

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 444 442**

51 Int. Cl.:

A23K 1/16 (2006.01)

A61P 1/14 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

A61K 36/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2008 E 08777110 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2013 EP 2165609**

54 Título: **Agente que mejora la fermentación en la panza**

30 Prioridad:

08.06.2007 JP 2007153285

08.02.2008 JP 2008029494

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

25.02.2014

73 Titular/es:

IDEMITSU KOSAN CO., LTD. (50.0%)

1-1 Marunouchi 3-chome Chiyoda-ku

Tokyo 100-8321, JP y

NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION

HOKKAIDO UNIVERSITY (50.0%)

72 Inventor/es:

KOBAYASHI, YASUO;

NAGASHIMA, KYO y

MOCHIZUKI, MASAMI

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 444 442 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

Agente que mejora la fermentación en la panza

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al uso no terapéutico de un agente que mejora la fermentación en la panza, preferentemente un alimento que contiene líquido de cáscara de nuez de anacardo.

10 **Técnica anterior**

En rumiantes tales como ganado vacuno y ovejas, un alimento lo digieren y fermentan microorganismos en sus panzas y los rumiantes viven usando los productos de fermentación. Por tanto, hay una pérdida de eficacia de energía cuando se genera metano desde las panzas. Además, ya que metano es un gas de efecto invernadero que influye en el calentamiento global, es importante reducir la cantidad de metano producido en la panza de los rumiantes. Un metanógeno en una panza reduce dióxido de carbono usando hidrógeno para producir de ese modo metano. La proporción de contribución de metano al calentamiento global es la segunda más alta después del dióxido de carbono y se considera que el metano emitido a partir de rumiantes constituye del 15 % al 20 % de la emisión total de metano.

En los años 1940 se encontró que el crecimiento de un animal doméstico se favorecía añadiendo una pequeña cantidad de un antibiótico a un alimento para animales domésticos. Desde entonces, la práctica de añadir el antibiótico al alimento para animales domésticos se ha realizado ampliamente como medida para fomentar el crecimiento del animal doméstico. Se considera que el antibiótico muestra una acción de fomento del crecimiento mediante su efecto de (1) prevención de infección bacteriana patogénica de un animal doméstico, (2) mejora en el metabolismo y (3) supresión de proliferación de enterobacterias nocivas, pero los detalles de esto son todavía inciertos. Por otro lado, como resultado de añadir antibióticos a un alimento, los antibióticos se distribuyen ampliamente en el medio ambiente y por consiguiente una aparición de bacterias resistentes a antibiótico ha pasado a ser un problema social. En años recientes, la adición de un antibiótico a un alimento se ha regulado rigurosamente y en Europa el uso del antibiótico para fomentar el crecimiento se prohibió en enero de 2006. Además existe una fuerte demanda por parte de los productores de productos de ganado que se hayan criado sin usar un antibiótico y por tanto la necesidad de una alternativa al antibiótico está creciendo.

Los ionóforos tales como monensina, que son antibióticos, se usan ampliamente en un alimento para un rumiante. La monensina muestra un efecto supresor selectivo con respecto a un microorganismo de la panza y tiene, como resultado, funciones de reducción de la producción de metano y fomento de la producción de ácido propiónico. El ácido propiónico tiene una eficacia de producción de ATP más alta comparada con otros ácidos grasos volátiles y, por tanto, la eficacia del alimento se mejora debido al fomento de la producción de ácido propiónico.

Además se desea el desarrollo de alternativas a monensina y similares que van a añadirse a un alimento para un rumiante. Como alternativas se ha estudiado un aceite extraído de una planta (documento no de patente 1), una vacuna contra bacterias que producen ácido láctico (documento no de patente 2), un anticuerpo de yema de huevo frente a bacterias que producen ácido láctico (documento no de patente 3) y similares. Sin embargo, estas tecnologías no están en uso práctico aún, porque existen problemas en que sus efectos no son estables, el registro de las mismas como alimentos no está permitido y similares. Además, se estudia también ácido glucónico (documento de patente 1), pero la cantidad de producción de ácido propiónico no se da como ejemplo, de modo que no se conoce un efecto de supresión de producción de metano.

Se sabe que el líquido de cáscara de nuez de anacardo tiene una acción antibacteriana (documento no de patente 4) y una acción que mitiga la coccidiosis (documento de patente 2). Además, en lo que respecta a los efectos que mejoran la función de la panza de un rumiante, se notifica un resultado de prueba *in vitro* usando ácido anacárdico (documento no de patente 5), pero no existe ninguna descripción sobre la reproducibilidad, aplicación y el contenido óptimo sobre un animal verdadero.

Documento de patente 1: WO 01/028551

Documento de patente 2: JP 08-231410 A

Documento no de patente 1: Benchaar *et al.*, Can. J. Anim. Sci. 86, 91-96 (2006)

Documento no de patente 2: Shu *et al.*, FEMS Immunology & Medical Microbiology, 26(2), 153-158 (1999)

Documento no de patente 3: DiLorenzo *et al.*, J. Anim. Sci., 84, 2178-2185 (2006)

Documento no de patente 4: Muroi, H. *et al.*, Bioorganic & Medicinal Chemistry 12, 583-587 (2004)

Documento no de patente 5: Van Nevel C. J., *et al.*, Applied Microbiology 21, 365-366 (1971)

Descripción de la invención

Un objetivo de la presente invención es fomentar el crecimiento de un rumiante y mejorar la eficacia del alimento mejorando la fermentación en la panza en el rumiante y contribuyendo a la supresión de la generación de gas de

efecto invernadero.

Los inventores de la presente invención han estudiado intensivamente con el fin de resolver los problemas anteriores y como resultado los inventores han encontrado que un alimento que contiene líquido de cáscara de nuez de anacardo suprime la producción de metano y favorece la producción de ácido propiónico en una panza. Por tanto, la presente invención se ha realizado.

La presente solicitud da a conocer:

- (1) un agente que mejora la fermentación en la panza, que comprende líquido de cáscara de nuez de anacardo.
- (2) Una composición para un alimento para mejorar la fermentación en la panza, que comprende el agente que mejora la fermentación en la panza de acuerdo con (1).
- (3) Un alimento para mejorar la fermentación en la panza, que comprende la composición para un alimento para mejorar la fermentación en la panza de acuerdo con (2).
- (4) Una composición para un alimento para mejorar la fermentación en la panza, que comprende líquido de cáscara de nuez de anacardo.
- (5) Un alimento para mejorar la fermentación en la panza, que comprende líquido de cáscara de nuez de anacardo.
- (6) Un alimento para mejorar la fermentación en la panza de acuerdo con (3) o (5), que es para un rumiante.
- (7) Un procedimiento para criar un rumiante, que comprende dejar al rumiante que ingiera el alimento para mejorar la fermentación en la panza de acuerdo con una cualquiera de (3), (5) y (6).
- (8) Uso de líquido de cáscara de nuez de anacardo para fabricar un agente que mejora la fermentación en la panza.
- (9) Uso de líquido de cáscara de nuez de anacardo para fabricar una composición para un alimento para mejorar la fermentación en la panza.
- (10) Uso de líquido de cáscara de nuez de anacardo para fabricar un alimento para mejorar la fermentación en la panza.
- (11) Un procedimiento para mejorar la fermentación en la panza de un animal doméstico, que comprende administrar líquido de cáscara de nuez de anacardo al animal.

Al dejar que un rumiante ingiera un alimento en el que está mezclado el agente que mejora la fermentación en la panza o la composición para un alimento de la presente invención o al dejar que un rumiante ingiera el alimento de la presente invención, puede suprimirse la producción de metano y puede favorecerse la producción de ácido propiónico. El alimento de la presente invención puede usarse preferentemente para criar rumiantes tales como ganado vacuno, cabras y ovejas.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

Un agente que mejora la fermentación en la panza de la presente invención incluye líquido de cáscara de nuez de anacardo (CNSL). Por tanto, los efectos que mejoran la fermentación en la panza incluyen un efecto que suprime la producción de metano y un efecto que favorece la producción de ácido propiónico en una panza.

El líquido de cáscara de nuez de anacardo que va usarse en la presente invención es un líquido aceitoso contenido en la cáscara de la semilla de un árbol de nuez de anacardo (*Anacardium occidentale* L.). El líquido de cáscara de nuez de anacardo contiene, como los componentes del mismo, ácidos anacárdicos, cardanol y cardol. En particular, con el fin de mostrar de manera estable efectos que mejoran la fermentación en la panza, se prefiere líquido de cáscara de nuez de anacardo en el que están contenidos ácidos anacárdicos en una proporción del 40 % en masa o más, y se prefiere más líquido de cáscara de nuez de anacardo en el que están contenidos ácidos anacárdicos en una proporción del 50 % en masa o más. Existen tres tipos de ácidos anacárdicos: un ácido anacárdico que tiene tres dobles enlaces en posiciones 8, 11 y 14 (a continuación en el presente documento denominado como 15:3); un ácido anacárdico que tiene dos dobles enlaces en posiciones 8 y 11 (a continuación en el presente documento denominado como 15:2); y un ácido anacárdico que tiene un doble enlace en posición 8 (a continuación en el presente documento denominado como 15:1). Desde el punto de vista de efectos que mejoran el funcionamiento en la panza, una proporción de (15:1) : (15:2) : (15:3) es preferentemente de 80 a 100 : 85 a 120 : 140 a 180 y más preferentemente de 90 a 95 : 100 a 110 : 150 a 160. Por otro lado, en el caso de usar un ácido anacárdico puro, surge un problema de que el coste de producción pasa a ser alto por las siguientes razones: el número de etapas para producir el ácido anacárdico puro aumenta, porque un ácido anacárdico necesita que se someta a extracción con disolvente de cáscaras de nuez de anacardo o líquido de cáscara de nuez de anacardo seguida por fraccionamiento; se requiere una instalación a prueba de explosión, porque se emplea un disolvente; y una instalación que permita completar la eliminación del disolvente, porque cuando el disolvente usado sigue estando en el ácido anacárdico, el ácido anacárdico no puede usarse como alimento. Por tanto, el líquido de cáscara de nuez de anacardo obtenido mediante extracción de aceite de cáscaras de nuez de anacardo se prefiere desde el punto de vista de que el coste de producción puede reducirse. Además, una proporción de los ácidos anacárdicos mencionados anteriormente, cardanol y cardol es preferentemente de 50 a 80 : 1 a 30 : 5 a 40 desde el punto de vista de los efectos que mejoran el funcionamiento en la panza y es más preferentemente de 55 a 65 : 5 a 20 : 10 a 30. Los ácidos anacárdicos, cardanol y cardol tienen cada uno una acción antioxidante y por tanto se considera que

estos componentes suprimen la oxidación el uno del otro. Por tanto, el agente que mejora la fermentación en la panza de la presente invención que contiene líquido de cáscara de nuez de anacardo puede mostrar efectos que mejoran la fermentación en la panza de manera más estable que usando ácidos anacárdicos, cardanol o cardol solos, que tiene cada uno doble(s) enlace(s) que van a oxidarse fácilmente.

5 En general, el líquido de cáscara de nuez de anacardo puede obtenerse calentando, pero en la presente invención se prefiere que el líquido de cáscara de nuez de anacardo se extraiga en condiciones no calentadas con el fin de evitar que se desnaturalicen por el calor ácidos anacárdicos que son los componentes constituyentes principales. Por ejemplo, el líquido de cáscara de nuez de anacardo puede obtenerse mediante un procedimiento de extracción
10 que implica comprimir la cáscara de una nuez de anacardo o un procedimiento descrito en el documento JP 08-231410 A. El líquido de cáscara de nuez de anacardo usado en la presente invención puede ser además un líquido obtenido mediante pulverización/trituración de la cáscara de una nuez de anacardo. Para el líquido de cáscara de nuez de anacardo usado en la presente invención puede usarse además un producto disponible comercialmente que no se ha sometido a tratamiento con calor. El líquido de cáscara de nuez de anacardo usado en la presente
15 invención es líquido de cáscara de nuez de anacardo preferentemente no calentado desde el punto de vista de la estabilidad de principios activos.

El contenido del líquido de cáscara de nuez de anacardo en el agente que mejora la fermentación en la panza de la presente invención es, desde los puntos de vista de efectos y costes, preferentemente del 1 % en masa al 100 %
20 en masa, más preferentemente del 5 % en masa al 90 % en masa, y todavía más preferentemente del 10 % en masa al 80 % en masa, con respecto a una cantidad total del agente que mejora la fermentación en la panza. Cuando el contenido es del 1 % en masa o más, el efecto de fermentación en la panza puede mostrarse de manera eficaz con una cierta cantidad del agente que mejora la fermentación en la panza. Además, una disolución madre de líquido de cáscara de nuez de anacardo puede administrarse directamente por vía oral.

25 El agente que mejora la fermentación en la panza de la presente invención puede contener además, adicionalmente al líquido de cáscara de nuez de anacardo, un (unos) componente(s) discrecionales tales como un componente que es eficaz para fomentar el crecimiento de un rumiante, un componente complementario nutricional, un componente para potenciar la estabilidad de conservación. Los ejemplos de los componentes discrecionales incluyen los
30 siguientes: probióticos tales como *Enterococcus*, *Bacillus* y *Bifidus*; enzimas tales como amilasa y lipasa; vitaminas tales como ácido L-ascórbico, cloruro de colina, inositol y folato; minerales tales como cloruro de potasio, citrato de hierro, óxido de magnesio y fosfatos; aminoácidos tales como DL-alanina, DL-metionina, L-lisina; ácidos orgánicos tales como ácido fumárico, ácido butírico, ácido láctico, ácido acético y sus sales; antioxidantes tales como etoxiquina, dibutilhidroxitolueno, butilhidroxi-anisol, ácido ferúlico, vitamina C y vitamina E; fungicidas tales como
35 propionato de calcio; aglutinantes tales como carboximetilcelulosa (CMC), caseína sódica y poliácido de sodio; emulsionantes tales como lecitina, éster de ácido graso de glicerina y éster de ácido graso de sorbitano; pigmentos tales como astaxantina y cantaxantina; y agentes aromatizantes tales como diversos ésteres, éteres y cetonas.

40 La formulación del agente que mejora la fermentación en la panza de la presente invención no está limitada en particular y el agente puede estar en una forma discrecional tal como polvo, líquido, sólido, un comprimido, una cápsula o emulsión. El agente que mejora la fermentación en la panza de la presente invención puede producirse mezclando líquido de cáscara de nuez de anacardo y, si se requiere, un componente discrecional y formando la mezcla para obtener una preparación. Obsérvese que, dependiendo de la forma de la formulación, el producto
45 pulverizado/triturado de la cáscara de nuez de anacardo mencionada anteriormente o la cáscara de nuez de anacardo como tal sin estar sometida a ningún tratamiento se mezcla con otro componente discrecional y la mezcla puede usarse como el agente que mejora la fermentación en la panza de la presente invención. Además, sin mezclarse con otro componente discrecional, el producto pulverizado/triturado como tal o la cáscara de nuez de anacardo como tal puede usarse como el agente que mejora la fermentación en la panza, y el propio agente que
50 mejora la fermentación en la panza puede usarse como una composición para un alimento o un alimento.

La composición para un alimento de la presente invención incluye líquido de cáscara de nuez de anacardo. Además, la composición para un alimento de la presente invención puede incluir también el agente que mejora la fermentación en la panza. El contenido del líquido de cáscara de nuez de anacardo en la composición para un
55 alimento de la presente invención es, desde los puntos de vista de efectos y costes, preferentemente de 0,5 a 500.000 ppm de masa, más preferentemente de 5 a 100.000 ppm de masa y aún más preferentemente de 50 a 50.000 ppm de masa con respecto a una masa seca de la composición para un alimento. La composición para un alimento de la presente invención se mezcla con otro componente alimenticio usado en alimentos para mascotas y complementos para mascotas (a continuación en el presente documento denominado como alimento), para producir de ese modo un alimento. El tipo de alimento y los componentes distintos del líquido de cáscara de nuez de
60 anacardo no están limitados en particular. El alimento es preferentemente para rumiantes.

El alimento de la presente invención incluye líquido de cáscara de nuez de anacardo. Además, el alimento de la presente invención puede incluir también la composición para un alimento. El contenido del líquido de cáscara de nuez de anacardo en el alimento de la presente invención es, desde los puntos de vista de efectos y costes,
65 preferentemente de 0,5 a 50.000 ppm de masa, más preferentemente de 5 a 10.000 ppm de masa y todavía más preferentemente de 50 a 5.000 ppm de masa con respecto a una masa seca del alimento. Debería observarse que

en el jugo de la panza de un rumiante real se considera que el líquido de cáscara de nuez de anacardo se diluye aproximadamente 10 veces, y por tanto, se sugiere que el líquido de cáscara de nuez de anacardo se administra aproximadamente 10 veces el contenido del contenido eficaz *in vitro*, en el caso de usarse *in vivo*.

5 El alimento de la presente invención puede producirse añadiendo líquido de cáscara de nuez de anacardo o una composición para un alimento que incluye el líquido de cáscara de nuez de anacardo tal cual a un componente alimenticio y mezclando el material resultante. En esta ocasión, cuando se usa una composición en polvo o sólida para un alimento, la forma de la composición para un alimento puede modificarse para obtener una forma líquida o una forma de gel para el fin de facilitar el proceso de mezclado. En este caso puede usarse lo siguiente como
10 vehículo líquido: agua; un aceite vegetal tal como aceite de soja, aceite de colza o aceite de maíz; o un compuesto polimérico soluble en agua tal como un aceite animal líquido, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona o poli(ácido acrílico). Además, con el fin de mantener la uniformidad del líquido de cáscara de nuez de anacardo en el alimento, el alimento contiene también preferentemente ácido alginico, alginato de sodio, goma xantana, caseína sódica, goma arábica, goma guar o polisacáridos solubles en agua tal como polisacáridos de semilla de tamarindo.

15 La especie de animales que ingiere el alimento de la presente invención es preferentemente un rumiante. El alimento de la presente invención es adecuado para criar, por ejemplo, rumiantes tales como vacas, cabras y oveja. La cantidad de alimento ingerido por un animal puede ajustarse de manera apropiada dependiendo de la especie de animal, peso corporal, edad, sexo, estado de salud, componente alimenticio, etc. En este caso, la cantidad de líquido de cáscara de nuez de anacardo contenido en el alimento es preferentemente de 0,005 a 500 g por rumiante por día, más preferentemente de 0,5 a 100 g por rumiante por día y todavía más preferentemente de 0,5 a 50 g por rumiante por día. Cualquier procedimiento usado normalmente puede adoptarse como procedimiento de alimentación de animales y procedimiento de crianza de animales dependiendo de la especie de animales.

25 Ejemplos

[Ejemplo 1]

30 Efectos de líquido de cáscara de nuez de anacardo (CNSL) sobre la producción de gas y producción de ácidos grasos volátiles *in vitro*

(1) Muestra

35 El líquido de cáscara de nuez de anacardo (CNSL), que se extrajo comprimiendo cáscaras de nuez de anacardo, se obtuvo de Cashew Trading Co., Ltd. Para un inóculo de cultivo se usó jugo de la panza (filtrado por gasa cuádruple) recogido de una vaca Holstein (equipada con cánula en la panza) que pertenece a Experiment Farm, Field Science Center for Northern Biosphere, Universidad de Hokkaido. El inóculo se diluyó dos veces con saliva artificial de McDougal (pH 6.8) y se usó.

40 (2) Cultivo

El cultivo se realizó de tal manera que la concentración de CNSL en un medio de cultivo de prueba era de 500 mg/l. Se disolvieron 0,05 g de CNSL en 1 ml de etanol y se añadieron 100 µl de la disolución a un tubo Hungate. Se volatilizó el etanol dejando en reposo el material resultante durante varias horas. Entonces, como sustratos de cultivo, se añadieron en el mismo 0,15 g de almidón de maíz, 0,025 g de polvo alimenticio combinado y 0,025 g de heno de hierba de huerto en polvo. Se añadieron 10 ml del jugo de la panza diluido mencionado anteriormente a la mezcla y se selló el tubo con un tapón de butil caucho y un tapón roscado de plástico mientras que se soplaban gas nitrógeno a la cámara de aire, que va a someterse a cultivo anaeróbico en un baño de agua (37 °C, 18 horas). Los tratamientos incluyen una zona libre de aditivos (sólo etano: control) y una zona de CNSL y se realizó el cultivo por
50 quintuplicado en cada zona.

(3) Análisis

55 Se analizaron metano, hidrógeno y dióxido de carbono mediante una cromatografía de gases TCD. Se determinaron la concentración y la composición de ácidos grasos volátiles totales (VFA) mediante cromatografía de gases FID.

(4) Resultados

(i) Producción de gas

60 La tabla 1 muestra los resultados de la producción de gas. Se redujeron dióxido de carbono y metano significativamente añadiendo CNSL. En particular apenas se detectó metano (98 % de supresión). La acumulación de hidrógeno acompañada por la reducción de metano no se observó y el hidrógeno producido en la fermentación anaeróbica se transfirió suavemente a un sistema alternativo que consume hidrógeno.

65

[Tabla 1]

Tabla 1 Producción de gas *in vitro* de medio de cultivo de la panza con CNSL añadido

	CO ₂ (ml)	CH ₄ (ml)	H ₂ (ml)
Zona de control	2,54 ± 0,65 _a	0 ± 78 ± 0,27 _a	0,007 ± 0,002
zona con CNSL añadido	1,82 ± 0,30 _b	0,01 ± 0,01 _b	0,013 ± 0,006

CNSL se añadió a una concentración final de 500 mg/l.

5 Se realizó el cultivo por quintuplicado de manera anaeróbica a 37 °C durante 18 horas.

Ciertas diferencias significativas están presentes entre letras alfabéticas diferentes.

(ii) Producción de ácidos grasos volátiles (VFA)

10 La tabla 2 muestra los resultados de la producción de VFA. La concentración de VFA no se cambió añadiendo CNSL y de ese modo no hubo supresión de la fermentación. Sin embargo, el patrón de fermentación cambió notablemente, la producción de ácido acético y la producción de ácido butírico disminuyó significativamente y la producción de ácido propiónico aumentó significativamente.

15 [Tabla 2]

Tabla 2 Producción de ácidos grasos volátiles *in vitro* de medio de cultivo de la panza con CNSL añadido

	VFA total (mM/dl)	Ácido acético (%)	Ácido propiónico (%)	Ácido butírico (%)
Zona de control	7,61 ± 0,50	67,62 ± 1,78 _a	21,59 ± 0,78 _a	9,68 ± 0,22 _a
zona con CNSL añadido	7,31 ± 0,73	54,75 ± 3,09 _b	40,50 ± 3,68 _b	4,31 ± 0,50 _b

Ciertas diferencias significativas están presentes entre letras alfabéticas diferentes.
“%” se refiere a porcentaje con respecto a VFA total.

20 Los resultados se relacionan bien con la disminución de la producción de metano, y la producción de ácido propiónico mejoró notablemente como sistema de consumo alternativo de hidrógeno.

[Ejemplo 2]

25 Acción antibacteriana de CNSL

30 Para examinar la acción antibacteriana de CNSL, las siguientes cepas se cultivaron en cada caso en un medio de infusión de cerebro-corazón (fabricado por NISSUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) a 37 °C durante un día: cepa *Staphylococcus aureus* aislada de un bovino; cepa *Streptococcus bovis* DSM20065; cepa *Bacillus subtilis* NBRC3009; cepa *Escherichia coli* ATCC11303; cepa *Pseudomonas aeruginosa* NBRC12689; y cepa *Saccharomyces cerevisiae* NBRC1021. En el medio de infusión de cerebro-corazón al que se añadió CNSL, se inocularon 10 ul de cada uno de los medios de cultivo de las cepas mencionadas anteriormente y el material resultante se cultivó a 37 °C durante dos días, para calcular de ese modo una concentración inhibitoria del crecimiento mínima (MIC). La tabla 3 muestra los resultados.

35

[Tabla 3]

		MIC (µg/ml)
Bacterias Gram-positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> aislado de un bovino	6,25
	<i>Streptococcus bovis</i> DSM20065	9,38
	<i>Bacillus subtilis</i> NBRC3009	6,25
Bacterias Gram-negativas	<i>Escherichia coli</i> ATCC11303	>1600
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NBRC12689	>1600
Hongos	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NBRC10217	>1600

40 El CNSL no tiene una acción antibacteriana contra bacterias Gram-negativas, mientras que CNSL tiene una alta acción antibacteriana contra bacterias Gram-positivas. Es decir, CNSL tiene una acción antimicrobiana selectiva contra microorganismos de la panza.

[Ejemplo 3]

45 Efectos de la concentración de CNSL sobre la producción de metano y ácidos grasos volátiles *in vitro*

(1) Muestra

El líquido de cáscara de nuez de anacardo (CNSL), que se extrajo comprimiendo cáscaras de nuez de anacardo, se obtuvo de Cashew Trading Co., Ltd. Para un inóculo de cultivo se usó jugo de la panza (filtrado por gasa cuádruple) recogido de una vaca Holstein (equipada con cánula en la panza) que pertenece a Experiment Farm, Field Science Center for Northern Biosphere, Universidad de Hokkaido. El inóculo se diluyó dos veces con saliva artificial de McDougal (pH 6.8) y se usó.

(2) Cultivo

El cultivo se realizó de tal manera que las concentraciones de CNSL en los medios de cultivo de prueba eran 50, 100, 250 y 500 mg/l. Se disolvió CNSL en 1 ml de etanol y se añadieron 100 µl de la disolución a un tubo Hungate. Se volatilizó el etanol dejando en reposo el material resultante durante varias horas. Entonces, como sustratos de cultivo, se añadieron en el mismo 0,15 g de almidón de maíz, 0,025 g de polvo alimenticio combinado y 0,025 g de heno de hierba de huerto en polvo. Se añadieron 10 ml del jugo de la panza diluido mencionado anteriormente a la mezcla y se selló el tubo con un tapón de butil caucho y un tapón roscado de plástico mientras que se soplaban gas nitrógeno a la cámara de aire, que va a someterse a cultivo anaeróbico en un baño de agua (37 °C, 18 horas). Los tratamientos incluyen una zona libre de aditivos (sólo etano: control) y una zona de CNSL y se realizó el cultivo por quintuplicado en cada zona.

(3) Resultados

[Tabla 4]

Concentración de CNSL (mg/l)	0	50	100	250	500
Cantidad de producción de metano (ml)	2,43 ± 0,30 _a	1,88 ± 0,22 _a	1,64 ± 0,40 _a	0,45 ± 0,02 _b	0,12 ± 0,04 _c
VFA total (mmol)	79,94 ± 2,32 _a	77,91 ± 7,59 _{abc}	80,46 ± 3,64 _a	67,56 ± 4,39 _{bc}	68,70 ± 1,81 _b
Ácido propiónico (mmol)	19,84 ± 0,21 _a	20,09 ± 1,39 _a	23,43 ± 1,04 _c	37,63 ± 2,01 _b	38,07 ± 0,85 _b
Ciertas diferencias significativas están presentes entre letras alfabéticas diferentes.					

Con la adición de 250 mg/l o más de CNSL, apenas se detectó metano. En la zona con 250 mg/l o más de CNSL añadidos, la concentración de los ácidos volátiles totales disminuyó ligeramente, pero el patrón de fermentación cambió notablemente. Con la adición de 100 mg/l o más de CNSL, la producción de ácido propiónico aumentó significativamente.

[Ejemplo 4]

Efectos con el tiempo de concentración de CNSL sobre la producción de ácidos grasos volátiles *in vitro*

(1) Muestra

El líquido de cáscara de nuez de anacardo (CNSL), que se extrajo comprimiendo cáscaras de nuez de anacardo, se obtuvo de Cashew Trading Co., Ltd. Para un inóculo de cultivo se usó jugo de la panza (filtrado por gasa cuádruple) recogido de una vaca Holstein (equipada con cánula en la panza) que pertenece a Experiment Farm, Field Science Center for Northern Biosphere, Universidad de Hokkaido.

(2) Prueba

En un fermentador de 1.000 ml se añadieron 800 ml de un medio de cultivo en el que se mezclaron jugo de la panza y saliva artificial de McDougal (pH 6,8) a una proporción de 1:1 (masa) y se sopló dióxido de carbono en el mismo para establecer de ese modo una condición anaeróbica. La saliva artificial se alimentó continuamente en el fermentador y se recogió como muestra el líquido residual. Se recogió el gas generado en un GasPak. Había una placa con orificios colocada en el interior del fermentador y debido al movimiento lento arriba y abajo de la placa, se mezclaron los contenidos. Se colocaron dos bolsas de maya de nailon cada una de las cuales conteniendo un alimento grueso (alimento) en el interior del fermentador en todo momento y la bolsa más antigua de las dos bolsas se sustituyó por otra bolsa una vez al día. Se añadió CNSL al alimento de tal manera que las concentraciones de CNSL en medios de cultivo eran 0, 50, 100 y 200 mg/l, y el cultivo se realizó por duplicado en cada medio de cultivo. El periodo de cultivo era de 21 días. El cultivo se realizó en condiciones de oscuridad en todo momento.

(3) Resultados

La tabla 5 muestra la cantidad (ml) de gas recogido.

ES 2 444 442 T3

[Tabla 5]

CNSL (mg/l)	Hidrógeno	Metano	Dióxido de carbono
0	1,30	67,07	500,84
50	1,76	50,34	531,11
100	4,99	38,04	577,25
200	4,36	23,91	511,18

La cantidad de metano se redujo añadiendo CNSL. La tabla 6 muestra la concentración (mmol/dl) de ácidos grasos volátiles totales (VFA) en el jugo de la panza recogido.

5

[Tabla 6]

Día	CNSL (mg/l)			
	0	50	100	200
0	10,77	11,43	11,37	10,96
3	10,80	10,89	12,13	11,40
6	11,73	13,03	13,39	12,69
9	12,56	12,76	12,99	12,83
12	11,70	11,89	13,80	11,70
15	10,49	11,79	11,77	10,86
18	11,11	12,17	11,83	11,57
21	10,65	11,35	12,19	11,21

La concentración de VFA total no se cambió añadiendo CNSL (es decir no hay supresión de la fermentación). La tabla 7 muestra la proporción molar (%) de ácido acético en el jugo de la panza recogido, la tabla 8 muestra la proporción molar (%) de ácido propiónico en el jugo de la panza recogido, y la tabla 9 muestra la proporción molar (%) de ácido butírico en el jugo de la panza recogido.

10

[Tabla 7]

15

Tabla 7 Proporción molar de ácido acético

Día	CNSL (mg/l)			
	0	50	100	200
0	48,6	95,9	44,1	41,7
3	48,9	45,9	44,3	41,4
6	49,0	46,3	44,7	41,0
9	50,2	46,6	45,1	41,6
12	48,6	46,2	45,1	41,7
15	50,2	45,4	45,6	40,6
18	48,2	45,3	43,6	41,3
21	48,1	45,5	43,4	40,9

[Tabla 8]

Tabla 8 Proporción molar ratio de ácido propiónico

Día	CNSL (mg/l)			
	0	50	100	200
0	26,8	27,6	30,6	35,8
3	26,5	27,4	30,7	35,9
6	26,1	27,4	30,8	36,1
9	25,8	27,2	31,2	36,1
12	26,1	27,3	31,1	35,9
15	25,4	27,1	30,4	36,0
18	26,2	27,7	31,5	34,5
21	25,9	27,3	31,6	36,0

[Tabla 9]

Tabla 9 Proporción molar de ácido butírico

Día	CNSL (mg/l)			
	0	50	100	200
0	15,3	15,7	14,5	12,7
3	15,4	15,7	13,9	12,6
6	15,1	15,2	13,6	12,7
9	14,5	15,2	13,1	12,3
12	15,3	15,1	13,2	12,5
15	14,4	15,4	13,0	12,6
18	15,2	15,1	13,1	13,2
21	14,8	15,1	13,1	12,3

- 5 Con la adición de 100 mg/l de CNSL y 200 mg/l de CNSL, el patrón de fermentación cambió notablemente, la producción de ácido acético y la producción de ácido butírico disminuyeron y la producción de ácido propiónico aumentó.

[Ejemplo 5]

10

Efectos con el tiempo de administración de CNSL *in vivo*

(1) Muestra

15

A cuatro ovejas equipadas con cánula en la panza se les proporcionó a cada una un alimento (alimento concentrado: heno = 3:7 (volumen)) en una cantidad equivalente al 1,4 % en masa del peso de cada una de las ovejas. Un primer muestreo de los contenidos de la panza se realizó antes de comenzar la administración de CNSL. Con respecto a la dosis de CNSL, se observaron efectos que mejoran la función de la panza con la adición de 100 mg/l o más de CNSL en la prueba *in vitro*. Con el fin de permitir que la concentración de CNSL en el jugo de la panza de las ovejas sea 100 mg/l, se requiere mezclar del 0,14 % al 0,28 % en masa (de 1.400 a 2.800 ppm de masa) de CNSL en el alimento, porque CNSL se diluye en el jugo de la panza. Por consiguiente, el 0,14 % en masa de CNSL se añadió al alimento durante las primeras dos semanas y el muestreo de contenidos de la panza se realizó una vez a la semana, es decir dos veces en total. El 0,28 % en masa de CNSL se añadió al alimento durante las siguientes dos semanas y el muestreo de contenidos de la panza se realizó una vez a la semana, es decir dos veces en total.

20

25

(2) Resultados

30

La tabla 10 muestra la cantidad del gas producido (ml/día/tubo) cuando el jugo de la panza recogido se selló en un tubo de prueba y se cultivó a 37 °C durante 24 horas.

[Tabla 10]

	Dosis de CNSL	Hidrógeno	Metano	Dióxido de carbono
Antes de comenzar la administración	-	0,03 ± 0,00	0,83 ± 0,42	3,44 ± 0,79
Primera semana	0,14 % en masa	0,04 ± 0,02	0,69 ± 0,12	3,43 ± 0,79
Segunda semana	0,14 % en masa	0,03 ± 0,01	0,46 ± 0,18	2,36 ± 0,72*
Tercera semana	0,28 % en masa	0,07 ± 0,07	0,22 ± 0,13**	1,63 ± 0,57**
Cuarta semana	0,28 % en masa	0,04 ± 0,01	0,32 ± 0,23*	2,65 ± 0,90
Quinta semana	Interrupción de la administración	0,02 ± 0,00**	0,44 ± 0,20	2,76 ± 0,74
Sexta semana	Interrupción de la administración	0,03 ± 0,01*	0,73 ± 0,80	3,30 ± 2,26
* P<0,10 comparado con antes de empezar la administración				
** P<0,05 comparado con antes de empezar la administración				

35

La cantidad de metano se redujo significativamente añadiendo CNSL. La acumulación de hidrógeno acompañada por la reducción de metano no se observó y por tanto se considera que el hidrógeno producido en la fermentación anaeróbica se transfirió suavemente a un sistema de consumo de hidrógeno alternativo. La tabla 11 muestra la concentración de VFA total (mmol/dl), la proporción molar (%) de ácido acético, la proporción molar (%) de ácido

propiónico, la proporción molar (%) de ácido butírico en el jugo de la panza recogido.

[Tabla 11]

	Dosis de CNSL	Concentración de VFA	% de ácido acético	% de ácido propiónico	% de ácido butírico
Antes de comenzar la administración	-	3,35 ± 0,4	60,8 ± 4,0	20,7 ± 3,5	15,5 ± 2,6
Primera semana	0,14 % en masa	3,53 ± 1,04	55,4 ± 2,9	24,0 ± 3,0	16,5 ± 2,6
Segunda semana	0,14 % en masa	3,43 ± 0,92	55,7 ± 1,7*	23,6 ± 5,9	11,8 ± 3,5
Tercera semana	0,28 % en masa	2,85 ± 1,03	46,8 ± 2,5**	31,0 ± 8,6*	13,4 ± 6,0
Cuarta semana	0,28 % en masa	3,05 ± 0,57	53,8 ± 1,6**	30,5 ± 4,8**	10,0 ± 3,6
Quinta semana	Interrupción de la administración	3,69 ± 0,77	59,7 ± 2,4	20,5 ± 5,4	13,2 ± 3,7
Sexta semana	Interrupción de la administración	4,10 ± 0,82	62,4 ± 1,1	17,8 ± 3,6	13,3 ± 3,4
* P<0,10 comparado con antes de empezar la administración					
** P<0,05 comparado con antes de empezar la administración					

- 5 La concentración de VFA total no se cambió añadiendo CNSL en una cantidad del 0,14 % en masa (es decir no hay supresión de la fermentación). Además, con la adición de CNSL en una cantidad del 0,28 % en masa, el patrón de fermentación cambió notablemente, la producción de ácido acético disminuyó significativamente y la producción de ácido propiónico aumentó significativamente.

La tabla 12 muestra la concentración de amoníaco (mgN/dl) en el jugo de la panza recogido.

10

[Tabla 12]

	Dosis de CNSL	Concentración de amoníaco
Antes de comenzar la administración	-	22,82 ± 5,00
Primera semana	0,14 % en masa	23,76 ± 3,81
Segunda semana	0,14 % en masa	21,71 ± 4,61
Tercera semana	0,28 % en masa	14,11 ± 6,62*
Cuarta semana	0,28 % en masa	13,01 ± 7,27*
Quinta semana	Interrupción de la administración	26,59 ± 6,86
Sexta semana	Interrupción de la administración	28,80 ± 7,26
* P<0,10 comparado con antes de empezar la administración		
** P<0,05 comparado con antes de empezar la administración		

- 15 Con la administración de CNSL se observó la tendencia de reducción de la concentración de amoníaco. Los resultados muestran que la proteólisis o desaminación se suprime y aumenta la eficacia del alimento. Los resultados *in vitro* obtenidos en los ejemplos 1 a 4 estaban bien correlacionados con los resultados obtenidos en el ejemplo 5, que usó ovejas. Es decir, en una panza real, con la adición de CNSL, disminuyeron dióxido de carbono y metano significativamente y porque la acumulación de hidrógeno acompañada por la reducción de metano no se observó en ese momento, se considera que el hidrógeno producido en la fermentación anaeróbica se transfirió suavemente a un sistema de consumo de hidrógeno alternativo. Además, la concentración de ácidos grasos volátiles totales no se cambió añadiendo CNSL (es decir no hay supresión de la fermentación). Sin embargo, el patrón de fermentación cambió notablemente, la producción de ácido acético disminuyó significativamente y la producción de ácido propiónico aumentó significativamente. Los resultados se relacionan bien con la reducción de la producción de metano y se considera que la producción de ácido propiónico se desarrolló suavemente como sistema de consumo alternativo de hidrógeno. Los hechos anteriores se ejemplificaron en la panza real las ovejas, y por tanto, se considera que el líquido de cáscara de nuez de anacardo potencia las eficacias de uso de energía y proteína en animales domésticos.

Aplicabilidad industrial

- 30 El metano producido por el ganado vacuno es una pérdida de energía alimentaria y es además un gas de efecto invernadero y por tanto es una cuestión urgente reducir la producción de metano del ganado vacuno desde los puntos de vista de la ciencia zootécnica y ciencia medioambiental. Dejando que un rumiante ingiera líquido de

5 cáscara de nuez de anacardo cuando se cría el rumiante puede suprimirse la producción de metano. Por otro lado, el ácido propiónico tiene la mayor eficacia de transformación de energía de hexosa de alimentos entre los ácidos grasos volátiles y es una sustancia original de azúcar que va a cambiarse en glucosa tras absorción y por tanto el fomento de la producción de ácido propiónico conduce a ahorrar otras sustancias originales de azúcar (por ejemplo, aminoácido). Por tanto, el alimento que contiene líquido de cáscara de nuez de anacardo puede potenciar las eficacias de uso de energía y proteína en animales domésticos.

REIVINDICACIONES

1. Uso no terapéutico de líquido de cáscara de nuez de anacardo para mejorar la eficacia del alimento mejorando la fermentación en la panza en un rumiante.
- 5 2. Uso no terapéutico de líquido de cáscara de nuez de anacardo para fomentar el crecimiento de un rumiante y para mejorar la eficacia del alimento mejorando la fermentación en la panza en el rumiante.
- 10 3. Uso no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho líquido de cáscara de nuez de anacardo suprime la producción de metano y amoníaco en la panza de un rumiante.
4. Uso no terapéutico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el líquido de cáscara de nuez de anacardo se proporciona en forma de un alimento.