

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 539**

51 Int. Cl.:

A61K 36/185	(2006.01) A61K 36/515	(2006.01)
A23K 1/14	(2006.01) A61K 36/65	(2006.01)
A23K 1/16	(2006.01) A61K 36/708	(2006.01)
A23K 1/18	(2006.01) A61K 36/45	(2006.01)
A61K 36/63	(2006.01) A61K 36/30	(2006.01)
A61K 36/28	(2006.01)	
A61K 36/61	(2006.01)	
A61K 36/76	(2006.01)	
A61K 36/736	(2006.01)	
A61K 36/355	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05747206 .0**
96 Fecha de presentación: **15.04.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1765371**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.03.2007**

54 Título: **Uso de plantas y extractos vegetales como aditivo de piensos para afectar la fermentación del rumen**

30 Prioridad:

16.04.2004 SE 0400996

45 Fecha de publicación de la mención BOP:

11.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

11.12.2012

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TB Heerlen , NL**

72 Inventor/es:

**BECKER, KLAUS;
DUFFY, CEPTA, D.;
HOFFMANN, ELLEN;
LOSA, RICCARDO;
MOULD, FERGUS, LAURENCE;
MUETZEL, STEFAN;
SECUNDINO, LÓPEZ, PUENTE;
SELJE, NATASCHA y
WALLACE, ROBERT, JOHN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 392 539 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

Uso de plantas y extractos vegetales como aditivo de piensos para afectar la fermentación del rumen

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al uso de un aditivo que contiene uno o más componentes procedentes de materiales vegetales o extractos vegetales a fin de mejorar la energía o retención de nitrógeno de la fermentación del rumen, o para disminuir la acidosis láctica. Los compuestos son adecuadamente administrados de forma oral al rumiante vía el pienso del animal o el agua de beber.

Antecedentes de la invención

10 El rumen es el primer estómago de los rumiantes tales como ganado vacuno, ovejas y cabras. Su estructura e importancia nutricional se describe por Hungate (1966). El rumen permite a estos animales digerir materiales vegetales con contenido elevado de fibra, inadecuados para la mayoría de los animales no rumiantes. El rumen es un gran órgano, que contiene un exceso de 150 kg de digesta en vacas lecheras, en el que se lleva a cabo la digestión por microorganismos. El rumen evolucionó de la manera que lo ha hecho para que el animal se beneficiase de las actividades digestivas de la fibra de los microbios. Los productos finales, ácidos grasos volátiles, son absorbidos a través de la pared del rumen, y se usan para energía y síntesis proteica. El beneficio principal de la fermentación en el intestino anterior del rumen en comparación con la fermentación en el intestino posterior es que las células microbianas formadas durante la fermentación pasan al cuajar, donde son digeridas y sus aminoácidos están disponibles para el animal hospedante. Por lo tanto, el rumen es un órgano muy eficiente en el contexto de la evolución de un herbívoro que subsiste en pastos pobres.

15 La fermentación del rumen también tiene algunas desventajas. Se produce metano como consecuencia natural de la fermentación anaerobia (Hungate 1966). La liberación de metano también representa una pérdida de energía del animal. Además, el metano es un potente gas de efecto invernadero, así que, en este sentido, los rumiantes dañan el medioambiente (Leng, 1992). El rumiante es también menos eficiente que otras especies en la utilización de una proteína dietética. Las pérdidas de nitrógeno de los rumiantes son excepcionalmente elevadas, particularmente en animales de pastoreo (Nolan, 1975). Esto es un problema medioambiental así como económico, debido al impacto de los excrementos ricos en nitrógeno en el medioambiente. Además, hay trastornos digestivos únicos de rumiantes que se producen como consecuencia directa de que la fermentación microbiana del rumen está alterada.

25 Los aditivos químicos y antibióticos para el pienso se han usado en el pasado para aliviar algunos de estos problemas. La presencia de tales materiales en la cadena alimentaria está haciéndose cada vez menos aceptable para las autoridades reguladoras y para el consumidor. De este modo, las soluciones a los problemas de la producción de ganado rumiante debe ser natural y sostenible.

30 La proteína dietética que entra al rumen es rota de una manera aparentemente descontrolada, dando como resultado la formación de amoníaco y la pérdida subsiguiente de nitrógeno en la orina (Nolan, 1975). La baja eficiencia de la retención de nitrógeno, que representa una pérdida económica importante, provoca estrés metabólico en el animal, y también provoca una carga en el medioambiente, por medio de desechos ricos en nitrógeno. Si el proceso de ruptura se pudiese disminuir, estos problemas se reducirían.

35 Además, la segunda posibilidad que existe para mejorar la retención proteica en el rumen es la supresión de la población de protozoos ciliados del rumen. Los protozoos consumen grandes cantidades de bacterias en el rumen, y su ruptura puede dar como resultado una disminución del rendimiento neto de proteína microbiana a partir de la fermentación en el rumen de hasta 50% (Wallace et al., 1997). Si se pudiesen suprimir los protozoos, habría menos formación de amoníaco y menos necesidad de suplementación de proteína dietética.

40 El ácido láctico es normalmente sólo un producto minoritario de la fermentación del rumen. Sin embargo, cuando se introduce demasiado rápidamente un pienso rápidamente degradado, o cuando los concentrados forman una proporción elevada de la dieta, la producción de ácidos grasos volátiles superará la capacidad tamponante del rumen. Esto puede conducir a un valor de pH tan bajo en el rumen que sólo pueden crecer bacterias productoras de ácido láctico (Russell e Hino, 1985).

45 Puesto que el ácido láctico es un ácido más fuerte que los ácidos grasos volátiles, el pH cae aún más, la recuperación de la fermentación normal se hace imposible, y el animal muere. Más típicamente, sin embargo, los rumiantes de dietas muy concentradas sufren acidosis subclínica, que provoca sufrimiento y disminuye la eficiencia de producción aunque no es amenazante para la vida. Los tampones químicos pueden invertir esta condición, pero sería mejor si se pudiese suprimir el crecimiento de bacterias productoras de ácido láctico.

50 La publicación WO 03/094628 describe un intento para reducir la producción de metano que emana de las actividades digestivas de los rumiantes mediante las adiciones de uno o más compuestos de aceites esenciales seleccionados del grupo que consiste en limoneno, eugenol, un salicilato, quinolina, vainilla, timol y un cresol. Al

mismo tiempo, las actividades microbianas en el rumen y la producción de los ácidos grasos volátiles, por ejemplo ácido propiónico, se podrían mantener en un nivel aceptable.

Objetos y resumen de la invención

5 El objeto de la presente invención es enfocarse general y colectivamente en los trastornos digestivos en el rumen y promover la utilización de fuentes de energía y de nitrógeno disponibles para el crecimiento del rumiante. Este objeto se puede lograr favoreciendo la formación de ácidos grasos volátiles, que son absorbidos a través de la pared del rumen y se usan para energía y síntesis proteica, y disminuyendo la ruptura de la proteína dietética y la proteína microbiana. Otros métodos son limitar la metanogénesis y controlar o suprimir las bacterias productoras de ácido láctico.

10 Según la invención, dicho objeto se puede lograr mediante el uso de un aditivo que contiene uno o más componentes de materiales vegetales seleccionados del grupo que consiste en *Lonicera japonica*, *Gentiana asclepidea*, *Gentiana lutea*, *Eugenia caryophyllata*, *Bellis perennis*, *Olea europaea*, *Symphytum officinale*, *Carduus pycnocephalus*, *Paeoniae alba radix*, *Populus tremula*, *Prunus avium*, *Salix caprea*, *Rheum nobile*, *Helianthemum canum*, *Arctostaphylos uvaursi*, *Peltiphyllum peltatum*, *Epilobium montanum*, *Knautia arvensis*, *Latuca sativa* y *Urtica dioica*, y sus extractos, y β -mirceno. La cantidad total de los componentes a administrar a un animal es adecuadamente de 0,02 mg a 20 g por día y kg de peso corporal.

Se ha demostrado que todos los componentes contribuyen esencialmente a la eficiencia de la fermentación en el rumen sin tener ningún inconveniente considerable. Algunos de los componentes suprimen la actividad de protozoos, y otros disminuyen la actividad proteolítica, la actividad metanogénica o la producción de ácido láctico.

20 Descripción detallada de la invención

Puesto que los componentes tienen influencia sobre la fermentación de diferentes maneras, es ventajoso combinar compuestos específicos para optimizar la fermentación según el objeto de la invención.

25 Bastos estudios han mostrado que los componentes de un subgrupo que consiste en materiales vegetales de *Helianthemum canum*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Epilobium montanum*, *Knautia arvensis* y *Peltiphyllum peltatum*, y sus extractos, reducen la proteólisis del rumen. Además, todos estos componentes inhiben la actividad de protozoos, y la mayoría de ellos también tienen influencias beneficiosas sobre otros parámetros esenciales de la fermentación, tales como la producción de metano, la cantidad de ácidos grasos volátiles, la digestibilidad, la biomasa microbiana y/o la eficiencia de la fermentación. Los componentes más adecuados son materiales vegetales procedentes de *Arctostaphylos uva-ursi*, *Knautia arvensis* y *Helianthemum canum*, y sus extractos. Los componentes más preferidos son materiales vegetales de *Knautia arvensis* y sus extractos, especialmente extractos metanólicos.

30 Los materiales vegetales procedentes de *Lonicera japonica*, *Gentiana asclepidea*, *Gentiana lutea*, *Eugenia caryophyllata*, *Bellis perennis*, *Olea europaea* y *Symphytum officinale*, y sus extractos, y β -mirceno, forman otro subgrupo, cuyos componentes suprimen la actividad bacteriolítica de protozoos ciliados en el fluido del rumen. *Eugenia caryophyllata* también aumenta la biomasa microbiana y reduce la producción de metano. *Bellis perennis* tiene una pequeña reducción de la producción de metano, y también mejora la eficiencia de la fermentación y la producción de la biomasa microbiana, mientras que *Symphytum officinale* aumenta la eficiencia de la fermentación y reduce los efectos de la acidosis. β -Mirceno tiene un efecto inhibitorio moderado sobre la actividad protozoica, pero también encuentra uso para la disminución de la producción de metano. Un extracto preparado a partir de las flores de *Lonicera japonica* eliminó la actividad bacteriolítica de protozoos ciliados. Una preparación de semillas de *Lonicera japonica* también redujo la actividad protozoica, pero sólo hasta alrededor de 60%. Los componentes preferidos de este subgrupo son materiales vegetales de *Bellis perennis*, *Eugenia caryophyllata*, *Olea europaea* y *Symphytum officinale*, y sus extractos, especialmente los extractos metanólicos y acuosos de *Bellis perennis* y *Gentiana asclepidea*.

35 Los materiales vegetales de *Carduus pycnocephalus*, *Paeoniae alba radix*, *Populus tremula*, *Prunus avium*, *Salix caprea*, y *Rheum nobile*, y sus extractos, forman un tercer subgrupo, cuyos componentes se usan de forma adecuada para disminuir la actividad metanogénica en la digesta del rumen. Para estos componentes no se han observado efectos perjudiciales importantes sobre otros parámetros de la fermentación. Los componentes preferidos son los materiales vegetales de

40 *Carduus pycnocephalus*, *Populus tremula*, y *Rheum nobile*, y sus extractos, especialmente se prefieren *Carduus pycnocephalus* y *Rheum nobile*.

45 Finalmente, un cuarto subgrupo está formado por materiales vegetales de *Latuca sativa* y *Urtica dioica*, y sus extractos. Estos componentes reducen la actividad y/o la formación de ácido láctico. *Latuca sativa*, algunas veces denominada *Latuca virosa*, también disminuye la producción de metano y las actividades protozoicas, e incrementa la formación de ácidos grasos volátiles. *Urtica dioica* también tiene efectos adicionales, e inhibe la proteólisis y las actividades protozoicas, y favorece la formación de ácidos grasos volátiles.

En una realización adecuada de la invención, el aditivo contiene componentes de más de uno de los subgrupos definidos anteriormente, y puede ser favorable que el aditivo contenga componentes de los cuatro subgrupos. Ventajosamente, el aditivo contiene al menos un componente seleccionado de cada uno de los grupos, que consiste en

- 5 i) materiales vegetales de *Knautia arvensis*, *Arctostaphylos uva-ursi* y *Helianthemum canum*, y sus extractos,
- ii) materiales vegetales de *Bellis perennis*, *Eugenia caryophyllata*, *Olea europaea*, *Lonicera japonica* *Symphytum officinale*, y sus extractos,
- iii) materiales vegetales de *Carduus pycnocephalus*, *Populus tremula*, y *Rheum nobile*, y sus extractos, y
- 10 iv) materiales vegetales de *Latuca sativa* y *Urtica dioica*, y sus extractos. La cantidad total de los componentes que pertenecen a los grupos i)-iv) es adecuadamente de 20-100% en peso, preferiblemente 40-100% en peso de la cantidad total de los componentes presentes según la invención.

15 Los extractos de materiales vegetales según la invención incluyen, pero no se limitan a, concretos, aceites esenciales, resinoides, tinturas, absolutos, y aceites absolutos. Cuando se producen extractos de plantas o partes vegetales, se puede usar agua, disolventes orgánicos, y sus mezclas, según métodos convencionales, pero también se puede aplicar la destilación seca. Los ejemplos de disolventes orgánicos adecuados son metanol, etanol, propanol, butanol, acetato de etilo, metil etil éter, éteres dietílicos, cloruro de metileno, cloroformo, tetracloruro de carbono, benceno, tolueno, éter de petróleo y acetona.

20 La cantidad total de los componentes administrados al animal depende de si los componentes son un compuesto de aceite esencial, extractos de material vegetal, o material vegetal. En el caso de que los componentes sean todos β -mirceno, y/o extractos, entonces la cantidad administrada es normalmente de 0,1-50 mg por día y kg de peso corporal, mientras que, cuando los componentes consisten solamente en material vegetal, la cantidad administrada es normalmente de 0,02-10 g por día y kg de peso corporal.

25 El aditivo puede contener otros ingredientes distintos de los componentes de la invención. De forma adecuada, el aditivo contiene 0,1-100%, preferiblemente 0,2-90% en peso de los componentes, así como agentes que mejoran el crecimiento, saborizantes, soportes absorbentes y/u otros ingredientes del pienso. Preferiblemente, la cantidad total de los agentes mejoradores del crecimiento, los saborizantes, los soportes absorbentes y/o los otros ingredientes del pienso es de 10 a 75% en peso del aditivo. En el caso en el que cualquiera de los componentes sea material vegetal, adecuadamente se secan y se muelen hasta un material en partículas o polvo antes de que se mezclen con los otros ingredientes en el aditivo, si los hay.

30 Los ejemplos de aditivos mejoradores del crecimiento y saborizantes adecuados son cresol, anetol, deca-, undeca- y/o dodecalactonas, iononas, irona, gingerol, piperidina, propilidénftalida, butilidénftalida, capsaicina y/o tanino. El soporte puede contener, por ejemplo, 40-50% en peso de fibras madereras, 8-10% en peso de estearina, 4-5% en peso de polvo de cúrcuma, 4-5% en peso de polvo de romero, 22-28% en peso de piedra caliza, 1-3% en peso de una goma, tal como goma arábica, 5-50% en peso de azúcar y/o almidón, y 5-15% en peso de agua. Los otros

35 ingredientes del pienso se seleccionan adecuadamente del grupo que consiste en vitaminas, enzimas, sales minerales, cereales molidos, componentes que contienen proteína, componentes que contienen hidratos de carbono, moyuelos y/o salvados de trigo. El aditivo se añade adecuadamente a la composición de pienso según la invención en cantidades tales que el pienso normalmente contendrá 0,4 ppm-80% en peso de los componentes.

La composición de pienso contiene habitualmente, calculado en el peso seco del pienso, los siguientes ingredientes:

- 40 a) 0-80% en peso seco de cereales,
- b) 0-30% en peso seco de grasa,
- c) 0-85% en peso seco de sustancias nutritivas que contienen proteína de un tipo distinto de cereales, y
- d) 10 ppm-40% en peso seco de los componentes de la invención.

Las cantidades totales de a)-d) son preferiblemente al menos 50% en peso seco.

45 Cuando se prepara la composición de pienso, el aditivo se puede mezclar con los ingredientes secos que consisten en cereales, tales como trigo molido o triturado, avena, cebada, maíz y arroz; fuentes de proteína vegetal basadas en, por ejemplo, semilla de colza, haba de soja y semilla de girasol; fuentes de proteína animal; molasas; y productos lácteos, tales como diversos polvos de leche y polvos de suero lácteo. Después de mezclar todos los ingredientes secos, se pueden añadir los ingredientes líquidos y los ingredientes, que después de calentarlos se hacen líquido. Los ingredientes líquidos pueden consistir en lípidos, tales como grasa, por ejemplo grasa vegetal,

50 opcionalmente licuada por calentamiento, y/o pueden consistir en ácidos carboxílicos, tales como un ácido graso. Después de un mezclamiento a conciencia, se obtiene una consistencia harinosa o en partículas, dependiendo del grado de molienda de los ingredientes. Para evitar la separación durante el uso, preferiblemente se debería añadir agua al pienso animal, que entonces se somete a un proceso de peletización, expansión o extrusión convencional.

Cualquier exceso de agua se puede eliminar mediante secado. Si se desea, el pienso animal granular resultante también se puede triturar hasta un tamaño más pequeño de partículas. La composición de pienso descrita se administra habitualmente en combinación con forraje verde seco y/o silaje.

- 5 El suplemento de agua de bebida puede contener al menos 1%, adecuadamente 1-99% en peso seco, preferiblemente 10-50% en peso seco, de los componentes. Además de uno o más de los componentes, el suplemento también puede contener 1-99% en peso seco de un gran número de otros ingredientes. Los ejemplos adecuados de otros ingredientes son sales minerales, vitaminas, aditivos que mejoran la salud y el crecimiento, saborizantes, vehículos solubles en agua o dispersables en agua, tales como azúcares, leche en polvo, subproductos lácteos y derivados de celulosa, agentes dispersantes y estabilizantes, tales como polímeros solubles
- 10 en agua o dispersables en agua, y sus mezclas. Cuando se prepara el agua de bebida, el suplemento se añade normalmente al agua en una cantidad tal que la concentración de los componentes es 1 ppm-10% en peso.

Dentro del alcance de la invención, también es posible producir una suspensión de la composición de pienso. Esto es especialmente conveniente si el pienso se prepara para consumo inmediato.

La presente invención se ilustrará ahora adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos.

15 Ejemplos

En los presentes Ejemplos, se llevó a cabo un número de ensayos con muestras de materiales vegetales, extractos de materiales vegetales, y un compuesto de aceite esencial. Las muestras de materiales vegetales se liofilizaron y se molieron, y se hicieron pasar a través de un tamiz de 1 mm. Las muestras fueron según lo siguiente.

Muestra nº	Nombre botánico	Descripción de la muestra
1	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	Hojas y tallo
2	<i>Bellis perennis</i>	Planta, principalmente hojas
3	<i>Carduus pycnocephalus</i>	Mezcla de tallos, hojas y flores
4	<i>Epilobium montanum</i>	Follaje
5	<i>Eugenia caryophyllata</i>	Semilla embrionica seca
6	<i>Gentiana asclepidea</i>	Preparación de hoja y tallo
7	<i>Helianthemum canum</i>	Hojas y flores
8	<i>Knautia arvensis</i>	Escabiosa, completamente sobre el suelo
9	<i>Latuca sativa</i>	Lechuga de jardín, toda sobre el suelo
10	<i>Lonicera japonica</i>	Hojas, tallos y flores
11	<i>Lonicera japonica (flor)</i>	Extracto de flores
12	<i>Lonicera japonica + Magnolia officinalis</i>	Hojas secas y flores
13	β -Myrcene	Compuesto de aceite esencial
14	<i>Olea europaea</i>	Hojas secas
15	<i>Paeoniae alba radix</i>	Raíz
16	<i>Peltiphyllum peltatum</i>	Completamente sobre el suelo
17	<i>Populus tremula</i>	Preparación de hojas y tallo
18	<i>Prunus avium</i>	Principalmente hojas y pequeños tallos
19	<i>Rheum nobile</i>	Hojas y tallo
20	<i>Salix caprea</i>	Principalmente hojas y pequeños tallos
21	<i>Symphytum officinale</i>	Planta completamente sobre el suelo
22	<i>Urtica dioica</i>	Ortigas

Los efectos sobre la digesta del rumen de las muestras 1-22 según la presente invención se ensayaron con respecto a la actividad bacteriológica de protozoos ciliados del rumen, a la actividad proteolítica de la digesta del rumen, a la formación de metano provocada por la digestión del rumen, a la acidosis láctica y a la formación de ácidos grasos volátiles, así como con respecto a otros efectos sobre la fermentación. En los ensayos se aplicaron las siguientes metodologías.

Actividad bacteriolítica de protozoos ciliados del rumen

La tasa de ruptura de *Selenomonas ruminantium* marcada con [¹⁴C]leucina se determinó incubando in vitro fluido ruminal colado con *S. ruminantium* marcado en presencia de 5 mM de L-leucina sin marcar, como se describe previamente (Wallace y McPherson, 1987). En estas condiciones, la gran mayoría de la ruptura proteica bacteriana está provocada por la ingestión y digestión de bacterias por protozoos ciliados. Excepto que se señale de otro modo, las muestras se añadieron a una concentración de 5 mg/ml. Las ovejas recibieron una dieta mixta de heno de pasto:concentrado (Frumholtz et al., 1989).

Persistencia de la actividad antiprotozoica

Las muestras se sometieron a una preincubación con tampón de Coleman, fluido ruminal o agua durante 24 h, y después se incubaron subsiguientemente con fluido ruminal reciente en el ensayo de bacteriolisis descrito anteriormente.

Actividad proteolítica de la digesta ruminal

Método 1. Para determinar la actividad proteolítica usando el método de ¹⁴C-caseína de Wallace (1983), se usó fluido ruminal colado procedente de las mismas ovejas. Las muestras se añadieron hasta una concentración de 2,5 mg/ml, y se usó un tiempo de incubación de 1 h.

Método 2. Basado en Hoffman et al. (2003a,b). Como animales donantes, se usaron cinco vacas Holstein lactantes fistuladas, alimentadas con una dieta para vacas lecheras típica. Se extrajo manualmente fluido del rumen antes de la alimentación matutina. El fluido del rumen se filtró a través de una malla de nailon de 100 µm y se mezcló con tampón de incubación al 10% (v/v). El fluido tamponado del rumen en un volumen de 75 ml se dispensó en las botellas de incubación (RPT) que contienen una mezcla de sustrato de 450 mg de silaje de maíz, 225 mg de grano de cebada (ambos molidos para pasar un tamiz de 1 mm), y un suplemento proteico compuesto de 150 mg de harina de haba de soja bruta sin grasa y 10 mg de seroalbúmina bovina. Este sustrato, sin adición de las plantas de ensayo, se incubó como control negativo. Cuando se añadieron las plantas de ensayo, sustituyeron al silaje. La monensina usada como control positivo se disolvió en etanol (14 mg/ml), y se dosificaron 11,25 µl de esta disolución madre en cada matraz inmediatamente después de llenarlos hasta una concentración final de 3 µM de monensina. Todos los matraces se incubaron a 39°C durante 12 h. Se tomaron como muestras dos réplicas de cada tratamiento a intervalos regulares, mientras que una tercera subréplica se reservó para la lectura de gas. En cada tiempo de toma de muestras, se extrajeron 2 x 900 µl de la botella de incubación con agitación vigorosa y se prepararon para la determinación de la concentración de SCFA, amoníaco y proteína. SDS-PAGE se llevó a cabo mediante el método de Laemmli, y la cuantificación de proteína total mediante transferencia de punto según Hoffman et al. (2002).

Efectos generales sobre la fermentación ruminal

Métodos de Hohenheim para efectos generales sobre la fermentación

Diseño experimental:

Sistema de incubación: Técnica de Presión de Reading (RPT), 75 ml, tiempo total del experimento 24 h

Animales donantes: 3 vacas Holstein no lactantes

Sustrato basal: Silaje de pasto 0,750 g (control)

Nivel de inclusión de plantas de ensayo: 10% (sustitución de silaje)

Lecturas de gas: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24 h

Toma de muestras: 24 h para SCFA y TD (tratamiento NDS en bolsas de nailon)

6, 8, 10 h para SCFA (900 µl) y ARN (30 µl, máximos analizados).

Paralelos: 3 experimentos independientes (3 animales donantes diferentes) por duplicados

Tampón de RPT

ES 2 392 539 T3

Componentes	Molaridad	Conc. final
Bicarbonato de amonio	60,1	13,5 mM
Bicarbonato de sodio	84,0	86,5 mM
Hidrogenofosfato disódico	142,0	5,5 mM
Dihidrogenofosfato potásico	136,1	9,5 mM
Sulfato de magnesio 7xH ₂ O	246,5	0,5 mM
Microminerales		0,020%
Resazurina al 1%		0,001%
d H ₂ O		
Disolución reductora		6%
Volumen total del fluido ruminal		10%

Disolución reductora		
Componentes	MW	Conc. final
Cisteína HCl	52,9	0,118 M
NaOH 1M	40,0	0,040 %
Na ₂ S	240,2	0,026 N
Volumen total	completar con dH ₂ O	
0,5x Microminerales		
Componentes	MW	Conc. final
Cloruro de calcio 2xH ₂ O	147,0	0,45 M
Cloruro de manganeso 4xH ₂ O	197,9	0,25 M
Cloruro de cobalto 6xH ₂ O	237,9	0,02 M
Tricloruro férrico 6xH ₂ O	270,3	0,15 M
Volumen total	completar con dH ₂ O	

Descripción detallada de los métodos:

Incubación *in vitro*

5 El fluido del rumen se recogió de vacas canuladas que recibieron una mezcla de heno de silaje de pasto a una alimentación de mantenimiento en dos porciones iguales a 8:00 y 16:00. El fluido del rumen se recogió antes de la alimentación en botellas de termo, se filtró a través de una malla de nailon de 100 µm y se añadió a una disolución mineral con tampón reducida. Todas las etapas se llevaron a cabo a 39°C en CO₂, para mantener las condiciones anaerobias.

10 Los sustratos se incubaron a una relación de 10 mg/ml de medio, es decir, se incubaron 750 mg de sustrato con 75 ml de fluido de rumen tamponado que contiene 7,5 ml de fluido de rumen filtrado (10% v/v de fluido de rumen).

El volumen o la presión de gas se registró frecuentemente a 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, y 24 horas de incubación, y se tomaron muestras después de 6, 8, 10 y 24 horas.

Análisis

La presión de gas se registró en las botellas de suero del sistema de RPT y se convirtió en volumen usando una curva de calibración determinada experimentalmente. Después de cada medición, el gas se liberó de las botellas de suero. La digestibilidad verdadera *in vitro* se determinó transfiriendo el contenido de incubación a bolsas de poliéster pesadas previamente (Ankom 51 μm de tamaño de poros). Las bolsas se cerraron herméticamente por calor, se cocieron en disolución detergente neutra durante 1 hora, se secaron a 105°C toda la noche, y se pesaron para la determinación de la digestibilidad. Los SCFAs se determinaron mediante cromatografía de gases usando una columna de acero inoxidable empaquetada con GP 10% SP 1000 1% H_3PO_4 , Chromosob W AW (Suppelco Inc. Bellefonte, PA). A 0,9 ml del sobrenadante de incubación se añadió 0,1 ml de ácido fórmico que contiene el patrón interno (ácido metilbútrico al 1%). Las proteínas se precipitaron toda la noche a 4°C. Las muestras se centrifugaron (30.000 g, 10 min., 4°C), y el sobrenadante se recogió para el análisis en viales de GC apropiados.

El ARN se extrajo según el protocolo modificado de extracción con fenol-cloroformo. Se añadieron a las muestras (300 μl) 600 μl de fenol pH 5,1, 270 μl de tampón de pH 5,1, 30 μl de SDS (20% p/v) y 1,0 g de perlas de circonio. Las células se lisaron golpeando a las muestras durante 2 x 2 minutos en una batidora de perlas (50 Hz), interrumpido por una incubación durante 10 min. a 60°C. Las muestras se enfriaron en hielo durante 10 min., y se añadieron 300 μl de cloroformo. Después de agitar vigorosamente y otros 10 min. a RT, las muestras se centrifugaron (10.000 g, 5 min., 4°C) para separar las fases acuosa y orgánica. La fase acuosa se eliminó cuantitativamente y se transfirió a un vial que contiene 300 μl de acetato de amonio (7,5M) y 900 μl de isopropanol. Las muestras se incubaron toda la noche a -20°C, y los ácidos nucleicos se precipitaron mediante centrifugación (16.000 g, 10 min., 4°C). El sobrenadante se descartó, y las muestras se lavaron una vez en etanol al 80%. Los ácidos nucleicos se cargaron en geles de agarosa y se cuantificaron densitométricamente después de tefir con bromuro de etidio frente a una curva de calibración (25-300 ng/ μl).

Métodos de lectura para efectos generales sobre la fermentación

Se llevó a cabo una serie de trece fermentaciones consecutivas, una por semana, usando la Técnica de Presión de Lectura [RPT], para identificar los efectos potenciales de la inclusión de estos materiales de ensayo en las características de fermentación y degradación de un forraje basal [silaje de maíz]. Todos los materiales se examinaron por triplicado y a dos niveles de inclusión [100 y 400 mg g^{-1} de sustrato DM], con la excepción de β -mirreno [niveles de inclusión de 10 y 40 mg g^{-1}]. El silaje de maíz se secó previamente y se molió para que pasara un tamiz de 2 mm. Se colocó en cada matraz de fermentación un total de 1,0 g de sustrato mezclado [silaje más sustrato]. Entonces se añadió medio de incubación tamponado [90 ml], los matraces se cerraron herméticamente y se almacenaron toda la noche a temperatura ambiente. Antes de la inoculación con fluido de rumen preparado, los contenidos del matraz se calentaron hasta 39°C. El fluido del rumen se obtuvo manualmente [contenidos exprimidos a mano] antes de la alimentación [07.00 h] de dos vacas lecheras lactantes a las que se les ofreció *a voluntad* una ración de silaje de maíz/pasto:concentrado [60:40]. El fluido se filtró a través de dos capas de muselina, y se mantuvo en CO_2 a 39°C hasta el uso. A cada matraz se añadieron 10 ml de fluido preparado, y se incubaron a 39°C durante todo el estudio. En cada experimento se incluyeron seis controles negativos [medio tamponado más fluido de rumen solamente], para corregir los valores de gas y los restos de la degradación para los efectos directos del fluido del rumen. Además, en todos los experimentos [seis matraces por experimento], se incluyó un silaje de maíz no suplementado [1,0 g matraz $^{-1}$]. Los resultados en los estudios se expresaron con respecto a los valores de control positivo.

Las lecturas de la presión del gas del espacio superior se obtuvieron 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 21 y 24 horas después de la inoculación. Después de la última medición, se tomaron como muestra aproximadamente 3,0 ml de medio de fermentación de cada matraz y se aumentó de volumen mediante material de ensayo/nivel de inclusión y se almacenó congelado [-20°C] hasta el análisis posterior para determinar la composición de VFA usando un cromatógrafo de gases Varian 3600 GC. Los residuos de la fermentación se recuperaron filtrando los contenidos del matraz a través de crisoles Gooch de 60 ml [porosidad 1, 100 a 160 μm] en ligero vacío. Los residuos se secaron entonces [100°C durante 24 horas], se pesaron, se pirolizaron [500°C toda la noche] y se volvieron a pesar. La cantidad de materia seca [DM] y materia orgánica [OM] determinada se usó para evaluar iDMD e iOMD [degradación *in vitro* de DM y de OM, respectivamente]. El grado [ml de gas g^{-1} OM incubada] y la tasa de liberación de gas de fermentación [ml h^{-1}] se generaron usando una función cuadrática derivada previamente para convertir la presión en volumen. La eficiencia de la fermentación [FE] del pienso se estimó como iDMD [g kg^{-1}]/liberación de gas acumulado [ml] a 24 h después de la inoculación. Las diferencias estadísticas entre las medias de tratamiento y el control positivo [silaje de maíz solo] se evaluaron usando la prueba de la t de Student y la significancia declarada a $P > 0,05$.

Métodos de León para efectos generales sobre la fermentación

Ovejas con el rumen canulado, alimentadas con una dieta que consiste en 75% de heno de alfalfa y 25% de cebada (acceso libre a suplementos vitamínicos y minerales y a agua), se usaron como donantes para el fluido ruminal. El fluido ruminal se recogió justo antes de la comida matutina.

El sustrato usado para los cultivos por lotes consistió en 50% de heno de alfalfa, 40% de heno de pasto y 10% de grano de cebada, molido en un molino de martillo con un tamiz de 1 mm. La cantidad de sustrato usada fue 500 mg, y la tasa de inclusión de la planta de ensayo fue 10% (aprox. 50 mg). Ambos se pesaron en botellas de suero, en las que se dispensaron anaeróbicamente 50 ml de fluido ruminal tamponado (que contiene 10 ml de fluido ruminal

filtrado y 40 ml del medio descrito por Goering y Van Soest, 1970). Las botellas se cerraron herméticamente y se incubaron a 39°C. Después de 24 h de incubación, se registraron las siguientes medidas:

- Producción de gas total (ml), usando un transductor de presión y recogiendo el gas en una jeringuilla calibrada.
- 5 - pH en el medio de incubación.
- Concentración de ácidos grasos volátiles en el medio de incubación, mediante GC (el VFA también se midió en el tiempo de inoculación para calcular la producción de VFA después de 24 h).
- Residuo de incubación de DM, filtrando los contenidos de las botellas en crisoles sinterizados y pesando el residuo después de secar. Después, se determinó el contenido de fibra detergente neutro (NDF) del residuo para calcular la cantidad de NDF sin degradar. A partir de esto, se estimó la desaparición de DM y de NDF.

Se incubaron tres réplicas por planta, y se usaron blancos (sin sustrato ni planta) y controles (500 mg de sustrato sin ninguna planta, y 550 mg de sustrato sin ninguna planta).

Formación de metano por digesta ruminal

Las incubaciones llevadas a cabo por el método general de León se analizaron para determinar la formación de metano. Se tomó para análisis subsiguiente una muestra representativa del gas producido. La toma de muestras se llevó a cabo usando jeringuillas de vidrio especiales herméticas a gas, equipadas con una válvula que permite encerrar y almacenar la muestra. La muestra se recogió directamente del espacio superior, después de insertar la aguja a través del tabique del tapón, tomando una muestra en la jeringuilla y cerrando la válvula. Esta muestra se recogió después de medir la producción de gas total, suponiendo que el consumo de gas fue el mismo en el gas liberado y en aquel que queda en el espacio superior.

La concentración de metano en el gas producido se determinó mediante cromatografía de gases. La muestra de gas (300 a 500 μ l) se inyectó directamente desde la jeringuilla hermética a gas al puerto correspondiente. Las configuraciones de los parámetros de GC usadas para el análisis fueron:

Instrumento: Shimadzu GC-14B proporcionado con un detector de ionización de llama (FID)

25 Columna: columna de acero inoxidable de 2,3 metros de longitud x 2,1 mm de diámetro interno empaquetada con fase estacionaria de Carboxen 1000 de malla 60/80

Gas portador: helio, caudal (100 kPa), modo de flujo constante

Temperaturas:

Detector: FID. Temperatura 200°C, caudal de aire sintético (50 kPa), caudal de H₂ (50 kPa)

30 Inyector: Temperatura 200°C

Horno de la columna: 170°C (isotermo)

El patrón usado para la calibración fue metano puro (99,9%). La curva patrón se estableció representando gráficamente una regresión lineal de las cantidades de patrón inyectadas de metano frente al área de los picos para obtener el factor de respuesta.

35 Ensayo de acidosis

Se usó un modelo en el que la disminución en el pH del medio de incubación y la concentración de ácido láctico producido, con respecto a los controles durante un período de fermentación de 48 h, proporcionó una indicación de la capacidad de los sustratos de ensayo para contrarrestar los efectos acidóticos potenciales. En este estudio se usó grano de trigo molido [2 mm] como el sustrato basal, y los materiales de ensayo se incluyeron a 100 mg g⁻¹ DM [o 10 mg g⁻¹ DM β -mirceno]. Como antes, a cada matraz se añadió 1,0 g de sustrato total. Para mejorar la producción de ácido láctico, la disolución de tampón preparada se diluyó al 50 por ciento. Esto se hizo para asegurarse de que se excedió la capacidad tamponante del medio de incubación, y de que la disminución resultante del pH alentó el crecimiento de lactobacilos y otras bacterias productoras de ácido láctico. El fluido ruminal se obtuvo y se preparó como se describió previamente, excepto que a las dos vacas usadas se les ofreció una ración de lactancia temprana con un nivel elevado de trigo molido grueso. Las medidas del pH del fluido se tomaron una hora después de la inoculación [pH de partida], y después de 23 y 47 horas más tarde, insertando un electrodo de pH directamente en cada matraz. Inmediatamente después de la última medición, se tomaron aproximadamente 3,0 ml de fluido de cada matraz, se aumentó en volumen mediante la muestra y se congeló almacenado a -20°C hasta que se analizó enzimáticamente para la determinación de ácido L [•] láctico.

Los resultados se presentan como diferencias absolutas con respecto a los controles. Se identificó un efecto positivo sobre la acidosis como disminución de la tasa reducida del pH a 24 h, un mayor pH de punto final y una concentración reducida de ácido láctico.

Resultados

- 5 Los resultados obtenidos de las medidas de las actividades de fermentación se muestran en las Tablas 2a, 2b y 2c más abajo.

Los resultados obtenidos en el ensayo de protozoos, el ensayo proteolítico mediante el método 1, y en la formación de metano, se muestran en las mismas tablas.

- 10 Los efectos de plantas/extractos vegetales seleccionados a diferentes tasas de inclusión sobre la actividad bacteriolítica de los protozoos in vitro se muestran en la Fig. 1 a Fig. 7. La persistencia de la actividad bacteriolítica de los protozoos fue mayor en el fluido ruminal que en tampón o en agua, particularmente con *G. asclepiadea* (Tabla 1). En la Fig. 8 se muestra la influencia de *K. arvensis*.

Tabla 1. Influencia de la preincubación en fluido ruminal o tampón de Coleman sobre la capacidad de las muestras para inhibir la actividad bacteriolítica de protozoos ciliados ruminales

Actividad bacteriolítica (% de actividad en control sin adición o preincubación)	<i>Bellis perennis</i>	<i>Gentiana asclepiadea</i>
Control, sin adición	100	100
+ aditivo, sin preincubación	0	42
+ aditivo, 24h de preincubación en RF	0	20
+ aditivo, 24h de preincubación en tampón de Coleman	13	28
+ aditivo, 24h de preincubación en agua	24	68

15

Tabla 2a. Efectos de materiales vegetales, extractos vegetales o componentes de idéntica naturaleza seleccionados sobre la fermentación. Los valores ausentes de material vegetal son 100.

Efectos generales sobre la fermentación		Muestra nº							
	Cantidad en el pienso, %	1	2	3	4	5	6	7	8
Dieta de Reading									
Digestión de materia seca	10	95	97	99	93		102	85	99
	40	82	106	99	84		98	43	96
Gas acumulativo, 24 h	10	86	97	92	85		96	79	96
	40	72	88	88	68		92	42	90
Eficacia de la fermentación	10	110	100	108	110		106	107	103
	40	114	121	112	124		106	101	107
Dieta de Hohenheim									
Digestibilidad	10	102	102	103	103	103	101	103	102
Producción de gas	10	105	102	108	108	103	104	108	99
Eficacia de la fermentación	10	97	100	95	95	99	97	95	102
SCFA	10	110	118	124	124	106	111	119	96

Efectos generales sobre la fermentación		Muestra nº							
	Cantidad en el pienso, %	1	2	3	4	5	6	7	8
C3/C2	10	106	102	108	108	95	97	107	96
Dieta de Leon									
Digestibilidad	10	104	105	106	106	97	102	103	105
Digestibilidad ap.	10	95	98	97-107	101	94	98	96	101
Producción de gas	10	105	103	104	104	102	104	103	96
Eficacia de la fermentación	10	100	102	102	102	96	98	101	115
Biomasa microbiana	10	104	108	110	110	98	97	105	125
C3/C2	10	101	100	95	95	102	100	99	96
TV FA	10	108	102	106	106	90	97	104	108
Efectos específicos sobre la fermentación									
Actividad protozoica	5 mg/ml	87	7	84	70	2	4	73	82
Formación de metano, Leon	10% de pienso	83	94	70-92	102	93	106	90	97
Proteolisis, Método 1		79	90	87	76	102	104	78	105
Acidez, 24h		99	77	76	88	61	79	80	89
48h		100	77	71	100	51	82	70	84

Tabla 2b. Efectos de materiales vegetales, extractos vegetales o componentes de idéntica naturaleza seleccionados sobre la fermentación. Los valores ausentes de material vegetal son 100

Efectos generales sobre la fermentación		Muestra nº							
	Cantidad en el pienso, %	9	10	11	12	13	14	15	16
Dieta de Reading									
Digestión de materia seca	10	102	99	98	97	103	92	104	90
	40	109	106	98	89	89	89	112	49
Gas acumulativo, 24 h	10	95	95	91	90	100	84	100	88
	40	79	91	82	82	82	63	107	51
Eficacia de la fermentación	10	107	104	108	107	103	110	104	102
	40	139	116	119	109	109	141	104	96
Dieta de Hohenheim									
Digestibilidad	10	102	100	97	99	100	101	99	102
Producción de gas	10	100	98	99	106	101	111	104	103

Efectos generales sobre la fermentación		Muestra nº							
	Cantidad en el pienso, %	9	10	11	12	13	14	15	16
Eficacia de la fermentación	10	102	102	98	94	99	91	94	99
SCFA	10	98	105	97	103	103	110	105	118
C3/C2	10	98	98	97	98	104	103	100	102
Dieta de Leon									
Digestibilidad	10	102	105	95	97	102	100	104	103
Digestibilidad ap.	10	96	100	98	97	93	93	110-113	107
Producción de gas	10	107	98	98	99	97	106	95	98
Eficacia de la fermentación	10	97	106	98	99	109	96	117	105
Biomasa microbiana	10	102	112	93	94	115	95	116	110
C3/C2	10	105	111	106	105	105	109	105	95
TVFA	10	105	94	99	103	96	108	120	97
Efectos específicos sobre la fermentación									
Actividad protozoica	5 mg/ml	67	40	18	5	68	12	103	83
Formación de metano, Leon	10% de pienso	86	108	106	108	90	100	46-92	93
Proteolisis, Método 1		154	112	113	92	110	70	83	73
Acidez, 24h		58	106	91	87	105	97	108	66
48h		63	100	92	82	115	91	109	91

Tabla 2c. Efectos de materiales vegetales, extractos vegetales o componentes de idéntica naturaleza seleccionados sobre la fermentación. Los valores ausentes de material vegetal son 100

Efectos generales sobre la fermentación		Muestra nº					
	Cantidad, %	17	18	19	20	21	22
Dieta de Reading							
Digestión de materia seca	10	96	99	97	97	93	99
	40	97	98	90	81	90	89
Gas acumulativo, 24 h	10	93	98	90	89	87	90
	40	84	89	64	76	80	78
Eficacia de la fermentación	10	104	100	107	109	108	110
	40	115	110	141	107	112	115
Dieta de Hohenheim							
Digestibilidad	10	100	101	97	102	101	100

Efectos generales sobre la fermentación		Muestra nº					
	Cantidad, %	17	18	19	20	21	22
Producción de gas	10	99	103	96	102	105	99
Eficacia de la fermentación	10	101	98	102	101	96	101
SCFA	10	107	101	98	103	105	107
C3/C2	10	100	93	100	91	97	100
Dieta de Leon							
Digestibilidad	10	99	103	102	105	99	99
Digestibilidad ap.	10	97-105	90-106	89-106	78-102	78	95
Producción de gas	10	95	100	104	109	98	95
Eficacia de la fermentación	10	104	104	99	96	100	104
Biomasa microbiana	10	102	107	107	102	96	102
C3/C2	10	103	92	107	99	86	103
TVFA	10	104	105	98	103	93	104
Efectos específicos sobre la fermentación							
Actividad protozoica	5 mg/ml	84	83	57	76	13	83
Formación de metano, Leon	10% de pienso	74-89	79-85	75-78	70-86	78	93
Proteolisis, Método 1	2,5 mg/ml	87	120	97	97	105	83
Acidez, 24h		78	82	69	72	14	77
48h		73	74	53	56	58	79

De los resultados obtenidos, es evidente que los componentes ensayados de la invención tienen efectos positivos sobre la fermentación del rumen, efectos los cuales apoyarán los objetos de la presente invención.

Bibliografía citada

- 5 Hoffman EM, Meutzel S, Becker K (2002), A modified dot-blot method of protein determination applied in the tannin-protein-precipitation assay to facilitate the evaluation of tannin activity in animal feeds, Br. J. Nutr. 87: 421-426
- Hoffman EM, Meutzel S, Becker K (2003), Effects of Moringa oleifera seed extract on rumen fermentation *in vitro*, Arch. Anim. Nutr. 57: 65-81
- 10 Hoffman EM, Meutzel S, Becker K (2003), The fermentation of soybean meal by rumen microbes *in vitro* reveals different kinetic features for the inactivation and the degradation of trypsin inhibitor protein, Anim. Feed Sci. Technol. 106: 189-197
- Hungate RE (1966), The rumen and its microbes, Academic Press, New York and London Leng RA (1992), Ruminant production and greenhouse gas emissions, Proc. NZ Soc. Anim. Prod. 52 (Supl.): 15-23
- 15 Nagaraja TG, Newbold CJ, Van Nevel CJ, Demeyer DI (1997), Manipulation of ruminal fermentation, en The rumen microbial ecosystem, ed. Hobson PN y Stewart CS, Chapman&Hall, Londres p. 523-632
- Nolan JV (1975), Quantitative models of nitrogen metabolism in sheep, in Digestion and Metabolism in the Ruminant, ed. McDonald IW y Warner ACI, University of New England Publishing Unit, Armidale, Australia p. 416-431
- Russell JB, HinoT (1985), Regulation of lactate production in Streptococcus bovis: aspiraling effect that contributes to rumen acidosis, J. Dairy Sci. 68: 1712-1721

Wallace RJ, McPherson CA (1987), Factors affecting the rate of breakdown of bacterial protein in rumen fluid, Br. J. Nutr. 58: 313-323

Wallace RJ (1983), Hydrolysis of 14 C-labelled proteins by rumen micro-organisms and by proteolytic enzymes prepared from rumen bacteria, Br. J. Nutr. 50: 345-355

- 5 Wallace RJ, Onodera R, Cotta MA (1997), Metabolism of nitrogen-containing compounds, in The rumen microbial ecosystem, ed. Hobson PN y Stewart CS, Chapman & Hall, Londres p. 283-328

REIVINDICACIONES

1. Uso de un aditivo que contiene uno o más materiales vegetales o extractos vegetales para afectar a la fermentación del rumen y para incrementar la disponibilidad de fuentes de energía y de nitrógeno para un rumiante, caracterizado porque el uno o más materiales vegetales o extractos vegetales se seleccionan del grupo que consiste en *Lonicera japonica*, *Gentiana asclepidea*, *Gentiana lutea*, *Eugenia caryophyllata*, *Bellis perennis*, *Olea europaea*, *Symphytum officinale*, *Carduus pycnocephalus*, *Paeoniae alba radix*, *Populus tremula*, *Prunus avium*, *Salix caprea*, *Rheum nobile*, *Helianthemum canum*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Peltiphyllum peltatum*, *Epilobium montanum*, *Knautia arvensis*, *Latuca sativa* y *Urtica dioica*, y sus extractos, y β -mirceno.
2. Uso según la reivindicación 1, caracterizado porque los componentes seleccionados contienen uno o más componentes del subgrupo que consiste en material vegetal de *Helianthemum canum*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Epilobium montanum*, *Knautia arvensis* y *Peltiphyllum peltatum*, y sus extractos, para disminuir la actividad proteolítica de la digestión ruminal.
3. Uso según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque los componentes seleccionados contienen uno o más componentes del subgrupo que comprende materiales vegetales de *Lonicera japonica*, *Gentiana asclepidea*, *Eugenia caryophyllata*, *Bellis perennis*, *Olea europaea* y *Symphytum officinale*, y sus extractos, y β -mirceno, para suprimir la actividad de protozoos.
4. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque los componentes seleccionados contienen uno o más componentes de los subgrupos que consisten en materiales vegetales de *Carduus pycnocephalus*, *Paeoniae alba radix*, *Populus tremula*, *Prunus avium*, *Salix caprea*, y *Rheum nobile*, y sus extractos, para disminuir la actividad metanogénica de la digestión del rumen.
5. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizado porque los componentes seleccionados contienen uno o dos de los componentes del subgrupo que consiste en materiales vegetales de *Latuca sativa* y *Urtica dioica*, y sus extractos, para disminuir la producción de ácido láctico.
6. Uso según las reivindicaciones 2-5, caracterizado porque el aditivo contiene componentes de al menos dos de los subgrupos definidos en las reivindicaciones 2-5.
7. Uso según la reivindicación 6, caracterizado porque contiene componentes de todos los subgrupos definidos en las reivindicaciones 2-5.
8. Uso según la reivindicación 7, caracterizado porque al menos uno de los componentes se selecciona de cada uno de los grupos i) que consiste en materiales vegetales de *Knautia arvensis*, *Arctostaphylos uva-ursi* y *Helianthemum canum*, y sus extractos, ii) que consiste en materiales vegetales de *Bellis perennis*, *Eugenia caryophyllata*, *Olea europaea*, *Lonicera japonica* *Symphytum officinale*, y sus extractos, iii) que consiste en materiales vegetales de *Carduus pycnocephalus*, *Populus tremula*, y *Rheum nobile*, y sus extractos, y iv) que consiste en materiales vegetales de *Latuca sativa* y *Urtica dioica*, y sus extractos.
9. Uso según la reivindicación 8, caracterizado porque la cantidad total de los componentes que pertenecen a los grupos i)-iv) es adecuadamente de 20-100% en peso de la cantidad total de los componentes presentes en el aditivo.
10. Uso según las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque la cantidad total de los componentes a administrar es de 0,02 mg a 20 g por día y kg de peso corporal del rumiante.

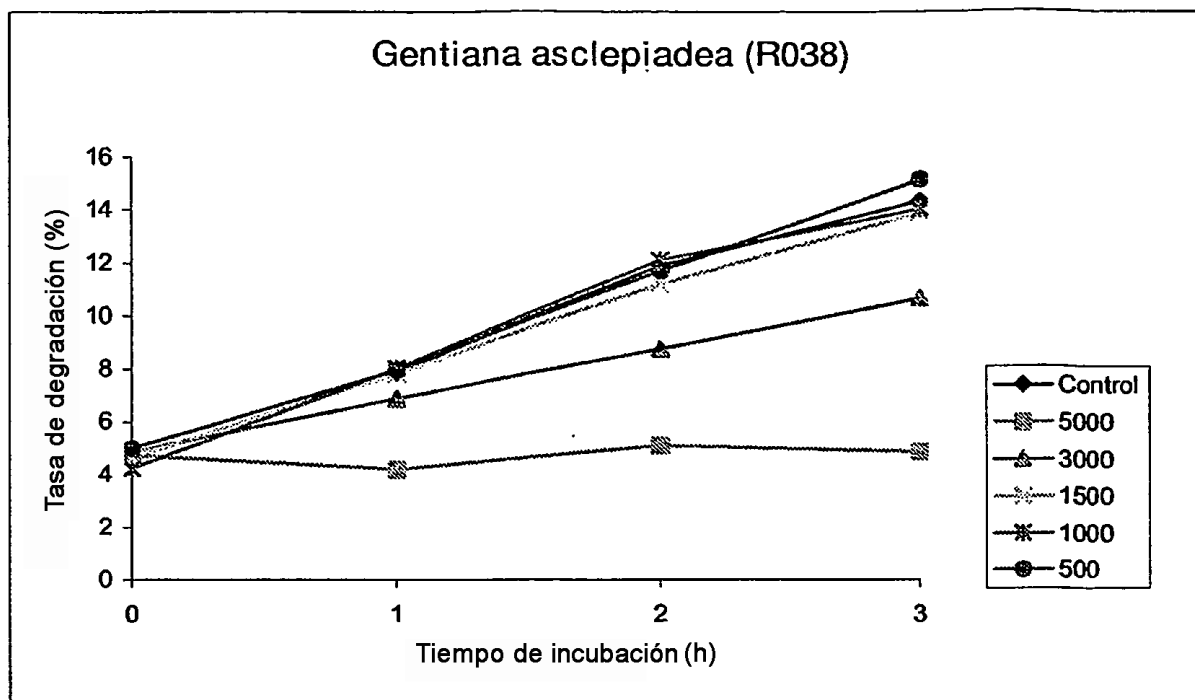


Fig. 1. Los efectos de *Gentiana asclepiadea* a diferentes tasas de inclusión ($\mu\text{g/ml}$) sobre la actividad bacteriolítica de protozoos ciliados del rumen *in vitro*.

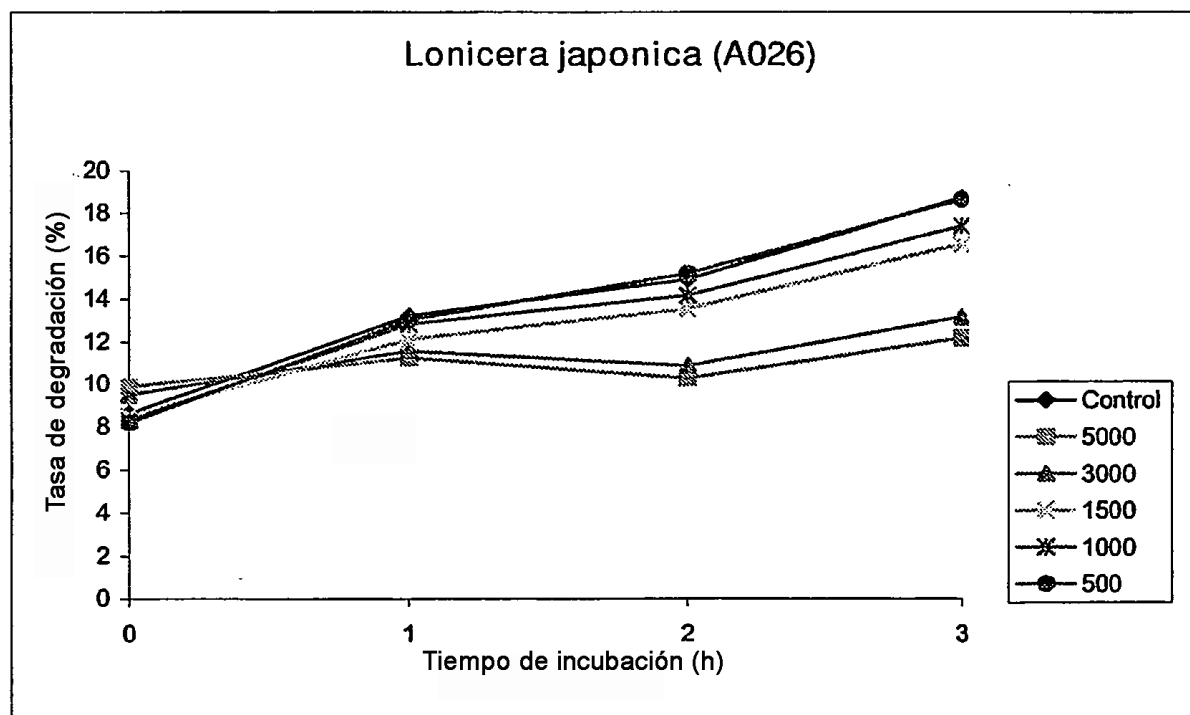


Fig. 2. Los efectos de *Lonicera japonica* a diferentes tasas de inclusión ($\mu\text{g/ml}$) sobre la actividad bacteriolítica de protozoos ciliados del rumen *in vitro*.

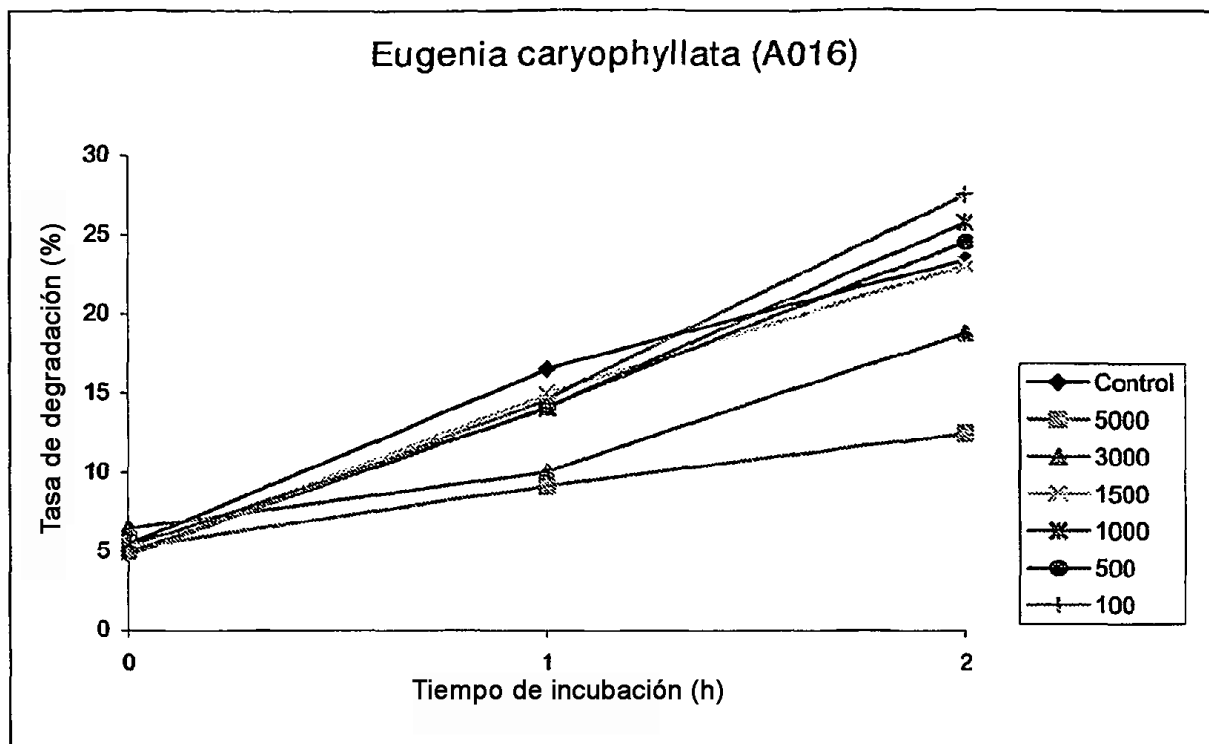


Fig. 3. Los efectos de *Eugenia caryophyllata* a diferentes tasas de inclusión ($\mu\text{g/ml}$) sobre la actividad bacteriolítica de protozoos ciliados del rumen *in vitro*.

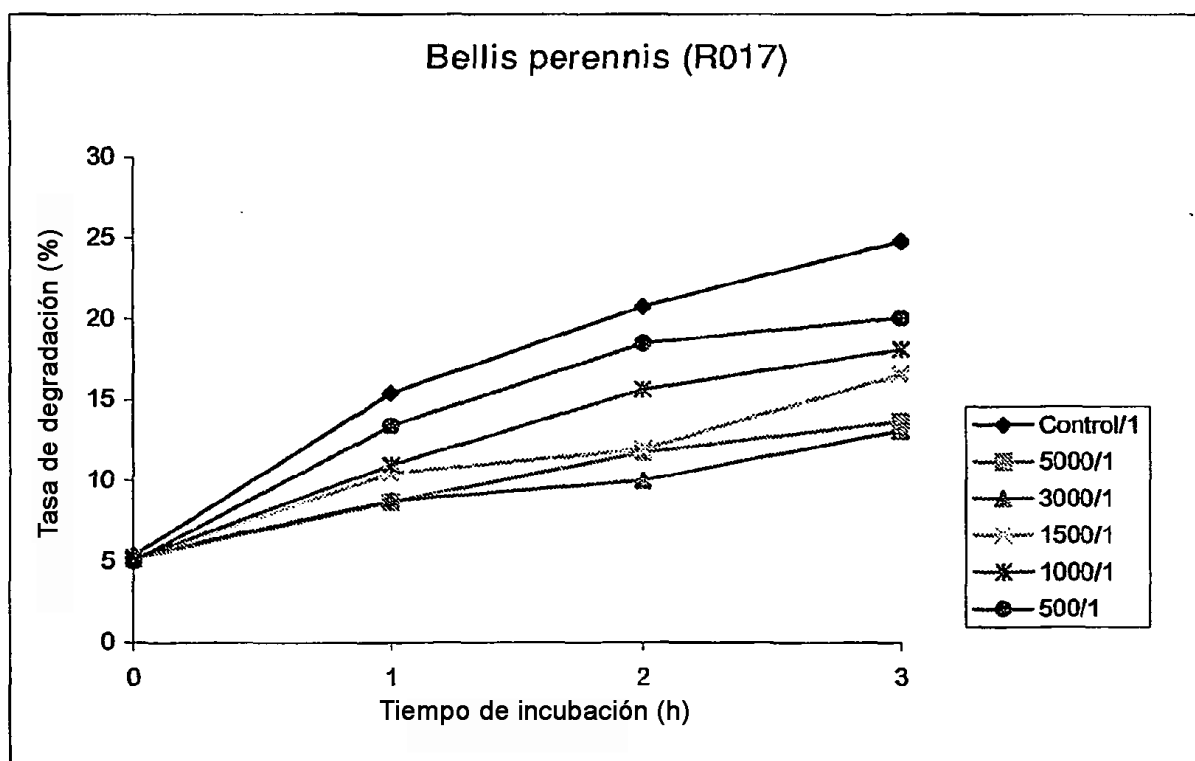


Fig. 4. Los efectos de *Bellis perennis* a diferentes tasas de inclusión ($\mu\text{g/ml}$) sobre la actividad bacteriolítica de protozoos ciliados del rumen *in vitro*.

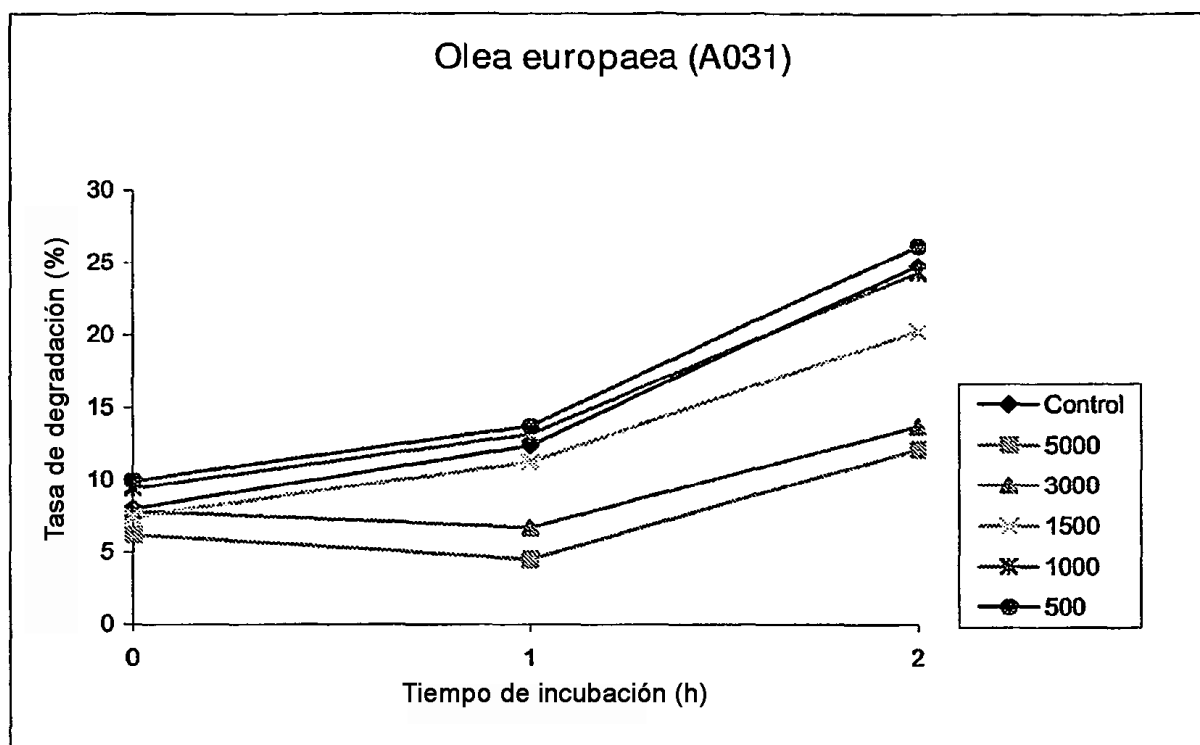


Fig. 5. Los efectos de *Olea europaea* a diferentes tasas de inclusión ($\mu\text{g/ml}$) sobre la actividad bacteriolítica de protozoos ciliados del rumen *in vitro*.

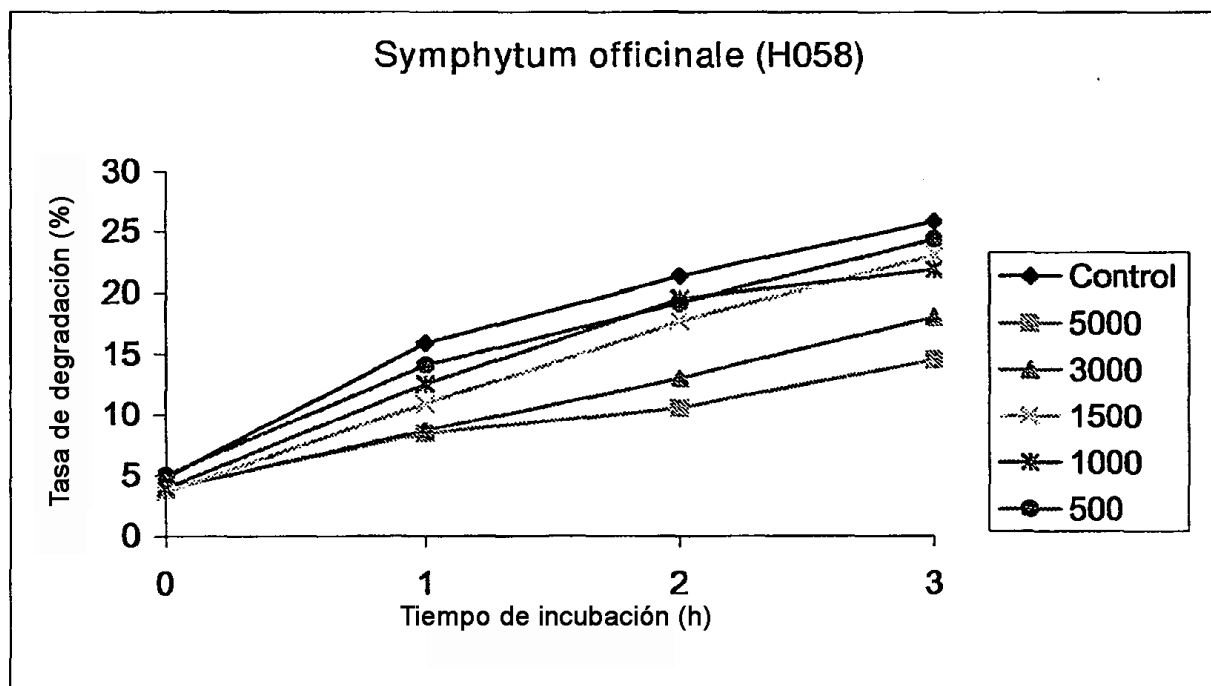


Fig. 6. Los efectos de *Symphytum officinale* a diferentes tasas de inclusión ($\mu\text{g/ml}$) sobre la actividad bacteriolítica de protozoos ciliados del rumen *in vitro*.

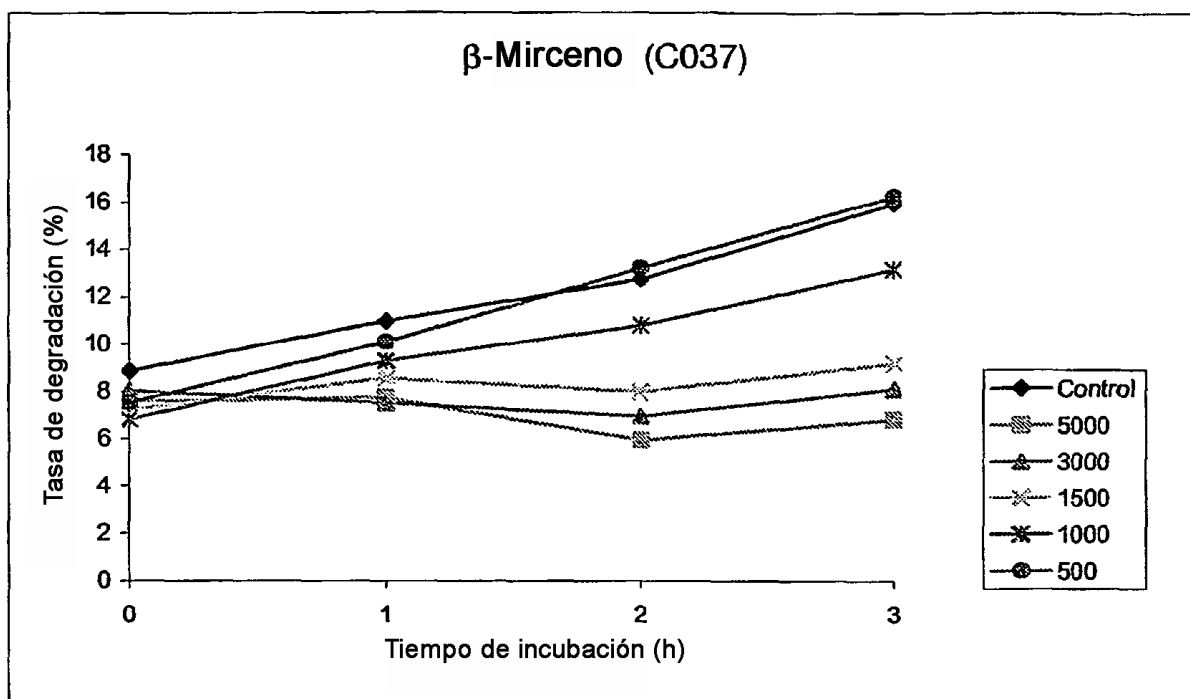


Fig. 7. Los efectos de β -mirceno a diferentes tasas de inclusión ($\mu\text{g/ml}$) sobre la actividad bacteriolítica de protozoos ciliados del rumen *in vitro*.

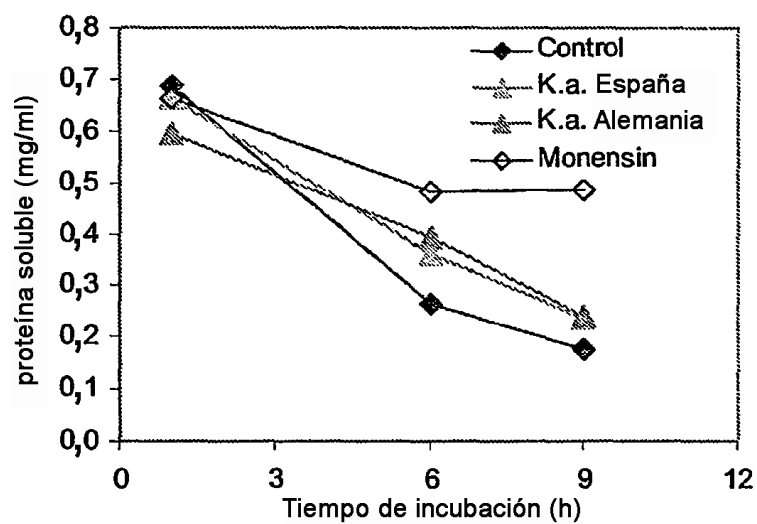


Fig. 8: La cuantificación de la degradación proteica mediante ensayo de transferencia de punto confirma la inhibición de la proteólisis por dos entradas diferentes de *K. arvensis*.