



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 351 808**

⑫ Número de solicitud: 200900784

⑮ Int. Cl.:
A23K 1/18 (2006.01)

A23K 1/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **23.03.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **10.02.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
10.02.2011

⑰ Solicitante/s: **ALIMENTACIÓN SIGLO XXII, S.L.**
Plaza Nueva, 11
41001 Sevilla, ES

⑱ Inventor/es: **Carmona Arroyo, Antonio**

⑲ Agente: **Ungría López, Javier**

⑳ Título: **Procedimiento de fermentación industrial para el enriquecimiento en proteína microbiana de gramíneas recolectadas en verde.**

㉑ Resumen:

Procedimiento de fermentación industrial para el enriquecimiento en proteína microbiana de gramíneas recolectadas en verde.

La presente invención se refiere a un procedimiento de fermentación industrial para el enriquecimiento en proteína microbiana de gramíneas recolectadas en verde, que comprende ensilar y fermentar en anaerobiosis dichas gramíneas mediante la incorporación de una fuente de nitrógeno no proteico y el inóculo de gérmenes proteo-sintéticos obtenido a través de una selección de gérmenes que comprende:

- sembrar sobre un sustrato de gramíneas ricas en energía, al que se añade una cantidad de NNP, un inóculo que contiene microorganismos celulolíticos procedentes de flora ruminal, fermentarlo en una estufa en anaerobiosis durante 45 días, deshidratar y micronizar el producto resultante de la anterior fermentación con lo que se obtiene una primera generación de gérmenes proteo-sintéticos, repetir las tres etapas primeras de la misma manera pero sembrando el sustrato con los gérmenes de la generación anterior, obteniendo así un inóculo mejorado.

ES 2 351 808 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de fermentación industrial para el enriquecimiento en proteína microbiana de gramíneas recolectadas en verde.

Campo de la invención

El objeto de la presente invención es una técnica de fermentación industrial para el enriquecimiento en proteína microbiana, de sustratos fermentables de diversas gramíneas ricas en energía, recolectadas en verde, antes de su completa maduración, mediante su ensilado y fermentación en anaerobiosis obteniendo así productos para la alimentación animal (rumiantes y monogástricos herbívoros).

Estado de la técnica

En relación con esta tecnología la solicitud de patente P200500025 se refiere a un procedimiento de fermentación de sustratos fibrosos y lignofibrosos para alimentación de rumiantes y monogástricos, mediante microorganismos celulolíticos. Se trata del acondicionamiento de un sustrato de pajas u otros lignofibrosos con la adición de una fuente de nitrógeno, sembrado con una flora digestiva específica, la flora celulolítica, y la aplicación de condiciones anaerobias. En la presente invención a diferencia de esta patente, el sustrato es completamente diferente, y el inóculo que produce la fermentación así mismo distinto, porque aunque procede del anterior, los fermentos han sido seleccionados por su alta capacidad de síntesis proteica.

Un segundo documento incorporado como referencia es la patente española número de solicitud P200500017, relativa a un procedimiento de fermentación utilizando microorganismos celulolíticos procedentes de flora ruminal.

Objeto de la presente invención

El objeto de la presente invención es una técnica de fermentación industrial para el enriquecimiento en proteína microbiana, de sustratos fermentables de diversas gramíneas ricas en energía, recolectadas en verde, antes de su completa maduración, que es el momento más adecuado para su ensilado y conservación, y cuando su digestibilidad, contenido en carbohidratos fermentables es más alta porque el grado de lignificación de sus tallos es todavía incipiente. Este sustrato se fermenta siguiendo las pautas que se indican (incorporación de una fuente de nitrógeno no proteico y un inóculo de gérmenes altamente proteo-sintéticos). Mediante el ensilado y fermentación en anaerobiosis de dicho sustrato fermentable se obtienen productos para la alimentación animal (rumiantes y monogástricos herbívoros) totalmente diferentes a los originales, enriquecidos con la proteína de origen microbiano de alta calidad por su contenido en aminoácidos, de mayor digestibilidad y mayor capacidad para ser consumidos por los animales a los que se destina.

El objeto de la presente invención no se refiere, por tanto, a un ensilaje en particular, forraje de maíz o de otras gramíneas, de las que se obtienen, en determinadas condiciones, productos destinados a la alimentación animal (rumiantes y monogástricos herbívoros). Se refiere a una técnica de fermentación específica, que aplicada a cualquier forraje de gramíneas, que cumpla las condiciones que se detallan más adelante, vale como sustrato de fermentación para enriquecer estos alimentos en proteína microbiana, mejorando sus características nutritivas.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere en primer lugar a un procedimiento de selección de gérmenes proteosintéticos caracterizado porque comprende:

- sembrar sobre un sustrato de gramíneas ricas en energía, al que se añade una cantidad de NNP, un inóculo que contiene microorganismos celulolíticos procedentes de flora ruminal,

- y fermentarlo en una estufa de anaerobiosis durante 45 días,

- deshidratar y micronizar el producto resultante de la anterior fermentación con lo que se obtiene una primera generación de gérmenes proteo-sintéticos,

- repetir el sembrado sobre un sustrato idéntico al anterior, pero esta vez sembrando con los gérmenes procedentes de la primera generación, y mantener otros 45 días en estufa de anaerobiosis, para obtener una segunda generación de gérmenes,

- repetir las tres etapas primeras de la misma manera pero sembrando con los gérmenes de la segunda generación, obteniendo así un inóculo así obtenido de tercera generación,

- sembrar el inóculo así obtenido de tercera generación sobre un sustrato idéntico a los anteriores, pero esta vez cultivarlo en un silo con capacidad industrial, obteniendo cantidad suficiente de inóculo de gérmenes proteo-sintéticos de cuarta generación, que después del mismo tiempo de fermentación, es deshidratado, micronizado y envasado en sacos de plástico y sellado.

ES 2 351 808 A1

La presente invención se refiere también a un procedimiento de fermentación industrial para el enriquecimiento en proteína microbiana, de substratos fermentables de gramíneas ricas en energía caracterizado porque comprende:

- seleccionar un inóculo de gérmenes proteo-sintéticos de cuarta generación según el procedimiento descrito,
- recolectar dichas gramíneas en verde, antes de su completa maduración,
- ensilar y fermentar en anaerobiosis dichas gramíneas mediante la incorporación de:
 - una fuente de nitrógeno no proteico y
 - el inóculo de gérmenes proteo-sintéticos de cuarta generación.

Según una realización preferida el procedimiento de fermentación industrial comprende:

- sembrar un inóculo de gérmenes proteo-sintéticos de cuarta generación obtenido por el procedimiento de selección descrito, sobre un substrato fermentable de gramíneas ricas en energía al que se le añade una cantidad de una fuente de nitrógeno no proteico,
- llevar inmediatamente este substrato ya preparado a un silo donde se prensará y aislará perfectamente del oxígeno aéreo,
- dejarlo en fermentación entre 30 y 45 días en verano, 60 ó más en primavera-otoño.

Según una realización particular las gramíneas utilizadas son gramíneas con un contenido en humedad entre el 80 y el 50%, preferentemente entre el 75 y 55% de humedad, y entre el 20 y el 50% de materia seca, preferentemente entre el 25 y 45% de materia seca, dicha materia seca contiene más del 70% en peso en carbohidratos con un grado de lignificación de sus tallos inferior al 6% de lignina ácido detergente, LAD.

El nitrógeno no proteico, NNP, puede provenir de cualquier fuente de nitrógeno, como por ejemplo, puede tener un origen orgánico, como son los aminoácidos libres, péptidos, peptonas, aminos, amidas, proteínas solubles o degradables o inorgánico como nitratos, nitritos, amoníaco, biuret, urea, sulfatos mono o di-amónico.

Las gramíneas pueden ser cualquiera, por ejemplo, maíz, sorgo, pasto del Sudán, trigo, cebada, centeno, maíz, avena, arroz, caña de azúcar y mezclas de las mismas.

La presente invención se refiere en tercer lugar a un producto para alimentación animal que comprende una mezcla fermentada de forraje de gramíneas caracterizado porque ha sido obtenido a través de un procedimiento de fermentación industrial de fermentables de gramíneas ricas en energía que comprende:

- seleccionar un inóculo de gérmenes proteo-sintéticos a partir de microorganismos celulolíticos procedentes de flora ruminal según el procedimiento de selección descrito anteriormente,
- recolectar dichas gramíneas en verde, antes de su completa maduración,
- ensilar y fermentar en anaerobiosis dichas gramíneas mediante la incorporación de:
 - una fuente de nitrógeno no proteico y
 - el inóculo de gérmenes proteo-sintéticos de cuarta generación.

El inóculo polimicrobiano proteosintético, tiene su origen en la patente propiedad de ALIMENTACIÓN SIGLO XXII, S. L., (presentada el 5 enero del 2005, con el nº 200500017) con el título: "Procedimiento de selección de microorganismos celulolíticos a partir de flora ruminal y reproducción por fermentación industrial de la flora seleccionada". En este producto están representadas la mayoría de las especies microbianas responsables de la digestión ruminal (que suelen clasificarse según su actividad principal en celulolíticas, hemicelulolíticas, sacarolíticas, amilolíticas, proteolíticas, productoras de amonio, de vitaminas etc.). Cada grupo está formado por numerosas especies cuya actividad más representativa es la digestión de los radicales químicos correspondientes al grupo al que pertenecen si bien la mayoría son polifacéticas, esto es, que son capaces de producir enzimas con actividad sobre diferentes componentes de los substratos. Todas las especies microbianas, para reproducirse necesitan radicales carbohidratados en los que fijar amoníaco, y algunas especies también determinados aminoácidos y péptidos para con ellos crear sus propias proteínas, utilizando como energía de síntesis el ATP generado de la hidrólisis de los hidrocarbonados.

En un determinado substrato de fermentación, solamente pueden desarrollarse aquellas bacterias, o grupos de bacterias, que disponen de los equipos enzimáticos adecuados para degradar carbohidratos o proteínas que estén presentes este medio, para producir radicales carbohidratados sencillos (monosacáridos, como glucosa o pentosas) a la vez que energía química de síntesis, adenosin-tri-fosfato (ATP) y esqueletos de proteína, aminoácidos y amoníaco, con los que en el interior de su protoplasma a partir de éstos radicales sintetizar proteína y así poder reproducirse. Es por tanto

ES 2 351 808 A1

la composición del sustrato (medio de cultivo) y las condiciones eugenésicas de medio (humedad, pH, tensión de oxígeno, temperatura, tiempo de fermentación etc.) los factores que SELECCIONAN las especies microbianas que se desarrollarán en ése medio de cultivo, y crecerán con mayor rapidez e intensidad las que están mejor dotadas para utilizar los nutrientes disponibles. El agotamiento de alguno de los nutrientes del medio, modificaciones intensas del pH, deshidratación, la disminución intensa de la temperatura óptima, o la acumulación de residuos de fermentación, pueden disminuir e incluso paralizar la fermentación, e inducir a la formación de esporas como medio de supervivencia a los gérmenes dotados de esta capacidad.

Por tanto, este tipo especial de fermentación, consiste en la degradación en anaerobiosis de los carbohidratos fermentables (azúcares, almidones, pectinas, hemicelulosas y celulosas) de un determinado sustrato hasta convertirlos primero en hexosas y pentosas, que tras su fosforilación produce dos moléculas de piruvato, del que proceden dos moléculas de acetil-coenzima A. Estas penetran en el interior de las bacterias, donde - mediante el llamado "Ciclo de Krebs" - sufre sucesivas deshidrogenaciones con producción de CO₂, ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico) y adenosin-tri fosfato (ATP), cargado de una enorme cantidad de energía de síntesis. Cada mol de glucosa produce 38 moles de ATP.

Por otra parte el nitrógeno no proteico, y parte de las proteínas contenidas en el sustrato, son desaminadas para generar amoníaco y esqueletos carbohidratados, capaces penetrar así mismo en el interior de su protoplasma a través de su cutícula externa, y usando como energía de síntesis la contenida en el ATP, generan su propia proteína lo que les permite multiplicarse por bipartición. Este proceso de fermentación "*in vitro*" produce una predigestión de los nutrientes contenidos en el sustrato, semejante a la digestión ruminal, con lo que se origina un nuevo alimento enriquecido en proteína microbiana de muy alta calidad para la alimentación animal.

Técnica de SELECCIÓN de gérmenes proteo-sintéticos a partir de la patente de invención 200500017

Cuando el concentrado de gérmenes patentado por ALIMENTACIÓN SIGLO XXII, S. L., se siembra en condiciones adecuadas (de humedad, temperatura, ph, ausencia de oxígeno, etc.) sobre un sustrato determinado especialmente rico en energía fermentable al que se le añade en cantidad suficiente una fuente de nitrógeno no proteico (urea, amoníaco, sulfato amónico, o cualquier otra fuente de nitrógeno no proteico autorizado), para que su agotamiento precoz no paralice la fermentación, y se mantiene en una estufa de anaerobiosis a temperatura (de 38°C ± 1), y humedad relativa (del 80 al 85%) controladas durante un mínimo de 45 días, se desarrollan en la masa de fermentación principalmente aquellos gérmenes que son capaces de reproducirse más rápida e intensamente, consumiendo energía y amoníaco y generando ácidos grasos volátiles y con lo que reproducen una enorme cantidad de cuerpos microbianos, precisamente los más aptos y los mejor dotados para generar biomasa, con lo que se SELECCIONA una primera generación de gérmenes especializados en TRANSFORMAR EL NITRÓGENO NO PROTEICO EN PROTEÍNA MICROBIANA a partir de la energía producida en la fermentación, ATP.

En un ejemplo concreto para esta primera fermentación de selección de gérmenes proteosintéticos, hemos usado el siguiente sustrato: FORRAJE DE MAÍZ, con la siguiente analítica: (Mat. Seca, 41'79%; Cenizas 4'94%; EE 4'20%; Prot. Bruta% 7'62; Fibra Br. 20'97%; LAD 3'22%; Almidones 28'23%; Carbohidratos Fermentables 80%; y N - NH₃ 0'23). UREA con el 46% de N. Y como INOCULO, el ya patentado por ALIMENTACIÓN SIGLO XXII, en las siguientes proporciones:

FORRAJE DE MAIZ	97'3%
UREA	2'5%
INOCULO DESCRITO EN P200500017 de ALIM. SIGLO XXII	0'2%

La composición de éste sustrato, contando todo el amoníaco contenido en la urea, como proteína bruta (N x 6'25), teóricamente producirla un contenido en proteína bruta del 24'78%, lo que garantiza que durante todo el tiempo de fermentación la falta de amoníaco no actuará como factor limitante de la reproducción de los gérmenes.

Tras 45 días de fermentación en estufa de anaerobiosis a temperatura y humedad controlada, (como ya se indicó anteriormente) el producto final de ésta fermentación se deshidrata, microniza, y se somete a análisis químico para compararlo con el análisis del sustrato original, con lo que se comprueba la cantidad, calidad de la proteína neoformada y se hace recuento de gérmenes contenidos en la materia seca siguiendo la técnica de recuento de número más probable de gérmenes por gramo de producto.

Este inóculo polimicrobiano, (procedente de la primera fermentación) se utiliza como inóculo para realizar una nueva generación (la segunda) utilizando el sustrato de fermentación con la misma composición que el anterior, y se procede de la misma manera: 45 días de fermentación en estufa de anaerobiosis, deshidratación, análisis químico, recuento de gérmenes y se compara con los resultados de la generación anterior para comprobar la mejora de la capacidad fermentativa de los gérmenes sembrados.

Una tercera generación a partir de la segunda mejora todavía la capacidad fermentativa de los gérmenes, aunque ya en menor grado que la anterior pero todavía obtiene una mejor eficacia en la síntesis de proteína (en cantidad y

calidad), con incremento el nº de gérmenes contenidos en un gramo de materia seca. Estas tres primeras generaciones se realizan en el laboratorio, en la estufa de anaerobios.

La 4ª generación se realiza ya fuera del laboratorio, a nivel industrial, para obtener gran cantidad de inóculo que es el que se utiliza para sembrar grandes masas de forrajes de gramíneas, para la obtención del producto para la alimentación animal. Los análisis de materia seca de los inóculos de esta 4ª generación, han producido ya una muy ligera mejora de la tercera, por lo que se considera que los gérmenes que contiene han sido óptimamente SELECCIONADOS por su cualidad proteosintética, a partir del alto contenido en energía del sustrato.

10 *Características que deben reunir los componentes del sustrato de fermentación para su fermentación y transformación piensos para rumiantes y monogástricos herbívoros*

Las gramíneas idóneas para éste tratamiento, pueden pertenecer a cualquier género, a modo de ejemplo no limitante, pueden ser maíz, sorgo, pasto del Sudán, trigo, cebada, centeno, maíz, avena, arroz, caña de azúcar y mezclas de las mismas, siempre que contengan suficiente humedad que permita el desarrollo de los gérmenes sembrados (entre el 75 y 55% de humedad, o lo que es lo mismo, entre el 25 y 45% de materia seca), que su materia seca tenga alto nivel de carbohidratos fermentables (más del 70% de la materia seca), que proporcionen energía fermentable suficiente, y que el grado de lignificación de sus tallos sea bajo (inferior al 6% de lignina ácido detergente (LAD)). Los carbohidratos fermentables (CF) se calculan mediante la siguiente fórmula: $CF = 100 - (Proteína\ bruta\% + Grasa\% + Cenizas\% + LAD\%)$.

Las gramíneas a las que se les puede aplicar este procedimiento de fermentación, son en la práctica todas las que recolectadas cuando sus granos alcanzan consistencia pastosa, y todavía sus cañas permanecen con un grado de lignificación bajo, momento en que el contenido en energía fermentable de estas plantas completas es más elevado, para que los gérmenes puedan generar el máximo de biomasa el sustrato de fermentación debe contener mucha energía fermentable.

Todas estas gramíneas son muy diferentes entre sí, en su digestibilidad, fermentabilidad y valor nutritivo, que se determina por su composición química analítica (materia seca, cenizas, proteína, fibra bruta, azúcares, almidones, fibras neutro detergente, ácido detergente, lignina etc.), e incluso varían muchísimo, dentro de cada especie según el estado vegetativo que se encuentran en el momento de la siega. No obstante todas tienen como característica común, cuando se siegan en verde con un grado adecuado de maduración de sus semillas, el alto contenido en energía fermentable de su materia seca, a utilizar por los gérmenes proteo-sintéticos capaces de desarrollarse en estos medios de cultivo, y cuya biomasa compuesta por los cuerpos microbianos son los que enriquecen el medio en proteína. Cuanto mayor sea el contenido energético, en presencia de NNP, se producirá un número mayor de cuerpos microbianos y se sintetizará más proteína microbiana.

El contenido en proteína y carbohidratos fermentables de cada uno de estos forrajes recién segados, depende, además de la especie de gramínea, de su humedad, ya que los nutrientes están ligados a su materia seca, (cuyo porcentaje disminuye en el forraje húmedo a medida que aumenta la humedad). Cuando los forrajes son muy jóvenes, antes de que se complete el crecimiento de sus cañas, y con sus espigas inmaduras todavía incipientes, son muy húmedos, (con solo el 14 o hasta el máximo del 20% de materia seca), por lo que por kilo de forraje recién recolectado, en estas condiciones, contiene pocos carbohidratos fermentables en relación a su peso húmedo. Su capacidad de transformar la energía en proteína es en estas condiciones, por tanto, baja. A medida que se produce la maduración de las semillas, la planta completa va creciendo gradualmente en materia seca, (llegando a sobrepasar con mucho el 80%, cuando culminan su completa madurez), y sus tallos van incrementando su contenido en lignina y cediendo casi todos sus nutrientes a las semillas por lo que su residuo final, cuando se cosechan los granos, son las pajas. Es por tanto el contenido en materia seca y el estado de maduración de los granos ya pasados del estado lechoso a francamente pastoso, e iniciado el estado cristalino, el momento en que la totalidad de la planta contiene mayor cantidad de energía fermentable y cuando todavía el grado de lignificación de los tallos y hojas es bajo y su humedad (55 al 70%) es la más adecuada para permitir el desarrollo microbiano.

Como origen de nitrógeno no proteico (NNP), puede valer cualquiera de las fuentes citadas anteriormente, siempre que se conozca el% de nitrógeno transformable en amoníaco que contiene, ya que cada fuente dispone de diferente % de este elemento. Las de origen orgánico aminoácidos, peptonas, proteínas solubles o degradables, etc., no pasan del 16% de N, y resulta cara su utilización, aunque son de una calidad excelente, porque cuando los enzimas de los fermentos las desaminan, dejan como residuo esqueletos carbohidratados que funcionan como factores de crecimiento microbiano. Algunos subproductos de origen orgánico contienen en cantidad este tipo de NNP. De origen inorgánico el amoníaco líquido, con el 80% de N, es la fuente más barata pero su manejo y distribución en ensilados es difícil porque se evapora con facilidad y es irrespirable, aunque pudiera utilizarse adoptando determinadas precauciones. La más universalmente usada como aditivo es la urea, con un 46% de nitrógeno, que es precisamente la que nosotros hemos utilizado. Los sulfatos mono o di-amónico, se recomiendan cuando el contenido en azufre de determinadas gramíneas es escaso, porque este elemento es necesario para la síntesis de determinados aminoácidos que forman parte de las proteínas neo-formadas. Cualquier fuente de NNP puede servir como fuente de amoníaco en este tipo de fermentaciones.

El inóculo de gérmenes proteo-sintéticos es fundamental, porque sin su presencia e intenso desarrollo en la masa de fermentación, solo se produciría un ensilado normal, a partir de la flora láctica ya contenida en el sustrato, que con

ES 2 351 808 A1

muy alta producción de ácido láctico y una bajada acelerada del pH hasta entre 3 y 4, que en muy corto tiempo, una a dos semanas, paraliza la fermentación, pero sin posibilidad de generación de nueva proteína neoformada. La siembra del inóculo proteo-sintético en el sustrato, orienta la fermentación hacia la producción de ácidos grasos volátiles, y energía de síntesis (ATP), a partir de los carbohidratos fermentables y la desaminación del nitrógeno no proteico para producir amoníaco, lo que les permite desarrollar su alta capacidad de proteosíntesis.

El nitrógeno no proteico, NNP, es de incorporación obligada al sustrato, porque es la fuente de nitrógeno necesaria para la síntesis de proteína por parte de los microorganismos. Las gramíneas son muy pobres en proteína para atender las altas necesidades de este nutriente de animales en crecimiento, cebo o producción de leche por lo que su enriquecimiento en nitrógeno no proteico transformado por fermentación en proteína es importante desde los puntos de vista zootécnico y económico.

Durante el proceso de fermentación el nitrógeno contenido en estas fuentes de NNP origina amoníaco, igual que el que procede de la desaminación de parte de las proteínas solubles y degradables que forman parte de los forrajes. Este amoníaco junto a algunos aminoácidos libres, y radicales carbohidratados procedentes de la hidrólisis de los glúcidos y de los esqueletos de aminoácidos desaminados del NNP, constituyen los metabolitos con los que las bacterias replican en el interior de su protoplasma su propia proteína para su crecimiento y multiplicación.

En un determinado sustrato de fermentación, solamente pueden desarrollarse aquellas bacterias, o grupos de bacterias, que disponen de los equipos enzimáticos adecuados para degradar carbohidratos o proteínas que estén presentes en este medio, para producir radicales carbohidratados sencillos (monosacáridos, como glucosa o pentosas) a la vez que energía química de síntesis, adenosin-tri-fosfato (ATP) y esqueletos de proteína, aminoácidos y amoníaco, con los que en el interior de su protoplasma a partir de éstos radicales sintetizar proteína y así poder reproducirse. Es por tanto la composición del sustrato (medio de cultivo) y las condiciones eugenésicas de medio (humedad, pH, tensión de oxígeno, temperatura, tiempo de fermentación etc.) los factores que seleccionan las especies microbianas que se desarrollarán en ese medio de cultivo, y crecerán con mayor rapidez e intensidad las que están mejor dotadas para utilizar los nutrientes disponibles. El agotamiento de alguno de los nutrientes del medio, modificaciones intensas del pH, deshidratación, la disminución intensa de la temperatura óptima, o la acumulación de residuos de fermentación, pueden disminuir e incluso paralizar la fermentación, e inducir a la formación de esporas como medio de supervivencia a los gérmenes dotados de esta capacidad.

Por tanto, este tipo especial de fermentación, consiste en la degradación en anaerobiosis de los carbohidratos fermentables (azúcares, almidones, pectinas, hemicelulosas y celulosas) de un determinado sustrato hasta convertirlos primero en hexosas y pentosas, que tras su fosforización produce dos moléculas de piruvato, del que proceden dos moléculas de acetil-coenzima A. Éstas penetran en el interior de las bacterias, donde mediante el "Ciclo de Krebs" sufren sucesivas deshidrogenaciones con producción de CO₂, ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico) y adenosin-tri fosfato (ATP), cargado de una enorme cantidad de energía de síntesis. Cada mol de glucosa produce 38 moles de ATP.

Por otra parte el nitrógeno no proteico, y parte de las proteínas contenidas en el sustrato, son desaminadas para generar amoníaco y esqueletos carbohidratados, capaces penetrar así mismo en el interior de su protoplasma a través de su cutícula externa. Usando como energía de síntesis la contenida en el ATP, generan su propia proteína lo que les permite multiplicarse por bipartición. Este proceso de fermentación "*in vitro*" produce una predigestión de los nutrientes contenidos en el sustrato, semejante a la digestión ruminal, con lo que se origina un nuevo alimento enriquecido en proteína de muy alta calidad para la alimentación animal.

El tiempo de fermentación activa se prolonga de 30 a 45 días en verano, porque las altas temperaturas favorecen la fermentación mientras que en invierno este tiempo es más largo porque la baja temperatura ralentiza la actividad microbiana y alarga la fermentación hasta los 60 días. La temperatura ambiente óptima para el desarrollo de esta flora está comprendida entre 30 y 40°C, que se corresponden con la época de primavera tardía, verano, y otoños cálidos, que son las fechas en que suelen cosecharse los forrajes de gramíneas para su ensilado. Valores por encima o debajo de estas temperaturas ralentizan la fermentación, prolongándose hasta 60 días el tiempo de fermentación, cuando la temperatura es de entre 15 y 30°C. Por debajo de estas temperaturas, la fermentación es escasísima y se paraliza del todo por debajo de los 4°C, porque los gérmenes son incapaces de reproducirse, aunque permanecen vivos, en estado de latencia hasta que se restablece de nuevo su temperatura eugenésica.

En cuanto a la humedad óptima del sustrato ya se ha dicho que está comprendida entre el 55 y el 70%. Un contenido de más del 45% de MS, ralentiza la fermentación, por falta de humedad; pero cuando baja del 30%, se concentran en el suelo y paredes de los silos líquidos rezumados de la masa en fermentación, y cuando la MS está por debajo del 20%, ya llegan a formar colecciones líquidas importantes.

El pH final de esta fermentación se sitúa entre 4 y 6, porque los ácidos grasos volátiles producidos (acético, propionico y butírico) son menos fuertes que el láctico cuya producción en este tipo de fermentación es escasa.

65 *Productos que pueden elaborarse con esta técnica*

Los productos que se pueden elaborar son muy numerosos en función de la clase de gramínea que forme parte del sustrato, de su composición química analítica, de la capacidad fermentativa de sus carbohidratos, contenido en

proteína etc., y de la cantidad potencial de producción de amoníaco procedente del nitrógeno no proteico durante la fermentación. La capacidad de fijación de proteína microbiana depende de la energía contenida en el sustrato y de la cantidad de amoníaco aportado en forma de NNP para su fermentación. Si la cantidad de amoníaco supera la potencial fermentabilidad del sustrato quedará en su seno un sobrante de amoníaco no utilizado, que como es muy alcalino, mantendrá alto el pH, incluso por encima de 7, lo que pudiera producir rechazo del alimento por los animales. Es por tanto muy importante la dosificación del NNP, en función del contenido en materia seca que contienen los carbohidratos fermentables de los forrajes, para permitir que el pH final del producto sea ácido y esté comprendido como máximo entre 5 y 6. De esta forma el ganadero puede formular la composición del sustrato y predecir de forma bastante aproximada la composición del producto que le interesa obtener, una vez finalizada la fermentación, de acuerdo con las necesidades nutritivas de sus animales.

En los trabajos de investigación que se han realizado para seleccionar el concentrado proteo-sintético y para la producción industrial del alimento para realizar las pruebas de alimentación, se ha utilizado forraje de maíz, que cumplía todas las condiciones de materia seca, madurez de granos etc., que ya se han reseñado. Se podría haber realizado sobre otra clase de gramíneas de composición química y analítica semejante y se hubieran obtenido resultados muy semejantes, tanto en la selección del concentrado proteo-sintético, como en el producto final de fermentación. Así, los gérmenes seleccionados por este procedimiento, actúan con la misma eficacia sobre distintos forrajes de gramíneas.

Uso de los productos de fermentación

Las necesidades nutricionales de los animales son muy diversas dependiendo de la especie, raza, orientación y situación productiva, nivel de producción según su grado de selección genética etc. Por otra parte, la capacidad de los animales para consumir alimentos en general es limitada, por lo que un alimento en teoría debería aportar todos los nutrientes necesarios contenidos en su materia seca para que, en la cantidad que voluntariamente pueda ingerir el animal, completara sus necesidades de mantenimiento y producción. En la práctica, las explotaciones ganaderas intensivas, tienen que complementar los forrajes con concentrados, formulados de forma que el conjunto complete, dentro de su ingestión voluntaria de materia seca, todas las necesidades nutritivas de sus altas producciones. Cuanto más rico es el forraje en energía y proteína, la necesidad de incluir concentrados es menor, lo que conduce a una importante mejora de las condiciones fisiológicas de la digestión, eliminando riesgos de acidosis ruminal, y a la vez una fuerte disminución de los costes de alimentación. Sin embargo, en animales cuyas necesidades nutritivas sean moderadas, próximas a las de mantenimiento, y hasta con producciones limitadas, como las de amamantamiento, estos productos de fermentación, pueden consumirse “*ad libitum*” o incluso racionadas con suplemento de pajas que reducirán el consumo de estos forrajes fermentados.

Animales que pueden hacer uso de estos alimentos

Naturalmente todos los rumiantes que han superado la fase de lactación están especialmente dotados para su consumo, porque someten los alimentos a una fermentación previa (fermentación ruminal) antes de que fluyan al estómago glandular (cuajar), donde se realiza la verdadera digestión. Estos animales, cuando ingieren alimentos con bajo contenido en proteína y alto en celulosa, hacen uso del NNP para sintetizar en el rumen proteína microbiana que después es digerida en el cuajar y además aprovechan parte de la energía contenida en celulosa para transformarla en ácidos grasos volátiles que les aportan energía a su metabolismo. Pero además hay una serie de monogástricos herbívoros, cuyo aparato digestivo está diseñado para consumir alimentos fibrosos como los équidos, asnos, cerdas adultas etc., grandes consumidores de hierba, que si bien no pueden hacer uso de la celulosa de los alimentos bastos, (por no disponer de rumen) si que utilizan los carbohidratos no celulósicos, los ácidos grasos volátiles, los productos intermedios de la fermentación, y además la proteína microbiana creada en el proceso de la fermentación “*in vitro*”, contenida en estos nuevos alimentos. Otras especies posibles consumidoras, pueden ser los leporinos, (conejos, liebres etc.) e incluso ciertas aves como los avestruces, grandes consumidores de forrajes.

Mediante la técnica de fermentación industrial para el enriquecimiento en proteína microbiana, de sustratos fermentables de diversas gramíneas se produce una importante mejora de sus características nutricionales.

Práctica para la elaboración de los sustratos para la producción de alimentos para ganadería

La siega y picado del forraje de gramíneas para su ensilado, se realiza con cosechadoras de forraje “*ad hoc*”, que cargan un vehículo para llevarlos hasta la granja, donde se ensilan. La mayoría de las explotaciones cuentan con un carro mezclador para alimentar a la ganadería en régimen “*unifeed*”, que resulta ideal para realizar las mezclas de los ingredientes que componen el sustrato de fermentación: Forraje de maíz, urea como fuente más usada de NNP y los fermentos que provocan la fermentación.

Para dosificar correctamente la mezcla del sustrato, conviene tener en cuenta los siguientes detalles

1º.- La materia seca (MS) que contiene el forraje, porque la dosis de urea como fuente de NNP, está en función del % de MS, pero que al dosificarla sobre forraje húmedo, cuya humedad es variable (entre el 55 y 70%) hay que calcular correctamente la cantidad a incorporar.

2º.- Hay que saber que por cada 1% de urea (46% de Nitrógeno) agregada a la MS del forraje, proporciona un incremento de 2'87% en la proteína microbiana (PM) naciente contenida en esta MS. Así, por ejemplo, si consideramos

ES 2 351 808 A1

un forraje que contiene un 30% de MS y una proteína bruta en su MS del 8%, y pretendemos conseguir un producto fermentado con el 15% de proteína, tenemos que crear un 7% de PM; Si dividimos 7 (que queremos crear) entre 2'87 (que aporta un 1% de urea) = 2'44% de la MS. Esto es 2'44 kilos de urea por cada 100 kilos de MS del forraje. Como consideramos que este forraje tiene un 30% de MS y tenemos que dosificar sobre el forraje húmedo, a cada 100 kilos de forraje le corresponden el 30% de 2'44 = 730 gr, de urea por cada 100 kilos de forraje que vayan a ensilarse.

3°.- Los fermentos a dosificar deben incorporarse a razón de entre 1 y 2 kilos por tonelada, esto es 100 a 200 gr, por 100 kilos.

4°.- Hay que procurar que la distribución de la urea y el inóculo en una masa tan grande de forraje sea lo más perfecta posible, por lo que se debe recurrir a elementos mecánicos que realicen con la mayor perfección la mezcla de los componentes del sustrato, empleando el tiempo necesario para la misma.

5°.- Inmediatamente después de preparado el sustrato debe llevarse al silo, donde se compactará perfectamente para la eliminación del aire, y se sellará en completa anaerobiosis.

En el cuadro siguiente se analiza la importancia de diferentes dosis de urea sobre la una gramínea con contenidos en humedad del 55, 60, 65 y 70% y con un contenido del 6'5% de proteína bruta en su materia seca, con incorporación de 0'5, 0'75, 1'00, 1'25 y 1'5% de urea; el análisis de su materia seca debe contener un mínimo de carbohidratos fermentables del 70%. En este caso las dosis recomendadas sobre MS de urea, para conseguir una buena fermentación, y máximo aprovechamiento de los carbohidratos fermentables (CF), en primavera-verano, con temperaturas de entre 20 y 30°C, deben estar comprendidas entre un máximo de 2'5 a 3%, que después de su fermentación, consigue añadir a la proteína de la MS del sustrato entre un 7 a un 8'5% de proteína microbiana, con un aprovechamiento del N-NH₃ prácticamente total.

%Humedad	%M: Seca	% Urea M.Humeda	% Urea M. Seca	PB. Urea M. Seca	PB.Total M.seca
55	45	0'5	1'11	3'19	9'69
60	40	0'5	1'25	3'59	10'09
65	35	0'5	1'42	4'08	10'58
70	30	0'5	1'66	4'77	11'27

%Humedad	%M: Seca	% Urea M.Humeda	% Urea M. Seca	PB. Urea M. Seca	PB.Total M. seca
55	45	0'75	1'66	4'77	11'27
60	40	0'75	1'87	5'37	11'87
65	35	0'75	2'14	6'15	12'65
70	30	0'75	2'50	7'18	13'68

%Humedad	%M: Seca	% Urea M.Humeda	% Urea M. Seca	PB. Urea M. Seca	PB.Total M. seca
55	45	1'00	2'22	6'38	12'88
60	40	1'00	2'50	7'18	13'68
65	35	1'00	2'85	8'91	15'41
70	30	1'00	3'33	9'57	16'07

ES 2 351 808 A1

%Humedad	%M: Seca	% Urea M.Humeda	% Urea M. Seca	PB. Urea M. Seca	PB.Total M. seca
55	45	1' 25	2' 77	7' 96	14' 21
60	40	1' 25	3' 12	8' 97	15' 47
65	35	1' 25	3' 57	10' 26	16' 76
70	30	1' 25	4' 16	11' 96	18' 46

%Humedad	%M: Seca	% Urea M.Humeda	% Urea M. Seca	PB. Urea M. Seca	PB.Total M. seca
55	45	1' 50	3' 30	9' 57	16' 07
60	40	1' 50	3' 75	10' 78	17' 28
65	35	1' 50	4' 28	12' 30	18' 80
70	30	1' 50	4' 58	13' 16	19' 66

Resultado práctico de la técnica de fermentación, para la producción de piensos para el ganado:

Para constatar éstos hechos, se confeccionaron tres microsilos con la siguiente composición:

1°.- Del forraje de maíz recién recolectado para ensilar, sin ningún aditivo, para que una vez ensilado sirviera como testigo con el que comparar con los dos siguientes

2°.- De un sustrato de fermentación, compuesto de: Forraje de maíz el 99'1%; Urea 46% de N el 0'9%, sin incorporación de fermentos.

3°.- De sustrato de fermentación idéntico al 2°, pero con incorporación además del 0'2% de fermentos proteo-sintéticos.

Con ellos se confeccionaron tres microsilos, fuertemente comprimidos y sellados, para conseguir un ambiente en anaerobiosis, que se mantuvieron en una estufa convencional durante 45 días a la temperatura de 39°C., (que es la temperatura normal en el interior del rumen) desde el 15 de mayo hasta el 3 de julio, fecha en que se abrió y se iniciaron los análisis de laboratorio.

Cuadro comparativo de los análisis químicos

	1°- Forraje de Maíz	2°- Sustrato sin fermentos	3°- Sustrato con fermentos
1.-Humedad	67' 5	66' 89	70' 97
2.-Materia seca	32' 5	33' 11	29' 10
3.-Proteína Bruta	7' 61	14' 06	14' 81
4.-Nitrógeno NH	0' 23	1' 266	0' 19
5.-Proteína Bruta			
NH ₃	1' 437	7' 918	1' 187
6.-Proteína Bruta.			
sin NH ₃	6' 173	6' 142	13' 623

ES 2 351 808 A1

Comentarios:

3.- La proteína bruta representa el nitrógeno total (incluido el contenido en nitrógeno NH_3) X 6'25 y representa la PB contenida en la MS.

4.- El nitrógeno NH_3 se analiza independientemente de la proteína bruta y representa el% de NH_3 contenido en la MS.

5.- La proteína bruta del NH_3 , representa el nitrógeno NH_3 (punto 4) X 6'25 que es la cantidad de proteína Br., NH_3 contenida en la MS.

6.- Representa la PB de 3, menos la línea 5 que es la PB de origen amoniacal.

En la columna 1ª (silo de maíz): La proteína bruta de la MS (7'61%) incluye el 1'437% de PB., de origen amoniacal, que corresponde al 0'23% de N- NH_3 X 6'25.

La columna 2ª, (maíz más urea, pero sin fermentos) con el 14'06% de proteína, de la que 7'918 es proteína de origen NH_3 aportada por la urea (1'266 X 6'25).

En la columna 3, maíz fermentado, con el 14'81% de PB, indica que la P.Br., del silo de maíz ha crecido desde 7'61 en 7'2 puntos hasta (14'81) y solamente quedan de residuos de proteína de origen amoniacal el 1'187%, que viene a ser la mitad de la que inicialmente contiene el silo de maíz.

Explicación detallada de la invención

Una vez ensilado perfectamente el sustrato, se inicia rápidamente la fermentación por gérmenes sembrados. Su capacidad para reproducirse es elevadísima en las condiciones eugenésicas del medio; esto es: abundancia de carbohidratos fermentables, ausencia de oxígeno, grado de humedad, temperatura adecuada, pH del medio y contenido en NNP de la mezcla.

La fermentación se produce entre un amplio margen de contenido en humedad: entre un 25 a 55% de MS, si bien se consideran óptimos entre 35 y 45%; la temperatura ambiente influye en la fermentatividad del sustrato, siendo óptima entre 25 y 40°C. La fermentación se paraliza con temperaturas por debajo de 4°C.

La proporción de urea en la mezcla en relación con el contenido en MS del forraje, depende del contenido de carbohidratos fermentables, que va creciendo a medida que va madurando la planta del forraje. Ya se ha calculado arriba la forma de calcular el% de urea sobre MS y sobre MH: El 1'5% sobre MS aumenta la proteína bruta en un 4'3% y el 2'5% en un 7'18%.

El tiempo de fermentación se prolonga durante los meses de invierno y con el aumento del% de urea, El pH inicial esta próximo a 7; Si la cantidad de urea es elevada puede elevarse durante la primera semana de fermentación hasta pH próximo a 8 para descender después hacia final de la fermentación hasta situarse por debajo de 5.

Una vez iniciada la fermentación se produce la inmediata degradación extracelular de carbohidratos fermentables, mediante la acción de enzimas bacterianos hasta hexosas y pentosas, con una enorme producción de energía (ATP). Estos azúcares y el ATP penetran en el interior de las células microbiana donde se convierten a través del pívurato en acetil-coenzima A, del que se producen ácidos orgánicos volátiles (acetato, propionato y butirato) y también CO_2 y CH_4 .

De manera sincronizada con el anterior proceso, las bacterias que producen ureasa, hidrolizan en el medio las moléculas de urea en CO_2 y 2NH_3 (amoníaco) así como las proteolíticas desaminan los aminoácidos libres y otras formas de NNP, con más producción de NH_3 y radicales carbohidratados.

En el interior de las bacterias se produce la síntesis de proteína mediante la replicación de su propia proteína microbiana, usando las más eficaces, como fuente de nitrógeno exclusivamente amoníaco, mientras que otras, con menos capacidad de síntesis, necesitan además aminoácidos libres o péptidos.

De esta forma, las bacterias se reproducen de forma activísima, una generación cada 20 minutos, hasta agotar el sustrato de carbohidratos fermentables o de amoníaco, o cuando el pH del medio es tan bajo, menor de 4, que paraliza el proceso. Muchas de las bacterias que intervienen en esta predigestión "in vitro", no superviven a éste nivel de pH, y terminan Usándose y vertiendo en el medio el contenido de su protoplasma muy rico en proteína; otras que tienen capacidad para esporular, lo hacen, y solo quedan de ellas los núcleos refringentes, y toda su proteína protoplasmática es vertida así mismo en el medio.

Los productos finales de la fermentación, ácidos grasos volátiles, radicales carbohidratados no utilizados, proteína microbiana soluble etc., permanecen en el sustrato, y cuando son ingeridas por los rumiantes, los AGV, se absorben

ES 2 351 808 A1

directamente a través de la mucosa ruminal y la proteína neoformada se comporta como de sobrepaso, o “by pass” y se digiere en su mayoría en intestino delgado, proporcionando aminoácidos de alta calidad al metabolismo animal. El CNCPS, estima la composición media de las bacterias que componen la biomasa que llegan al estómago glandular (cuajar), para ser digeridas que es: 12% de grasa, 21% de carbohidratos, 4’5% de cenizas, 37’5 de proteína verdadera digestible en el intestino delgado, 15’5 de proteína verdadera ligada a la pared bacteriana no digestible y 9’5 de ácidos nucleicos que se absorben, y excretan en la orina, una vez transformados en purinas.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de fermentación industrial para el enriquecimiento en proteína microbiana de gramíneas recolectadas en verde **caracterizado** porque comprende:

- a) seleccionar un inóculo de gérmenes proteo-sintéticos de cuarta generación mediante las siguientes etapas:
 - a₁) sembrar sobre un sustrato de gramíneas ricas en energía, al que se añade una cantidad de NNP, un inóculo que contiene microorganismos celulolíticos procedentes de flora ruminal,
 - a₂) fermentarlo en una estufa en anaerobiosis durante 45 días,
 - a₃) deshidratar y micronizar el producto resultante de la anterior fermentación con lo que se obtiene una primera generación de gérmenes proteo-sintéticos,
 - a₄) repetir el sembrado sobre un sustrato idéntico al anterior, pero esta vez sembrando con los gérmenes procedentes de la primera generación, y mantener otros 45 días en estufa de anaerobiosis, para obtener una segunda generación de gérmenes,
 - a₅) repetir las tres etapas primeras de la misma manera pero sembrando con los gérmenes de la segunda generación, obteniendo así un inóculo de tercera generación, y
 - a₆) sembrar el inóculo de tercera generación sobre un sustrato idéntico a los anteriores, pero esta vez cultivarlo en un silo con capacidad industrial, obteniendo cantidad suficiente de inóculo de gérmenes proteo-sintéticos de cuarta generación, que después del mismo tiempo de fermentación, es deshidratado, micronizado y envasado en sacos de plástico y sellado,
- b) recolectar dichas gramíneas en verde, antes de su completa maduración,
- c) ensilar y fermentar en anaerobiosis dichas gramíneas mediante la incorporación de:
 - una fuente de nitrógeno no proteico y
 - el inóculo de gérmenes proteo-sintéticos de cuarta generación seleccionado en el paso a).

2. Procedimiento de fermentación industrial según la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende:

- a) sembrar un inóculo de gérmenes proteo-sintéticos de cuarta generación sobre un sustrato fermentable de gramíneas ricas en energía seleccionado en el paso a) de la reivindicación 1 al que se le añade una cantidad de una fuente de nitrógeno no proteico,
- b) llevar inmediatamente este sustrato ya preparado a un silo donde se prensará y aislará perfectamente del oxígeno aéreo,
- c) dejarlo en fermentación entre 30 y 45 días en verano, 60 ó más en primavera-otoño.

3. Procedimiento de fermentación industrial según la reivindicación 1, **caracterizado** porque las gramíneas utilizadas son gramíneas con un contenido en humedad entre el 80 y el 50%, preferentemente entre el 75 y 55% de humedad, y entre el 20 y el 50% de materia seca, preferentemente entre el 25 y 45% de materia seca, dicha materia seca contiene más del 70% en peso en carbohidratos con un grado de lignificación de sus tallos inferior al 6% de lignina ácido detergente, LAD.

4. Procedimiento de fermentación industrial según la reivindicación 1, **caracterizado** porque las gramíneas están seleccionadas entre maíz, sorgo, pasto del Sudán, trigo, cebada, centeno, maíz, avena, arroz, caña de azúcar y mezclas de las mismas.

5. Procedimiento de fermentación industrial según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el nitrógeno no proteico, NNP, está seleccionado entre aminoácidos libres, péptidos, peptonas, aminas, amidas, proteínas solubles o degradables, nitratos, nitritos, urea, amoníaco, sulfatos mono o di-amónico y biuret.

6. Producto para alimentación animal según la reivindicación 1 que comprende una mezcla fermentada de forraje de gramíneas **caracterizado** porque ha sido obtenido a través de un procedimiento de fermentación industrial de fermentables de gramíneas ricas en energía que comprende:

- a) seleccionar un inóculo de gérmenes proteo-sintéticos obtenidos mediante el paso a) de la reivindicación 1 a partir de microorganismos celulolíticos procedentes de flora ruminal según el procedimiento de la reivindicación

ES 2 351 808 A1

b) recolectar dichas gramíneas en verde, antes de su completa maduración,

c) ensilar y fermentar en anaerobiosis dichas gramíneas mediante la incorporación de:

- 5 - una fuente de nitrógeno no proteico y
- el inóculo de gérmenes proteo-sintéticos de cuarta generación seleccionado en el paso a) de la reivindicación 1.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200900784

②② Fecha de presentación de la solicitud: 23.03.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A23K1/18** (01.01.2006)
A23K1/00 (01.01.2006)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 2560830 A (TURNER CHARLES W) 17.07.1951, todo el documento.	1-6
A	ES 2261059 A1 (ALIMENTACION SIGLO XXII S L) 01.11.2006, todo el documento.	1-6
A	US 3857971 A (ABDO K et al.) 31.12.1974, todo el documento.	1-6
A	US 2007098822 A1 (MANKOVITZ ROY J) 03.05.2007, párrafos 0058-0069.	1-6
A	ES 2257208 A1 (ALIMENTACION SIGLO XXII S L) 16.07.2006, todo el documento.	1-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 25.01.2011	Examinador E. Ulloa Calvo	Página 1/5
--	------------------------------	---------------

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A23K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.01.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-6	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-6	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 2560830 A (TURNER CHARLES W)	17.07.1951
D02	ES 2261059 A1 (ALIMENTACION SIGLO XXII S L)	01.11.2006
D03	US 3857971 A (ABDO K et al.)	31.12.1974
D04	US 2007098822 A1 (MANKOVITZ ROY J)	03.05.2007
D05	ES 2257208 A1 (ALIMENTACION SIGLO XXII S L)	16.07.2006

La solicitud describe un procedimiento de fermentación industrial para el enriquecimiento en proteína microbiana de gramíneas recolectadas en verde, así como el producto obtenido por ese procedimiento.

El documento D01 habla del empleo de un complemento en alimentación para ganado que aumenta la capacidad de asimilación de nitrógeno no proteico (NNP) por parte del mismo en los casos en que los forrajes empleados como alimento llevan insuficientes sustancias estimulantes del desarrollo de los microorganismos del rumen. Con escasez de sustancias estimulantes crecen pocos microorganismos en el rumen, y el NNP no se convierte en proteína microbiana. Para evitarlo, adiciona a la ración (ej. ensilado de gramíneas) bacterias del rumen previamente seleccionadas junto con nitrógeno no proteico y concentrados. Para obtener los microorganismos seleccionados del rumen, y emplearlos como sustancia estimulante, se realiza un cultivo in vitro de los microorganismos, fermentando anaeróbicamente sobre heno, gramíneas en verde u otro sustrato, junto con vitaminas. Se obtiene un inóculo que se seca. Mediante este cultivo in vitro se pueden obtener cultivos de microorganismos específicos mediante técnicas de selección conocidas en el estado de la técnica. Así, se pueden obtener finalmente cultivo de bacterias con alta capacidad de digestibilidad de celulosa (celulolíticas), alta capacidad proteo-sintética, etc.

El documento D02 selecciona microorganismos celulolíticos a partir de microorganismos del rumen para su empleo posterior sobre sustratos lignofibrosos. Realiza un cultivo acidificado, con urea como fuente de nitrógeno no proteico, sobre un sustrato rico en proteína (harina de soja, salvado de trigo con bagazo de cerveza,...). Posteriormente deshidrata, microniza y envasa en sacos de plástico sellados.

El documento D03 se refiere a un aditivo para ganado que incluye microorganismos del rumen cultivados sobre un sustrato a base de almidón, y con NNP (nutrientes). El cultivo se realiza en varias etapas para adaptar los microorganismos al sustrato. De esta forma el rumen del ganado se adaptará al nuevo alimento a base de almidón sin sufrir un periodo de adaptación, ya que los microorganismos del rumen estarán adaptados al sustrato que utilizarán como fuente de energía, así como al NNP que emplearán. Este documento selecciona un inóculo a partir de microorganismos del rumen (incluso de cuarta generación), pero sobre otro sustrato distinto al indicado en la solicitud.

El documento D04 describe un alimento para animales a base de microorganismos obtenidos del rumen fermentados sobre gramíneas ricas en energía. Los microorganismos del rumen se emplean directamente o tras ser cultivados o amplificados para su uso.

El documento D05 narra un procedimiento de obtención de un producto alimenticio para rumiantes y monogástricos, que incluye la fermentación mediante gérmenes celulolíticos de sustratos fibrosos y lignofibrosos.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y 8.1 L.P.)**

La solicitud describe un procedimiento de fermentación industrial para el enriquecimiento en proteína microbiana de gramíneas recolectadas en verde, así como el producto obtenido por ese procedimiento. Consta de tres etapas: selección del inóculo de gérmenes proteo-sintéticos de cuarta generación (partiendo de microorganismos celulolíticos), recolección de las gramíneas en verde y ensilado y fermentado de las mismas en anaerobiosis, junto con el inóculo de la primera etapa y una fuente de nitrógeno no proteico.

Es conocido en el estado de la técnica la selección de inóculos de microorganismos procedentes del rumen para su empleo posterior en alimentación animal, si bien ninguno de ellos parte de microorganismos celulolíticos. En concreto, la patente D02 habla de la selección de microorganismos celulolíticos a partir de microorganismos del rumen para su empleo posterior sobre sustratos lignofibrosos, empleando para ello urea como fuente de NNP, pero utilizando otro sustrato distinto a la solicitud (sustrato proteico). Hay otras patentes que utilizan microorganismos procedentes del rumen para la selección, y utilizando gramíneas en verde como sustrato, si bien no especifican el partir de microorganismos celulolíticos. Un ejemplo de ello es el documento D01, que selecciona cultivando in vitro los microorganismos del rumen sobre un sustrato de gramíneas en verde. Esta patente determina que la selección de bacterias puede ir enfocada a obtener bacterias con alta capacidad de digestibilidad de celulosa (celulolíticas), alta capacidad proteo-sintética, etc, pero no parte de microorganismos celulolíticos del rumen, sino de bacterias del mismo en general. El documento D03 también selecciona bacterias del rumen con NNP, pero empleando un sustrato rico en almidón. De esta forma adapta los microorganismos al sustrato que se empleará posteriormente como alimento para el ganado.

Por otro lado, es conocida la fermentación de gramíneas ricas en energía junto con microorganismos seleccionados procedentes del rumen para alimento animal (documentos D01 y D04), así como la fermentación de sustratos fibrosos y lignocelulósicos con microorganismos celulolíticos (documento D05).

Sin embargo, ningún documento realiza un procedimiento tan específico como el indicado en la presente solicitud, con una selección inicial del inóculo a partir de microorganismos celulolíticos del rumen, con NNP y gramíneas recolectadas en verde, de forma que selecciona dentro de estos microorganismos celulolíticos los más adaptados a ese sustrato (fermentación en estufa durante 45 días, deshidratado, micronizado y empleo de lo obtenido para repetir el proceso dos veces, y una tercera en silo y posterior micronizado, envasado y sellado en sacos de plástico), y posterior recolección de gramíneas recolectadas en verde y ensilado y fermentado de las mismas con NNP y el inóculo de cuarta generación seleccionado en la primera etapa.

Por tanto, y a la vista del estado de la técnica conocido, las reivindicaciones 1-6 cumplen con el requisito de novedad y actividad inventiva.