

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 568**

51 Int. Cl.:

**A23K 50/10** (2006.01)

**A23K 10/16** (2006.01)

**A23K 20/147** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.02.2011 PCT/US2011/024940**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2011 WO11100763**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2011 E 11743016 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2536295**

54 Título: **Composiciones de complemento alimenticio para rumiantes y métodos de fabricación y uso de las mismas**

30 Prioridad:

**15.02.2010 US 304739 P**

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

**18.05.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**TRICARICO, JUAN M.;  
DAWSON, KARL A. y  
JOHNSTON, JAMES D.**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI, Peter**

ES 2 668 568 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones de complemento alimenticio para rumiantes y métodos de fabricación y uso de las mismas

### Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a composiciones de complemento alimenticio, a productos alimenticios (por ejemplo, piensos) que comprenden las mismas y a métodos de uso de las mismas. En particular, la invención proporciona composiciones de complemento alimenticio para rumiantes (por ejemplo, que comprenden un extracto de proteína (por ejemplo, un extracto de proteína en bruto (por ejemplo, un extracto bacteriano o de levadura))) que tienen un perfil de nitrógeno y/o aminoácidos específico y un tamaño de partícula pequeño, métodos de fabricación de las mismas, y composiciones que los contienen y métodos de uso de las mismas (por ejemplo, como composición líquida o seca de complemento alimenticio o como componente de un producto alimenticio (por ejemplo, piensos) para aumentar la absorción de proteínas y aminoácidos en un rumiante).

### Antecedentes

15 Las vacas lecheras requieren nitrógeno (N) en forma de aminoácidos absorbidos intestinalmente (AA) para necesidades de mantenimiento y producción. Hay dos fuentes que proporcionan AA absorbidos intestinalmente al rumiante. Una fuente de AA absorbidos intestinalmente es proteína microbiana que resulta del crecimiento microbiano ruminal. Para crecer, los microbios del rumen necesitan hidratos de carbono fermentables y proteína de pienso degradable en el rumen (RDP). El pienso puede proporcionar RDP en forma de auténtica proteína y/o no proteína N (NPN) puesto que los microbios ruminales pueden absorber AA o sintetizarlos a partir de amoníaco-N producido a partir de la degradación ruminal de AA. La proteína microbiana sintetizada ruminalmente proporciona AA absorbidos intestinalmente de alta calidad debido a su alta digestibilidad y perfil de AA. La otra fuente de AA absorbidos intestinalmente es proteína de pienso no degradada ruminalmente (RUP). RUP se compone de auténtica proteína proporcionada por el pienso que escapa de la fermentación ruminal, se digiere postruminalmente, y los AA de componente se absorben en el intestino.

25 El objetivo de la nutrición de proteínas a rumiantes es alimentar al animal rumiante con combinaciones de piensos que minimizan la cantidad total de N alimenticio mientras se proporcionan cantidades y tipos adecuados de RDP y RUP que permiten el nivel deseado de productividad. Por tanto, los nutricionistas de rumiantes se centran en maximizar la síntesis ruminal de proteína microbiana de alta calidad. Sin embargo, el crecimiento microbiano ruminal tiene un límite superior y deben alimentarse fuentes alimenticias de RUP altamente digerible que proporcionan un perfil de AA adecuado a la vaca lechera para lograr niveles satisfactorios de producción de leche.

30 Los nutricionistas de rumiantes intentan continuamente optimizar el suministro de RDP y RUP a la vaca lechera con el uso de diversos piensos y fuentes comerciales de RUP denominadas comúnmente proteínas protegidas ruminalmente. Las fuentes comercialmente disponibles de proteínas protegidas ruminalmente incluyen proteínas animales y vegetales, y AA individuales protegidos de la degradación ruminal mediante tratamientos físicos y/o químicos. La bibliografía incluye numerosas publicaciones sobre el desarrollo y evaluación de fuentes de proteínas protegidas ruminalmente. Alimentar fuentes de proteínas protegidas ruminalmente para obtener productividad de rumiante aumentada mientras se minimiza el suministro de N de pienso total es impreciso. Las reseñas de Santos *et al.* (1998) e Ipharraguerre y Clark (2005) demuestran las dificultades asociadas con alimentar fuentes de proteínas protegidas ruminalmente con la intención de aumentar la productividad de las vacas lecheras.

40 El documento US 4.199.561 se refiere a recubrimientos para nutrientes o sustancias terapéuticas para la administración a rumiantes; el documento US 3.619.200 da a conocer composiciones de pienso para rumiantes que comprenden material de pienso proteínico, que se trata para que sea resistente a la descomposición dentro del rumen; el documento WO 2006/001968 describe composiciones de pienso para animales que tienen una cantidad potenciada de histidina; el documento WO 2006/099153 se refiere a ingredientes de piensos proteínicos que se tratan con un tratamiento de calor húmedo y tienen cantidades aumentadas de materia proteínica que escapa de la fermentación dentro del rumen; el documento US 6.231.895 da a conocer materias primas para rumiantes; el documento US 5.767.080 se refiere a aumentar la producción de leche en una vaca lechera; Netemeyer *et al.*, J. Dairy Sci. 1980, 63, 574-578 dan a conocer el efecto del tamaño de partícula de harina de soja sobre el uso de proteínas; Fastinger *et al.*, J. Anim. Sci. 2003, 81, 697-704 describen el efecto del tamaño de partícula de harina de soja sobre la digestibilidad de aminoácidos y energía.

### 50 Sumario de la invención

El problema objetivo de la presente invención se resuelve basándose en las reivindicaciones 1 a 13.

55 La presente invención se refiere a una composición de complemento alimenticio para rumiantes rica en proteínas que comprende aproximadamente el 5-10% de nitrógeno, el 30-60% de proteína en bruto, y del 0,5% al 1,5% de amoníaco en una base de materia seca, y en la que dicha composición está constituida por partículas secadas de 0,100-0,500 mm de tamaño, preferiblemente de 0,100-0,250 mm de tamaño, en la que dicha composición carece de barrera protectora derivada del tratamiento físico o químico de la composición, y en la que dicha proteína en bruto se deriva de una fuente seleccionada del grupo que consiste en levadura completa, extracto de levadura, algas y

bacterias.

Esta invención se refiere a composiciones de complemento alimenticio, a productos alimenticios (por ejemplo, piensos) que comprenden las mismas y a métodos de uso de las mismas. En particular, la invención proporciona composiciones de complemento alimenticio para rumiantes (por ejemplo, que comprenden un extracto de proteína (por ejemplo, un extracto de proteína en bruto (por ejemplo, un extracto bacteriano o de levadura)) que tienen un perfil de nitrógeno y/o aminoácidos específico y un tamaño de partícula pequeño, métodos de fabricación de las mismas, y composiciones que los contienen y métodos de uso de las mismas (por ejemplo, como composición líquida o seca de complemento alimenticio o como componente de un producto alimenticio (por ejemplo, piensos) para aumentar la absorción de proteínas y aminoácidos en un rumiante).

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la invención proporciona una composición de complemento alimenticio que comprende un componente proteínico (levadura completa y/o extracto de proteína (extracto de proteína en bruto (extracto de proteína de levadura, bacteriano y/o de algas (por ejemplo, con un perfil de nitrógeno y/o aminoácidos específico) que se preparara como materia particulada fina (por ejemplo, una composición que comprende partículas de 0,100-0,500 mm, 0,25-0,5 mm, 0,125-0,250 mm de tamaño)).

En realizaciones preferidas, una composición de complemento alimenticio de la invención se prepara como materia particulada fina que tiene un tamaño de partícula de aproximadamente 125-250  $\mu\text{m}$ . La composición de complemento alimenticio comprende el 5-10% de nitrógeno y el 30-60% de proteína en bruto. En una realización preferida, la composición de complemento alimenticio comprende, en una base de materia seca, el 6,5-7,8% de nitrógeno y el 40-50% de proteína en bruto. En una realización adicional preferida, la composición de complemento alimenticio comprende el 7% de nitrógeno y el 45,3% de proteína en bruto en una base de materia seca. En algunas realizaciones, la proteína en bruto se compone de tanto fracciones solubles como insolubles. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la proteína en bruto tiene el 25-60% de proteína soluble y el 40-75% de proteína insoluble. En algunas realizaciones, la proteína en bruto tiene el 36-46% de proteína soluble y el 53-63% de proteína insoluble. En algunas realizaciones, la proteína en bruto tiene el 40-45% de proteína soluble y el 55-60% de proteína insoluble. En algunas realizaciones, la proteína en bruto tiene el 42% de proteína soluble y el 58% de proteína insoluble. En algunas realizaciones, la composición de complemento alimenticio comprende, en una base de materia seca, del 0,5% al 1,5% de amoníaco. En algunas realizaciones, la composición de complemento alimenticio comprende un componente proteínico (por ejemplo, extracto de proteína) que comprende un perfil de aminoácidos tal como se muestra en la tabla 1 o tabla 2. En algunas realizaciones, el perfil de aminoácidos de un componente proteínico de una composición de complemento alimenticio de la invención comprende un porcentaje de los diferentes aminoácidos tal como se muestra en la tabla 1 o tabla 2, más o menos un determinado porcentaje (por ejemplo, más o menos el 1, el 2, el 3, el 4, el 5, el 6, el 7, el 8, el 9, el 10 o más por ciento).

En algunas realizaciones, el componente proteínico de la composición de complemento alimenticio es un extracto celular de levadura. En algunas realizaciones, el componente proteínico de la composición de complemento alimenticio es levadura completa. En algunas realizaciones, el componente proteínico de la composición de complemento alimenticio es un extracto celular microbiano. En algunas realizaciones, el componente proteínico de la composición de complemento alimenticio es un extracto celular de algas. En la técnica se conocen bien métodos de preparación de extractos celulares. En algunas realizaciones, un extracto celular de levadura se prepara haciendo crecer levadura, separando la pared celular de levaduras de los componentes intracelulares de levaduras (por ejemplo, usando centrifugación), y eliminando el material de la pared celular de levaduras para producir un extracto de levadura, ("extracto de levadura" solamente). Cualquier levadura y/o cepa de levadura conocida en la técnica puede usarse como fuente de la composición de complemento alimenticio de la invención, incluyendo una levadura de los géneros *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Torulaspota* y/o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*. Una vez que se obtiene una fuente de proteínas (por ejemplo, levadura completa y/o un extracto de levadura, algas o microbiano), puede generarse una composición de complemento alimenticio de la invención a partir de la misma. Por ejemplo, en una realización preferida, la fuente de proteínas (por ejemplo, levadura completa o extracto de proteína (por ejemplo, extracto de levadura, algas o microbiano) se seca usando atomización. En una realización preferida, la atomización produce un material secado (por ejemplo, levadura completa o extracto de proteína secados) que contiene partículas de un tamaño deseado (por ejemplo, el material secado contiene partículas entre 0,100-0,500 mm, o más preferiblemente 0,100-0,250 mm). En algunas realizaciones, se selecciona una boquilla de atomizador para producir un material secado que contiene partículas de un tamaño deseado. La invención no está limitada por el método utilizado para secar la fuente de proteínas (levadura completa o extracto de levadura, algas o microbiano). Efectivamente, puede usarse una variedad de métodos incluyendo secado por congelación, secado por pulverización, secado por tambor, secado por lecho fluido, etc.). Además, pueden tomarse etapas adicionales para generar una composición de complemento alimenticio que contiene un tamaño de partícula de un intervalo deseado incluyendo molienda y/o tamizado de la proteína secada (levadura completa o extracto de levadura o microbiano).

La invención no está limitada por el método de administración de una composición de complemento alimenticio a un sujeto (por ejemplo, un rumiante (por ejemplo, un rumiante adulto). Efectivamente, una composición de complemento alimenticio de la invención puede administrarse al rumiante de varias maneras diferentes. Por ejemplo, una composición de complemento alimenticio puede combinarse con un aditivo de pienso que puede ingerirse por vía oral para formar un complemento o premezcla que va a añadirse a piensos convencionales. En algunas

- realizaciones, una composición de complemento alimenticio se añade directamente a un pienso convencional (por ejemplo, un pienso para rumiantes). Por ejemplo, una composición de complemento alimenticio puede añadirse a un pienso convencional o aditivo de pienso como caldo o equivalente de caldo, o pasta o como material liofilizado. En algunas realizaciones, se prepara una composición de complemento alimenticio como materia particulada fina (por ejemplo, que tiene un tamaño de partícula de 0,25-0,5 mm, o de 0,125-0,250 mm) que se añade al pienso. La composición de complemento alimenticio puede añadirse a un portador y/o encapsularse antes de la adición al pienso. En algunas realizaciones, se añade una composición de complemento alimenticio (por ejemplo, preparada como materia particulada fina) directamente a piensos (por ejemplo, rociando un caldo líquido que contiene la composición sobre el pienso o añadiendo una forma particulada seca de la composición de complemento al pienso).
- En algunas realizaciones, se administra una composición de complemento alimenticio a un sujeto (por ejemplo, un rumiante (por ejemplo, una vaca lechera)) como proporción de la ingesta de materia seca diaria total. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se administra una composición de complemento alimenticio a un sujeto (por ejemplo, vaca lechera) como el 1,5%-2,5% de la ingesta de materia seca diaria total del sujeto, aunque pueden administrarse cantidades menores (por ejemplo, el 1,25%, el 1,0%, el 0,75%, el 0,5%, el 0,25%, o menos) y mayores (por ejemplo, el 2,75%, el 3%, el 3,25%, el 3,5%, el 4%, o más) de la composición de complemento alimenticio. En una realización preferida, se administra una composición de complemento alimenticio a un sujeto (por ejemplo, vaca lechera) como el 1,5%-2,5% de la ingesta de materia seca diaria total del sujeto. Por ejemplo, si una vaca consume 23 kg de materia seca al día, la cantidad de ingesta de composición de complemento alimenticio es de entre 345 g y 575 g.
- Una composición de complemento alimenticio se añade a y/o se combina con cualquier pienso que puede ingerirse por vía oral incluyendo granos secados de destilería, alfalfa, harina de maíz, harina de cítricos, residuos de fermentación, conchas de ostras molidas, atapulguita, moyuelos de trigo, productos solubles de melaza, harina de mazorca de maíz, sustancias vegetales comestibles, harina de soja sin cáscara tostada, pienso de molienda de soja, *Mycelis* antibiótica, vermiculita, harinas gruesas de soja, caliza triturada y similares. Se añade una composición de complemento alimenticio a piensos convencionales tales como "concentrados" que tienen un bajo contenido en fibra y un alto contenido en nutrientes digeribles totales. Esta clase incluye los diversos granos y subproductos de alta calidad tales como harina zootécnica de maíz, salvado de trigo, harina de algodón, harina de lino, pienso de gluten de maíz, etc. Una composición de complemento alimenticio también es útil para la adición a piensos de pasto blando, que son ricos en fibra, o mezclas de pasto blando y piensos de concentrado.
- En algunas realizaciones, la invención proporciona un método de criar ganado (por ejemplo, rumiantes) con una dieta nutricionalmente equilibrada que comprende proporcionar al ganado una composición de pienso que contiene una composición de complemento alimenticio descrita en el presente documento y administrar la composición de pienso al ganado en condiciones tales que se consiguen características del ganado (por ejemplo, producción de leche y características de calidad) (por ejemplo, de manera que la calidad de la leche y/o cantidad producida sean superiores a las obtenidas en un sujeto de control al que no se le administró la composición de complemento alimenticio). En algunas realizaciones, la leche producida por una vaca a la que se le alimentó una composición de complemento alimenticio de la invención disfruta de una caducidad más larga en comparación con la leche producida a partir de una vaca a la que no se le alimentó una composición de complemento alimenticio de la invención. En algunas realizaciones, la leche producida por una vaca a la que se le alimentó una composición de complemento alimenticio de la invención contiene una cantidad aumentada de grasa láctea y/o secreciones de proteínas en comparación con la leche de una vaca a la que no se le alimentó una composición de complemento alimenticio de la invención. Por tanto, la presente invención proporciona, en algunas realizaciones, un coste disminuido asociado con la producción de leche y/o componentes de la leche. En algunas realizaciones, usar una composición de complemento alimenticio en el pienso reduce la excreción de nitrógeno de un rumiante y/o mejora la eficacia de nitrógeno.
- Puede usarse una variedad de métodos incluyendo atomización, molienda mecánica, tamizado u otro método conocido en la técnica que reduce el tamaño de partícula de un material. En algunas realizaciones, puede usarse cualquier método conocido en la técnica que puede generar materia particulada (por ejemplo, que comprende partículas de 1-2 mm, 0,5-1 mm, 0,25-0,5 mm, 100-200  $\mu\text{m}$ , 125-250  $\mu\text{m}$ , 62,5-125  $\mu\text{m}$ , o 3,9-62,5  $\mu\text{m}$ ) a partir de un material (por ejemplo, para producir una composición de complemento alimenticio). Según la invención el tamaño de las partículas secadas es de 0,100 a 0,500 mm.
- En una realización preferida, el tamaño de partícula de una composición de complemento alimenticio es de un tamaño que permite que la composición de complemento alimenticio escape de la fermentación ruminal (por ejemplo, fluyendo a la velocidad de flujo líquido en el rumen de un rumiante) en una cantidad mayor que un pienso o producto alimenticio que no comprende la composición de complemento alimenticio).
- En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a métodos de alimentación de ganado que comprenden la administración de piensos al ganado que comprenden las composiciones de proteínas descritas anteriormente y a continuación. De acuerdo con la invención, el ganado es una vaca u otro rumiante.

#### Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra un escape alimenticio a modo de ejemplo de una composición de complemento alimenticio de la

invención.

La figura 2 muestra la composición química y de ingredientes de las raciones usadas en los estudios llevados a cabo durante el desarrollo de las realizaciones de la invención.

5 La figura 3 muestra los efectos de una composición de complemento alimenticio (denominada “DEMP” en la figura) sobre la producción de leche y los metabolitos sanguíneos observados durante el desarrollo de las realizaciones de la invención.

La figura 4 muestra los ingredientes de dietas experimentales usadas en el ejemplo 2.

La figura 5 muestra la composición nutritiva de dietas experimentales usadas en el ejemplo 2 basándose en análisis de ingredientes individuales realizados por DairyLand Laboratories Inc. (Arcadia, WI).

10 La figura 6 muestra las raciones mezcladas totales (TMR) usadas en el ejemplo 2 analizadas por DairyLand Laboratories Inc. (Arcadia, WI).

La figura 7 muestra resultados de producción de leche y contenido de leche usando diversas dietas experimentales que contienen una composición de complemento alimenticio de la invención.

### Definiciones

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “levadura” y “células de levadura” se refiere a microorganismos eucariotas clasificados en el reino *Fungi*, que tienen una pared celular, membrana celular y componentes intracelulares. Las levaduras no forman una agrupación taxonómica o filogenética específica. Actualmente, se conocen unas 1.500 especies; se estima que sólo se ha descrito el 1% de todas las especies de levadura. El término “levadura” a menudo se toma como sinónimo de *S. cerevisiae*, pero la diversidad filogenéticas  
20 de las levaduras se muestra por su ubicación en las divisiones tanto *Ascomycota* como *Basidiomycota*. Las levaduras de gemación (“levaduras verdaderas”) se clasifican en la orden *Saccharomycetales*. La mayoría de las especies de levadura se reproducen asexualmente mediante gemación, aunque algunas se reproducen por bipartición. Las levaduras son unicelulares, aunque algunas especies se vuelven pluricelulares a través de la formación de una cadena de células de gemación conectadas conocida como pseudohifas o hifas falsas. El tamaño de las levaduras puede variar enormemente según las especies, que miden normalmente 3-4  $\mu\text{m}$  de diámetro, aunque algunas levaduras pueden alcanzar más de 40  $\mu\text{m}$ .

Tal como se usa en el presente documento, los términos “levadura enriquecida con selenio” y “levadura selenizada” se refieren a cualquier levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*) que se cultiva en un medio que contiene sales de selenio inorgánicas.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término p/p (peso/peso) se refiere a la cantidad de una sustancia dada en una composición en base al peso. Por ejemplo, un pienso que comprende el 0,02% p/p de complemento de pienso alimenticio de la invención significa que la masa del complemento de pienso alimenticio es del 0,02% de la masa total del pienso (es decir, 200 gramos de composición de complemento de pienso alimenticio de la invención en 907.200 gramos de pienso animal).

35 Tal como se usa en el presente documento, el término “pared celular de levaduras” también denominada “YCW” se refiere a la pared celular de un organismo de levadura que rodea la membrana plasmática y los componentes intracelulares de levaduras. La pared celular de levaduras incluye tanto la capa exterior (principalmente manano) y la capa interior (principalmente glucano y quitina) de la pared celular de levaduras. Una función de la pared celular es proporcionar estructura y proteger el citoplasma metabólicamente activo. Las rutas de señalización y reconocimiento  
40 tienen lugar en la pared celular de levaduras. La composición de la pared celular de levaduras varía de cepa a cepa y según las condiciones de crecimiento de la levadura.

Tal como se usa en el presente documento, el término “componentes intracelulares de levaduras” y “componentes intracelulares” se refiere al contenido celular extraído de un organismo de levadura eliminando las paredes celulares.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término “purificado” o “purificar” se refieren a la eliminación de componentes de una muestra. Por ejemplo, se purifican las paredes celulares de levaduras o extractos de pared celular de levaduras mediante la eliminación de componentes de la pared celular no de levaduras (por ejemplo, componentes de la membrana plasmática y/o intracelulares de levaduras); también se purifican mediante la eliminación de contaminantes u otros agentes distintos a la pared celular de levaduras. La eliminación de componentes de la pared celular no de levaduras y/o contaminantes de la pared celular no de levaduras da como  
50 resultado un aumento en el porcentaje de pared celular de levaduras o componentes de la misma en una muestra.

Tal como se usa en el presente documento, el término “digerir” se refiere a la conversión de comida, piensos u otros compuestos orgánicos en una forma que puede absorberse; para ablandar, deteriorar o descomponer por calor y humedad o acción química.

Tal como se usa en el presente documento, “sistema digestivo” se refiere a un sistema (incluyendo el aparato digestivo) en el que la digestión se produce o puede producirse.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “pienso” se refiere al/los material(es) que se consume(n) por animales y contribuyen energía y/o nutrientes a la dieta de un animal. Los ejemplos de piensos incluyen ración mezclada total (TMR), pasto(s), gránulo(s), concentrado(s), premezcla(s), coproducto(s), grano(s), grano(s) de destilería, mezcla, fibra(s), forraje(s), hierba(s), heno, pepita(s), hojas, harina, producto(s) soluble(s) y complemento(s).

10 Tal como se usa en el presente documento, los términos “complemento nutricional” “complemento alimenticio” “composición de complemento alimenticio” se refieren a productos alimenticios formulados como complemento alimenticio o nutricional que va a usarse como parte de una dieta, por ejemplo como adición a piensos. Las composiciones de complemento alimenticio a modo de ejemplo se describen en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, el término “animal” se refiere a aquellos del reino *Animalia*. Esto incluye, pero no se limita a ganado, animales de granja, animales domésticos, animales como mascota, animales marinos y de agua dulce y animales salvajes.

15 Tal como se usa en el presente documento, “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad de una composición suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados. Una cantidad eficaz puede administrarse y/o combinarse con otro material en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término “digerir” se refiere a la conversión de comida, piensos u otros compuestos orgánicos en una forma que puede absorberse; para ablandar, deteriorar o descomponer por calor y humedad o acción química.

Tal como se usa en el presente documento, “sistema digestivo” se refiere a un sistema (incluyendo el aparato digestivo) en el que la digestión se produce o puede producirse..

25 Tal como se usa en el presente documento, el término “administración” y el término “que administra” se refieren al acto de proporcionar una sustancia, incluyendo un fármaco, profármaco, u otro agente, o tratamiento terapéutico a un sujeto.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término “célula” se refiere a una unidad autorreplicante autónoma que puede existir como unidad de vida independiente funcional (como en el caso de un organismo unicelular, por ejemplo, levadura), o como subunidad en un organismo pluricelular (tal como en plantas y animales) que se especializa en llevar a cabo funciones particulares hacia la causa del organismo como un todo. Hay dos tipos de células distintos: células procariotas y células eucariotas.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término “eucariota” se refiere a organismos cuyas células están organizadas en estructuras complejas encerradas dentro de membranas. Los “eucariotas” pueden distinguirse de los “procariotas”. El término “procariota” se refiere a organismos que carecen de núcleo celular u otros orgánulos unidos a la membrana. El término “eucariota” se refiere a todos los organismos con células que presentan características típicas de los eucariotas, tales como la presencia de un núcleo verdadero unido por una membrana nuclear, dentro del cual se encuentran los cromosomas, la presencia de orgánulos unidos a la membrana, y otras características comúnmente observadas en organismos eucariotas.

40 Tal como se usa en el presente documento, el término “reproducción de levaduras” se refiere al ciclo de las levaduras, que tienen ciclos reproductivos asexuales y sexuales, sin embargo, el modo más común de crecimiento vegetativo en levaduras es la reproducción asexual mediante “gemación” o “partición” con una “célula hija” que se forma en la “célula parental”. El núcleo de la célula parental se divide en un núcleo hija y migra al interior de la célula hija. La yema continúa creciendo hasta que se separa de la “célula parental”, formando una nueva célula. En condiciones de alto estrés, las células haploides morirán generalmente, sin embargo, en las mismas condiciones, las células diploides pueden experimentar esporulación, entrar en reproducción sexual (meiosis) y producir una variedad de esporas haploides que pueden reproducirse (conjugarse), volviendo a formar el diploide.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término “gemación” se refiere a un tipo de división celular en los hongos (por ejemplo, levadura) y en protozoos en los que una de las “células hijas” se desarrolla como una protuberancia más pequeña de la otra. Habitualmente, la posición de la célula de gemación se define por la polaridad en la “célula parental”. En algunos protozoos, la hija brotada puede encontrarse dentro del citoplasma de la otra hija.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término “cultivar levaduras” y el término “crecer levaduras” se refieren al acto de poblar y/o propagar levaduras.

55 Tal como se usa en el presente documento, el término “centrifugación” se refiere a la separación de moléculas por tamaño o densidad usando fuerzas centrífugas generadas por un rotor que pone un objeto en rotación alrededor de un eje fijo, aplicando una fuerza perpendicular al eje. La centrifuga actúa usando el principio de sedimentación, en el

que se usa la aceleración centrípeta para distribuir uniformemente sustancias de mayor y menor densidad en diferentes capas de densidad.

Tal como se usa en el presente documento, el término “cosecha” se refiere al acto de recoger o reunir materiales que se han producido (por ejemplo, reunir materiales producidos durante la producción de levaduras).

- 5 Tal como se usa en el presente documento, el término “secado” se refiere a secado por pulverización, secado por congelación, secado al aire, secado a vacío o cualquier otro tipo de procedimiento que reduce o elimina líquido en una sustancia.

- 10 Tal como se usa en el presente documento, el término “secado por pulverización” se refiere a un método usado comúnmente de secado de una sustancia que contiene líquido usando gas caliente para evaporar el líquido para reducir o eliminar líquido en la sustancia. En otras palabras, el material se seca por medio de pulverización o atomización en el interior una corriente de aire seco calentado.

- 15 Tal como se usa en el presente documento, el término “secado por congelación” y el término “lío-filización” y el término “criodesecación” se refieren a la eliminación de un disolvente de materia en un estado congelado mediante sublimación. Esto se logra congelando el material para secarlo por debajo de su punto eutéctico y luego proporcionar el calor latente de sublimación. El control preciso de la entrada de calor permite secar desde el estado congelado sin fundido del producto. En aplicaciones prácticas, el procedimiento se acelera y controla con precisión en condiciones de presión reducida.

Tal como se usa en el presente documento, el término “molienda” se refiere a reducir el tamaño de partícula mediante impacto, cizalladura o desgaste.

- 20 Tal como se usa en el presente documento, el término “lavado” se refiere a la eliminación o lavado (por ejemplo, usando cualquier tipo de soluto (por ejemplo, agua destilada, tampón o disolvente) o mezcla) de impurezas o producto no deseado soluble de una preparación.

Tal como se usa en el presente documento, el término “proteína” se refiere a compuestos bioquímicos que consisten en uno o más polipéptidos plegados normalmente en forma globular o fibrosa de manera biológicamente funcional.

- 25 Tal como se usa en el presente documento, el término “péptido,” y el término “polipéptido” se refieren a una secuencia primaria de aminoácidos que se unen por “uniones peptídicas” covalente. Generalmente, un péptido consiste en unos pocos aminoácidos, y es más corto que una proteína. Los péptidos, polipéptidos o proteínas pueden ser sintéticos, recombinantes o producirse de manera natural.

- 30 Tal como se usa en el presente documento, el término “aminoácido” se refiere a moléculas que contienen un grupo amina, un grupo ácido carboxílico y una cadena lateral que varía entre diferentes aminoácidos.

Los elementos clave de un aminoácido son carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno.

Tal como se usa en el presente documento, el término “proteasa” se refiere a cualquiera de diversas enzimas, incluyendo las endopeptidasas y exopeptidasas que catalizan la descomposición hidrolítica de proteínas para dar péptidos o aminoácidos.

- 35 Tal como se usa en el presente documento, el término “lisis” se refiere a la desintegración o ruptura de la membrana celular de levaduras y pared celular de levaduras que da como resultado la liberación de los componentes intracelulares.

Tal como se usa en el presente documento, se produce “lisis” como resultado de mecanismos físicos, mecánicos, enzimáticos (incluyendo autólisis e hidrólisis) u osmóticos.

- 40 Tal como se usa en el presente documento, el término “autólisis” se refiere a la descomposición de una parte o toda la célula o el tejido por enzimas autoproducidas.

Tal como se usa en el presente documento, el término “hidrólisis” se refiere al proceso de dividir un compuesto en fragmentos con la adición de agua (por ejemplo, que se usa para descomponer polímeros en unidades más sencillas (por ejemplo, almidón en glucosa)).

- 45 Tal como se usa en el presente documento, el término “rumiante” se refiere a un mamífero del orden Artiodactyla que digiere pienso basado en plantas ablandándolo inicialmente dentro del primer estómago del animal, luego regurgitando la masa digerida, ahora conocida como contenido ruminal, y masticándola de nuevo. El proceso de remasticación del contenido ruminal para descomponer materia vegetal y estimular la digestión se denomina “rumiación”. Hay aproximadamente 150 especies de rumiantes que incluyen especies tanto domésticas como silvestres. Los mamíferos rumiantes incluyen ganado, cabras, ovejas, jirafas, bisontes, alces americanos, alces europeos, yaks, búfalos de agua, ciervos, alpacas, camellos, llamas, ñus, antílopes, berrendos y nilgós.

Tal como se usa en el presente documento, el término “rumen” (también conocido como panza) forma la parte más

grande del retículo-rumen, que es la primera cámara en el canal alimentario de animales rumiantes. Sirve como sitio primario para la fermentación microbiana del pienso ingerido. La parte más pequeña del retículo-rumen es el retículo, que es completamente continuo con el rumen, pero difiere del mismo con respecto a la textura del revestimiento. El rumen se compone de varios sacos musculares, el sacro craneal, el saco ventral, el saco ciego ventral y el retículo.

### Descripción detallada

Esta invención se refiere a composiciones de complemento alimenticio, a productos alimenticios (por ejemplo, piensos) que las comprenden y a métodos de uso de las mismas. En particular, la invención proporciona composiciones de complemento alimenticio para rumiantes (por ejemplo, que comprenden un extracto de proteína (por ejemplo, un extracto de proteína en bruto (por ejemplo, un extracto bacteriano o de levadura))) que tienen un perfil de nitrógeno y/o aminoácidos específicos y un tamaño de partícula pequeño, métodos de fabricación de las mismas y composiciones que los contienen y métodos de uso de las mismas (por ejemplo, como composición líquida o seca de complemento alimenticio o como componente de un producto alimenticio (por ejemplo, piensos) para aumentar la absorción de proteínas y aminoácidos en un rumiante).

En determinadas realizaciones, la invención proporciona una composición de complemento alimenticio rica en proteínas (por ejemplo, de origen de levadura, u otro origen) con características físicas que proporcionan un escape sustancial de la fermentación en el rumen y un perfil de aminoácidos (AA) similar a proteína microbiana ruminal. En algunas realizaciones, la composición rica en proteínas de complemento alimenticio se denomina proteína microbiana de escape (EMP) o proteína microbiana de escape dietética (DEMP), por ejemplo en la tabla 2.

En algunas realizaciones, la composición de complemento alimenticio rica en proteínas (por ejemplo, derivadas de una fuente de levadura o microbiana) se procesa para dar un tamaño de partícula fino. Aunque no es necesaria una comprensión del mecanismo para poner en práctica la invención, y la invención no se limita a ningún mecanismo de acción particular, en algunas realizaciones, el tamaño de partícula fino de la composición de complemento alimenticio permite que la composición de complemento fluya con la fracción líquida tras el rumen en donde se absorben los aminoácidos en el intestino. Aunque la invención no se limita a ningún mecanismo particular, y no es necesaria una comprensión del mecanismo para comprender o poner en práctica la invención, en algunas realizaciones, la utilidad de la composición de complemento alimenticio se aprovecha de uno o más de los siguientes 1) la composición del material (por ejemplo, que tiene un perfil de nitrógeno y/o aminoácidos específico; 2) el tamaño de partícula fino (por ejemplo, descrito en el presente documento) del material (por ejemplo, que permite que se reparta en la fracción líquida ruminal; 3) la velocidad de degradación fraccional relativamente baja del material (por ejemplo,  $0,175 \text{ h}^{-1}$ ); y/o 4) la velocidad fraccional relativamente alta de flujo de salida de líquido del rumen (por ejemplo,  $0,12 \text{ h}^{-1}$ ).

Un beneficio significativo de una composición de complemento alimenticio rica en proteínas de la invención es que no es necesario protegerla (por ejemplo, usando tratamientos físicos o químicos (por ejemplo, encapsulación)) de la degradación ruminal. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una composición de complemento alimenticio rica en proteínas de la invención no es necesario que tenga una barrera protectora. En su lugar, la invención proporciona una composición de complemento alimenticio rica en proteínas (por ejemplo, de origen de levadura) en la que las propiedades físicas y/o químicas de la composición de complemento alimenticio (por ejemplo, perfil o contenido en nitrógeno y/o aminoácidos, tamaño de partícula fino, baja velocidad de degradación de la composición.) permite que la composición de complemento alimenticio escape de la fermentación ruminal (por ejemplo, fluyendo a la velocidad de flujo de líquido) y proporciona una cantidad significativa de proteína de pienso no degradada altamente digerible ruminalmente con un perfil de aminoácidos deseable en los intestinos.

En algunas realizaciones, la composición de complemento alimenticio es un extracto celular de levadura. Un organismo de levadura usado para la composición de la presente invención puede ser cualquiera de varias levaduras incluyendo, pero sin limitarse a, una levadura del género *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces* o especie de *Torulasporea*, o una combinación de las mismas. En una realización preferida, la levadura usada es *Saccharomyces cerevisiae*. En una realización preferida, la levadura usada es la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* 1026. El extracto de levadura se obtiene mediante métodos conocidos comúnmente en la técnica (véase, por ejemplo, Peppier, H.J. 1979. Production of yeasts and yeast products. En *Microbial Technology & Microbial Processes*, vol. 1 (2ª ed.), Academic Press). El organismo de levadura se hace crecer siguiendo técnicas comunes usadas en fermentaciones relacionadas con alimentos y las industrias de bebidas. La biomasa de levadura se separa y se lava mediante centrifugación para producir una crema de levadura. Tras la separación, el organismo se lisa. Puede utilizarse cualquiera de varios métodos comunes en la técnica para lisar el organismo de levadura, incluyendo hidrólisis y autólisis. Una realización preferida de la presente invención permite que los organismos de levadura se autolisen a temperatura y presión ambiente a lo largo de un periodo de 12-24 horas. Puede añadirse una proteasa tal como papaína o cualquiera de varias proteasas alcalinas o neutras durante la fase de lisis para acelerar la solubilización de las proteínas de levadura e impedir la aglutinación de componentes intracelulares. Tras la lisis, los componentes intracelulares del organismo de levadura se separan y se retiran de la pared celular de levaduras. En una realización preferida, los componentes intracelulares se retiran del material de la pared celular de levaduras lavando varias veces mediante centrifugación. El extracto de levadura resultante puede secarse mediante cualquiera de varios métodos comunes en la técnica, incluyendo secado por pulverización, secado por tambor y

5 secado por lecho fluido para formar un polvo. En realizaciones preferidas, el polvo de extracto de levadura secado se convierte en un polvo fino (por ejemplo, por medio de trituración, tamizado o de lo contrario desgaste). En una realización preferida, el extracto de levadura resultante se seca mediante atomización. Por ejemplo, un extracto de levadura se bombea al interior de un atomizador (por ejemplo, atomizador centrífugo o de tipo boquilla) que crea una niebla fina de partículas de extracto de levadura. La niebla fina de partículas de extracto de levadura se pone en contacto con aire que se calienta hasta temperaturas de 250-450°C, lo que seca las partículas. Las partículas de extracto de levadura secado se recogen. En algunas realizaciones, el atomizador está configurado para generar partículas de levadura secadas de un tamaño deseado. En otras realizaciones, las partículas de extracto de levadura secadas se tamizan, trituran adicionalmente, o se descomponen de otra forma para dar partículas más pequeñas tras salir del atomizador.

10 Existe la suposición general en el campo de que la proteína soluble se degrada completamente en el rumen debido a una presunta alta velocidad de degradación fraccional. La incubación *in situ* es el procedimiento más ampliamente aceptado para la determinación experimental de las contribuciones de proteína de pienso degradable en el rumen (RDP) y proteína de pienso no degradada en el rumen (RUP) de un pienso. Este procedimiento estima la desaparición de proteína del pienso colocado dentro de una bolsa porosa suspendida en el rumen de un animal canulado ruminalmente. La desaparición se determina mediante la diferencia en peso con partículas insolubles muy pequeñas y solubles que no se eliminan por lavado de la bolsa que se supone que están inmediatamente disponibles para y se utilizan completamente por los microbios ruminales. Usando un método descrito por Raab *et al.* (See Raab *et al.* (1983), se realizaron experimentos para determinar la velocidad de degradación de proteínas fraccional de una composición de complemento alimenticio de la invención. Usando el método de Raab *et al.*, se determinó que la velocidad de degradación de proteínas fraccional de la composición de complemento alimenticio descrita en la tabla 1 era de 0,175 h<sup>-1</sup> (DE = 0,052).

TABLA 1

% de DM	EMP	Bacterias del rumen <sup>1</sup>
N	7,3	7,7
CP	45,3	48,1
CP soluble, % de CP	41,9	--
CP insoluble, % de CP	58,1	--
NH <sub>3</sub>	1,0	--
Aminoácidos	39,9	32,0
	% de aminoácidos totales	
Alanina	7,3	7,5
Arginina	6,0	5,1
Ácido aspártico	10,4	12,2
Cistina	1,4	--
Ácido glutámico	16,5	13,1
Glicina	5,0	5,8
Histidina	2,5	2,0
Isoleucina	5,1	5,7
Leucina	9,5	8,1
Lisina	6,7	7,9
Metionina	2,1	2,6
Fenilalanina	5,1	5,1
Prolina	5,5	3,7
Serina	5,7	4,6
Treonina	5,3	5,8
Triptófano	1,4	--
Valina	5,8	6,2

<sup>1</sup> Clark *et al.*, 1992

25 Una composición de complemento alimenticio de la invención tiene, como porcentaje de material seco, el 5-10% de nitrógeno y el 30-60% de proteína en bruto. En una realización preferida, la composición de complemento alimenticio comprende, en una base de materia seca, el 6,5-7,8% de nitrógeno y 40-50%% de proteína en bruto. En una realización adicional preferida, la composición de complemento alimenticio comprende el 7% de nitrógeno y el 45,3% de proteína en bruto en una base de materia seca. En algunas realizaciones, la proteína en bruto se compone de tanto fracciones solubles como insolubles. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la proteína en bruto tiene el 25-60% de proteína soluble y el 40-75% proteína insoluble. En algunas realizaciones, la proteína en bruto tiene el 36-46% de proteína soluble y el 53-63% de proteína insoluble. En algunas realizaciones, la proteína en bruto tiene el 40-45% de proteína soluble y el 55-60% de proteína insoluble. En algunas realizaciones, la proteína en bruto tiene el 42% de proteína soluble y el 58% de proteína insoluble. En algunas realizaciones, la composición de complemento alimenticio comprende, en una base de materia seca, del 0,5% al 1,5% de amoniaco. En algunas realizaciones, la composición de complemento alimenticio comprende un componente proteínico (por ejemplo, extracto de proteína) que comprende un perfil de aminoácidos tal como se muestra en la tabla 1 o tabla 2. En algunas realizaciones, el

perfil de aminoácidos de un componente proteínico de una composición de complemento alimenticio de la invención comprende un porcentaje de los diferentes aminoácidos tal como se muestra en la tabla 1 o tabla 2, más o menos un determinado porcentaje (por ejemplo, más o menos el 1, el 2, el 3, el 4, el 5, el 6, el 7, el 8, el 9, el 10 o más por ciento).

- 5 Para comparación, se compara el perfil de aminoácidos de una composición de complemento alimenticio de la invención con el perfil de aminoácidos de bacterias del rumen (véase la tabla 2).

TABLA 2

% de AA totales	DEMP	Bacterias del rumen <sup>1</sup>
Arg	6,0	5,1
His	2,5	2,0
Ile	5,1	5,7
Leu	9,5	8,1
Lys	6,7	7,9
Met	2,1	2,6
Phe	5,1	5,1
Thr	5,3	5,8
Trp	1,4	--
Val	5,8	6,2

1. Clark *et al*, 1992.

10 En determinadas realizaciones, se prepara una composición de complemento alimenticio usando un extracto de levadura. Por ejemplo, se obtiene un extracto de levadura secado (por ejemplo, secado por congelación) usando cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica. Puede usarse cualquier levadura conocida. Además, la levadura puede modificarse (por ejemplo, genéticamente o mediante otros métodos). Por ejemplo, la levadura puede enriquecerse en uno o más nutrientes (por ejemplo, enriquecerse en selenio (por ejemplo, cultivarse en un medio que contiene sales de selenio inorgánicas)). El extracto de levadura secado (por ejemplo, que puede combinarse o no con otros materiales (por ejemplo, vitaminas, minerales, productos alimenticios, u otros materiales)) se convierte entonces (por ejemplo, se tritura) en un tamaño de partícula más fino. Puede usarse cualquiera de los métodos bien conocidos de preparación de un material (por ejemplo, material secado) para dar un material de tamaño de partícula más pequeño incluyendo atomización, trituración, tamizado y/u otros métodos de desgaste del material. En una realización preferida, la composición de complemento alimenticio (por ejemplo, extracto de levadura o microbiano secado) se tritura para dar partículas finas que tienen un tamaño de material particulado de 0,25-0,5 mm, 0,125-0,250 mm, o 0,125 mm, aunque también pueden usarse tamaños de partícula más grandes y más pequeños. El tamaño de partícula de la composición de complemento alimenticio se define mediante las reivindicaciones.

25 Una composición de complemento alimenticio de la invención se añade a y/o se combina con cualquier pienso ingerible por vía oral. Puede usarse cualquier combinación de piensos conocida en la técnica según la invención (por ejemplo, mezclada o combinada con una composición de complemento alimenticio) tal como harina de colza, harina de algodón, harina de soja y harina de maíz, pero se prefieren particularmente harina de soja y harina de maíz. La combinación de piensos se complementa con una composición de complemento alimenticio de la invención, pero pueden añadirse otros ingredientes opcionalmente a la combinación de piensos. Los ingredientes opcionales de la combinación de piensos incluyen azúcares e hidratos de carbono complejos tales como monosacáridos, disacáridos y polisacáridos tanto solubles en agua como insolubles en agua. Ingredientes de aminoácidos opcionales que pueden añadirse a la combinación de piensos son arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina, etiltirosina HCl, alanina, ácido aspártico, glutamato de sodio, glicina, prolina, serina, etilcisteína HCl, y análogos, y sales de los mismos. Vitaminas que pueden añadirse opcionalmente son tiamina HCl, riboflavina, piridoxina HCl, niacina, niacinamida, inositol, cloruro de colina, pantotenato de calcio, biotina, ácido fólico y vitaminas A, B, K, D, E, y similares. También pueden añadirse minerales, ingredientes proteínicos, incluyendo proteína obtenida de harina de carne o harina de pescado, huevo líquido o en polvo, productos solubles de pescado, concentrado de proteína de suero lácteo, aceites (por ejemplo, aceite de soja), almidón de maíz, calcio, fosfato inorgánico, sulfato de cobre, sal y caliza. Puede añadirse cualquier ingrediente de medicamento conocido en la técnica a la combinación de piensos tal como antibióticos.

45 En algunas realizaciones, un pienso comprende uno o más de los siguientes: alfalfa, cebada, loto, *Brassicas* (por ejemplo, Chau moellier, col rizada, colza, colinabo (nabo sueco), nabo), trébol (por ejemplo, trébol Alsike, trébol rojo, trébol subterráneo, trébol blanco), hierba (por ejemplo, hierba de avena falsa, festuca, hierba de Bermuda, bromo, brezo, hierba de pastos (de céspedes de pastizales mezclados de manera natural), hierba de orquídea, raigrás, hierba de Timothy), maíz, mijo, avenas, sorgo, sojas, árboles (brotes de árboles desmochados para "heno de árboles") y trigo.

Las composiciones de la invención pueden comprender uno o más ingredientes inertes (por ejemplo, si es deseable para limitar el número de calorías añadidas a la dieta mediante el complemento alimenticio) cuando se alimenta a los

animales. Por ejemplo, una composición de complemento alimenticio y/o piensos o productos alimenticios a los que se añade la composición de complemento alimenticio de la invención puede contener también ingredientes opcionales incluyendo, por ejemplo, hierbas, vitaminas, minerales, potenciadores, colorantes, edulcorantes, aromatizantes, ingredientes inertes, deshidroepiandrosterona (DHEA), Fo-Ti o Ho Shu Wu (hierba común en tratamientos asiáticos tradicionales), uña de gato (ingrediente herbal antiguo), té verde (polifenoles), inositol, quelpo, dulce, bioflavonoides, maltodextrina, ortigas, niacina, niacinamida, romero, selenio, sílice (dióxido de silicio, gel de sílice, cola de caballo, equiseto), espirulina y zinc. Tales ingredientes opcionales pueden o bien producirse de manera natural o estar en formas concentradas.

En algunas realizaciones, una composición de complemento alimenticio de la invención se mezcla con y/o se combina con otros productos alimenticios (por ejemplo, para generar piensos) incluyendo fosfato o acetato de calcio, tribásico; fosfato de potasio, dibásico; sulfato u óxido de magnesio; sal (cloruro de sodio); cloruro o acetato de potasio; ortofosfato férrico; niacinamida; sulfato u óxido de zinc; pantotenato de calcio; gluconato de cobre; riboflavina; beta-caroteno; clorhidrato de piridoxina; mononitrato de tiamina; ácido fólico; biotina; cloruro o picolonato de cromo; yoduro de potasio; selenato de sodio; molibdato de sodio; filoquinona; vitamina D3; cianocobalamina; selenito de sodio; sulfato de cobre; vitamina A; inositol; yoduro de potasio. Pueden obtenerse dosificaciones adecuadas para vitaminas y minerales, por ejemplo, consultando las directrices de la U.S. RDA.

En realizaciones adicionales, una composición de complemento alimenticio de la invención u otro producto alimenticio al que se le añade y/o se combina con una composición de complemento alimenticio (por ejemplo, para generar piensos) puede incluir uno o más saborizantes alimentarios tales como acetaldehído (etanal), acetoína (acetilmetilcarbinol), anetol (parapropenilanol), benzaldehído (aldehído benzoico), ácido N-butírico (ácido butanoico), d o l carvona (carvol), cinamaldehído (aldehído cinámico), citral (2,6 dimetiloctadien-2,6-al-8, geranial, neral), decanal (N-decinaldehído, capraldehído, aldehído cáprico, caprinaldehído, aldehído C10), acetato de etilo, butirato de etilo, éster etílico del ácido 3-metil-3-fenilglicídico (glicidato de etilmetilfenilo, aldehído de fresa, aldehído C16), etilvainillina, geraniol (3,7-dimetilo-2,6 y 3,6-octadien-1-ol), acetato de geraniol (acetato de geraniol), limoneno (d, l y dl), linalool (linalol, 3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol), acetato de linalilo (bergamol), antranilato de metilo (2-aminobenzoato de metilo), piperonal (3,4-metilendioxibenzaldehído, heliotropina), vainillina, alfalfa (*Medicago sativa* L.), pimienta inglesa (*Pimenta officinalis*), semilla de ambreta (*Hibiscus abelmoschus*), angélica (*Angelica archangelica*), angostura (*Galipea officinalis*), anís (*Pimpinella anisum*), anís estrellado (*Illicium verum*), bálsamo (*Melissa officinalis*), albahaca (*Ocimum basilicum*), laurel (*Laurus nobilis*), caléndula (*Calendula officinalis*), (*Anthemis nobilis*), pimienta (*Capsicum frutescens*), alcaravea (*Carum carvi*), cardamomo (*Elettaria cardamomum*), casia (*Cinnamomum cassia*), pimienta de cayena (*Capsicum frutescens*), semilla de apio (*Apium graveolens*), perifollo (*Anthriscus cerefolium*), cebollino (*Allium schoenoprasum*), coriandro (*Coriandrum sativum*), comino (*Cuminum cyminum*), flores de saúco (*Sambucus canadensis*), hinojo (*Foeniculum vulgare*), fenogreco (*Trigonella foenum graecum*), jengibre (*Zingiber officinale*), marrubio (*Marrubium vulgare*), rábano picante (*Armoracia lapathifolia*), hisopo (*Hyssopus officinalis*), lavanda (*Lavandula officinalis*), macis (*Myristica fragrans*), mejorana (*Majorana hortensis*), mostaza (*Brassica nigra*, *Brassica juncea*, *Brassica hirta*), nuez moscada (*Myristica fragrans*), pimentón (*Capsicum annuum*), pimienta negra (*Piper nigrum*), menta verde (*Mentha piperita*), semilla de amapola (*Papayer somniferum*), romero (*Rosmarinus officinalis*), azafrán (*Crocus sativus*), salvia (*Salvia officinalis*), ajedrea (*Satureia hortensis*, *Satureia montana*), sésamo (*Sesamum indicum*), hierbabuena (*Mentha spicata*), estragón (*Artemisia dracuncululus*), tomillo (*Thymus vulgaris*, *Thymus serpyllum*), cúrcuma (*Curcuma longa*), vainilla (*Vanilla planifolia*), zedoaria (*Curcuma zedoaria*), sacarosa, glucosa, sacarina, sorbitol, manitol, aspartamo. Se dan a conocer otros saborizantes adecuados en referencias tales como Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Mack Publishing, págs. 1288-1300 (1990), y Furia y Pellanca, Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients, The Chemical Rubber Company, Cleveland, Ohio, (1971), conocidas por los expertos en la técnica.

En otras realizaciones, las composiciones comprenden al menos un colorante alimentario natural o sintético (por ejemplo, extracto de achiote, astaxantina, polvo de remolacha, azul ultramarino, cantaxantina, caramelo, caroteno, beta-caroteno, carmín, harina de semilla de algodón tostada, gluconato ferroso, lactato ferroso, extracto de color de uva, extracto de hollejo de uva, óxido de hierro, zumo de frutas, zumo de verduras, harina de tagetes, secada, aceite de zanahoria, aceite de endospermo de maíz, pimentón, oleorresina de pimentón, riboflavina, azafrán, cúrcuma, cúrcuma y oleorresina).

En todavía realizaciones adicionales, las composiciones comprenden al menos un fitonutriente (por ejemplo, isoflavonoides de soja, proantocianidinas oligoméricas, indol-3-carbinol, sulforafona, ligandos fibrosos, fitosteroles vegetales, ácido ferúlico, antocianocidas, triterpenos, ácidos grasos omega 3/6, ácidos grasos conjugados tales como ácido linoleico conjugado y ácido linoléico conjugado, poliacetileno, quinonas, terpenos, catequinas, galatos y quercitina). Las fuentes de fitonutrientes vegetales incluyen lecitina de soja, isoflavonas de soja, germen de arroz integral, jalea real, propóleo de abejas, polvo de jugo de baya de acerola, té verde japonés, extracto de pepita de uva, extracto de hollejo de uva, zumo de zanahoria, arándano, harina de semilla de lino, polen de abejas, *Ginkgo biloba*, onagra (aceite de onagra), trébol rojo, raíz de bardana, diente de león, perejil, escaramujos, cardo mariano, jengibre, ginseng de siberia, romero, curcumina, ajo, licopeno, extracto de pepita de pomelo, espinaca y brócoli.

En todavía otras realizaciones, las composiciones comprenden al menos una vitamina (por ejemplo, vitamina A, tiamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina (B6), cianocobalamina (B12), biotina, ácido retinoico (vitamina D), vitamina E, ácido fólico y otros folatos, vitamina K, niacina y ácido pantoténico). En algunas realizaciones, un pienso (por

- ejemplo, que comprende una composición de complemento alimenticio) comprende al menos un mineral (por ejemplo, sodio, potasio, magnesio, calcio, fósforo, cloro, hierro, zinc, manganeso, flúor, cobre, molibdeno, cromo y yodo). En algunas realizaciones particularmente preferidas, un pienso (por ejemplo, que comprende una composición de complemento alimenticio) comprende vitaminas o minerales en el intervalo de la cantidad diaria recomendada (RDA) especificada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. En todavía otras realizaciones, las partículas comprenden una fórmula de complemento de aminoácidos en el que se incluye al menos un aminoácido (por ejemplo, 1-carnitina o triptófano).
- En algunas realizaciones, las composiciones de pienso contienen enzimas complementarias. A modo de ejemplo de tales enzimas están proteasas, celulasas, xilanasas, fitasa y fosfatasas ácidas. Las enzimas pueden proporcionarse en forma purificada, parcialmente purificada o forma en bruto. Las fuentes de enzimas pueden ser naturales (por ejemplo, fúngicas) o sintéticas o producirse *in vitro* (por ejemplo, recombinante). En algunas realizaciones, se añade una proteasa (por ejemplo, pepsina).
- En algunas realizaciones, también pueden añadirse antioxidantes al producto alimenticio, tal como una composición de pienso. La oxidación puede prevenirse mediante la introducción de antioxidantes que se producen de manera natural, tales como beta-caroteno, vitamina C, y/o de antioxidantes sintéticos tales como hidroxitolueno butilado, hidroxianisol butilado, butilhidroquinona terciaria, galato de propilo o etoxiquina al producto alimenticio. También pueden añadirse compuestos que actúan de manera sinérgica con los antioxidantes tales como ácido ascórbico, ácido cítrico y ácido fosfórico. La cantidad de antioxidantes incorporada de esta manera depende de requisitos tales como formulación de producto, condiciones de envío, métodos de envasado y caducidad deseada.
- La composición de complemento alimenticio resultante (por ejemplo, que comprende partículas de extracto de levadura o microbiano finas (opcionalmente mezcladas con otros componentes tales como vitaminas, minerales, etc.)) se alimenta a animales (por ejemplo rumiantes (por ejemplo, con el fin de potenciar la producción de leche y/o alterar el contenido de la leche (por ejemplo, aumento de la grasa de la leche)).
- En algunas realizaciones, la invención proporciona un método de cría de ganado (por ejemplo, rumiantes) con una dieta nutricionalmente equilibrada que comprende proporcionar ganado y una composición de pienso que contiene una composición de complemento alimenticio descrita en el presente documento y administrar la composición de pienso al ganado en condiciones tales que las características del ganado (por ejemplo, producción de leche y características de calidad) se consiguen (por ejemplo, de manera que la calidad de la leche y/o la cantidad producida es superior a la obtenida en un sujeto de control al que no se le administró la composición de complemento alimenticio).

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar determinadas realizaciones y aspectos de la invención.

#### Ejemplo 1

- Administración de una composición de complemento alimenticio a vacas lecheras y su efecto sobre la producción de leche, ingesta de alimentos, y metabolitos sanguíneos, granjas lecheras canadienses
- Se usaron tres granjas lecheras situadas en las provincias de Ontario y Quebec en el este de Canadá para determinar los efectos de alimentar una composición de complemento alimenticio a vacas lecheras. Se generó una composición de complemento alimenticio secando extracto de levadura derivado de *Saccharomyces cerevisiae* usando un secador por pulverización (atomizador). El extracto secado tenía el 47% de proteína (40% soluble) en una base de materia seca. La tabla 1 describe propiedades de la composición de complemento alimenticio. El tamaño de partícula de la composición de complemento alimenticio era de entre 0,100 - 0,250 mm de tamaño, y se administró a vacas lecheras tal como se administró a continuación. Se monitorizaron y caracterizaron las vacas para determinar la producción de leche, componentes lácteos, y metabolitos sanguíneos.
- Se llevó a cabo el estudio como un diseño cruzado con dos periodos de 21 días.
- Las raciones experimentales fueron: 1) control, 0 g/d de composición de complemento alimenticio; o 2) 600 g/d de composición de complemento alimenticio. Las dietas eran isonitrógenas e isonérgicas y se formularon para proporcionar 600 g/hd/d de composición de complemento alimenticio (2,1% de materia seca por ración). Se mostraron las raciones en la figura 2. Se reemplazó una porción de proteína a base de plantas con composición de complemento alimenticio. A cada granja se le asignó una de dos secuencias de tratamiento: control seguido por composición de complemento alimenticio o composición de complemento alimenticio seguida por control. Se registró la producción de leche e ingesta de pienso durante los últimos 2 días de cada periodo, y se extrajeron muestras de sangre de 15 vacas seleccionadas al azar de cada granja durante la última semana de cada periodo. Se analizó la leche para determinar la grasa y proteína y se analizó la sangre para determinar ácidos grasos no esterificados (NEFA), ácido β-hidroxibutírico (BHBA), y nitrógeno ureico en sangre (BUN) (Véase la figura 3). La leche con energía corregida fue superior (P = 0,09) para la composición de complemento alimenticio que para el control (36,1 frente a 33,3 ± 0,8 kg/d) mientras que la ingesta de materia seca no fue diferente, dando un promedio de 24,0 ± 0,5 kg/d. El contenido en grasa láctea (3,96 frente a 3,86 ± 0,05 %, P = 0,03) y producción de grasa (1,34 frente a 1,22 ± 0,03

kg/d,  $P = 0,09$ ) fue mayor para la composición de complemento alimenticio que para el control. El contenido en proteínas de la leche no fue diferente entre tratamientos, dando un promedio de  $3,34 \pm 0,06\%$ , pero la producción de proteínas fue mayor ( $P = 0,04$ ) para animales a los que se les alimentó la composición de complemento alimenticio que para los animales de control ( $1,13$  frente a  $1,05 \pm 0,02$  kg/d). Mientras que BHBA y NEFA no fueron diferentes entre tratamientos, dando un promedio de  $0,68 \pm 0,03$  mmol/l para BHBA y  $0,17 \pm 0,04$  mmol/l para NEFA, BUN fue mayor ( $P = 0,02$ ) para la composición de complemento alimenticio que para el control ( $4,95$  frente a  $4,53 \pm 0,04$  mmol/l).

Por tanto, en algunas realizaciones, la invención proporciona que incluir composición de complemento alimenticio en una ración a 600 g/d aumentó la leche corregida con energía (por ejemplo, en 2,8 kg/d) y aumentó tanto la grasa láctea como la secreción de proteínas (por ejemplo, en 0,12 kg/d), mientras no afectaba la ingesta de materia seca. Los metabolitos sanguíneos BHBA y NEFA no resultaron afectados por la composición de complemento alimenticio, lo que indica que el aumento en la producción y los componentes no se debía a movilización de las reservas corporales.

### Ejemplo 2

#### Administración de una composición de complemento alimenticio a vacas lecheras y su efecto sobre la producción de leche, ingesta de alimentos, y metabolitos sanguíneos, South Dakota State University

Se llevaron a cabo experimentos para determinar el efecto de una composición de complemento alimenticio sobre la ingesta de alimentos, producción de leche y componentes lácteos. La tabla 1 describe propiedades de la composición de complemento alimenticio. El tamaño de partícula de la composición de complemento alimenticio era de entre 0,100 - 0,250 mm de tamaño. Se llevaron a cabo experimentos en la Dairy Research y Training Facility en la South Dakota State University (Brookings), y todos los procedimientos fueron aprobados por la South Dakota Institutional Animal Care and Use Committee. Dieciséis vacas lecheras lactantes Hostein (ocho multíparas y cuatro primíparas) con  $93 \pm 37$  DIM se usaron en un diseño de cuadrados  $4 \times 4$  Latin con cuatro periodos de 28 días. Se bloquearon las vacas por paridad y producción; un cuadrado contenía 4 animales con fistulas. Las dietas basales contenían el 40% de ensilado de maíz, el 20% de heno de alfalfa, y el 40% de mezcla de concentrado (véase la figura 4), y se formularon para el 16,1% de proteína en bruto, y 1,58 Mcal/kg de energía neta de lactación.

La figura 5 muestra la composición de nutrientes de las dietas experimentales usadas basándose en el análisis de componentes individuales realizado por DairyLand Laboratories Inc. (Arcadia, WI). La figura 6 muestra las raciones mezcladas totales (TMR) analizadas por DairyLand Laboratories Inc. (Arcadia, WI). Durante cada periodo, a las vacas se les alimentaron uno de 4 tratamientos: control (0 g/hd/d de composición de complemento alimenticio), 300 (300 g/hd/d de composición de complemento alimenticio), 600 (600 g/hd/d de composición de complemento alimenticio), y 900 (900 g/hd/d de composición de complemento alimenticio). La composición de complemento alimenticio reemplazó la harina de soja customizada (44% de proteína en bruto (CP)) para dar como resultado dietas isonitrógenas e isoenergéticas.

Se mezclaron previamente los pastos en un mezclador vertical y se combinaron con concentrados en un Calan Data Ranger (American Calan Inc., Northwood, NH). Se alimentaron las vacas individualmente una ingesta *ad libitum* una vez al día (09:00 h) usando alimentadores para animales individuales Calan Broadbent (American Calan, Inc., Northwood, NH). Se pesaron restos de comida una vez al día y la dieta ofrecida se ajustó para garantizar el 10% de rechazo de alimento. Se usaron las semanas 1 y 2 de cada periodo para el ajuste de las dietas, y las semanas 3 y 4 para la recogida de datos.

Las vacas tenían acceso ilimitado a agua y pienso durante el día excepto cuando se les extraía la leche. Todas las vacas recibieron una inyección de rbST (Posilac; Monsanto, St. Louis, MO) cada 14 días según el protocolo de granjas normal.

#### Mediciones y muestreo.

Las ingestas de pienso y restos de comida para vacas individuales se registraron diariamente usando un Calan Data Ranger (American Calan Inc.) El porcentaje de materia seca (DM) del ensilado de maíz y el heno de alfalfa se determinó semanalmente, y se ajustaron las dietas con el fin de mantener la misma razón de pasto con respecto a concentrado durante el experimento. Se recogieron muestras de heno de alfalfa, ensilado de maíz, mezcla de concentrado, composición de complemento alimenticio (DEMP), harina de soja, y ración mezclada total (TMR) de cada tratamiento en tres días consecutivos durante la semana 4 de cada periodo, se congelaron y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis. Se tomaron muestras de TMR adicionales en la siguiente semana para análisis usando un separador de partículas (procedimiento separador de partículas de Penn State).

Se muestreó el líquido ruminal de las vacas con fistulas en la siguiente semana de cada periodo en 9 puntos de tiempo, antes de la alimentación, y 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24 h después de la alimentación. Se midió el pH inmediatamente después de que se tomaran las muestras, y se coloraron 10 ml de alícuotas de líquido del rumen en viales de centelleo, uno que contenía ácido sulfúrico al 50% (vol/vol) y otro que contenía ácido metafosfórico al 25% (p/vol). Se congelaron las muestras y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para análisis de amoníaco y VFA adicional.

Se extrajo sangre mediante venopunción de la vena de la cola aproximadamente 3 horas después de la alimentación en dos días consecutivos durante la semana 4 de cada periodo. Se extrajo sangre en 10-ml de tubos evacuados que contenían anticoagulante K<sub>3</sub>-EDTA (Becton Dickinson and Co., Rutherford, NJ).

5 Se ordeñaron las vacas 3 veces al día (06:00, 14:00 y 21:00 h) en un puesto de ordeño paralelo de 8 doble equipado con identificación automática de vacas, registro de producción individual, y unidades de leche separadas automatizadas. Se muestreó la leche de vacas individuales en cada ordeño en 2 días consecutivos en las semanas 3 y 4 para análisis de composición de leche, y se tomó una muestra adicional el 1 día en la semana 3 y 4 para análisis de ácidos grasos.

10 Se registraron los pesos corporales (BW) en los 3 días consecutivos al inicio del experimento y al final de cada periodo. Se puntuó el estado corporal (BCS) en 3 individuos independientes en una escala de 1 a 5 (véase, por ejemplo, Wildman *et al.*, 1982) al comienzo del experimento y al final de cada periodo.

Análisis de laboratorio.

15 Todas las muestras de TMR y pienso se produjeron para dar productos compuestos en periodo y se secaron a 55°C en un horno Despatch (estilo V-23; DespatchOven Co., Minneapolis, MN) durante 48 h y se molieron a través de un tamiz de 4 mm de un molino Wiley (modelo 3; Arthur H. Thomas Co., Filadelfia, PA), y luego se molieron adicionalmente a través de un tamiz de 1 mm (molino ultracentrífuga Brinkman, Brinkman Industries Co., Westbury, NY). Se secaron submuestras de productos compuestos de pienso a 105°C durante 3 h para determinación DM (Shreve, 2006). Se enviaron productos compuestos de ensilado de maíz, heno de alfalfa, DEMP, mezcla de concentrado, harina de soja customizada, y TMR, se secaron 55°C, a DairyLand Laboratories Inc. (Arcadia, WI) para análisis de composición mediante química en húmedo. Se determinó la distribución del tamaño de partícula de las dietas por el separador de tamaño de partícula de tamiz 4 Pen State (PSPS; véase, por ejemplo, Kononoff *et al.*, 2003).

25 Se enviaron muestras de leche al Heart of America DHIA Laboratory (Manhattan, KS) para análisis de composición de leche. Se analizó la grasa de mantequilla, proteína de leche, lactosa y grasa no sólida (SNF) con espectroscopía de infrarrojo medio (analizador de leche de infrarrojos Bentley 2000, Bentley Instruments, Chaska, MN); se contaron células somáticas mediante tecnología láser (Soma Count 500, Bentley Instruments, Chaska, MN), y se determinó nitrógeno ureico en leche (MUN) usando metodología química basada en una reacción de Berthelot modificada (analizador ChemSpec 150, Bentley Instruments). Se congelaron productos compuestos de leche y se analizaron para determinar la composición de ácidos grasos.

30 Se recogió plasma tras centrifugar muestras de sangre a 2000 rpm durante 20 min a 5°C (centrífuga CR412; Jouan Inc., Winchester, VA) y se congelaron hasta el análisis. Se determinó la glucosa en plasma mediante reacción de glucosa oxidasa (véase, por ejemplo, Trinder, 1969) con kit de glucosa (kit de glucosa, código 439-90901, Wako Chemicals USA, Inc, Richmond, VA).

35 Se determinó la concentración de β-hidroxibutirato (BHBA) en plasma con kit de BHBA (kit de BHBA, n.º de cat. 2440-058, Stanbio Laboratory, Boerne, TX) según métodos descritos (véase por ejemplo, Williamson, 1962). Todos los cuerpos de cetona (acetona, acetoacetato y BHBA) pueden medirse en plasma, pero BHBA se considera el indicador más robusto y aplicable porque la acetona es un compuesto extremadamente volátil y el acetoacetato es un compuesto inestable que forma acetona de manera espontánea (véase por ejemplo, Nielsen *et al.*, 2005). Se analizó el plasma para determinar ácidos grasos no esterificados (NEFA) usando un kit de NEFA (kit de NEFA, código 434-91795, Wako Chemicals USA, Inc, Richmond, VA) siguiendo las especificaciones de Johnson y Peters (véase, por ejemplo, Johnson y Peters, 1993). Se leyeron preparaciones de kit de glucosa, NEFA y BHBA en sangre en un lector de microplacas (Cary 50 MPR, Varian Inc., Lake Forest, CA).

45 Se centrifugaron muestras de rumen conservadas con ácido metafosfórico a 12.500 x g durante 15 min a 4°C (Accuspin Micro 17R, Fisher Scientific Inc., Denver CO), se enviaron submuestras del líquido del rumen centrifugado a Alltech Laboratories (Alltech, Nicholasville, KY) para análisis ácidos grasos volátiles (VFA). Se usó cromatografía de gas (HP Agilent 6890 CG, Hewlett Packard, Palo Alto, CA) para analizar VFA tal como se describió (véase, por ejemplo, Erwin *et al.*, 1961) usando Chromosorb WAW en una columna de vidrio de 6 pies x 4 mm (Supelco, Inc., Bellefonte, PA). Se determinó la concentración de amoníaco de nitrógeno y las fracciones de nitrógeno en las muestras de rumen conservadas con ácido sulfúrico.

50 Se centrifugaron submuestras del rumen y se analizaron para determinar la concentración de amoníaco de nitrógeno tal como se describió (véase, por ejemplo, Weatherburn, 1967). Se determinaron las fracciones de nitrógeno del rumen siguiendo un procedimiento descrito (véase, por ejemplo, Reynal *et al.*, 2007).

Análisis de datos.

55 El diseño experimental fue un cuadrado latino de 4 x 4 con periodos de 28 días. Se analizaron todos los datos mediante el procedimiento MIXED en SAS (véase SAS, 2001). Se usaron las medias semanales de rendimiento de leche y DMI durante las 2 semanas finales de cada periodo para el análisis estadístico. Se calcularon también las medias para datos recogidos para la composición de la leche los d 18, 19, 25 y 26, los d 25 y 26 para muestras

desangre, y los d 25, 26 y 28 para BCS y BW. Se analizaron estos datos usando el siguiente modelo ajustado:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + P_j + C_{k(S1)} + S_l + \varepsilon_{ijkl},$$

- 5 en donde  $Y_{ijkl}$  es la variable dependiente,  $\mu$  es la media global,  $T_i$  es el efecto del tratamiento  $i$  ( $i =$  de 1 a 4),  $P_j$  es el efecto del periodo  $j$  ( $j =$  de 1 a 4),  $C_{k(S1)}$ : efecto de la vaca  $k$  ( $k =$  de 1 a 4) anidado con cuadrado 1,  $S_l$  es el efecto del cuadrado 1 ( $l =$  de 1 a 4) y  $\varepsilon_{ijkl}$  es el error residual. El diseño experimental usó la vaca como unidad experimental y la vaca (cuadrado) como variable al azar.

Se obtuvieron las medias del cálculo de la fracción de nitrógeno a partir de la recogida de muestras de 9 puntos de tiempo el d 27, y se analizaron usando el modelo ajustado:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + C_k + \varepsilon_{ijk},$$

- 10 en donde  $Y_{ijk}$  es la variable dependiente,  $\mu$  es la media global,  $T_i$  es el efecto del tratamiento  $i$  ( $i =$  de 1 a 4),  $P_j$  es el efecto del periodo  $j$  ( $j =$  de 1 a 4),  $C_k$  es el efecto de la vaca  $k$  ( $k =$  de 1 a 4), y  $\varepsilon_{ijk}$  es el error residual. Todos los términos se consideraron fijos excepto la vaca ( $C_k$ ) que se consideró como variable al azar.

Se usó un modelo de medidas repetidas para evaluar parámetros ruminales (pH, NH<sub>3</sub> y VFA):

$$Y_{ijm} = \mu + T_i + P_j + \varepsilon_{ij} + H_m + HT_{mi} + W_{ijm},$$

- 15 en donde  $Y_{ijm}$  es la variable dependiente,  $\mu$  es la media global,  $T_i$  es el efecto del tratamiento  $i$  ( $i =$  de 1 a 4),  $P_j$  es el efecto del periodo  $j$  ( $j =$  de 1 a 4),  $\varepsilon_{ij}$  es el error de gráfico completo,  $H_m$  es el efecto del tiempo  $m$  ( $m =$  de 1 a 9), es la interacción entre el tiempo  $m$  y el tratamiento  $i$ , y  $W_{ijm}$  es el error del subgráfico. La estructura de covarianza correspondió al valor más bajo según el criterio de información de Akaike que está seleccionándose (véase Littell, 2006).

- 20 Se usaron contrastes ortogonales polinómicos para someter a prueba los efectos lineales, cuadráticos y cúbicos del aumento de la inclusión de DEMP en las dietas. Las interacciones se no se consideraron significativas se retiraron de los modelos. Se declaró significación a  $P \leq 0,05$ , y se comentaron las tendencias a  $0,05 \leq P \leq 0,10$ .

#### Resultados

- 25 En la figura 7 se muestran los resultados de alimentar las dietas experimentales a vacas lecheras. Tal como se indica en la figura 7, la leche corregida para grasa y corregida para energía era mayor para tratamientos que contenían la composición de complemento alimenticio que con tratamientos de control que carecían de la composición de complemento alimenticio. Los tratamientos con 300 y 600 g de composición de complemento alimenticio aumentaron la FCM en 2,1 y 2,5 kg, respectivamente, en comparación con el control.

- 30 La concentración y el rendimiento de grasa láctea fueron también mayores para los tratamientos con composición de complemento alimenticio que para el control. Los tratamientos con composición de complemento alimenticio de 300 y 600 g aumentaron el rendimiento de grasa láctea 0,10 y 0,14 kg, respectivamente, en comparación con los controles. Las mejores respuestas de producción estaban asociadas con tratamientos con composición de complemento alimenticio a 300 y 600 g.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición de complemento alimenticio para rumiantes rica en proteínas que comprende el 5-10% de nitrógeno, el 30-60% de proteína en bruto, y del 0,5% al 1,5% de amoníaco en una base de materia seca, y en la que dicha composición está constituida por partículas secadas de 0,100-0,500 mm de tamaño, preferiblemente de 0,100-0,250 mm de tamaño, en la que dicha composición carece de barrera protectora derivada del tratamiento físico o químico de la composición, y en la que dicha proteína en bruto se deriva de una fuente seleccionada del grupo que consiste en levadura completa, extracto de levadura, algas y bacterias.
- 10 2. Composición de complemento alimenticio según la reivindicación 1, en la que dicha composición comprende el 6,5-7,8% de nitrógeno y el 40-50% de proteína en bruto en una base de materia seca, preferiblemente el 7% de nitrógeno y el 45% de proteína en bruto en una base de materia seca.
3. Composición de complemento alimenticio según la reivindicación 1, en la que dicha proteína en bruto comprende fracciones solubles e insolubles, preferiblemente el 40-45% de proteína soluble y el 55-60% de proteína insoluble.
- 15 4. Composición de complemento alimenticio según la reivindicación 1, en la que dicha proteína en bruto se deriva de *Saccharomyces*.
5. Composición de complemento alimenticio según la reivindicación 1, en la que dicha proteína en bruto se seca y posteriormente se muele o se tamiza.
- 20 6. Método de producción de la composición según la reivindicación 1, que comprende secar dicha proteína en bruto usando un atomizador.
- 25 7. Método de aumento de una proteína adsorbida intestinalmente en un rumiante que comprende proporcionar a un rumiante una composición de complemento alimenticio que comprende el 6,5-7,8% de nitrógeno, el 40-50% de proteína en bruto, y del 0,5% al 1,5% de amoníaco en una base de materia seca, y en el que dicha composición está constituida por partículas secadas de 0,100-0,500 mm de tamaño, en el que dicha composición carece de barrera protectora derivada del tratamiento físico o químico de la composición, y en el que dicha proteína en bruto se deriva de una fuente seleccionada del grupo que consiste en levadura completa, extracto de levadura, algas y bacterias.
- 30 8. Método de aumento de la producción de leche en un rumiante que comprende proporcionar a un rumiante una composición de complemento alimenticio que comprende el 6,5%-7,8% de nitrógeno, el 40-50% de proteína en bruto y del 0,5% al 5% de amoníaco en una base de materia seca, en el que dicha composición está compuesta por partículas secadas de 0,100-0,500 mm de tamaño, en el que dicha composición carece de barrera protectora derivada del tratamiento físico o químico de la composición, y en el que dicha proteína en bruto se deriva de una fuente seleccionada del grupo que consiste en levadura completa, extracto de levadura, algas y bacterias.
- 35 9. Método según la reivindicación 8, en el que aumentar la producción de leche comprende la producción de leche que contiene un contenido en grasa láctea aumentado y/o un contenido en secreción de proteína aumentado en comparación con leche producida de un rumiante al que no se le alimentó una composición de complemento alimenticio de la invención.
- 40 10. Método según la reivindicación 8, en el que la composición de complemento alimenticio se administra al rumiante para proporcionar el 1,5%-2,5% de la ingesta de materia seca diaria total del rumiante.
11. Método según la reivindicación 8, en el que la composición de complemento alimenticio se añade a un pienso para rumiantes convencional.
- 45 12. Método según la reivindicación 8, en el que la composición de complemento alimenticio permite que aminoácidos y/o proteínas escapen de la fermentación ruminal en el rumen en una cantidad mayor en comparación con la cantidad de aminoácidos y/o proteína que escapan de la fermentación ruminal en un rumen de un rumiante al que no se le ha alimentado la composición de complemento alimenticio.
13. Método de fabricación de un pienso para rumiantes que comprende combinar un pienso para rumiantes convencional y una composición de complemento alimenticio según la reivindicación 1.

**FIGURA 1**

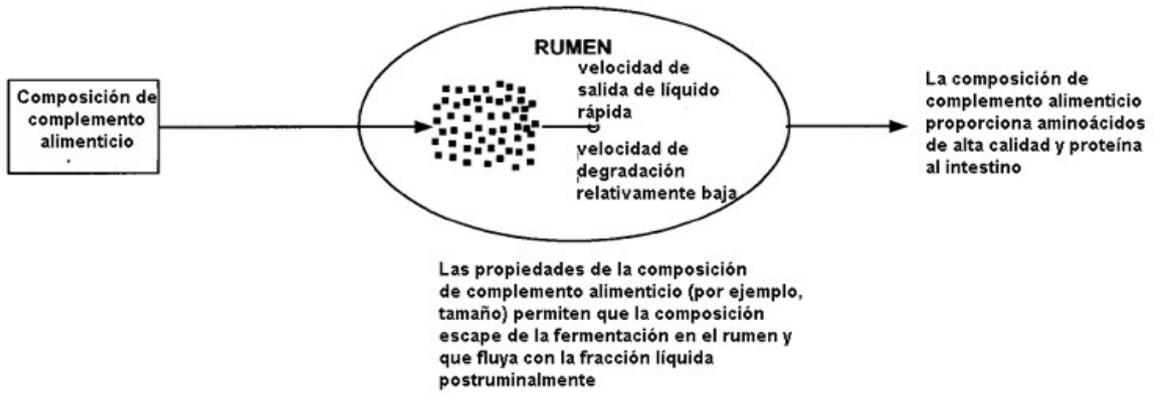


FIGURA 2

<b>Composición química y de ingredientes para raciones.</b>		
<b>Ingrediente, % DM</b>	<b>DEMP</b>	<b>control</b>
EMP	2,1	–
<b>Ensilado de maíz</b>	36,7	36,7
<b>Henolaje</b>	19,9	19,9
<b>Heno</b>	4,3	4,3
<b>Maíz</b>	5,4	5,4
<b>Colza</b>	6,0	5,8
<b>Destilados de trigo</b>	–	2,1
<b>Alimentación de gluten</b>	2,6	2,1
SBM	1,5	2,9
Optigen	0,5	0,3
<b>Vitaminas, minerales, etc.</b>	20,3	20,5
<b>Productos químicos, % DM</b>		
DM, %	46,6 ± 3,4	48,5 ± 3,6
CP	16,1 ± 1,8	17,2 ± 1,1
<b>CP soluble</b>	4,58 ± 1,79	7,15 ± 1,44
NDF	35,0 ± 3,1	31,6 ± 1,7
ADF	22,0 ± 1,4	20,9 ± 1,95
<b>Grasa</b>	3,76 ± 0,37	4,15 ± 0,58
<b>Almidón</b>	25,5 ± 1,5	22,0 ± 1,0

La composición química es el promedio ( $\pm$  desviación estándar) de análisis de química en húmedo de raciones de las tres granjas incluidas en el estudio.

FIGURA 3

<b>Efectos de DEMP sobre la producción de leche y metabolitos sanguíneos.</b>				
	<b>DEMP<sup>1</sup></b>	<b>Control</b>	<b>SEM</b>	<b>Valor de P</b>
<b>Leche, kg/d</b>	33,8	31,5	1,1	0,11
<b>ECM<sup>2</sup>, kg/d</b>	36,1	33,3	0,8	0,09
<b>FCM<sup>3</sup>, kg/d</b>	36,4	33,4	1,1	0,09
<b>Grasa láctea, %</b>	3,96	3,86	0,05	0,03
<b>Grasa láctea, kg/d</b>	1,34	1,22	0,03	0,09
<b>Proteína láctea, %</b>	3,34	3,34	0,06	NS
<b>Proteína láctea, kg/d</b>	1,13	1,05	0,02	0,04
<b>DMI, kg/d</b>	24,2	23,7	0,5	0,12
<b>BHBA<sup>4</sup>, mmol/L</b>	0,73	0,63	0,03	<0,01
<b>NEFA<sup>5</sup>, mmol/L</b>	0,14	0,19	0,04	NS
<b>BUN<sup>6</sup>, mmol/L</b>	4,95	4,53	0,04	0,02

1 DEMP = 600 g/hd/d DEMP; control = 0% DEMP

2 Leche corregida para energía

3 Leche corregida para grasa

4 Ácido  $\beta$ -hidroxibutírico

5 Ácidos grasos no esterificados

6 Nitrógeno ureico en sangre

FIGURA 4

## Constituyentes de las dietas experimentales del ejemplo 2.

Materia seca %	Cont (0)	300	600	900
<b>Ensilado de maíz</b>	41,6	41,6	41,6	41,6
<b>Heno de alfalfa</b>	18,9	18,9	18,9	18,9
<b>Soja, harina (46,5% CP)</b>	9,09	9,09	9,09	9,09
<b>Soja, harina (44% CP)</b>	3,41	2,28	1,14	0
<b>Composición de complemento alimenticio</b>	0	1,14	2,28	3,41
<b>Soja ,Hulls</b>	1,89	1,89	1,89	1,89
<b>DDG</b>	4,91	4,91	4,91	4,91
<b>Maíz molido seco</b>	17,0	17,0	17,0	17,0
<b>Sebo</b>	0,94	0,94	0,94	0,94
<b>Mezcla de minerales (Ca 17:P 21)</b>	0,23	0,23	0,23	0,23
<b>Sal</b>	0,34	0,34	0,34	0,34
<b>Bicarbonato de sodio</b>	0,36	0,36	0,36	0,36
<b>Caliza</b>	0,38	0,38	0,38	0,38
<b>Óxido de magnesio</b>	0,15	0,15	0,15	0,15
<b>Carbonato de calcio</b>	0,57	0,57	0,57	0,57
<b>Premezcla de vitaminas <sup>1</sup></b>	0,09	0,09	0,09	0,09
<b>Vitamina E<sup>2</sup></b>	0,02	0,02	0,02	0,02

1. **Contenía:** 4,3% Zn, 3,8% Mn, 7,800 ppm Cu, 900 ppm I, 315 ppm Co, 220 ppm Se, 5,632,000 **UI**/kg vitamina A, 1,408,000 **UI** /kg vitamina D3, 18,700 **UI**/kg vitamina E (Vita Plus Corporation, Madison, WI)

2. **Contenía:** 20,000 **UI**/kg.

FIGURA 5

**Composición de nutrientes de las dietas experimentales.<sup>1</sup>**

<i>Nutriente</i>	<i>CONTROL</i>	<i>300</i>	<i>600</i>	<i>900</i>
DM	48,1	48,3	47,7	48,2
CP (% DM)	16,1	16,0	16,0	15,9
NEI <sup>2</sup> (Mcal/kg DM)	1,56	1,56	1,56	1,56
NDF (% DM)	34,7	34,6	34,5	34,5
ADF (% DM)	22,3	22,2	22,1	22,1
Almidón(% DM)	23,7	23,7	23,6	23,6
Grasa (% DM)	3,7	3,7	3,7	3,6
Ca (% DM)	0,9	0,9	0,9	0,9
P (% DM)	0,4	0,4	0,4	0,4

1. Cálculos basados en análisis de ingredientes individuales

2. NRC, 2001.

FIGURA 6

**Composición de nutrientes de las dietas experimentales.<sup>1</sup>**

<i>Nutriente</i>	<i>CONTROL</i>	<i>300</i>	<i>600</i>	<i>900</i>
DM	46,8	47,1	46,7	47,2
CP (% DM)	17,5	17,3	17,2	17,2
NEI (Mcal/kg DM)	1,60	1,60	1,60	1,61
NDF (% DM)	32,8	32,1	32,5	32,5
ADF (% DM)	23,6	22,9	22,7	22,6
Almidón (% DM)	22,7	23,4	22,7	23,3
Grasa (% DM)	4,28	3,97	3,87	3,86
Ca (% DM)	1,08	1,14	1,03	1,08
P (% DM)	0,43	0,46	0,44	0,44

1. Analizado por DayriLand Laboratories Inc. (Arcadia, WI).

FIGURA 7

## Resultados de producción

	Control	300	600	900	SEM	L	Q
DMI, kg/d	25,9	27,1	25,9	26,6	0,7	0,57	0,59
Leche, kg/d	40,3	41,5	41,2	41,4	1,2	0,20	0,33
<b>FCM, kg/d</b>	<b>36,3</b>	<b>38,4</b>	<b>38,8</b>	<b>37,8</b>	<b>1,1</b>	<b>0,20</b>	<b>0,08</b>
<b>ECM, kg/d</b>	<b>39,5</b>	<b>41,5</b>	<b>41,8</b>	<b>41,0</b>	<b>1,2</b>	<b>0,20</b>	<b>0,09</b>
<b>Grasa, %</b>	<b>3,53</b>	<b>3,66</b>	<b>3,62</b>	<b>3,53</b>	<b>0,14</b>	<b>0,82</b>	<b>0,06</b>
<b>Grasa, kg/d</b>	<b>1,35</b>	<b>1,45</b>	<b>1,49</b>	<b>1,42</b>	<b>0,57</b>	<b>0,26</b>	<b>0,07</b>
Proteína, %	3,09	3,12	3,10	3,12	0,05	0,60	0,78
Proteína, kg/d	1,23	1,27	1,27	1,26	0,04	0,39	0,42
<b>MUN, mg/dL</b>	<b>13,4</b>	<b>13,7</b>	<b>13,5</b>	<b>12,9</b>	<b>0,5</b>	<b>0,08</b>	<b>0,05</b>
ECM/DMI	1,52	1,55	1,60	1,56	0,04	0,28	0,29