar una mezcla de la sal metálica (B) en agua mientras se mezcla. Opcionalmente este mezclador (3) puede ser calentado o enfriado. Opcionalmente, el mezclador (3) puede calentarse a la temperatura requerida para pasteurizar el material e inactivar la actividad enzimática. Cuando la solución de polisacárido y la solución de sal metálica (B) se mezclan, se producirá cierta cantidad de formación de complejos entre los iones metálicos y los polisacáridos presentes en la harina de algas húmeda, de modo que el producto final puede considerarse un complejo de polisacárido metálico.

Después de alcanzar la cantidad deseada de mezcla, la mezcla se transfiere a un deshidratador (4), que es cualquier dispositivo capaz de secar el material. Por ejemplo, el deshidratador (4) puede ser un secador de bandejas, un secador de banda, un secador de tambor rotatorio, etc. Una vez que el material contiene menos del 10 % de humedad, se transfiere a un molino (5) donde su tamaño de partícula se reduce a menos de 500 μm . Más preferiblemente, su tamaño de partícula se reduce a menos de 250 μm . Una vez molido el material se envasa (6) en contenedores de tamaño adecuado y se etiquetan. Opcionalmente, se puede omitir la adición de la solución de sal metálica (B) a la harina de algas húmeda y el producto resultante será harina de algas.

Con referencia a la Fig. 6, se muestra otra realización de un proceso de fermentación. La biomasa de algas se produce en un fermentador (7) bajo condiciones estériles en medios químicamente definidos. Opcionalmente, la biomasa de algas se puede producir en un tanque de crecimiento bajo condiciones no estériles utilizando cualquier medio que contenga únicamente materiales aptos para pienso animal y que esté libre de sustancias nocivas (por ejemplo, metales pesados, toxinas y productos químicos peligrosos). Después del tiempo deseado en el fermentador o tanque de crecimiento (7), el caldo del fermentador se transfiere a un mezclador (8), como un tanque de mezcla o cualquier pieza del equipo capaz de proporcionar mezclado (por ejemplo, mezclador de cinta). El caldo del fermentador contiene una mezcla de células enteras de algas, fragmentos de células de algas y gránulos de polisacáridos. En el caso de un tanque de crecimiento no estéril, también pueden estar presentes niveles bajos de biomasa no proveniente de algas. Opcionalmente, el pH del caldo de fermentación se ajusta mediante la adición de productos químicos (C) ácidos o básicos al mezclador (8) para lisar las células, liberando así la mayoría de los gránulos de polisacáridos del interior de las células. Esto se puede lograr agregando una base (por ejemplo, NaOH) al caldo del fermentador. Opcionalmente, el caldo también puede procesarse mecánicamente a través de un homogeneizador de alta presión o un perturbador celular ultrasónico para lisar las células. Opcionalmente, el caldo puede ajustarse a un pH alcalino y luego neutralizarse antes de la centrifugación. Después de un tiempo suficiente para que la mayoría de las células, si no todas, se lisen, la mezcla resultante se transfiere a una centrífuga (9) que deshidrata el caldo para producir dos corrientes de proceso: una solución (D) de polisacárido crudo y una mezcla de otros materiales (E) de biomasa.

La solución (D) de polisacárido crudo se transfiere a un mezclador (10), como un tanque de mezcla o cualquier pieza del equipo capaz de proporcionar mezclado (por ejemplo, mezclador de cinta). La solución (D) de polisacárido crudo puede lavarse opcionalmente con agua o un alcohol adecuado (etanol, isopropanol) para eliminar materiales que no sean polisacáridos. Se pueden realizar lavados adicionales con cualquier producto químico adecuado para eliminar materiales que no sean polisacáridos. El pH de la solución (D) de polisacárido crudo se puede ajustar opcionalmente con ácido o base (F).

Una solución concentrada de una sal (G) metálica soluble, como $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, se prepara y se agrega al tanque (10) de mezcla y se mezcla vigorosamente con la solución de polisacárido durante 1-120 minutos. Se puede utilizar cualquier sal metálica soluble en agua, de modo que el producto final puede ser, por ejemplo, un complejo de polisacárido de cobre, un complejo de polisacárido de zinc, un complejo de polisacárido de hierro, un complejo de polisacárido de cobalto, un complejo de polisacárido de magnesio o un complejo de polisacárido de manganeso. La preparación de la solución de sal metálica soluble puede implicar calentar una mezcla de la sal metálica en agua mientras se mezcla. Opcionalmente, el mezclador (10) puede calentarse o enfriarse. Opcionalmente, el mezclador (10) puede calentarse a la temperatura requerida para pasteurizar el material e inactivar la actividad enzimática. Cuando la solución de polisacárido y la solución de sal metálica se mezclan, se producirá cierta cantidad de formación de complejos entre los iones metálicos y los polisacáridos presentes, de modo que el producto final puede considerarse un complejo de polisacárido metálico.

Después de alcanzar la cantidad deseada de mezcla, la mezcla se transfiere a un deshidratador (11), que es cualquier dispositivo capaz de secar el material. Por ejemplo, el deshidratador (11) puede ser un secador de bandejas, un secador de banda, un secador de tambor rotatorio, etc. Una vez que el material contiene menos del 10 % de humedad, se transfiere a un molino (12) donde su tamaño de partícula se reduce a menos de 500 μm . Más preferiblemente, su tamaño de partícula se reduce a menos de 250 μm . Una vez molido el material, se envasa (13) en bolsas de tamaño adecuado y se etiquetan.

El material no polisacárido (E) contiene proteínas y aminoácidos parcialmente hidrolizados y se transfiere a un mezclador (14), como un tanque de mezcla o cualquier equipo capaz de proporcionar mezcla (por ejemplo, mezclador de cinta). El pH del material no polisacárido (E) se puede ajustar opcionalmente con ácido o base (H). Una solución concentrada de una sal metálica soluble (I), como $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ se prepara y se agrega al mezclador (14) y se mezcla vigorosamente con el material rico en aminoácidos durante 1-120 minutos. Se puede utilizar cualquier sal metálica soluble en agua, de modo que el producto final puede ser, por ejemplo, un proteinato de cobre, proteinato de zinc, proteinato de hierro, proteinato de cobalto, proteinato de magnesio, proteinato de manganeso y combinaciones de los mismos. La preparación de la solución de sal metálica soluble puede implicar calentar una mezcla de la sal metálica en agua mientras se mezcla. Opcionalmente, el mezclador (14) puede calentarse o enfriarse. Opcionalmente, el mezclador (14) puede calentarse a la temperatura requerida para pasteurizar el material e inactivar la actividad enzimática. Cuando la solución no polisacárida y la solución de sal metálica se mezclan, se producirá cierta cantidad de formación de complejos entre los iones metálicos y las proteínas y aminoácidos parcialmente hidrolizados presentes, de modo que el producto final puede considerarse un proteinato metálico.

Después de alcanzar la cantidad deseada de mezcla, la mezcla se transfiere a un deshidratador (15), que es cualquier dispositivo capaz de secar el material. Por ejemplo, el deshidratador (15) puede ser un secador de bandejas, un secador de banda, un secador de tambor rotatorio, un evaporador de efecto múltiple, etc. Una vez que el material contiene menos de un 10 % de humedad, se transfiere a un molino (16) donde su tamaño de partícula se reduce a menos de 500 μm . Más preferiblemente, su tamaño de partícula se reduce a menos de 250 μm . Una vez molido el material, se envasa (17) en bolsas de tamaño adecuado y se etiqueta. Opcionalmente, se puede omitir la adición de la solución de sal metálica a cada corriente de proceso (D, E) y los productos resultantes serán un polisacárido relativamente puro y una harina de proteína parcialmente hidrolizada.

Las ventajas de combinar el metal traza y el beta glucano incluyen un aumento de la biodisponibilidad del metal traza en combinación con los aspectos moduladores del sistema inmunológico del beta glucano. El beta glucano no es digerible en el intestino y puede evitar que el metal traza se enlace a un agonista hasta que se libera en el intestino, por ejemplo. Además, debido a que algunos metales traza, como el zinc, suelen ser necesarios en la dieta para obtener una funcionalidad óptima del sistema inmunológico, la combinación con un compuesto que mejore el sistema inmunológico, como el beta glucano, puede ser más preferible en algunas situaciones para combinar en un pienso animal o una mezcla de premezcla de vitaminas que combinar el mismo metal traza con otra fuente, como un aminoácido o una proteína, que también se puede proporcionar como un producto separado. Los procesos actuales demuestran la capacidad de beta glucano derivado de *Euglena* para enlazar o absorber concentraciones suficientemente grandes de zinc y otros metales traza para proporcionar concentraciones significativas del metal traza en la dieta animal.

Algunas realizaciones de un complejo de beta glucano y metal incluyen un miembro seleccionado del grupo que consiste en un complejo de beta glucano y cobre, un complejo de beta glucano y zinc, un complejo de beta glucano y hierro, un complejo de beta glucano y cobalto, un complejo de beta glucano y magnesio, un complejo de beta glucano y molibdeno, un complejo de beta glucano y manganeso y combinaciones de los mismos.

Aunque se puede utilizar cualquier sal inorgánica que contenga minerales traza, algunos ejemplos de sales incluyen aquellas que son productos básicos que ya se utilizan comercialmente como ingredientes de pienso. Los ejemplos de dichas sales inorgánicas incluyen, pero no se limitan a, sulfatos metálicos, óxidos metálicos, cloruros metálicos, sales metálicas hidratadas, acetatos metálicos, bromuros metálicos, yoduros metálicos, fosfatos metálicos, selenitos metálicos y combinaciones de los mismos, donde una porción de la sal puede incluir hierro, magnesio, litio, zinc, cobre, cromo, níquel, cobalto, vanadio, molibdeno, manganeso, selenio, tungsteno, yodo y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, el complejo de polisacárido metálico resultante incluye entre un 3 % y un 25 % en peso de metal y al menos un 25 % en peso de beta glucano. En ciertos casos, la porción de polisacárido del producto puede estar compuesta por al menos un 50 % en peso de beta glucano. Se puede utilizar sulfato de zinc u óxido de zinc como sal que contiene minerales traza para elaborar un complejo de beta glucano y zinc, donde el complejo de beta glucano y zinc puede comprender al menos un 1 % en peso de zinc sobre una base de peso seco que se puede administrar en menos de un 3 % en peso de inclusión total en la dieta de un animal.

Medición de los efectos del beta glucano

Se espera que la composición de pienso para animales descrita aquí module en general el sistema inmunológico. En última instancia, estos beneficios pueden traducirse en un mejor bienestar general y una mejor salud de los animales, así como en una mejor economía de la producción ganadera, especialmente en métodos de producción ganadera que no emplean un uso subterapéutico de antibióticos en el agua o en el pienso animal. Los métodos para evaluar el uso de las presentes composiciones en el pienso animal incluyen medir aumentos en los títulos de anticuerpos, medir aumentos en la actividad de las células del sistema inmunológico (por ejemplo, tasas de fagocitosis y citotoxicidad de células asesinas naturales), medir mejoras en la eficiencia de conversión de pienso, medir la disminución del estrés, medir la mejora en la pérdida o aumento de peso, medir mejoras en el consumo de pienso, medir mejoras en la ganancia diaria promedio, realizar estudios de exposición en donde al menos a uno de los grupos de tratamiento se le administra una composición como la descrita aquí, medir las tasas de mortalidad reducidas en una población animal, medir las alternancias en los niveles de interleucinas u otras citoquinas que se sabe que están relacionadas con el rendimiento inmunológico, medir los efectos en el factor de necrosis tumoral alfa, marcar con fluorescencia los componentes de las composiciones descritas aquí y observar su presencia o metabolismo en diversas muestras de células, sangre o tejido, realizar un análisis histológico general en animales que se alimentan con una composición descrita aquí, pesar los órganos o animales que se alimentan con una composición descrita aquí, o cualquier otro análisis que demuestre un efecto significativo en los animales cuando se les alimenta con una o más de las composiciones descritas aquí.

Sustituto de leche para pienso animal

Las presentes composiciones de pienso para animales se pueden formular como un sustituto de la leche, donde un sustituto de la leche es un producto que se alimenta a un mamífero joven como suplemento o un reemplazo de la leche natural de la madre. Existen productos sustitutos de la leche para una amplia gama de mamíferos, incluidos, pero no limitado a, vacas, cabras, corderos, ovejas, ardillas, humanos e incluso animales exóticos del zoológico. Algunos mamíferos, como las vacas, tienen un sistema digestivo rumiante. Sin embargo, los rumiantes jóvenes no tienen sistemas digestivos completamente desarrollados o funcionales; los órganos que producen enzimas digestivas no son completamente funcionales al nacer. Estos rumiantes jóvenes sufren variaciones en la dieta y son particularmente vulnerables a las infecciones y al estrés. A menudo se proporciona a las vacas jóvenes un sustituto de leche que comprende proteína cruda, grasa cruda, suero y otras sustancias para reducir la variabilidad de su dieta y también porque puede ser más económico alimentarlas con sustituto de leche y vender la leche materna.

Los sustitutos de leche generalmente contienen alguna combinación de componentes de las siguientes sustancias: proteína de suero, grasa, proteína cruda, emulsionante, agente de flujo, fosfato dicálcico, lisina, vitaminas, minerales traza, carbonato de calcio, colina, compuestos saborizantes, ceniza, calcio y fosfato. Las fuentes de grasas y proteínas pueden ser a base de animales o plantas. Se ha demostrado que diferentes composiciones de grasa, medidas por la longitud de la cadena de hidrocarburos, y de proteínas, medidas por los componentes de aminoácidos, producen diferentes resultados en términos de eficiencia de conversión de pienso, aumento de peso, tasas de crecimiento, mortalidad y resistencia general a las infecciones.

La presente tecnología incluye una composición de pienso animal que está formulada como un sustituto de la leche, donde el sustituto de la leche puede incluir proteínas, grasas y beta glucano para proporcionar calorías sustanciales y mejorar el bienestar de un mamífero. También se incluye un método para estimular el aumento del peso corporal y mejorar el bienestar de un mamífero joven alimentándolo con un producto sustituto de la leche que comprende proteínas, grasas y beta glucano.

Ejemplos

Análisis de la ramificación del beta glucano

Se realizó un análisis de ramificación en beta glucano extraído de *Euglena gracilis* cultivado mediante un método de fermentación estéril y heterotrófico.

Se emplearon los siguientes métodos:

5 Cultivo celular y mediciones de beta glucano. Dos cultivos de *Euglena*, cada uno de ellos cultivado en un medio que contenía nutrientes esenciales mayores y menores (incluidos nitrógeno, fósforo), minerales traza y vitaminas (B1 y B12), como es habitual en el cultivo de esta especie. Los cultivos de 200 mL se burbujearon con aire en matraces Erlenmeyer de 250 mL para proporcionar oxígeno, dióxido de carbono y mezcla de los cultivos. La densidad inicial de *Euglena* fue de 0.7 g L^{-1} . Ambos cultivos fueron expuestos a niveles de luz de $150 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y 4 g L^{-1} de carbono fijado se dosificó como tratamiento complementario de carbono en un cultivo. Después de dos días, se midieron las muestras para determinar los sólidos suspendidos totales para determinar el peso seco de la biomasa. El contenido de beta glucano se determinó lisando las células y centrifugando los cristales de beta glucano.

15 Aproximadamente 1 parte de biomasa de *Euglena* (base de peso seco) se suspende en 5 partes de agua y 10 partes de (10 g/L de dodecil sulfato de sodio). Esta solución se mezcló vigorosamente y luego se calentó a 100 grados C durante 30 minutos. Luego la solución se enfría y se centrifuga a $>500 \text{ g}$ durante 5 minutos. Se descarta el sobrenadante y se lava la pella mediante resuspensión en 10 partes de agua, se mezcla vigorosamente y se centrifuga a $>500 \text{ g}$ durante 5 minutos. El proceso de lavado se repite 2 veces más con 10 partes de etanol al 70-95 %, para llegar a una pella de beta glucano purificado. La pella se puede secar aún más hasta obtener un polvo blanco/marrón claro bajo vacío a 65 grados C. La figura 7 muestra la masa en peso seco por litro de *Euglena* y beta glucano cultivado en el medio de control y un medio que tiene el tratamiento complementario de carbono. La figura 8 muestra el porcentaje de beta glucano por peso seco de *Euglena* cultivados en medios de control y en medios que tienen el tratamiento suplementario con carbono.

20 Per-O-metilación y análisis de enlace. Para el análisis de enlace glicosilo, dos muestras de beta glucano extraídas utilizando los métodos anteriores, fueron permetiladas, despolimerizadas, reducidas y acetiladas; los acetatos de aldito parcialmente metilados (PMAA) resultantes se analizaron mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) como se describe en York et al (1985) Methods Enzymol. 118:3-40.

30 Inicialmente, la muestra seca se suspendió en aproximadamente 300 μL de dimetilsulfóxido y se colocó en un agitador magnético durante 1-2 semanas. Luego la muestra fue permetilada mediante el método de Ciukanu y Kerek (1984) Carbohydr. Res. 131:209-217 (tratamiento con hidróxido de sodio y yoduro de metilo en DMSO seco). La muestra se sometió a la base de NaOH durante 10 minutos, luego se agregó yoduro de metilo y se dejó durante 40 minutos. Luego se añadió la base durante 10 minutos y finalmente se añadió más yoduro de metilo durante 40 minutos. Esta adición de más yoduro de metilo y base NaOH fue para asegurar la metilación completa del polímero. Después del procesamiento de la muestra, el material permetilado se hidrolizó utilizando ácido trifluoroacético 2 M (2 horas en un tubo sellado a 121°C), reducido con NaBD₄ y acetilado utilizando anhídrido acético/ácido trifluoroacético. Los PMAA resultantes se analizaron en un Hewlett Packard 5975C GC con una interfaz a un MSD 7890A (detector selectivo de masas, modo de ionización por impacto de electrones); la separación se realizó en una columna capilar de sílice fundida en fase enlazada Supelco 2330 de 30 m.

Tabla 5. Resultado del análisis de per-O-metilación y de enlace de 2 muestras de beta glucano extraídas.

Muestra	β -glucano 1	β -glucano 2
residuo de glicosilo	Área PK %	
residuo de glucopiranosilo con enlace terminal (t-glc)	0.34	0.3
Residuo de glucopiranosilo con enlace en 3 (3-glc)	93.03	94.1
Residuo de glucopiranosilo con enlace en 4 (4-glc)	2.25	2.4
Residuo de glucopiranosilo con enlace en 2,3 (2,3-glc)	3.47	2.3
Residuo de glucopiranosilo con enlace en 3,6 (3,6-glc)	0.36	0.8
Residuo de glucopiranosilo con enlace en 2,3,4 (2,3,4-glc)	0.55	0.1
Total	100.0	100.0

40 Los resultados del enlace indican que ambas muestras están compuestas principalmente por residuos de glucopiranosilo con enlace en 3. Se detectan cantidades menores de residuos de Glc con enlace en 4 y en 2,3 junto con una cantidad insignificante de Glc con enlace en 3,6, terminal y con enlace en 2,3,4.

Parámetros de respuesta inmunitaria en ratones

Se realizó un estudio en colaboración con el Dr. Vaclav Vetvicka en el Departamento de Patología de la Universidad de Louisville para determinar si el paramilo era un estimulante inmunológico eficaz en mamíferos cuando se suministraba como ingrediente en el pienso. Los objetivos incluyeron:

- 5 1. Determinar si el paramilo estimula el sistema inmunológico de ratones cuando se dosifica oralmente;
2. Comparar los efectos del paramilo frente a otros productos de beta glucano utilizados en suplementos en pienso para animales en distintos niveles de dosificación; y
3. Evaluar la eficacia del paramilo de células enteras frente al paramilo extraído y purificado,

Se emplearon los siguientes métodos:

- 10 La biomasa de algas que contiene beta glucano se cultivó utilizando procesos de fermentación como se describe aquí. En este estudio con ratones se probaron dos productos de células enteras diferentes (WBG50A y WBG50B) y un extracto de beta glucano purificado. La muestra WBG50A se produjo a partir de células cultivadas con glucosa como fuente de carbono orgánico, mientras que la muestra WBG50B se produjo a partir de células cultivadas sobre etanol. Ambos productos de células enteras contenían aproximadamente 50 % en
- 15 peso de beta-1,3 glucano y se centrifugaron y luego se secaron sin ningún procesamiento adicional. Al fraccionar la biomasa WBG50A para aislar el beta glucano y luego lavar repetidamente la fracción de beta glucano para eliminar los componentes celulares que no son beta glucano se produjo la muestra de "extracto". El extracto contenía aproximadamente 93 % en peso de beta-1,3 glucano.

- 20 Las muestras de biomasa de células enteras, extracto de beta glucano y otros productos de beta glucano se secaron y molieron hasta obtener tamaños de partículas inferiores a 500 micrones. Luego, estos polvos secos se mezclaron con regulador PBS y se diluyeron hasta alcanzar concentraciones adecuadas antes de dosificarlos por sonda a los ratones. Se asignaron tres ratones BALB/c a cada grupo de tratamiento y se les administraron distintos niveles de beta glucano en forma de porcentaje en peso de su dieta total, que oscilaron entre menos del 0.001 % al 0.25 % de la ración de dieta del ratón en el día 1 del experimento. Aquí sólo se
- 25 representan los datos de los niveles de dosificación del 0.005 % y 0.05 %.

- Se extrajo sangre de cada ratón para medir la actividad no específica del sistema inmune. Se evaluaron los siguientes parámetros: actividad de fagocitosis (la capacidad de los macrófagos de ingerir partículas extrañas), actividad de las células asesinas naturales (NK) (la capacidad de las células NK de destruir células extrañas o infectadas) y concentraciones de citoquinas (IL-2). Para medir la capacidad de la respuesta inmune específica,
- 30 se midió la formación de anticuerpos en respuesta a la ovoalbúmina mediante un ensayo inmunoabsorbente enlace a enzimas (ELISA) utilizando un adyuvante de Freund como control positivo y PBS como control negativo.

Se obtuvieron los siguientes resultados.

- 35 La fagocitosis es una respuesta del sistema inmunitario para capturar y destruir partículas potencialmente dañinas (por ejemplo, bacterias). El índice de fagocitosis se midió como el porcentaje de neutrófilos que capturaron y engulleron activamente partículas marcadas. Los ratones a los que se les administró sólo el control PBS tuvieron un índice de fagocitosis del 30 % (ver Fig. 9). El índice registrado más alto (45 %) se observó en los ratones alimentados con la dosis de 0.05 % de WBG50B, lo que supone un aumento del 50 % respecto del
- 40 tratamiento de control. En general, el tratamiento con WBG50B tuvo el índice de fagocitosis más alto de todos los tratamientos en cada uno de los dos niveles de dosificación, y fue especialmente eficaz en comparación con todos los tratamientos en el nivel de dosificación más bajo (0.005 % de la dieta).

- La actividad de las células NK es un índice de la capacidad de las células asesinas naturales (NK) aisladas del bazo para matar células objetivo (por ejemplo, células YAC-1 de una línea celular de linfoma T) durante una incubación de 4 horas. Los ratones que fueron alimentados con el control PBS mostraron un índice de
- 45 citotoxicidad del 12 %, mientras que los ratones alimentados con la dosis del 0.05 % de WBG50B tuvieron un índice de citotoxicidad tres veces mayor (38.5 %, ver Fig. 10). Tanto el tratamiento con WBG50B como el tratamiento con extracto superaron sustancialmente a otros productos de beta glucano (Fibosel, Biomatrix) en ambos niveles de dosificación y, en algunos casos, el tratamiento con WBG50B mostró casi el doble de
- 50 respuesta de actividad de células NK, como se refleja en la citotoxicidad, de Fibosel en los niveles de dosificación de 0.05 % y 0.005 %.

- La interleucina-2 (IL-2) es una importante molécula mensajera de citoquinas que ayuda a regular la respuesta inmunitaria a la infección microbiana. La producción de IL-2 se mide como la cantidad de IL-2 producida por las células del bazo cosechadas durante un período de incubación; la respuesta de IL-2 es una respuesta
- 55 inmunitaria más generalizada que la actividad de las células NK, fagocitosis y formación de anticuerpos. Como tal, muchos tipos diferentes de compuestos extraños, no solo el beta glucano, pueden provocar un aumento en la producción de IL-2. Los ratones alimentados con el control PBS no observaron un aumento en la producción

de IL-2, mientras que todos los tratamientos con productos de beta glucano provocaron una respuesta de IL-2 muy fuerte que aumentó notablemente con la dosis más alta (ver Fig. 11). El tratamiento con extracto dio como resultado la mayor producción de IL-2, seguido por los otros productos de beta glucano (Fibosel, Biomatrix) y luego los productos WBG50.

- 5 La formación de anticuerpos indica que el beta glucano puede actuar como adyuvante (potenciador) de las vacunas. A los ratones se les inyectó ovoalbúmina (proteína de clara de huevo, un antígeno modelo) el día 0 y el día 14 mientras se les alimentaba con cada producto de beta glucano diariamente durante 21 días. El día 21 se mide el número de anticuerpos contra la ovoalbúmina en el suero. Se utilizó adyuvante de Freund (una emulsión de células bacterianas inactivadas) como control positivo, ya que se reconoce como un estándar industrial para inducir la formación de anticuerpos. Sin embargo, el adyuvante de Freund no se utiliza en muchos animales, incluidos los humanos, debido a su fuerte efecto tóxico. Como se esperaba, el adyuvante de Freund produjo un nivel muy alto de anticuerpos (véase la Fig. 12). Con una tasa de dosificación del 0.05 %, tanto las muestras de células enteras como los productos de la competencia provocaron una producción de anticuerpos similar, aproximadamente un 20 % del nivel del adyuvante de Freund. La muestra de extracto produjo una respuesta de anticuerpos mucho más fuerte para la tasa de dosificación del 0.05 %, alcanzando casi el 55 % del nivel inducido por el adyuvante de Freund.

Estos experimentos establecen los siguientes preceptos con respecto a la tecnología actual:

1. Cada uno de los productos que contienen beta glucano de *Euglena* (WBG50A, WBG50B, extracto) indujeron aumentos significativos en cada una de las respuestas inmunes medidas (fagocitosis, actividad de células NK, producción de IL-2, producción de anticuerpos) en comparación con los controles.

2. Para cada medida de respuesta inmune, los productos de beta glucano de *Euglena* funcionaron tan bien, y en muchos casos, mejor que otros productos de beta glucano Fibosel y Biomatrix. En particular, WBG50B (biomasa de células enteras cultivada en etanol como fuente de carbono) demostró los niveles más altos medidos para fagocitosis y actividad de células NK.

3. El producto de beta glucano extraído de *Euglena* provocó una respuesta de anticuerpos muy fuerte que superó el 50 % del nivel inducido por un adyuvante de Freund, lo que indica el potencial para aplicaciones como adyuvante.

4. Con la excepción de la producción de anticuerpos, la respuesta inmune a la biomasa de células enteras fue tan alta, si no mayor, que la extraída solo de beta glucano de *Euglena*. Esto sugiere que otros componentes de las células de las algas (por ejemplo, ácidos grasos omega-3, vitamina E, metales traza) pueden tener un efecto sinérgico con el beta glucano para inducir una respuesta inmune más fuerte.

5. En todos los casos, la respuesta inmune a los niveles de dosificación (0.005 % y 0.05 %) no fue lineal (es decir, 10 veces mayor) y difirió entre los productos, lo que sugiere que la tasa de dosificación óptima para los productos de beta glucano de *Euglena* es probablemente más baja que el nivel de dosificación más alto (0.05 %). Cabe destacar que la respuesta inmune en la actividad de las células NK y la fagocitosis para la dosificación más baja de WBG50B fue incluso mayor que para el nivel de dosificación más alto para Fibosel y Biomatrix, lo que sugiere la posibilidad de requisitos de dosificación reducidos para beta glucano de *Euglena*. Además, las tasas de dosificación se pueden optimizar para la respuesta de fagocitosis, que es la primera línea de defensa contra los patógenos.

- Producción eficiente de beta glucano mediante fermentación heterotrófica de *Euglena gracilis*

Para determinar la producción óptima de beta glucano con otros coproductos sinérgicos utilizando *Euglena gracilis*, fueron probados una amplia gama de diferentes formulaciones de medios de crecimiento, pH, controles de temperatura, condiciones de luz y cepas genéticas de *Euglena*. Inesperadamente, se determinó que *Euglena gracilis* produjo mayores cantidades de proteínas valiosas y lípidos antioxidantes cuando se cultivó en condiciones fotosintéticas. Sin embargo, *Euglena* cultivado heterotróficamente en recipientes de fermentación oscuros y estériles produjo mayores cantidades de beta-1,3-glucano. Ratones que fueron alimentados con *Euglena gracilis* seca derivado de recipientes de fermentación estériles mostraron un rendimiento del sistema inmunológico que superó a los beta glucanos derivados de fuentes de levadura o de *Euglena* que contenían cantidades más pequeñas de beta glucanos.

- A diferencia de otros informes que describen la producción de vitamina E y otros antioxidantes utilizando algas cultivadas fotosintéticamente, *Euglena gracilis* cultivado heterotróficamente parece producir beta glucano que es más adecuado para aplicaciones de pienso animal.

Además, los experimentos actuales determinaron que es importante secar rápidamente las algas como parte del proceso de fabricación para evitar la descomposición de carotenoides valiosos y otros antioxidantes. Cabe señalar que en algunos casos puede resultar económicamente beneficioso almacenar una suspensión de algas húmeda durante un período de tiempo prolongado antes de secarla. En una realización, las algas recién centrifugadas se pueden conservar calentando el material en frascos de vidrio o bolsas de retorta, de manera

similar a como se enlatan los alimentos para su almacenamiento a largo plazo a temperatura ambiente. Esta información se utilizó en el desarrollo de los procesos de fabricación descritos aquí e ilustrados en las Figs. 5 y 6.

Tabla 6. Ejemplos de concentraciones de compuestos en muestras de *Euglena* (en base al peso seco)

	Concentración en muestra húmeda almacenada a temperatura ambiente durante 2 días.	Concentración en muestra secada inmediatamente después de la centrifugación.
Luteína	80 ppm	145.7 ppm
Zeaxantina	17.2 ppm	2.9 ppm
Astaxantina	7.4 ppm	7.6 ppm
Beta-caroteno	9.4 ppm	59.3 ppm
DHA	Sin datos	0.33 %
EPA	Sin datos	0.33 %
Alfa tocoferol	120 IU/kg	34 IU/kg

5

Exposición en ratones con *E. coli*

Los objetivos de este ejemplo incluyen:

1. Determinar si las dosis orales de harina de algas de *Euglena* y productos de beta glucano purificados aumentan la supervivencia contra una dosis letal de la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*);

10 2. Determinar si harina de algas de *Euglena* y productos de beta glucano estimularon específicamente el sistema inmunológico de ratones, medido por la producción de anticuerpos, citotoxicidad de las células asesinas NK y actividad de fagocitosis; y

3. Comparar los efectos de harina de algas de *Euglena* y productos de beta glucano purificados a otros productos de beta glucano derivados de levadura en diferentes niveles de dosificación.

15 Se emplearon los siguientes métodos:

Las células de *Euglena* se cultivaron en un fermentador estéril. Una vez alcanzada la densidad de biomasa deseada en el fermentador, las células se centrifugaron y la pasta resultante se almacenó congelada a -20 ° C. Para producir la muestra de harina de algas, la pasta congelada se descongeló, se secó a 65 ° C hasta formar una escama seca y luego se molió hasta obtener un tamaño de partícula inferior a 250 micrones. La muestra de beta glucano de algas purificadas se produjo fraccionando las células de *Euglena* y aislando el beta glucano a través de un proceso de purificación patentado que da como resultado un extracto con > 90 % de beta glucano y un tamaño de partícula de menos de 250 micrones. Macrogard, un producto de beta glucano derivado de levadura, extraído, que garantiza > 60 % de beta glucano, se adquirió de un distribuidor comercial y se utilizó "tal cual", sin modificaciones adicionales. Cada producto seco se mezcló con solución salina regulada con fosfato (PBS) y se diluyó a concentraciones apropiadas antes de dosificarlo por sonda a los ratones en los niveles de dosificación prescritos.

Todo el trabajo con animales se realizó en el laboratorio del Dr. Vaclav Vetvicka en el Departamento de Patología de la Universidad de Louisville. El Dr. Vetvicka es muy conocido por sus investigaciones sobre los efectos fisiológicos del beta glucano y su laboratorio ha realizado numerosas comparaciones lado a lado de productos de beta glucano para determinar su posible eficacia.

Exposición bacteriana con *E. coli*. Se asignaron diez ratones BALB/c a cada grupo de tratamiento y recibieron una dosis letal nominal de *E. coli* (3 X 10⁷) vía inyección intramuscular el día 0. Los productos de beta glucano (0.01 % de la ración diaria de pienso en peso) se dosificaron por vía oral mediante sonda a los ratones diariamente desde dos días antes de la inyección (día -2) hasta dos días después de la inyección (día +2). El grupo de control recibió sólo una sonda de PBS, mientras que un grupo tratado con antibióticos recibió dosis orales de ampicilina (13 mg/kg) los días 0, 1, 2, 3 y 4. Los ratones fueron evaluados diariamente hasta el día 10.

Títulos de anticuerpos. Se asignaron tres ratones BALB/c a cada grupo de tratamiento y recibieron una dosis oral diaria de productos de beta glucano equivalente al 0.002, 0.005, 0.010 y 0.020 % de su ración de pienso

diaria en peso a partir del día 0. El antígeno (ovoalbúmina) se administró mediante inyección intraperitoneal los días 3 y 16 y la producción del título de anticuerpos se midió el día 23 utilizando un ensayo ELISA con un adyuvante de Freund como un control positivo y PBS como el control negativo.

Citotoxicidad y actividad fagocítica de las células NK. Se asignaron nueve ratones BALB/c a cada grupo de tratamiento y se alimentaron con productos de beta glucano de la misma manera que el experimento de titulación de anticuerpos explicado anteriormente para medir la citotoxicidad de las células asesinas naturales (NK) (la capacidad de las células NK de destruir células extrañas o infectadas) y la actividad de fagocitosis (la capacidad de los macrófagos de ingerir partículas extrañas). Los días 1, 7 y 14, se sacrificaron tres ratones de cada grupo de tratamiento para recolectar material para los análisis. La actividad de las células NK (medida como citotoxicidad) es un índice de la capacidad de las células NK aisladas del bazo para matar células objetivo (por ejemplo, células YAC-1 de una línea celular de linfoma T) durante una incubación de 4 horas. El índice de fagocitosis se mide como el porcentaje de células neutrófilas que capturan y engullen activamente partículas marcadas en un tiempo determinado.

Estos experimentos produjeron los siguientes resultados.

Exposición bacteriana con *E. coli* (ver Fig. 13). Todos los ratones del grupo de control, que recibieron sólo PBS, murieron dentro de los siete días siguientes a la inyección de *E. coli*. Por el contrario, la mortalidad en el día 10 se redujo en todos los grupos de tratamiento en al menos un 40 %. Cabe destacar que el 70 % de los ratones que recibieron el producto de beta glucano de algas purificado sobrevivieron 10 días después de la inyección con *E. coli*. Este grupo de tratamiento y el que recibió ampicilina mostraron tasas de supervivencia muy similares a lo largo del tiempo, lo que sugiere que el tratamiento con beta glucano derivado de *Euglena* promovió una actividad antibacteriana similar a la ampicilina. Los ratones que recibieron harina de algas, que contiene aproximadamente un 50 % de beta glucano, también mostraron una disminución significativa en la mortalidad en comparación con el grupo de control. En este grupo de tratamiento, el 50 % de los ratones sobrevivieron 10 días después la inyección con *E. coli* en comparación con el 40 % que sobrevivió en el grupo alimentado con un producto de extracto de beta glucano derivado de levadura (Macrogard).

Títulos de anticuerpos (ver Fig. 14). Un aumento significativo en el título de anticuerpos indica el potencial de un producto como el beta glucano para servir como adyuvante (potenciador) de las vacunas. Como se esperaba, el control positivo (adyuvante de Freund, una emulsión de células bacterianas inactivadas) produjo niveles muy altos de anticuerpos contra la ovoalbúmina. Sin embargo, el adyuvante de Freund es tóxico y, en realidad, no se utiliza en animales ni en humanos como un adyuvante. Todos los grupos de tratamiento con beta glucano provocaron un aumento en la producción de anticuerpos que también aumentó con la tasa de dosificación. El tratamiento con beta glucano de algas purificadas produjo la mayor cantidad de anticuerpos en cada uno de los niveles de dosificación del tratamiento, seguido de cerca por el grupo de tratamiento con harina de algas. El grupo de tratamiento con extracto de beta glucano de levadura Macrogard demostró títulos de anticuerpos sustancialmente más bajos (entre 15 % y 50 % más bajos) que los tratamientos con beta glucano de algas purificadas y harina de algas en niveles de dosificación moderados (0.005 y 0.010 %), pero igualó al tratamiento con harina de algas en la tasa de dosificación más alta.

Citotoxicidad de las células NK (ver Fig. 15). La citotoxicidad de las células NK es un índice de la respuesta inmune no específica de las células NK para matar organismos potencialmente patógenos. Los ratones alimentados con el control PBS mostraron un índice de citotoxicidad del 12 %, mientras que los ratones alimentados con dosis tan bajas como 0.005 % de harina de algas o beta glucano de algas purificado demostraron un índice de citotoxicidad tres veces mayor (36 % a 50 %). En dosis de 0.005 % y superiores, tanto los tratamientos con harina de algas como con beta glucano de algas purificadas provocaron una respuesta de citotoxicidad más fuerte que los tratamientos con extracto de beta glucano de levadura Macrogard.

Actividad de fagocitosis (ver Fig. 16). La fagocitosis es otra respuesta inmune no específica para engullir organismos potencialmente patógenos. Los ratones a los que se les administró sólo el control PBS tuvieron un índice de fagocitosis del 30 %, mientras que los ratones alimentados con la dosis más alta de beta glucano de algas purificado demostraron casi el doble de actividad de fagocitosis (59 %). Como se observó con la citotoxicidad de las células NK y los títulos de anticuerpos, el grupo de tratamiento con beta glucano de algas purificadas demostró el mejor desempeño en cada nivel de dosificación. Los grupos de tratamiento con harina de algas y extracto de beta glucano de levadura Macrogard demostraron una actividad de fagocitosis similar en los dos niveles de dosificación más bajos, pero los ratones alimentados con extracto de beta glucano de levadura Macrogard en los dos niveles de dosificación más altos tuvieron una actividad de fagocitosis ligeramente mayor.

En consecuencia, los datos de estos experimentos demuestran lo siguiente:

1. Cada uno de los productos de beta glucano (harina de algas, beta glucano de algas purificado y extracto de beta glucano de levadura, Macrogard) aumentó la supervivencia de los ratones expuestos a una dosis letal de *E. coli*. En particular, el tratamiento con harina de algas aumentó la supervivencia el día 10 del 0 % en el grupo de control hasta el 50 %. El tratamiento con beta glucano de algas purificadas aumentó la supervivencia hasta

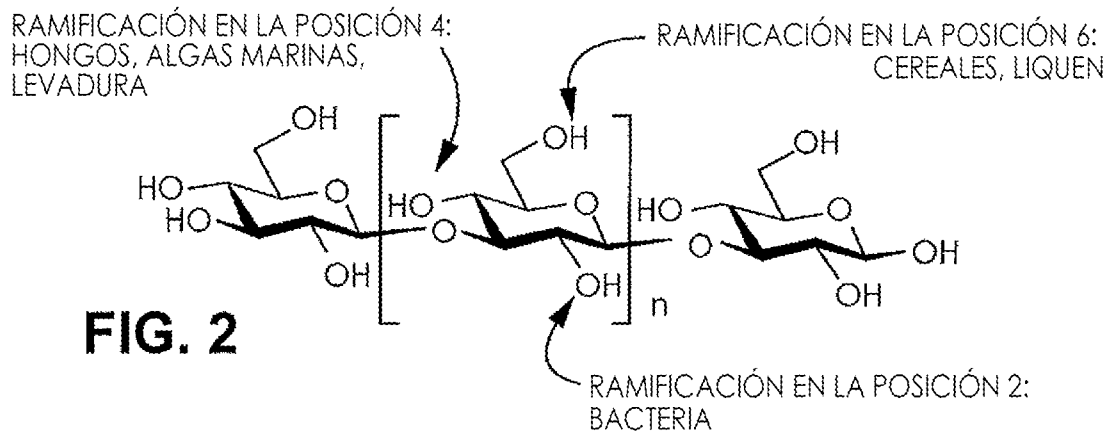
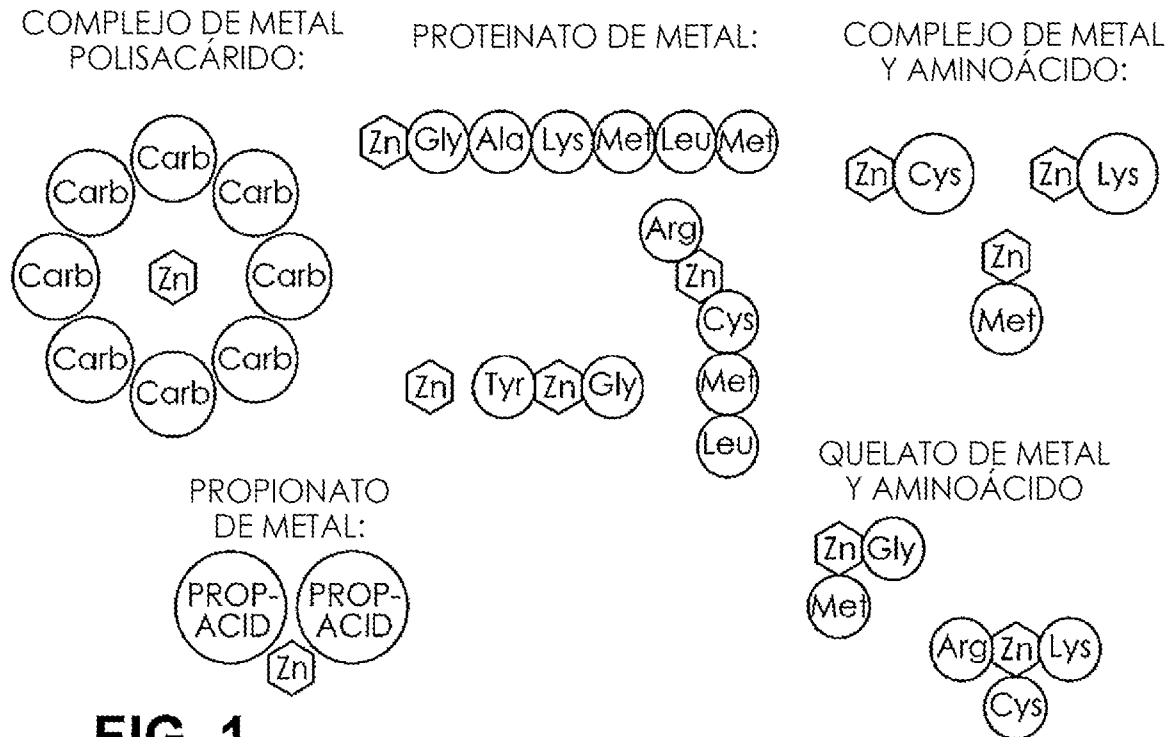
un 70 %, lo que fue la misma respuesta que el tratamiento con antibióticos (ampicilina). Estos datos indican que el beta glucano derivado de *Euglena* estimula el sistema inmunológico para proporcionar una potente actividad antibacteriana y ese beta glucano dentro de la harina de algas, que no ha sido extraído ni purificado, es fácilmente biodisponible.

- 5 2. Tanto las respuestas inmunes específicas (es decir, producción de anticuerpos) como las respuestas inmunes no específicas (es decir, la citotoxicidad de las células NK y la actividad de fagocitosis) aumentaron significativamente en los grupos de tratamiento alimentados con cualquiera de los productos de beta glucano. En todas las métricas inmunes, el grupo de tratamiento con beta glucano de algas purificadas provocó la respuesta inmune más fuerte en todos los niveles de tratamiento.
- 10 3. Tanto los productos de harina de algas como los de beta glucano de algas purificados provocaron una respuesta de anticuerpos muy fuerte que superó el 50 % del nivel inducido por un adyuvante de Freund, lo que indica la utilidad de estos productos para servir como adyuvantes.
- 15 4. El producto de harina de algas funcionó tan bien, o incluso mejor, que el producto de extracto de beta glucano de levadura Macrogard en casi todos los niveles de tratamiento, tanto en la producción de anticuerpos como en los ensayos de citotoxicidad de células NK. En la mayoría de los casos, el producto de harina de algas indujo una respuesta casi igual o mejor en comparación con Macrogard con solo una cuarta parte o la mitad del nivel de dosificación.
- 20 5. El extracto de beta glucano de levadura Macrogard provocó una respuesta de fagocitosis menor que el producto de beta glucano de algas purificado, pero funcionó tan bien o mejor que el producto de harina de algas. En general, el impacto global de todos los productos de beta glucano sobre la fagocitosis es más moderado que los efectos sobre la citotoxicidad de las células NK y la producción de anticuerpos.
- 25 6. Estos resultados corroboran estudios anteriores de menor duración (3 días) que encontraron que la harina de algas y los productos de beta glucano de algas purificados inducen respuestas inmunes mejoradas en comparación con los controles y otros productos de beta glucano de levadura, como el extracto de beta glucano de levadura Fibosel y otro producto genérico de beta-glucano de levadura.
- 30 Se proporcionan ejemplos de realizaciones para que esta divulgación sea exhaustiva y transmita completamente el alcance a aquellas personas experimentadas en la técnica. Se establecen numerosos detalles específicos, como ejemplos de componentes, dispositivos y métodos específicos, para proporcionar una comprensión completa de las realizaciones de la presente divulgación. Será evidente para las personas experimentadas en la técnica que no es necesario emplear detalles específicos, que las realizaciones de ejemplo pueden realizarse en muchas formas diferentes y que ninguna de ellas debe interpretarse como limitante del alcance de la divulgación. En algunas realizaciones de ejemplo, no se describen en detalle procesos bien conocidos, estructuras de dispositivos bien conocidas y tecnologías bien conocidas.

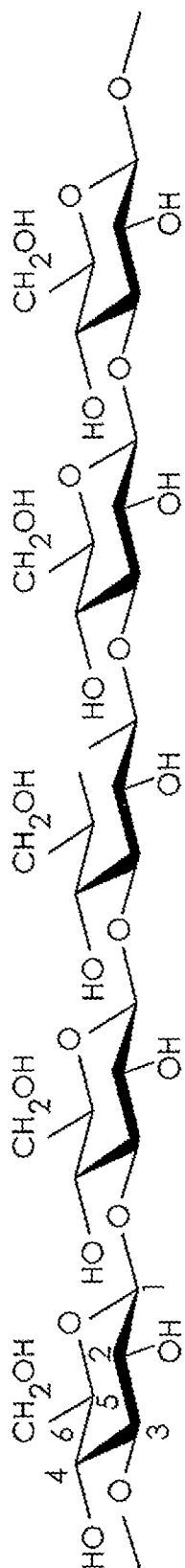
REIVINDICACIONES

1. Una composición de pienso para animales que comprende beta-(1,3)-glucano no ramificado y un componente de pienso para animales,
5 en donde la composición de pienso para animales comprende harina de algas derivada de *Euglena gracilis* cultivadas heterotróficamente, la harina de algas que comprende el beta-(1,3)-glucano no ramificado,
en donde la harina de algas comprende más del 20 % de beta glucano, medido sobre una base de peso seco, y el beta glucano comprende más del 90 % de beta-(1,3)-glucano no ramificado, y
en donde el beta-(1,3)-glucano no ramificado está presente en una cantidad de entre 0.001 % a 1 % del peso total de la composición de pienso animal.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, en donde el beta glucano comprende paramilo.
3. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la composición comprende además un metal.
4. La composición de la reivindicación 3, en donde el metal es un metal traza y el beta-(1,3)-glucano no ramificado y el metal traza forman un complejo.
- 15 5. La composición de la reivindicación 3 o 4, en donde el metal comprende zinc.
6. La composición de la reivindicación 1, en donde el componente de pienso animal comprende un miembro seleccionado del grupo que consiste en astaxantina, luteína, beta-caroteno, ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico, ácido graso omega 3, ácido graso omega 6, alfa tocoferol y combinaciones de los mismos.
- 20 7. La composición de la reivindicación 1, en donde la composición de pienso para animales está formulada como un sustituto de la leche y el componente de pienso para animales comprende proteína y grasa.
8. La composición de la reivindicación 1, que comprende además un ingrediente inmunomodulador adicional, reductor del estrés u otro ingrediente estimulante seleccionado del grupo que consiste en alfa tocoferol, colecalciferol, zinc, cromo, selenio, arginina, ácido ascórbico, alquilglicerol, cafeína, kava kava, *Curcuma longa*, espirulina, calcio-D-glucarato, coenzima Q10, péptidos, dimetilglicina, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico, ácido alfa-linolénico, astaxantina, beta-caroteno, luteína, probióticos de lactobacillus, probióticos de Bifidobacterium, manano-oligosacáridos, fructo-oligosacáridos, astrágalo, Equinácea, Estritox, ajo, glutatión, laminaria, L-arginina, L-ornitina, gránulos de lecitina, extractos de hongos miitake, reishi o shiitake, manganeso, quercetina, bromelina, hoja de olivo, Sambucus, Umcka, ácido pantoténico, quercetina, ácido alfa lipoico, aceites esenciales, aceites de pescado, especias y sus derivados, pterostilbeno y combinaciones de los mismos.
- 25 30 9. La composición de la reivindicación 8, en donde la composición está suspendida en una solución líquida.
10. La composición de pienso para animales de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para uso en la mejora de la función inmunológica de un animal, mediante la administración de la composición de pienso para animales al animal.

35



LINEAL BETA-(1,3)-GLUCANO (EUGLENA)



RAMIFICACIÓN SOBRE RAMIFICACIÓN BETA-(1,3;1,6)-GLUCANO (LEVADURA)

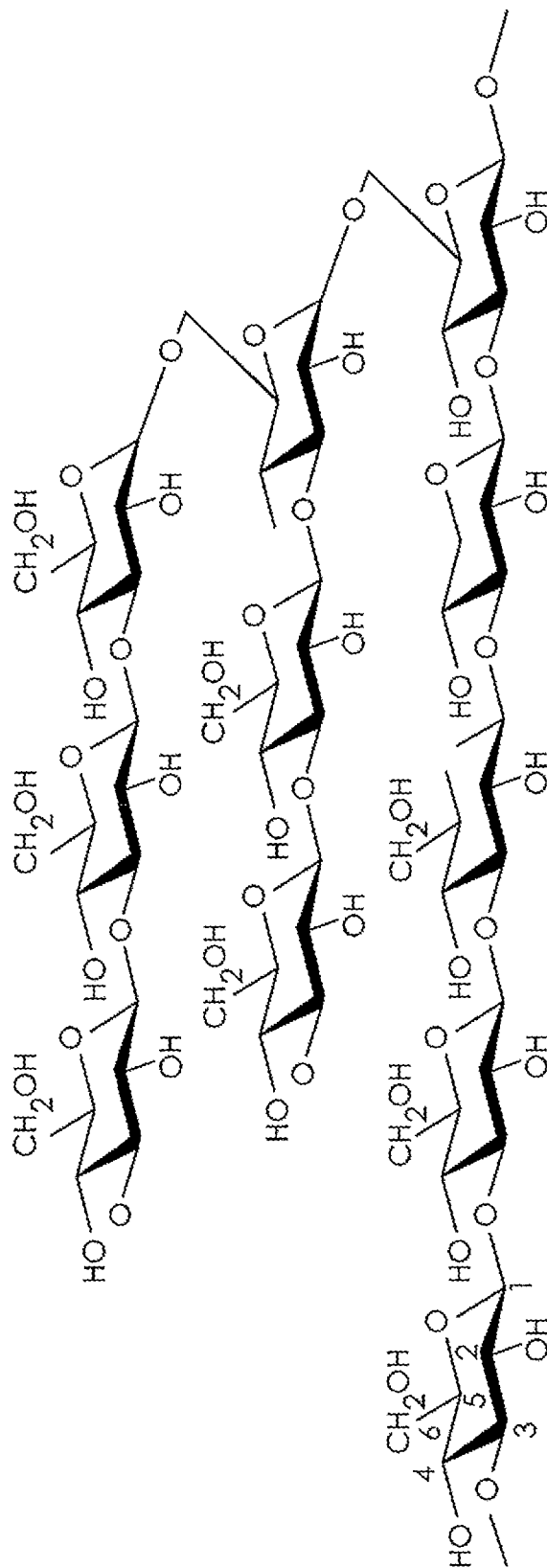
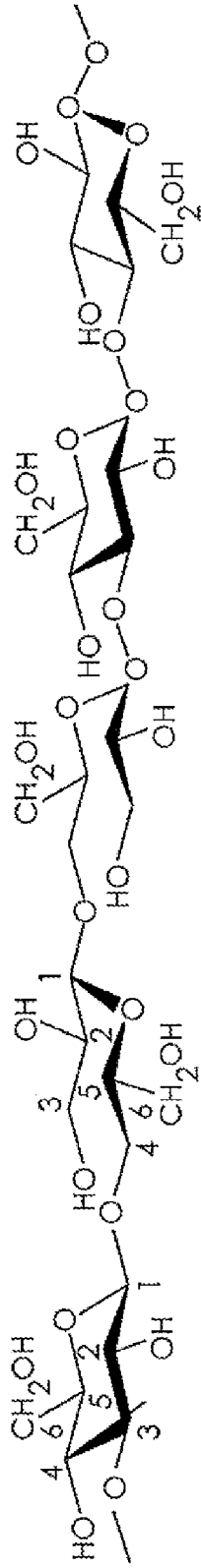


FIG. 4a

LINEAL BETA-(1,3;1,4)-GLUCANO (AVENA, CEBADA)



CADENA LATERAL RAMIFICADA
BETA-(1,3;1,6)-GLUCANO (LAMINARIA)

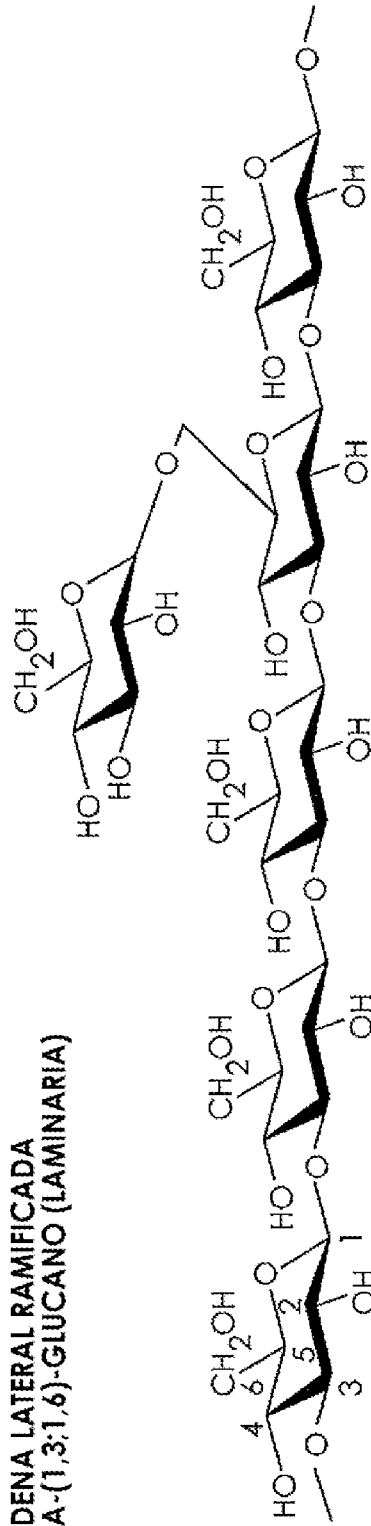


FIG. 4b

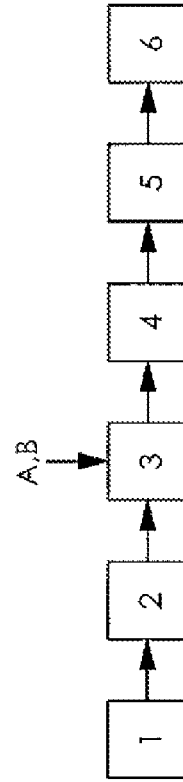


FIG. 5

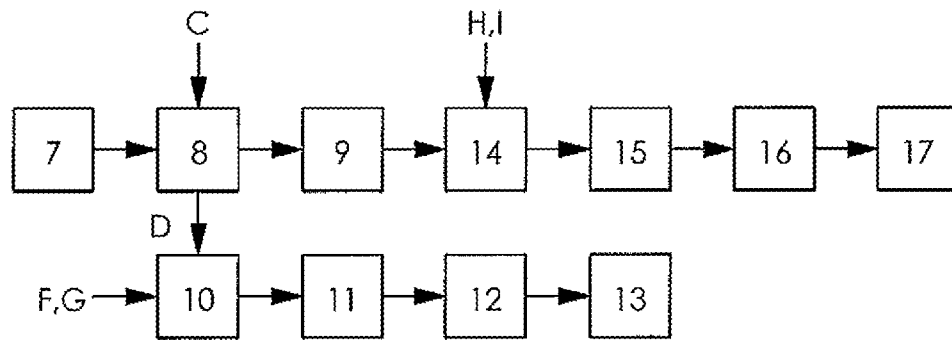


FIG. 6

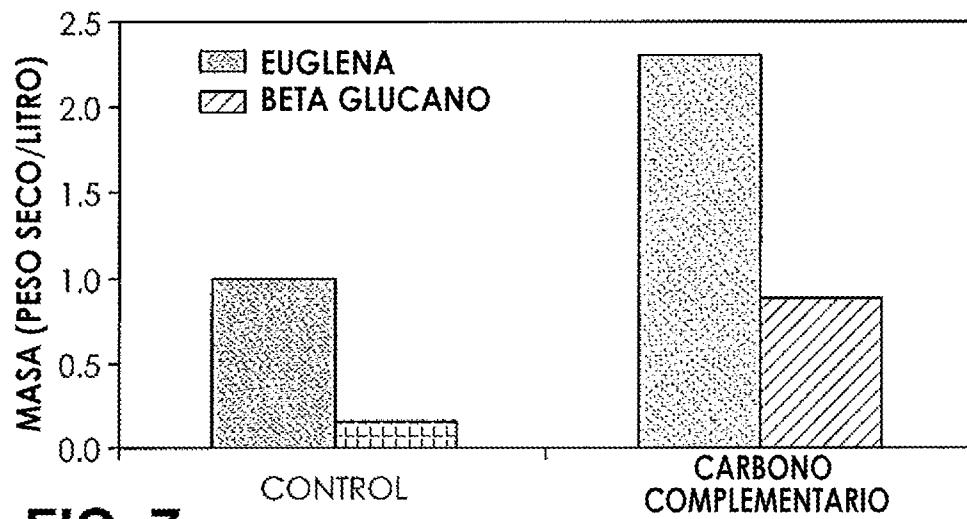


FIG. 7

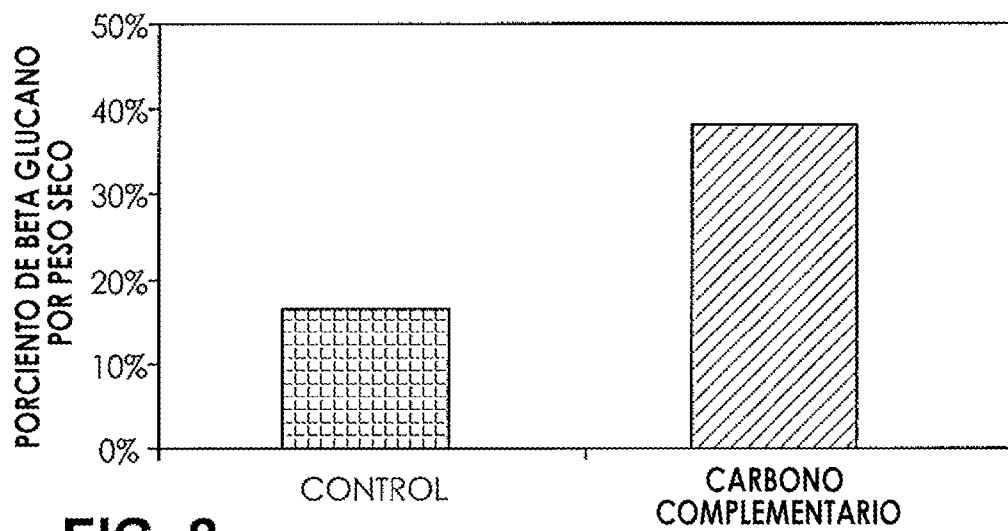


FIG. 8

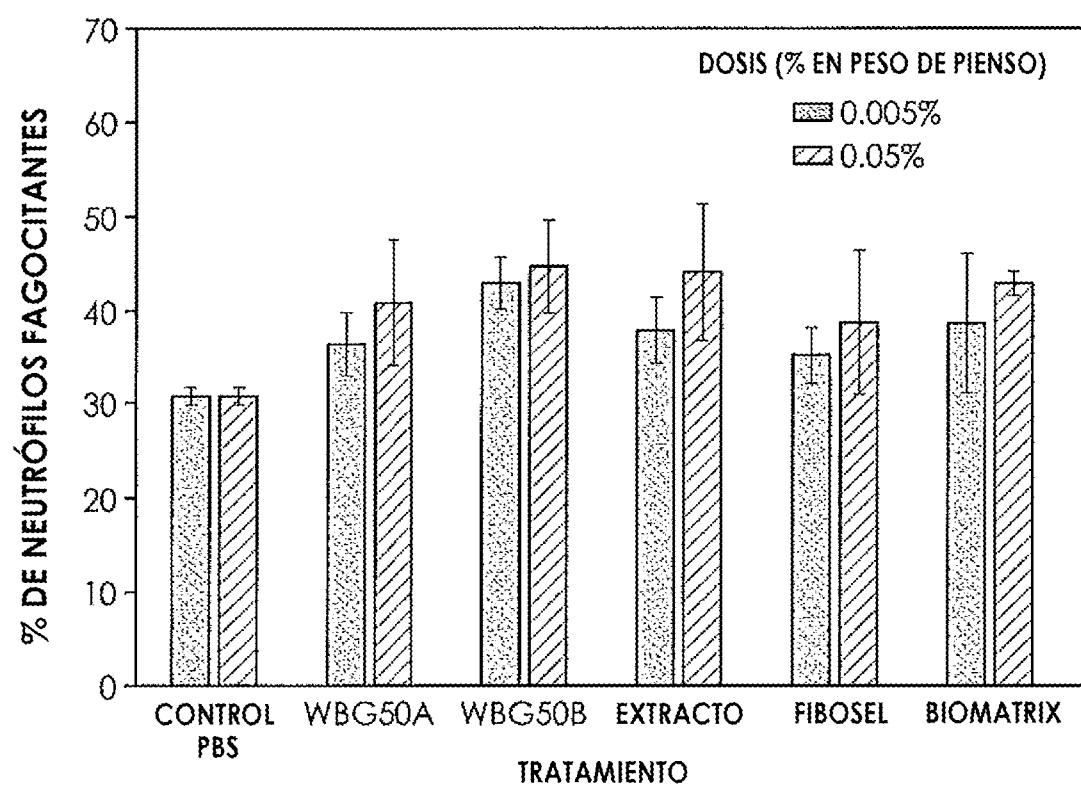


FIG. 9

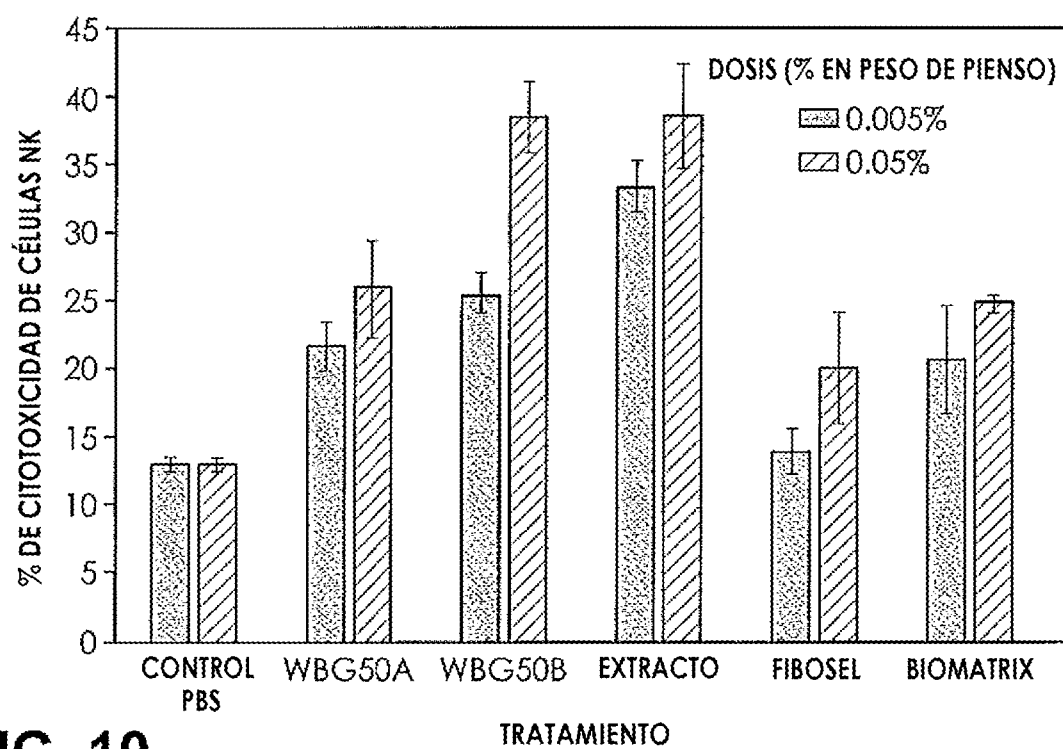


FIG. 10

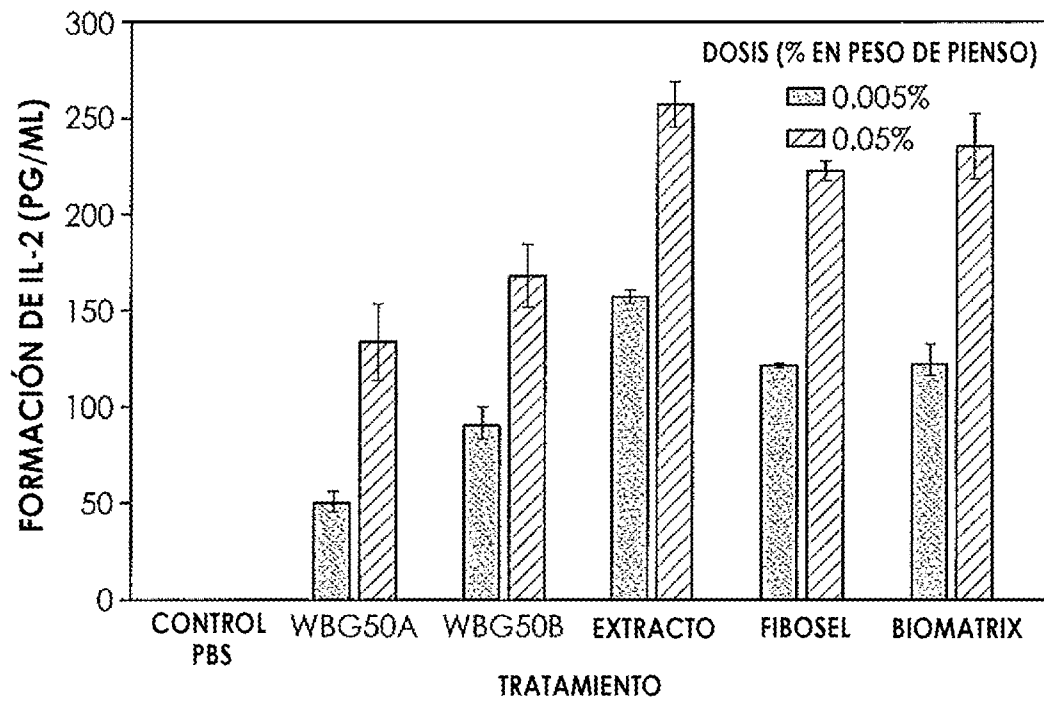


FIG. 11

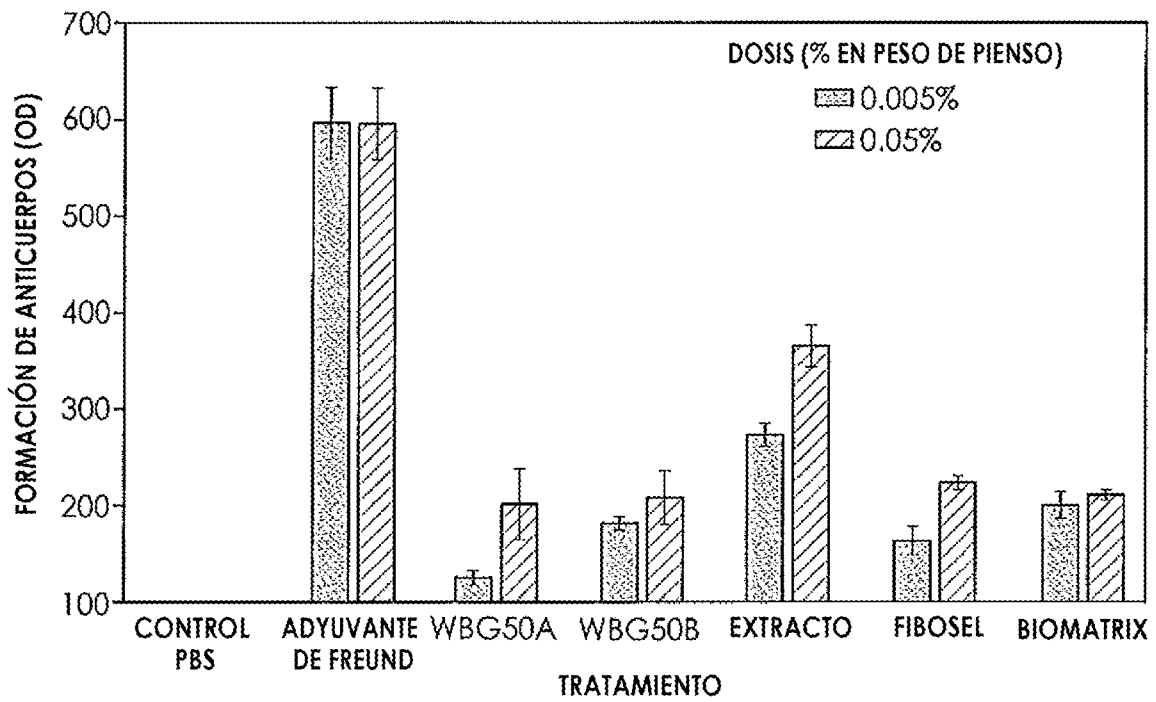
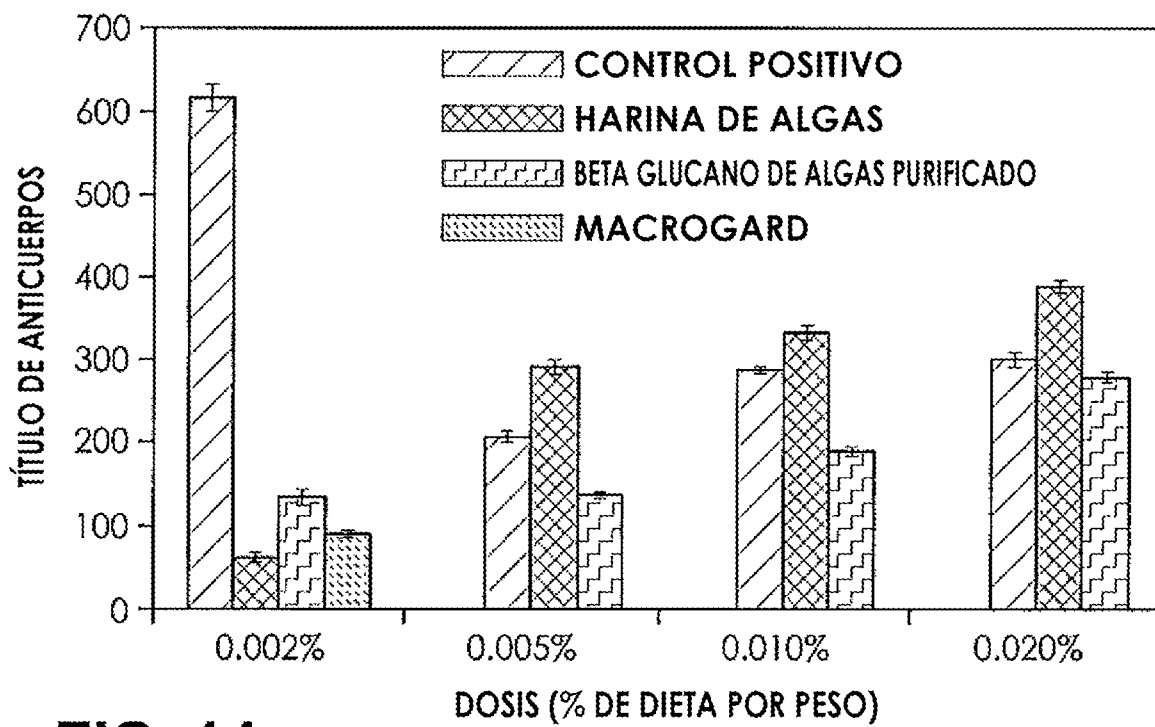
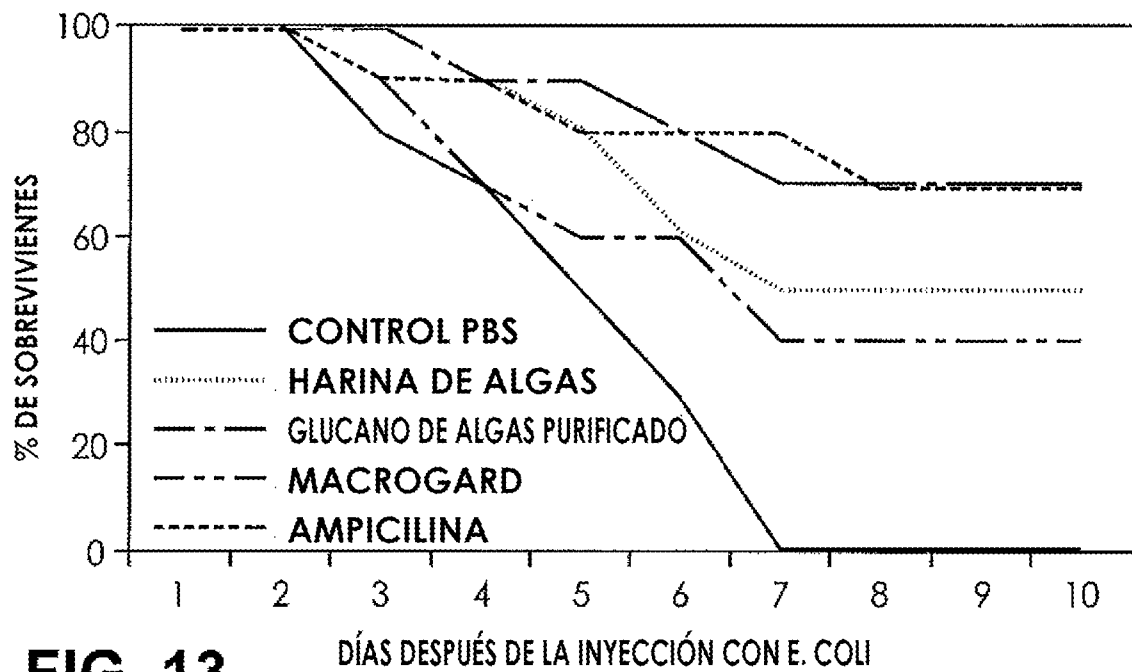


FIG. 12



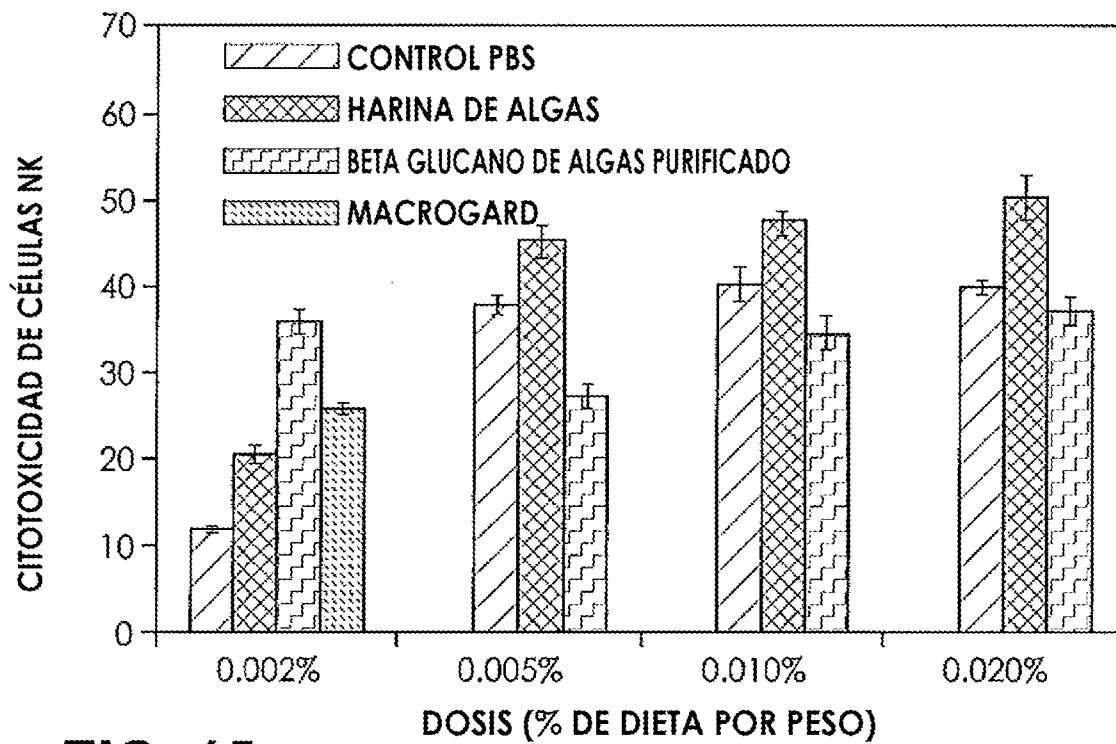


FIG. 15

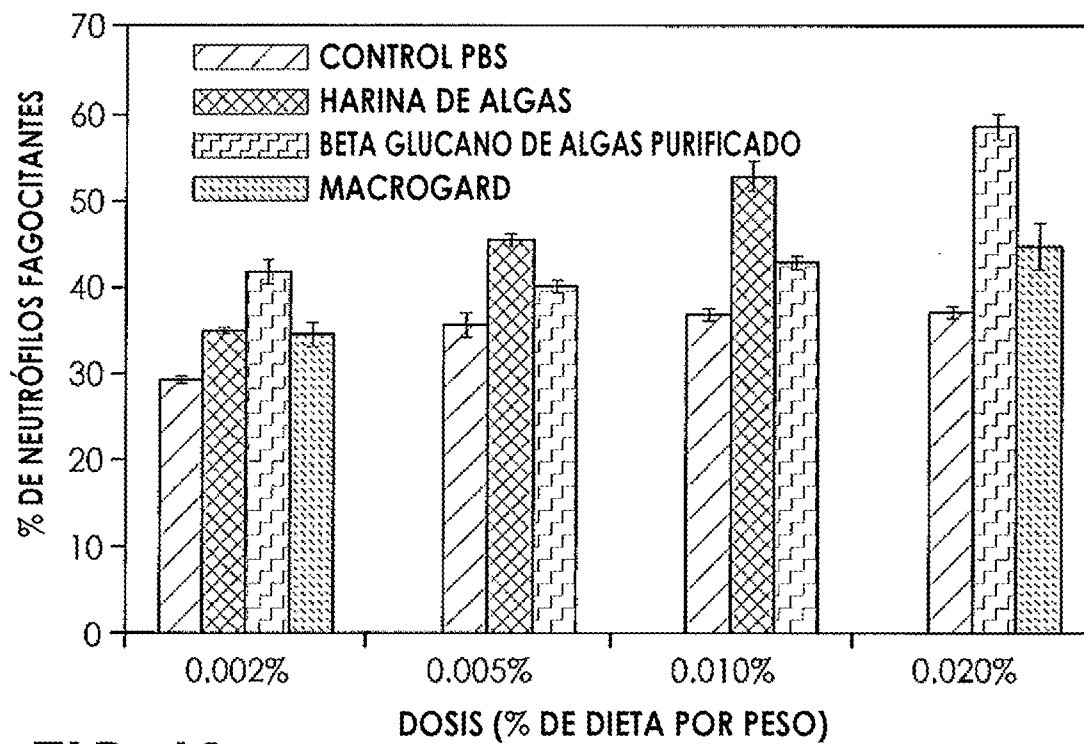


FIG. 16