

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(10) Numéro de publication internationale
WO 2015/110663 A1

(43) Date de la publication internationale
30 juillet 2015 (30.07.2015)

WIPO | PCT

(51) Classification internationale des brevets :
A23K 1/00 (2006.01) A23K 1/165 (2006.01)
A23K 1/14 (2006.01) A23K 1/18 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2015/051621

(22) Date de dépôt international :
27 janvier 2015 (27.01.2015)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1450650 27 janvier 2014 (27.01.2014) FR

(71) Déposant : ETABLISSEMENTS J. SOUFFLET
[FR/FR]; Quai du Général Sarraill, F-10400 Nogent Sur
Seine (FR).

(72) Inventeurs : DELORD, Benoît; 11 rue des Préaux, F-
89140 Courlon Sur Yonne (FR). TOURNAT, Mathieu; 6
rue Flore Thibault, F-10150 Sainte-maure (FR).

(74) Mandataires : BIOT, Philippe et al.; Lavoix, 2, place
d'Estienne d'Orves, F-75009 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG,
MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,
PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,
TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))



WO 2015/110663 A1

(54) Title : USE OF AN ENZYMATIC COMPOSITION IN THE FEED OF RUMINANTS

(54) Titre : UTILISATION D'UNE COMPOSITION ENZYMATIQUE DANS L'ALIMENTATION DES RUMINANTS

(57) Abstract : The present invention relates to an enzymatic composition comprising a main substrate, selected from the group made up of a wheat, a wheat bran, a rapeseed oil cake and a mixture thereof, fermented with a strain of *Aspergillus*, section *Nigri*, said enzymatic composition having: (i) xylanase activity no lower than 500 AXC per gramme of composition, (ii) β -glucanase activity no lower than 500 BGU per gramme of composition, and (iii) cellulase activity no lower than 50 CMC per gramme of composition; as well as the use thereof in the feed of ruminants.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une composition enzymatique comprenant un substrat principal, sélectionné dans le groupe constitué d'un blé, un son de blé, un tourteau de colza et un mélange de ceux-ci, fermenté avec une souche d'*Aspergillus* section *Nigri*, ladite composition enzymatique présentant: (i) une activité xylanase supérieure ou égale à 500 AXC par gramme de composition, (ii) une activité β -glucanase supérieure ou égale à 500 BGU par gramme de composition, et (iii) une activité cellulase supérieure ou égale à 50 CMC par gramme de composition; ainsi que son utilisation dans l'alimentation des ruminants.

USO DE UNA COMPOSICIÓN ENZIMÁTICA EN PIENSOS PARA RUMIANTES

La presente invención se refiere a una mejora en los rendimientos zootécnicos de los rumiantes mediante la adición de aditivos alimentarios no medicinales en la alimentación.

El progreso genético en los rumiantes ha dado la posibilidad de obtener animales de granja que se caracterizan por muy altos rendimientos zootécnicos. Esto se expresa en niveles muy altos de producción de leche (más de 40 kg/vaca/día) y en ganancias muy elevadas de peso en el ganado de engorde (más de 1500 g/animal/día). Estos rendimientos requieren una mayor ingesta de alimentos por los animales y una alimentación muy rica a fin de cubrir sus necesidades de mantenimiento y producción.

El aumento en el nivel de ingesta y el aumento de la porción de concentrado en la ración de los rumiantes tienen efectos en la reducción de la eficiencia metabólica de los animales. Los animales utilizan mucho menos los nutrientes ya que el tránsito se acelera y, por lo tanto, es menos eficaz. Por lo tanto, existe una necesidad significativa en la búsqueda de soluciones nutricionales capaces de mejorar el rendimiento en la transformación de la ración (pienso y concentrados) en productos (leche o carne).

Se sabe que lo que limita la digestibilidad general de la ración de los rumiantes es la digestibilidad de las fibras, la celulosa y la hemicelulosa, mientras que el uso de enzimas en la alimentación de los rumiantes se describe en la técnica anterior (Beauchemin *et al.* (2003) *J. Anim. Sci.* E.Suppl.2: E37-E47). Además, se ha propuesto el uso de amilasas bacterianas (US 2009/0324571) o amilasas fúngicas (WO 03/068256) a fin de aumentar la digestibilidad del almidón en rumiantes. Sin embargo, los autores reconocen la variabilidad significativa en las respuestas de los animales, a la administración de suplementos de enzimas y, por lo tanto y por un lado, la necesidad de encontrar aditivos específicos para los rumiantes y por otro lado, la necesidad de encontrar aditivos destinados a mejorar la digestibilidad de los polisacáridos mayoritarios en la alimentación de los rumiantes: celulosa y hemicelulosa. Así pues, se propone añadir, a la alimentación de rumiantes, complejos enzimáticos purificados que incluyen celulasa, xilanasa, β -glucanasa, pectinasa, mananasa y las actividades de α -galactosidasa a fin de aumentar la digestibilidad del pienso ingerido (WO 2009/0006362). Sin embargo, estos aditivos se utilizan únicamente con pienso y no se pueden utilizar con los

productos alimenticios concentrados (cereales, subproductos, tortas prensadas) mientras que la adición de los productos alimenticios concentrados es el principal medio utilizado para la mejora de los resultados zootécnicos de los rumiantes.

Por lo tanto, existe una necesidad significativa de nuevos aditivos para piensos de rumiantes que permitan mejorar los resultados zootécnicos de los animales, incluso alimentados con un pienso optimizado que comprende, por ejemplo, los productos alimenticios concentrados.

Se ha propuesto el uso de diferentes tipos de microorganismos que producen enzimas a fin de mejorar los resultados zootécnicos de los rumiantes (Beauchemin *et al* (2004) *Can J. Anim. Sci.* 84: 23-36). Una vez que se completa la fermentación que lleva a la producción de estas enzimas, las enzimas son generalmente separadas de los residuos de fermentación y de los microorganismos productores. Sin embargo, los tipos y las actividades de las enzimas ampliamente producidas varían de acuerdo al tipo de microorganismo utilizado, al sustrato utilizado y a las condiciones de cultivo utilizadas, lo que conduce a una fuerte heterogeneidad de los efectos observados en los animales y, por lo tanto, limita su beneficio para el agricultor. En particular, el uso de una combinación eficiente de las actividades enzimáticas es difícil de determinar, sobre todo con las enzimas producidas por organismos modificados genéticamente en fermentación de estado líquido. El método para la administración de las enzimas es también un problema cuando las enzimas se utilizan en forma líquida, ya que se drenan rápidamente y se inactivan en el rumen.

La presente invención resulta de la constatación inesperada por los inventores que es posible obtener de forma reproducible una composición de multi-enzimas que presenta actividades enzimáticas de celulasa, xilanasas y β -glucanasa a determinados niveles, mediante fermentación en estado sólido de cereales, de subproductos de cereales y/o de los subproductos de semillas oleaginosas con un hongo filamentoso del tipo *Aspergillus* sección *Nigri*, más particularmente del tipo *Aspergillus tubingensis* y que esta composición enzimática permite, cuando se proporciona en la ración alimentaria de un rumiante, cualquiera sea, una mejora de sus resultados zootécnicos, en particular, de mejora en la producción de leche, la eficiencia alimentaria, el índice de consumo, el aumento de peso, el aumento de la actividad de rumia, el aumento de la capacidad de ingestión de pienso, el aumento de la digestibilidad de los piensos y/o de los concentrados y la reducción de la producción de metano.

La presente invención se refiere por tanto a una composición enzimática que comprende un sustrato principal y seleccionado del grupo que consiste en trigo, salvado de trigo, torta de semilla de colza, una mezcla de un salvado de trigo y de trigo, una mezcla de trigo y de torta de semilla de colza, una mezcla de salvado de trigo y la torta de semilla de colza y una mezcla de trigo, de salvado de trigo y de la torta de semilla de colza, fermentado con una cepa de *Aspergillus* sección *Nigri*, más particularmente de *tubingensis Aspergillus*, dicha composición enzimática presenta:

- (i) una actividad de xilanasa igual o mayor a 500 AXC por gramo de composición,
- (ii) una actividad β -glucanasa igual o mayor a 500 BGU por gramo de composición, y
- (iii) una actividad de celulasa igual o mayor a 50 CMC por gramo de composición.

Se refiere además a un método para la fabricación de esta composición enzimática que comprende una etapa de fermentación en estado sólido de un sustrato principal, seleccionado del grupo que consiste en trigo, salvado de trigo, torta de semilla de colza, una mezcla de trigo y de salvado de trigo, una mezcla de trigo y de torta de semilla de colza, una mezcla de salvado de trigo y de torta de semilla de colza y una mezcla de trigo, de salvado de trigo y de torta de semilla de colza, con una cepa de sub clado *A. tubingensis*, más particularmente con una cepa de *Aspergillus tubingensis* o *Aspergillus neoniger*, más preferiblemente con una cepa de *Aspergillus tubingensis*, al menos hasta que el producto de fermentación muestre los siguientes valores mínimos de actividad enzimática:

- (i) una actividad de xilanasa igual o mayor a 500 AXC por gramo de composición,
- (ii) una actividad β -glucanasa igual o mayor a 500 BGU por gramo de composición, y
- (iii) una actividad de celulasa igual o mayor a 50 CMC por gramo de composición, la fermentación se detiene preferiblemente a la aparición de las primeras esporas en el medio de cultivo.

También se refiere a un aditivo para la alimentación de los rumiantes que comprende esta composición enzimática.

El objeto de la presente invención es también el uso de este aditivo como ingrediente, en particular como un ingrediente no medicinal, de composiciones o premezcla de pienso para la alimentación de los rumiantes.

También se trata de una premezcla para la alimentación de rumiantes que comprenda este aditivo, así como con una composición de pienso suplementado para rumiantes que comprende una cantidad eficaz de este aditivo o de esta mezcla previa, en asociación con piensos adecuados para los rumiantes.

Otro objeto de la presente invención se refiere a un método para la fabricación de una composición de pienso suplementado para rumiantes que comprende mezclar el aditivo como es definido anteriormente o la premezcla como es definida anteriormente con piensos adecuados para los rumiantes.

La presente invención también se refiere al uso de la composición enzimática como es definida anteriormente, del aditivo como es definido anteriormente, de la premezcla como es definida anteriormente o de la composición alimenticia como es definida anteriormente, para mejorar los resultados zootécnicos de un rumiante.

Por último, se dirige a un método para mejorar los resultados zootécnicos de un rumiante en el cual se hace ingerir al rumiante, una cantidad eficaz de la composición enzimática como es definida anteriormente, del aditivo como es definido anteriormente, de la premezcla como es definida anteriormente o de la composición de pienso como es definida anteriormente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los rumiantes

En el contexto de la invención, el término “rumiantes” designa cualquier mamífero herbívoro y poligástricos, para los que la digestión se lleva a cabo total o parcialmente a través de un proceso de remasticado de la alimentación después de su ingestión.

El tracto digestivo de los rumiantes consiste en 4 compartimentos: el rumen, el retículo, el omaso y el abomaso. De estos 4 compartimentos, el rumen es el más importante, ya que la mayoría de los nutrientes se digieren en éste. La digestión corresponde en él a un proceso de fermentación que implica una importante y variada flora microbiana responsables de celulolisis, hemicelulolisis, proteólisis, producción de ácido, de metano, síntesis de vitaminas, etc. Debido a la función primordial de la flora ruminal, por lo tanto, la fisiología digestiva de los rumiantes es considerablemente diferente a la de los animales monogástricos, para los que la flora juega un papel secundario.

Dichos animales son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, bovinos, ovinos, caprinos, cérvidos y camélidos. Preferiblemente, dentro del contexto de la invención, el rumiante es un animal bovino.

Por “bovino” o “animal bovino”, se entiende aquí a una sub-familia de los bóvidos que comprende varias especies importantes de animales de granja. Los bovinos, en particular, incluyen vacas, en particular, vacas lecheras, vacas nodrizas, novillas, becerros destetados, novillos, res criado, res de engorde, toros, búfalos, yaks, gaurs y bantengs. Preferiblemente, cuando el rumiante utilizado dentro del alcance de la invención es un animal bovino, se selecciona de vacas, en particular de vacas lecheras, terneros, animales destetados, terneros alimentados con leche, res criado y res de engorde.

Por “ovinos”, se entiende aquí a los herbívoros rumiantes del género *Ovis*. Los animales ovinos incluyen, en particular, ovejas salvajes, ovejas, corderas, corderas jóvenes y corderos.

Por “caprino”, se entiende aquí a los herbívoros rumiantes del género *Capra*. Los caprinos incluyen, en particular, a cabras, chivos, cabritas y cabras de montes.

Por “cérvido”, se entiende aquí a los rumiantes de la familia *Cervidae* teniendo cuernos. Los cérvidos incluyen, en particular, venados, cervatillos, ciervos jóvenes, corzos, ciervo, gamas, renos, gamos, gamas (venado hembra o gamo) y alces.

Por “camélidos”, se entiende aquí a mamíferos artiodáctilos de la familia *Camelidae*. Los camélidos incluyen en particular, a dromedarios, camellos, camellas, llamas y alpacas.

Preferiblemente, en el contexto de la invención, el rumiante es un animal de granja.

Composición enzimática

La composición enzimática según la invención comprende, consiste esencialmente o consiste en un sustrato principal, seleccionado del grupo que consiste en trigo, salvado de trigo, torta de semilla de colza, una mezcla de trigo y salvado de trigo, una mezcla de trigo y torta de semilla de colza, una mezcla de salvado de trigo y torta de semilla de colza y una mezcla de trigo, salvado de trigo y torta de semilla de colza, fermentada con una cepa de *Aspergillus* sección *Nigri*,

preferiblemente una cepa de *Aspergillus tubingensis*, dicha composición enzimática presenta:

- (i) una actividad de xilanasa igual o mayor a 500 AXC por gramo de composición,
- (ii) una actividad β -glucanasa igual o mayor a 500 BGU por gramo de composición, y
- (iii) una actividad de celulasa igual o mayor a 50 CMC por gramo de composición.

Las actividades enzimáticas anteriores se expresan por gramo de composición seca.

Por "xilanasa", se entiende aquí a una enzima de la clase EC 3.2.1.8 de la nomenclatura de enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB), que degrada el polisacárido lineal β -1,4-xilano en xilosa degradando así y en particular, la hemicelulosa.

Las técnicas para medir la actividad de la xilanasa son bien conocidas para un experto en la técnica. Típicamente y a fin de demostrar esta actividad, es posible hacer que la solución enzimática actúe en una solución de xilano de avena soluble unido a un cromóforo, Rémozol Brilliant Blue R, y para medir los oligómeros liberados por la acción de la solución enzimática. Los oligómeros se encuentran en la fracción soluble después de precipitación con etanol. El medio de reacción utilizado preferentemente en este método consiste en 130 μ l de solución azo-xilano de avena (MEGAZYME) 10 g/L, 50 μ l de solución enzimática diluida en un tampón de acetato 0,4 M, pH 4,70. La reacción se realiza preferiblemente a 31 °C durante 20 minutos. La reacción típicamente se detiene mediante la adición de 500 μ l de etanol a 96%. La densidad óptica del sobrenadante obtenido después de la centrifugación (10 minutos a 3000 rpm a 20 °C) se lee a 590 nm. Una unidad de actividad de xilanasa (AXC) puede entonces ser definida como la cantidad de enzima que, diluido a 1 unidad/ml, a un pH de 4,70 y a 30 °C, que liberan desde una solución de xilano de Rémozol Brilliant Blue R, oligómeros que no pueden ser precipitados en etanol de tal manera que la densidad óptica del sobrenadante es 0,93 a 590 nm.

Preferiblemente, la composición enzimática según la invención muestra una actividad de xilanasa mayor a 500 AXC por gramo de composición, más preferiblemente una actividad de xilanasa mayor a 750 AXC por gramo de composición, más preferiblemente una actividad de xilanasa mayor a 1000 AXC

por gramo de composición, preferiblemente entre todos, una actividad de xilanasa igual o mayor a 2000 AXC por gramo de composición.

Por “ β -glucanasa”, se entiende aquí una enzima de la clase EC 3.2.1.6 de la nomenclatura de enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) que escinde glucano. Las β -glucanasas, en particular, incluyen β -1,3-glucanasa que escinde β -1,3-glucanos como calosa o curdlan, β -1,6-glucanasa que escinde β -1,6-glucanos, celulasa, endo- β -1,4-glucanasa específica para xiloglucano o exo- β -1,4-glucanasa específica de xiloglucano.

Las técnicas para medir la actividad β -glucanasa son bien conocidas para un experto en la técnica. Típicamente, para la demostración de esta actividad, es posible hacer que la solución enzimática reaccione en una solución β -glucano de cebada unido a un cromóforo, Rémozol Brillant azul R. La hidrólisis a pH 4,8 de este sustrato por las actividades de β -glucanasa libera oligómeros unidos al cromóforo y que no pueden ser precipitados con etanol, la concentración de los cuales se evalúa midiendo la absorbancia a 590 nm. El medio de reacción utilizado preferentemente en este método consiste en 130 μ l de una solución de glucano de azo-cebada (Megazyme) diluida a $4/5^{10}$ en un tampón de dilución de fosfato de acetato a 0,1 M y se ajusta a pH 4,75, 50 μ l de solución enzimática diluida en tampón de fosfato de acetato a 0,1 M, pH 4,60. Preferiblemente la reacción se lleva a cabo a 31 °C durante 20 minutos. La reacción se detiene típicamente mediante la adición de 620 μ l de una solución de precipitación (30 g de trihidrato de acetato de sodio y 3 g de acetato de zinc en 1 litro de 96% de etanol). La densidad óptica del sobrenadante obtenido después de la centrifugación (10 minutos a 3000 rpm a 20 °C) se lee a 590 nm. Una unidad de actividad de β -glucanasa (BGU) puede entonces ser definida como la cantidad de enzima, diluida a una concentración de 1 unidad por ml, en condiciones de ensayo (30 °C y pH 4,8), que libera oligómeros de β -glucano de cebada unidos a Rémozol Brillant Blue R que no pueden ser precipitados en etanol, de modo que la absorbancia del sobrenadante es de 0,9 a 590 nm.

Preferiblemente, la composición enzimática según la invención muestra una actividad β -glucanasa mayor a 500 BGU por gramo de composición, más preferiblemente una actividad de β -glucanasa mayor a 600 BGU por gramo de composición, más preferiblemente una actividad de β -glucanasa mayor a 1.000 BGU por gramo de la composición, preferiblemente entre todos, una actividad β -glucanasa igual o mayor a 1.500 BGU por gramo de composición.

Por “celulasa”, se entiende aquí una enzima de la clase EC 3.2.1.4 de la nomenclatura de las enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBBM), que escinde la celulosa, el liquenina y los β -glucanos de cereales, en donde el polímero de glucosa es unido en β -1-4. Las “celulasas” incluyen, en particular, a endo-1,4- β -D-glucanasa, β -1,4-glucanasa, hidrolasa de β -1,4-endoglucano, celulasa A, celulosina AP, endoglucanasa D, celulasa alcalina, celulasa A 3, celludextrinasa, 9,5 celulasa, avicelasa, pancelasa SS y 4-glucanohidrolasa de 1,4-(1,3,1,4)- β -D-glucano.

Las técnicas para medir la actividad de celulasa son bien conocidos para un experto en la técnica. Típicamente y a fin de demostrar esta actividad, es posible hacer que la solución enzimática actúe en una solución de carboximetil celulosa parcialmente despolimerizada y unida a un cromóforo, Rémozol Brillant azul R. La hidrólisis a pH 4,5 de este sustrato por las actividades de la celulasa libera oligómeros unidos al cromóforo y que no pueden ser precipitados con etanol, la concentración de los cuales se evalúa midiendo la absorbancia a 590 nm. El medio de reacción utilizado preferentemente en este método consiste en 100 μ l de solución de azo-carboximetil-celulosa (Megazyme 90504a) a 20 g/L y pH 4,5, 100 μ l de solución enzimática diluida en tampón de acetato a 0,1 M y pH 4,60. La reacción se realiza preferiblemente a 41 °C durante 10 minutos. La reacción típicamente se detiene mediante la adición de 500 μ l de una solución de precipitación (40 g de trihidrato de acetato de sodio y 4 g de acetato de zinc en 1 litro de 96% de etanol). La densidad óptica del sobrenadante obtenido después de la centrifugación (10 minutos a 3000 rpm a 20 °C) se lee a 590 nm. Una unidad de actividad carboximetilcelulasa (CMC) puede entonces ser definida como la cantidad de enzima que, se diluyó a una concentración de 1 unidad por ml en condiciones de ensayo (41 °C y pH 4,5), libera oligómeros de carboximetil celulosa parcialmente despolimerizada unidos a Rémozol Brillant Blue R que no puede ser precipitado con la solución de precipitación, de manera que la absorbancia del sobrenadante es 1,0 a 590 nm.

Preferiblemente, la composición enzimática según la invención muestra una actividad de celulasa mayor a 50 CMC por gramo de composición, más preferiblemente una actividad de celulasa mayor a 75 CMC por gramo de composición, más preferiblemente una actividad de celulasa mayor a 120 CMC por gramo de composición, preferiblemente entre todos, una actividad de celulasa igual o mayor a 180 CMC por gramo de composición.

En una forma de realización particularmente preferida, la composición enzimática según la invención muestra una actividad de xilanasa igual o mayor a 2000 AXC por gramo de composición, una actividad β -glucanasa igual o mayor a 1.500 BGU por gramo de composición y una actividad de celulasa igual o mayor a 180 CMC por gramo de composición.

La composición enzimática según la invención puede comprender además actividades enzimáticas distintas a las actividades anteriores de xilanasa, β -glucanasa y celulasa, pero en niveles muy bajos. Preferiblemente, la composición enzimática según la invención está desprovista de cualquier actividad α -galactosidasa pectinasa, mananasa y/o amilasa. Preferiblemente, la composición enzimática según la invención está desprovista de cualquier actividad de esterasa de ácido ferúlico.

Por "composición desprovista de cualquier actividad enzimática X", se entiende aquí una composición en la que la actividad enzimática X no es detectable con técnicas convencionales para la detección de la actividad enzimática. En otras palabras, una composición desprovista de cualquier actividad enzimática X no comprende cualquier proteína que tenga una actividad X enzimática o comprende proteínas que tengan una actividad enzimática X en una concentración tan baja (por ejemplo, determinada por técnicas proteómicas) que la correspondiente actividad enzimática X no se pueda medir con técnicas convencionales para la detección de la actividad enzimática.

Las actividades anteriores de xilanasa, β -glucanasa y celulasa son originadas por la fermentación del sustrato, en particular del sustrato principal, comprendido en la composición enzimática según la invención, con una cepa de *Aspergillus* sección *Nigri*, más particularmente una cepa de *Aspergillus tubingensis*.

Por "sustrato principal", se entiende aquí al sustrato que representa al menos 70%, preferiblemente al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o 100% del sustrato utilizado durante la fermentación con una cepa de *Aspergillus* sección *Nigri*, más particularmente una cepa de *Aspergillus tubingensis*.

Este sustrato, en particular, este sustrato principal, se selecciona del grupo que consiste en trigo, salvado de trigo, torta de semilla de colza, una mezcla de trigo y salvado de trigo, una mezcla de trigo y torta de semilla de colza, una mezcla de salvado de trigo y torta de semilla de colza y una mezcla de trigo, salvado de trigo y torta de semilla de colza. Preferiblemente, el sustrato se

selecciona del grupo que consiste en salvado de trigo, torta de semilla de colza, y una mezcla de éstos. Preferiblemente entre todos, el sustrato, en particular, el sustrato principal, es una mezcla de salvado de trigo y torta de semilla de colza. El salvado de trigo y la torta de semilla de colza pueden estar presentes en la mezcla en proporciones de masa que van desde 10/90 (en otras palabras 10% de salvado de trigo para 90% de torta de semilla de colza) a 90/10 (en otras palabras 90% de salvado de trigo para 10% de torta de semilla de colza), preferiblemente 15/85 (en otras palabras 15% de salvado de trigo para 85% de torta de semilla de colza) a 80/20 (en otras palabras 80% de salvado de trigo para 20% de torta de semilla de colza), preferiblemente de 20/80 (en otras palabras 20% de salvado de trigo para 80% de torta de semilla de colza) a 70/30 (en otras palabras 70% de salvado de trigo para 30% de torta de semilla de colza), preferiblemente de 25/75 (en otras palabras 25% de salvado de trigo para 75% de torta de semilla de colza) a 60/40 (en otras palabras 60% de salvado de trigo para 40% de torta de semilla de colza), aún más preferiblemente de 20/80 (en otras palabras 20% de salvado de trigo para 80% de torta de semilla de colza) a 50/50 (en otras palabras 50% de salvado de trigo para 50% de torta de semilla de colza), aún más preferiblemente de 30/70 (en otras palabras 30% de salvado de trigo para 70% de torta de semilla de colza) a 50/50 (en otras palabras 50% de salvado de trigo para 50% de torta de semilla de colza).

El sustrato usado durante la fermentación con una cepa de *Aspergillus* sección *Nigri*, más particularmente una cepa de *Aspergillus tubingensis*, puede comprender además como un sustrato adicional:

- Tortas de semillas oleaginosas, tales como tortas de soja, tortas de germen de maíz, tortas de girasol, tortas de palmiste, tortas de lino, tortas de maní, tortas de cacao, tortas de copra, tortas de algodón, tortas de pepita de uva, orujo de oliva, tortas de caméline, tortas de semillas de jatrofa o tortas de sésamo ;
- Subproductos de cereales excepto el salvado de trigo, como harina, moyuelos, remodelado integral, salvado, alimento de gluten, maicena de gluten, granos secos de plantas de destilerías/etanol, granos secos y solubles de destilería/plantas de etanol, granos de cerveza, mazorca desmotada de maíz, raicillas, gérmenes o maicena, avena, trigo, cebada, triticale, arroz, centeno o maíz;
- Fuentes de nitrógeno orgánicas tales como aminoácidos, concentrados de proteínas de soja, concentrados de proteínas de patata, gluten de trigo o gluten de maíz;

- fuentes de nitrógeno inorgánico tales como urea, amoníaco, sales de amonio o de vinaza;
- sales minerales de sodio, potasio, cloro, calcio o fósforo; y/o
- Traza de elementos tales como hierro, cobre, zinc, manganeso, cobalto, yodo o selenio.

Preferiblemente, el sustrato usado durante la fermentación con una cepa de *Aspergillus* sección *Nigri*, más particularmente una cepa de *Aspergillus tubingensis*, puede comprender además, como sustrato adicional, tortas de semillas oleaginosas, en particular, tortas de germen de maíz.

El sustrato como es definido anteriormente se fermenta con una cepa de *Aspergillus* sección *Nigri*, preferiblemente una cepa clado A de *Aspergillus* sección *Nigri. niger*, más preferiblemente una cepa de *Aspergillus tubingensis* o *Aspergillus neoniger*, más preferiblemente una cepa de *Aspergillus tubingensis*, a fin de obtener las actividades de celulasa, xilanasa, β -glucanasa y como son definidas anteriormente. En una forma alternativa de realización, el sustrato como es definido anteriormente se fermenta con una cepa de *Aspergillus* sección *Nigri* que no es una cepa de *Aspergillus tubingensis*. La fermentación puede ser una fermentación sumergida (o una fermentación en estado líquido), una fermentación de estado sólido o una fermentación en estado líquido/sólido. Preferiblemente, la fermentación es una fermentación en estado sólido.

En el contexto de la invención, “fermentación en estado sólido” se define como el cultivo de microorganismos en sustratos sólidos y húmedos, en sustratos inertes o sobre sustratos insolubles que se pueden utilizar como fuente de carbono y energía. El proceso de fermentación se lleva a cabo en ausencia o casi ausencia de agua libre, en el espacio entre las partículas de sustrato. Por el contrario, “fermentación sumergida” se refiere aquí a un cultivo de microorganismos en los que tanto nutrientes como microorganismos se sumergen en un medio acuoso.

Preferiblemente, el sustrato como es definido anteriormente es fermentado por fermentación en estado sólido con una cepa de *Aspergillus tubingensis*.

Por “*Aspergillus* sección *Nigri*” se entiende aquí una sección del género *Aspergillus*, previamente designado como grupo *A. niger*, que normalmente comprende 26 especies como se describe en Varga *et al.* (2011) *Estudios en Micología* 69: 1-17, agrupados en 5 clados principales: el clado *A. Niger* que comprende las especies *A. neoniger*, *A. costaricensis*, *A. vadensis*, *A. eucalypticola*, *A. piperis*, *A. Acidus*, *A. tubingensis*, *A. awamori*, *A. niger* y *A. brasiliensis*; el clado *A. Carbonarius* que comprende las especies *A. ibericus*, *A.*

sclerotii carbonarius, *A. carbonarius* y *A. sclerotium niger*, el clado *A. Heteromorphus* que comprende las especies *A. ellipticus* y *A. heteromorphus*; el clado *A. Homomorphus* que comprende las especies *A. homomorphus*; y el clado *A. Aculeatus* que comprende las especies *A. fijiensis*, *A. aculeatus*, *A. aculeatinus*, *A. uvarum*, *A. indologenus*, *A. japonicus* y *A. violaceofuscus*. Preferiblemente, la cepa de *Aspergillus* sección *Nigri* utilizada dentro del alcance de la invención es una cepa del clado *A. niger*. En una forma particular de realización, la cepa de *Aspergillus* sección *Nigri* utilizada dentro del alcance de la invención es una cepa del clado *A. niger* que no es una cepa de *A. tubingensis*.

Como se indicó anteriormente, el clado *A. niger* comprende 10 especies agrupadas en 3 sub-clados: el sub-clado *A. tubingensis*, que comprende la especie *A. neoniger*, *A. costaricaensis*, *A. vadensis*, *A. eucalypticola*, *A. piperis*, *A. acidus* y *A. tubingensis*; el sub-clado *A. Niger* que comprende la especie *A. awamori* y *A. Niger*, y el sub-clado *A. brasiliensis* que comprende la especie *A. brasiliensis*. Preferiblemente, la cepa de *Aspergillus* sección *Nigri* utilizada dentro del alcance de la invención es una cepa de la sub-clado *A. tubingensis*. En una forma particular de realización de la invención, la cepa de *Aspergillus* sección *Nigri* utilizada dentro del alcance de la invención es una cepa de la sub-clado *A. Tubingensis* que no es una cepa de *A. tubingensis*. Más preferiblemente, la cepa de *Aspergillus* sección *Nigri* utilizada dentro del alcance de la invención es una cepa de *Aspergillus tubingensis* o *Aspergillus neoniger*, incluso más preferiblemente una cepa de *Aspergillus tubingensis*.

Por "*Aspergillus tubingensis*", se entiende aquí un miembro de la sección *Aspergillus nigri*, la cepa característica de que es la cepa de *Aspergillus tubingensis* que Mosseray describe en *La Cellule* (1934) 43: 245-247. Es un hongo filamentoso que produce conidios negro, ubicuo de la tierra, saprofita y capaz de crecer en muchos sustratos naturales y complejos. *Aspergillus tubingensis* no aparece en la lista de agentes patógenos del anexo III de la Directiva 2000/54/CE relativa a la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes biológicos durante el trabajo.

Los ejemplos de cepas de *Aspergillus tubingensis* son bien conocidos para un experto en la técnica e incluyen *Aspergillus tubingensis* Mosseray ATCC MYA-81, *Aspergillus tubingensis* Mosseray ATCC MYA-83, *Aspergillus tubingensis* Mosseray ATCC MYA-84, *Aspergillus tubingensis* Mosseray ATCC MYA-4879, *Aspergillus tubingensis* Mosseray ATCC MYA-77, *Aspergillus tubingensis* Mosseray ATCC MYA-78, *Aspergillus tubingensis* Mosseray ATCC MYA-79,

Aspergillus tubingensis Mosseray ATCC MYA-82, *Aspergillus tubingensis* Mosseray ATCC MYA-80, *Aspergillus tubingensis* Mosseray ATCC 10550, *Aspergillus tubingensis* Mosseray ATCC 76608 y *Aspergillus tubingensis* Mosseray ATCC 201255.

Por “*Aspergillus neoniger*”, se entiende aquí un miembro de *Aspergillus* sección *nigri*, para la cual la cepa característica es la cepa *Aspergillus neoniger* que Varga describen en Varga *et al.* (2011) *Estudios en Micología* 69: 1-17.

Los ejemplos de cepas de *Aspergillus neoniger* son bien conocidos para un experto en la técnica e incluyen *Aspergillus neoniger* CBS 115656 o NRRL 62634 y *Aspergillus neoniger* CBS 115657.

Preferiblemente, el sustrato como es definido anteriormente se trata previamente antes de la fermentación a fin de ser pasteurizada o esterilizada. El tratamiento térmico puede, por ejemplo, consistir en un calentamiento en autoclave. El sustrato puede, así, estar en un autoclave durante 15 a 45 min, preferiblemente de 20 a 40 min, más preferiblemente durante 35 min, a una temperatura comprendida entre 90 y 125 °C, preferiblemente entre 95 y 115 °C, más preferiblemente a una temperatura de 105 °C.

Más preferiblemente, el sustrato como es definido anteriormente es pre-humidificado a fin de alcanzar 40 a 100% de materia seca, preferiblemente 45 a 90% de materia seca, preferiblemente 50 a 80% de materia seca, preferiblemente 55 a 70% de materia seca, preferiblemente 60% de materia seca.

Ventajosamente, es posible ajustar el pH durante la humidificación en el rango de 4,8 a 6,2, preferiblemente 5,0 a 6,0, preferiblemente 5,2 a 5,8, preferiblemente entre todos de 5,6; a fin de mejorar el efecto de pasteurización del tratamiento térmico y el arranque de la fermentación deseada.

La inoculación del sustrato como es definido anteriormente puede llevarse a cabo con cualquier inóculo adecuado. Un experto en la técnica es consciente de las múltiples maneras para la preparación de un inóculo adecuado de una cepa seleccionada de *Aspergillus tubingensis*. La dosis de inoculación es ventajosamente de al menos 1×10^7 esporas por gramo de materia seca inicial de sustrato.

El contenido de agua del sustrato al comienzo de la fermentación se ajusta preferiblemente entre 40 y 50%, preferiblemente a 45% de la masa total de sustrato y agua, y se mantiene preferentemente y sustancialmente en este intervalo durante la fermentación, por ejemplo, se procede periódicamente con adiciones de agua para compensar la pérdida de agua del medio. La expresión

“mantenido sustancialmente” significa que es tolerable que el contenido de humedad tenga un valor con una distancia de 5 unidades de % del intervalo de 40 a 50% durante un período relativamente corto entre dos ajustes sucesivos de la tasa de humedad o al final de la fermentación. El nivel de humedad del sustrato puede, de hecho, tender a disminuir durante la fermentación por la evaporación bajo el efecto del aumento de la temperatura generada por el crecimiento de hongos.

La fermentación puede llevarse a cabo en cualquier reactor adecuado. Ejemplos de reactores que pueden utilizarse son descritos en el artículo de A. Durand *et al.* publicado en Agro-Food-Industry Hi-Tech (Mayo-Junio 1997, páginas 39-42).

La fermentación puede llevarse a cabo por un período de 1 a 3 días, preferiblemente de 30 a 60 horas, más preferiblemente durante 48 horas. Preferiblemente, la fermentación se detiene con la aparición de las primeras esporas en el medio de cultivo, debido a que la presencia de esporas puede molestar a los animales después de su ingestión, debido a su carácter volátil.

La temperatura del medio se mantiene preferiblemente entre 28 y 38 °C, preferiblemente entre 30 y 36 °C, más preferiblemente a 33 °C.

Preferiblemente, la fermentación se lleva a cabo en condiciones aeróbicas y preferiblemente en la oscuridad.

El producto de fermentación obtenido de este modo es un producto sólido y húmedo. Se puede secar o deshidratar, preferentemente a una temperatura moderada, por ejemplo de menos de 45 °C, a fin de no afectar a la actividad enzimática. El secado o la deshidratación puede llevarse a cabo con cualquier técnica adecuada y conocida para un experto en la técnica, tales como el uso de un lecho fluidizado, un secado por congelación, al vapor, al vapor a vacío o por zeodración.

También puede congelarse, preferiblemente en estado húmedo, a una temperatura baja, por ejemplo -20 °C.

El producto de fermentación también puede extraerse en agua y recuperarse en forma líquida mediante cualquier técnica adecuada y conocida para un experto en la técnica. La extracción del producto de fermentación se puede realizar por cualquier técnica bien conocida para un experto en la técnica, en particular mediante una extracción en solución acuosa, extracción en solución alcohólica, extracción con disolventes, homogeneización a alta presión, extracción supercrítica, extracción con lecho fluidizado, molienda, molienda criogénica,

descompresión, cavitación, burbujeo, extracción con ultrasonido, adsorción en resinas o zeolitas. La(s) enzima(s) en forma líquida se puede(n) purificar entonces mediante cualquier técnica conocida para un experto en la técnica, en particular, por centrifugación, filtración, ultrafiltración, cromatografía, uso de membranas o precipitación.

La composición enzimática según la invención puede estar en cualquier forma adecuada para su uso en un aditivo. Preferiblemente, está en una forma cruda, no extraída.

Por "forma cruda", se entiende aquí el medio de fermentación que contiene las actividades enzimáticas como son definidas anteriormente, el sustrato fermentado y el hongo *Aspergillus* sección *Nigri*, en particular, el hongo *Aspergillus tubingensis* como es definido anteriormente. El medio de fermentación después de la fermentación del sustrato por una cepa de *Aspergillus* sección *Nigri*, más particularmente una cepa de *Aspergillus tubingensis*, puede en particular ser deshidratado y/o molido antes de ser utilizado directamente en la composición enzimática según la invención. Esta molienda se puede llevar a cabo por cualquier técnica adecuada, bien conocida por un experto en la técnica, tales como la micronización, molienda con cizalladura, molienda por impacto, moliendo criogénica o desmigajado.

La composición enzimática según la invención puede además ser estandarizada. Tal estandarización da la posibilidad ventajosamente de garantizar una buena homogeneidad de la composición y de facilitar su uso durante la etapa de fabricación de los piensos.

Aditivo para alimentación de los rumiantes

La presente invención se refiere a un aditivo, preferiblemente un aditivo no medicinal, para la alimentación de los rumiantes, como se define en la sección "Los rumiantes" anterior, que comprende, consiste esencialmente o consiste en una composición enzimática tal como se define en la sección "Composición enzimática" anterior.

Por "aditivo", se entiende aquí un componente o mezcla de componentes que se pueden añadir a un pienso, a una ración de pienso o a una dieta de alimentación de un animal o dada para ser ingerido por el animal.

El aditivo según la invención puede comprender además ingredientes adicionales tales como vehículos fisiológicamente aceptables, estabilizadores, antioxidantes o conservantes, así como las enzimas adicionales tales como

proteasas, fitasas, mananasas, amilasas, alfa-galactosidasas, esterases de ácido ferúlico y/o pectinasas.

El aditivo de acuerdo con la invención puede estar en cualquier forma adecuada para su uso posterior, en particular en una forma líquida, en polvo o gránulo.

El aditivo de acuerdo con la invención se puede utilizar como ingrediente, en particular como un ingrediente no medicinal, de composiciones para piensos o premezclas para pienso de los rumiantes tal como se definen en la sección "*Los rumiantes*" anterior.

Premezcla

Por "*premezcla*", se entiende aquí un concentrado de enzimas y, opcionalmente, de oligoelementos, vitaminas y minerales, asociados en un bajo porcentaje de las diferentes materias primas para hacer el alimento completo para rumiantes.

La premezcla se hace preferiblemente a partir de una dilución o deposición sobre un soporte de aditivo como se define en la sección "*Aditivo*" anterior, a fin de estandarizar la actividad enzimática y facilitar su utilización en los animales objetivos.

La presente invención se refiere así a una mezcla previa para la alimentación de los rumiantes tal como se define en la sección "*Los rumiantes*" anterior que comprende un aditivo tal como se define en la sección "*Aditivo*" anterior.

La premezcla según la invención puede comprender otros aditivos usados convencionalmente en la alimentación de animales, en particular de los rumiantes.

Tales aditivos son bien conocidos para un experto en la técnica e incluyen aditivos tecnológicos tales como conservantes, antioxidantes, emulsionantes, estabilizantes, espesantes, agentes gelificantes, aglutinantes, sustancias para control de la contaminación de radionucleidos, agentes de anti-aglomeración, correctores de acidez, aditivos para ensilaje, agentes desnaturalizantes, aditivos sensoriales tales como agentes colorantes (dopaje o modificado del color de los piensos para animales, sustancias que, incluidas en la alimentación de los animales van a dar color a los productos alimenticios que son producidos a partir de estos animales), sustancias aromáticas, aditivos nutricionales, como vitaminas, provitaminas, ácidos grasos omega 3 y "*sustancias químicamente bien definidas con un efecto similar*", compuestos de oligoelementos, aminoácidos, urea, ácidos

grasos y aditivos zootécnicos tales como agentes de mejora de digestibilidad como las enzimas, estabilizadores de la flora intestinal, o sustancias que tienen un *“efecto positivo sobre el medio ambiente”*.

Como ejemplo, la premezcla de acuerdo con la invención puede tener la siguiente composición:

Composición enzimática según la invención	0,3 – 3%
Mezcla de vitaminas (A, B, D, E, ácido nicotínico, etc.)	0,1 – 1%
Sales minerales (CaHPO ₄ , CaCO ₃ , NaCl, CuO, MnO, FeSO ₄ , ZnO, etc. número)	0 – 99,6%
Sustancias desde cereales (salvado, remodelar, harina de pienso, mazorca de maíz, raicillas de cebada, etc.)	0 – 99,6%

La premezcla según la invención puede estar en cualquier forma adaptada para su uso posterior, en particular, en forma líquida, de polvo o granulado.

Composición del pienso

La presente invención también se refiere a una composición de pienso suplementado para rumiantes tal como son definidos en la sección anterior “Los rumiantes”, que comprende una cantidad eficaz de un aditivo como es definido en la sección anterior “Aditivo” o de una premezcla como es definida en la sección anterior “Premezcla”, en conjunto con piensos adecuados para rumiantes como son definidos en la sección anterior “Los rumiantes”.

Los piensos adecuados para rumiantes son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, piensos de cualquier tipo y en todas sus formas (verdes, deshidratado, ensilado, aglomerados, etc.) como la hierba y otras gramíneas piensoras, cereales piensoros (cebada, maíz, avena, trigo, sorgo, soja, centeno), legumbres (guisantes, haba, altramuz, soja, alfalfa, esparceta, tréboles), raíces, tubérculos y sus subproductos (remolacha, pulpa de remolacha, patata, pulpa de patata, etc.), la col, la colza, el girasol, desechos vegetales (tapas, tallos, cáscaras de cereales, salvado, mazorcas de maíz descascarillado, bagazo) y almidones, subproductos de la industria agroalimentaria (fabricación de almidón, producción de almidón, plantas de etanol, cervecías, molinos, etc.), así como tortas oleaginosas, jarabes, y materiales de productos alimenticios que contengan nitrógeno tales como la urea y los derivados de ésta (biuret, ureidos) y sales de amonio.

Preferiblemente, los piensos adecuados para rumiantes utilizados dentro del alcance de la invención comprenden un pienso, preferiblemente ensilado de maíz que representa típicamente del 10 al 50% de la materia seca ingerida, preferiblemente todos los días, preferiblemente en conjunto con otros piensos como el heno, la paja o hierba, o cereal ensilado y preferiblemente suplementado con piensos concentrados, tales como cereales, tortas oleaginosas o piensos compuestos.

Una ración de alimento para rumiantes puede, en particular, contener la composición enzimática como es definida en la sección anterior "composición enzimática" con:

- Pienso húmedo, secado o seco en proporciones que van desde 0 a 100%, preferiblemente de 40 a 70%.
- Piensos concentrados (materia prima concentrada o pienso compuesto) en proporciones que van desde 0 a 100%, preferiblemente de 30 a 60%.

Preferiblemente, la composición enzimática tal como es definida en la sección anterior "composición enzimática", el aditivo según es definido en la sección anterior "Aditivo" o la premezcla como es definida en la sección anterior "Premezcla" están presentes en la composición alimenticia en una cantidad tal que se proporciona al animal la dosis diaria y eficaz, como es definida en la sección a continuación "dosis diaria y eficaz".

La composición del pienso de acuerdo con la invención puede ser de cualquier forma adecuada para la alimentación de rumiantes, en particular los rumiantes de ganado. En particular, puede ser en forma de copos, gránulos, migas o harina.

La presente invención también se refiere a un método para la fabricación de una composición de pienso suplementado para los rumiantes tal como es definida anteriormente, que comprende una etapa de mezclar un aditivo como se define en la sección anterior "Aditivo" o una premezcla como se define en la sección anterior "Premezcla" con piensos adecuados para rumiantes, en particular los rumiantes de granja, como son definidos anteriormente.

La etapa de mezclar el aditivo o la premezcla con el pienso puede llevarse a cabo por cualquier técnica bien conocida por un experto en la técnica.

El método para la fabricación de la composición de pienso de acuerdo con la invención puede comprender además una etapa de formulación de la composición de pienso, así como una etapa de acondicionamiento. Estos pasos

pueden llevarse a cabo mediante cualquier técnica convencional y bien conocida para un experto en la técnica. Por lo tanto, el aditivo o la mezcla previa, cuando están en forma de polvo, se pueden añadir al pienso en el momento de la etapa de formulación (o mezcla) o, cuando están en forma líquida, puede ser pulverizados después de la granulación del pienso.

Dosis diaria y eficaz

El aditivo tal como se define en la sección anterior “Aditivo”, la premezcla como se define en la sección anterior “Premezcla” o la composición del pienso como se define en la sección anterior “Composición del pienso”, se formulan a fin de proporcionar la cantidad eficaz de actividad enzimática a los animales objetivos. La formulación del aditivo, de la premezcla o de la composición de pienso puede llevarse a cabo con cualquier técnica bien conocida por un experto en la técnica, en particular y tal como la mezcla, la dilución, la deposición sobre un soporte, la pulverización o el espolvoreado en gránulos o la distribución directa a los animales.

La formulación adoptada depende de la especie objetivo y es motivada preferentemente por el nivel de actividad de β -glucanasa.

Las dosis diarias eficaces son típicamente:

- Vacas de leche: de 2250 a 9000 BGU/animal/día, preferiblemente de 4500 BGU/animal/día
- Bovinos de engorde: de 2250 a 9000 BGU/animal/día, preferiblemente 2250 BGU/animal/día para un peso vivo de hasta 500 kg y 3375 BGU/animal/día para un peso vivo más allá de 500 kg.

Las dosis diarias eficaces de los otros tipos de rumiantes pueden calcularse por un experto en la técnica mediante la comparación con las vacas de leche o los bovinos de engorde, de acuerdo con técnicas bien conocidas por un experto en la técnica, tales como y en particular dependiendo del peso en vivo, en función del peso vivo metabólico (PV_{0,75}), dependiendo del volumen del rumen, dependiendo de la cantidad total de materia seca ingerida por día, con una cantidad mínima preferiblemente de 1125 BGU/animal/día, en particular en animales para los que el peso vivo es menor a 100 kg.

Usos para el aumento de los rendimientos zootécnicos

Los inventores mostraron que la suplementación de la ración de las vacas de leche o de los bovinos de engorde con la composición enzimática según la

invención permite aumentar sorprendentemente sus resultados zootécnicos, en particular, en la producción mejorada de leche, incluyendo el nivel de butirosas y el nivel de proteína de la leche producida, el aumento de la ganancia de peso, aumento de la actividad de rumia, la mejora en la eficiencia de alimentación y en el índice de consumo, el aumento de la capacidad de ingestión de pienso, el aumento de la digestibilidad de pienso y/o de los concentrados y la reducción de la producción de metano.

El objeto de la presente invención es, por lo tanto y también, el uso de una composición enzimática según se define en la sección anterior “composición enzimática” de un aditivo como se define en la sección anterior “Aditivo” de una premezcla como se define en la sección anterior “Premezcla” o de una composición de pienso tal como se define en la sección anterior “Composición de pienso” para aumentar los rendimientos zootécnicos de un rumiante como se define en la sección anterior “Los rumiantes”.

Por “rendimientos zootécnicos”, se entiende aquí un indicador que permite la estimación de la calidad de un animal, en particular, su capacidad biológica para diversas funciones (crecimiento, trabajo, reproducción...). Los resultados zootécnicos incluyen, en particular, el aumento de peso del animal, en particular, la media diaria del aumento de peso, su índice de consumo o su eficiencia de alimentación, el peso a una edad típica, el rendimiento de la canal, el peso de la canal, la conformación de la canal, la ingesta de alimentos, la capacidad de ingesta de pienso, la digestibilidad de los piensos y/o de los concentrados, la producción de leche, el nivel de proteína de la leche, el nivel de grasas de la leche, la actividad de rumia, la producción de metano, el tamaño de la camada o la producción de pelos. Preferiblemente, la composición enzimática tal como se define en la sección anterior “Composición enzimática”, el aditivo según se define en la sección anterior “Aditivo”, la premezcla como se define en la sección anterior “premezcla” o por la composición de pienso como se define en la sección anterior “Composición de pienso” permite promover el aumento de peso y/o mejorar el índice de consumo y/o promover la ingesta de pienso y/o mejorar el rendimiento de la canal, el peso de la canal, la conformación de la canal, la producción de leche, el nivel de proteína de la leche, la grasas nivel de la leche, el tamaño de la camada y/o la producción de pelos y/o el aumento de la actividad de rumia y/o aumentar la capacidad de la ingestión de pienso y/o el aumento de la digestibilidad de los piensos y/o de los concentrados y/o la reducción de la producción de metano en un rumiante tal como se define en la sección anterior “Los rumiantes”.

Más preferiblemente, la composición enzimática tal como se define en la sección anterior “Composición enzimática”, el aditivo según se define en la sección anterior “Aditivo”, la premezcla como se define en la sección anterior “Premezcla” o por la composición de pienso como se define en la sección anterior “Composición de pienso” permite aumentar la producción de leche y/o mejorar el índice de consumo y/o promover la ganancia de peso y/o aumentar la actividad de rumia y/o aumentar la capacidad de ingestión de piensos y/o el aumento de la digestibilidad de piensos y/o de concentrados y/o reducir la producción de metano de los rumiantes como se define en la sección anterior “Los rumiantes”. Preferiblemente entre todos, la composición enzimática tal como se define en la sección anterior «composición enzimática» anteriormente, el aditivo según se define en la sección anterior “Aditivo” anteriormente, la premezcla como se define en la sección anterior “Premezcla” y la composición de pienso como se define en la sección anterior “Composición de pienso” permite aumentar la producción de leche y/o mejorar el índice de consumo y/o promover la ganancia de peso y/o aumentar la actividad de rumia en los rumiantes como se define en la sección anterior “Los rumiantes”.

Por “aumento de peso” o “media diaria de ganancia”, se entiende aquí la evolución en el crecimiento del peso del animal, expresada en g/día.

Por “índice de consumo”, se entiende aquí la eficiencia de conversión de alimento. Este índice se determina mediante la relación entre la cantidad de alimentos consumidos y la ganancia de peso en vivo, en el caso de los rumiantes de engorde, y mediante la relación entre la cantidad de alimentos consumidos y la producción de leche en el caso de los rumiantes que producen leche.

Por “eficiencia alimentaria”, se entiende aquí la medición de la transformación de la ración de alimentación de los rumiantes en productos. Esta es la razón inversa del índice de consumo como es definido anteriormente.

Por “peso a una edad típica”, se entiende aquí el peso del animal a una edad de referencia (1 año o 18 meses, por ejemplo), lo que permite facilitar las comparaciones.

Por “rendimiento de canal”, se entiende aquí la proporción entre el peso de la canal y el peso vivo del animal, lo que permite la estimación del “rendimiento verdadero”.

Por “peso de canal”, se entiende aquí el peso de la canal tras refrigeración.

Por “ingesta de alimentos”, se entiende la cantidad de alimentos ingeridos por el animal.

Por “capacidad de ingestión de piensos”, se entiende la cantidad de pienso ingerida de forma espontánea por el animal.

Por “digestibilidad de los piensos y/o de los concentrados”, se entiende la proporción de pienso y/o concentrados retenido o digerido con eficacia por el animal.

Por “producción de leche”, se refiere a la cantidad de leche producida por día, expresada en una unidad de volumen o una unidad de peso. En el contexto de la invención, la mejora en la producción de leche puede ser expresada por un aumento en la cantidad de leche producida, sino también por una mejora del nivel de butirosas y/o del nivel de proteína de la leche.

Por “nivel de proteína de la leche”, se entiende la cantidad de materia de proteína contenida en la leche.

Por “nivel de grasas de la leche”, se entiende aquí la cantidad de grasas contenidas en la leche.

Por “tamaño de la camada”, se entiende el número y el peso al nacer de los jóvenes o crías.

Por “actividad de rumia”, se entiende aquí el número de minutos por día dedicadas a masticar el bolo alimenticio.

Por “producción de pelos”, se entiende la cantidad de pelos producidos por un mamífero criado por sus pelos (por ejemplo una cabra cachemira).

Preferiblemente, la composición enzimática tal como se define en la sección anterior “Composición enzimática”, el aditivo según se define en la sección anterior “Aditivo”, la premezcla como se define en la sección anterior “Premezcla” o por la composición de pienso como se define en la sección anterior “Composición de pienso” permite mejorar la producción de leche, en particular, mejorar el nivel de butirosas y/o el nivel de proteínas de la leche, mejorar el índice de consumo y/o la eficiencia de alimentos, promover la ganancia de peso, mejorar la actividad de rumia, aumentar la capacidad de ingerir pienso, aumentar la digestibilidad de los piensos y/o de los concentrados y/o reducir la producción de metano de una manera significativa en un rumiante como se define en la sección anterior “Los rumiantes”.

En particular, la composición enzimática tal como se define en la sección anterior “Composición enzimática”, el aditivo según se define en la sección anterior “Aditivo”, la premezcla como se define en la sección anterior “Premezcla” o por la composición de pienso como se define en la sección anterior “Composición de pienso” permite mejorar la producción de leche en 1 a 5%, preferiblemente 3% y/o

mejorar el nivel de proteína de la leche en 0,5 a 1,5%, preferiblemente 1%, en un rumiante, en particular en un animal bovino, preferiblemente en una vaca lechera, preferiblemente alimentada con un pienso que comprende ensilado de maíz, preferentemente un pienso que comprende pienso natural, como paja o heno, tortas de semillas oleaginosas, pulpa de remolacha y que contiene nitrógeno y concentrados energéticos, la composición enzimática como se define en la sección anterior "Composición enzimática" está preferiblemente presente en el pienso a fin de proporcionar 4500 BGU/animal/día.

En particular, la composición enzimática tal como se define en la sección anterior "Composición enzimática", el aditivo según se define en la sección anterior "Aditivo", la premezcla como se define en la sección anterior "Premezcla" o por la composición de pienso como se define en la sección anterior "Composición de pienso" también permite la mejora de la ganancia de peso por 1 a 15%, preferiblemente un 10%, en un rumiante, en particular en un animal bovino, preferiblemente en un animal bovino de engorde, preferiblemente alimentado con un pienso que comprende ensilado de maíz, preferiblemente un pienso que comprende ensilado de maíz y que contiene nitrógeno y concentrados energéticos, la composición enzimática tal como se define en la sección anterior "Composición enzimática" estando preferiblemente presente en el pienso a fin de proporcionar 2.250 BGU/animal/día hasta un peso vivo de 500 kg y 3.375 BGU/animal/día más allá de un peso vivo de 500 kg.

En particular, la composición enzimática tal como se define en la sección anterior "Composición enzimática", el aditivo según se define en la sección anterior "Aditivo", la premezcla como se define en la sección anterior "Premezcla" o por la composición de pienso como se define en la sección anterior "Composición de pienso" también permite el aumento de la actividad de rumia de 5 a 15%, preferiblemente de 8 a 11%, en un rumiante, en particular en un animal bovino, preferiblemente en una vaca lechera, preferiblemente alimentada con un pienso que comprende ensilado de maíz, preferiblemente un pienso que comprende ensilado de maíz y concentrados que contienen nitrógeno y energéticos, la composición enzimática tal como se define en la sección anterior "Composición enzimática" está preferiblemente presente en el pienso a fin de proporcionar 4500 BGU/animal/día.

En particular, la composición enzimática tal como se define en la sección anterior "Composición enzimática", el aditivo según se define en la sección anterior "Aditivo", la premezcla como se define en la sección anterior "Premezcla" o por la

composición de pienso como se define en la sección anterior “Composición de pienso” también permite reducir la producción de metano de 0,5 a 9%, preferiblemente de 2,5 a 8%, en un rumiante, en particular en un animal bovino, preferiblemente en una vaca sacrificada, alimenta preferiblemente con un pienso que comprende heno de hierba, ensilado de maíz y/o ensilado de hierba, preferiblemente un pienso que comprende heno de hierba, la composición enzimática tal como se define en la sección anterior “Composición enzimática” está preferiblemente presente en el pienso a fin de proporcionar 3375 BGU/animal/día.

La composición enzimática tal como se define en la sección anterior “Composición enzimática”, el aditivo según se define en la sección anterior “Aditivo”, la premezcla como se define en la sección anterior “Premezcla” y la composición de pienso como se define en la sección anterior “Composición de pienso”, permiten además mantener un buen estado general de los rumiantes o de la manada de rumiantes a los cuales son administrados y, en particular, mantener la fertilidad, la morbilidad y/o mortalidad de la manada en que sean aceptables para el agricultor o incluso promover esta fertilidad y/o reducir esta morbilidad y/o mortalidad.

La presente invención también se refiere a un método para aumentar los rendimientos zootécnicos de un rumiante caracterizado porque el rumiante se hace para ingerir, preferiblemente en la ración de pienso, una cantidad eficaz de la composición enzimática tal como se define en la sección anterior “Composición enzimática”, del aditivo como se define en la sección anterior “aditivo”, de la premezcla como se define en la sección anterior “Premezcla” o de la composición alimenticia tal como se define en la sección anterior “Composición de pienso”.

Por “cantidad eficaz”, se entiende aquí la cantidad de composición enzimática, opcionalmente presente en el aditivo, en la premezcla o en la composición de pienso, que permite el aumento de los rendimientos zootécnicos como son definidos anteriormente. Como esto será claramente evidente para un experto en la técnica, esta cantidad depende del rumiante pertinente, de su edad, su género, de su tipo genético, de su estado fisiológico, de su peso, de su nivel de rendimiento esperado y de su ración de pienso.

Por lo general, en el caso de los bovinos, la cantidad efectiva e ingerida es tal que la actividad de β -glucanasa ingerida está comprendida entre 2250 y 9000 BGU/día, preferiblemente de 4500 BGU/día para una vaca lechera y entre 2250 a

9000 BGU/día para un animal bovino de engorde, preferiblemente 2250 BGU/día para un animal bovino de engorde con un peso vivo de hasta 500 kg y 3375 BGU/día para un animal bovino de engorde con un peso vivo superior a 500 kg.

Generalmente, la composición enzimática tal como se define en la sección anterior "Composición enzimática" es proporcionada al rumiante en forma de tomas sucesivas repartidas en el tiempo, por ejemplo de acuerdo con los ritmos diarios, dos veces por semana, semanales u otros ritmos bimensuales. Preferiblemente, se hace ingerir a los rumiantes, una cantidad eficaz de composición enzimática tal como se define en la sección anterior "Composición enzimática" de acuerdo con una dosis diaria.

Para los rumiantes que se alimentan exclusivamente mediante el pastoreo, la composición enzimática como se define en la sección anterior "Composición enzimática" preferiblemente se proporciona separadamente de su alimentación principal.

Para los rumiantes que se alimentan con pienso fresco o con piensos almacenados (por ejemplo, heno), o de lo contrario con piensos industriales, incluyendo con concentrados alimenticios, la composición enzimática tal como se define en la sección anterior "Composición enzimática" puede estar provista en una mezcla con estos piensos o en forma separada de estos piensos.

La presente invención se ilustrará con más detalle con los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Producción de la composición enzimática según la invención por fermentación en estado sólido

En este ejemplo, se describe un método para obtener la composición enzimática según la invención por fermentación en estado sólido de una mezcla de salvado de torta de semilla de colza y trigo en presencia de una cepa de *Aspergillus tubingensis*.

Un medio nutritivo se forma con una mezcla de torta de semilla de colza con una harina y salvado de trigo en una proporción de 7/3 en peso. Después pre-

humidificar la mezcla a 60% de materia seca y puesta en autoclave durante 35 min a 105 °C. Después de enfriar, el medio se inocula con una solución de esporas de *Aspergillus tubingensis* a fin de obtener una concentración de 1×10^7 esporas por gramo de materia seca y una humedad inicial de 45%. El pH se ajusta a 4,9 por adición de ácido sulfúrico. El medio de cultivo obtenido de este modo se distribuye en viales Erlenmeyer, en una cantidad de 10 g de materia seca por vial. Los viales Erlenmeyer se incuban a 33 °C en condiciones aeróbicas en la oscuridad durante 48 h sin agitación. El cultivo se detiene al producirse las primeras esporas en el medio de cultivo (ya que la presencia de las esporas puede molestar a los animales durante la ingestión debido a su volatilidad, los productos fermentados están diseñados de manera que contenga una cantidad mínima posible de esporas).

La mezcla obtenida al final de la fermentación se puede secar y se utiliza como tal en la alimentación de los animales o se extrae en agua a fin de que se añada en forma líquida.

Ejemplo 2: Medición del efecto de la composición enzimática según la invención en los resultados de la producción de leche de vaca

En este ejemplo, se describe el efecto de la composición enzimática según la invención en los resultados de producción de una manada de vacas lecheras de alta productividad.

Materiales y métodos

38 vacas de leche altamente productivas de la raza Prim'Holstein se distribuyen en 2 grupos y son emparejadas. Su agrupamiento se lleva a cabo según los siguientes criterios: la producción de leche, el nivel de proteína de la leche, el nivel de grasa de la leche, el rango de lactancia, el peso vivo.

Los animales reciben una ración mixta que consiste en 9,5 kg de MS (materia seca) de maíz de ensilaje, 2,1 kg de materia seca de alimento fibroso (paja + alfalfa con hebras largas), 4,9 kg de MS de corrector que contiene nitrógeno (cuya composición se describe en la Tabla 1), 8,0 kg de alimento de producción (cuya composición se describe en la Tabla 1).

La composición enzimática, obtenida por el método descrito en el Ejemplo 1, se estandariza como una premezcla para garantizar una buena homogeneidad

de la composición y facilitar su utilización durante la etapa de fabricación de los piensos. La premezcla de ese modo estandarizada fue incorporada en el pienso de producción, en una cantidad de 0,25% a fin de proporcionar 4500 BGU/animal/día. Las características de la mezcla previa de este modo estandarizada son: 130 AXC/g, 290 BGU/g y 35 CMC/g. La duración de la prueba es de 8 semanas.

Un suministro de 1 kg/día de un pienso que contiene monopropyleneglycol (Sandi+, una fuente energética) es logrado en las vacas con menos de 30 días de lactancia.

Las características medias de la ración son (en %/materia seca): Total de materia que contiene nitrógeno: 17,7%; Fibras insolubles en detergente neutro (FDN): 35,8% y almidón: 17,6%.

Tabla 1: Composición de los alimentos para vacas lecheras

Materia prima (%)	corrector conteniendo nitrógeno	Pienso de producción (control)	piensos de producción (+composición enzimática según la invención)	Sandi+
Expeller de torta de colza	18,0			
Cebada	15,2	15,3	42,3	18,5
tortas de soja	52,9	5,8	6,6	
Grano de Colza		7,8	7,9	
Torta de colza		24,8	24,3	32,6
Cáscara de soja		20,0	20,0	
Pulpa de remolacha		22,0	21,6	
Paja		2,0	2,0	
Salvado				15,1
Aceite de soja	1,7			
Bicarbonato Na	1,3	1,5	1,5	
Suplemento mineralizado o de	3,9	0,3	0,3	

vitaminas (MVS)				
Urea	1,1			
Premezcla	0,5	0,5	0,5	
Monopropilenglicol				10,0
Trigo	2,3	0,3		
Composición enzimática según la invención			0,25	
Materia seca (%)	90,1	88,7	88,7	88,2
Proteínas (% del crudo)	35,0	18,0	18,0	18,0
Grasas (% del crudo)	5,0	5,1	5,1	2,2
Celulosa cruda (%)	6,4	16,4	16,4	8,0
FDN (% del crudo)	16,4	35,0	35,0	24,0
Fibras insolubles en detergentes ácido (FDA) (% del crudo)	9,2	21,1	21,0	11,0
Lignina (ADL) (% del crudo)	2,0	3,4	3,4	3,5
Leche UF (/kg del crudo)	100,1	95,0	95,0	90,0
PDIA (g/kg del crudo)	116,1	55,7	56,0	48,6
PDIN (g/kg del crudo)	245,2	119,7	119,8	117,9
PDIE (g/kg del crudo)	164,3	106,5	106,9	97,5

Las características de los lotes de animales se describen en la Tabla 2.

Tabla 2: Características de los lotes de vacas de leche al agruparse (luego de 2 semanas antes del experimento)

	Control	Tratamiento
Número de animales	19	19
Etapa de lactancia (d)	168	185
Producción de leche (kg/d)	39,5	39,5
Nivel butirosas (g/kg)	35,9	35,9
Nivel de proteína (g/kg)	31,6	32,1
Células somáticas de la leche (1000/mL)	391	220
Urea (mg/L)	267	284
Peso vivo (kg)	658	670

Resultados

Los resultados de la producción de ambos grupos se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3: Los resultados de producción de los lotes y las estadísticas

	Control	Tratamiento	Efecto de lote
Número de animales	19	19	
Producción de leche (PL) (kg/d)	39,3	40,4	***
Nivel butirosas (BL) (g/kg)	35,8	35,6	NS
Nivel de proteína (PL) (g/kg)	31,0	31,3	**
Grasa exportada (g/d)	1395	1413	NS
Proteína exportada (g/d)	1210	1244	***
Producción de leche corregida a 7% (kg/d)	37,2	38,0	**

Células somáticas de la leche (1000/mL)	94	106	NS
Peso vivo (kg)	682	671	***

NS: no significativo; *: P <0,10; **: P <0,05; ***: P <0,001

Los inventores se han dado cuenta de que la provisión de la composición enzimática tiene un efecto muy pronunciado en muchos criterios:

- un aumento significativo en la producción de leche;
- un aumento significativo en el nivel de proteínas (0,3 g/kg), y en la materia de proteína producida;
- aumento significativo de la MP 7% (producción de leche corregida por los niveles = $MP * (BL + PL)/70$): +0,7 kg.

Estos efectos no se acompañan de un aumento de la materia seca e ingerida y, por lo tanto, expresan una mejor eficiencia de alimentación (cantidad de materia producida leche/materia seca ingerida).

Este ejemplo muestra que el suministro de una composición enzimática según la invención permite mejorar resultados zootécnicos en la producción de leche y una mejor valorización de la ración de alimentación de las vacas lecheras de alta productividad.

Ejemplo 3: Medición del efecto de la composición enzimática según la invención en los resultados de crecimiento en bovinos de engorde

En este ejemplo, el efecto de la composición enzimática según la invención se describe en los resultados de crecimiento en los bovinos de engorde.

Materiales y métodos

40 bovinos de engorde de la raza Charolais fueron distribuidos en dos grupos. La dosificación se llevó a cabo con el criterio de peso vivo.

Los animales recibieron una ración completa y mezclada, cuyas composiciones se detallan en la Tabla 4.

La composición enzimática, obtenida por el método descrito en el Ejemplo 1, se estandarizó como una premezcla a fin de garantizar una buena homogeneidad de la composición y facilitar su utilización durante la etapa de distribución a los animales. La premezcla de ese modo estandarizada se incorporó en la ración completa y mezclada a fin de proporcionar 9000 BGU/animal/día. Las características de la premezcla de este modo estandarizada son: 80 AXC/g, 150 BGU/g y 17 CMC/g.

La prueba duró 10 meses.

Tabla 4: Composición de la ración completa y mezclada de bovinos de engorde

Ingrediente	Cantidad distribuida (kg de crudo/animal/día)	
	Engorde de 300 a 500 kg de peso vivo	Acabado de 500 a 750 kg de peso vivo
Pulpa de patata	3,0	3,0
Paja de trigo	0,8	0,8
Alfalfa envuelta (33% de materia seca)	3,0	3,0
Concentrado conteniendo nitrógeno (44% MAT)	0,8	0,65
Concentrado energética (1 UFV/kg)	2,5	3,5
Minerales	0,1	0,1
Urea	0,01	0,06
Ensilaje de maíz y remolacha prensada sobre-pulpas (50/50 de materia seca)	14,0	20,0

Resultados

Los resultados de producción de ambos grupos se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5: Resultados de crecimiento de los lotes

DAWG (g/animal/día)	Nacimiento en T0 (8,3	T0 a T0 +	T0 + 1 mes a	T0 + 2 meses	T0 a T0 + 8	Peso de la
---------------------	-----------------------	-----------	--------------	--------------	-------------	------------

		meses en promedio)	1 mes	T0 + 2 meses	a T0 + 8 meses	meses	canal (kg)
Controlar	Promedio	1139	1564	1633	1095	1219	415
	Desviación estándar	139	369	340	236	186	30
Tratamiento	Promedio	1139	1708	1709	1218	1342	425
	Desviación estándar	117	590	293	197	200	39
Mejora inducida por el tratamiento expresada en base 100 del control (% de mejora)		100 (0%)	109 (9%)	105 (5%)	111 (11%)	110 (10%)	102 (2%)

Los inventores se dieron cuenta de que mediante al agregar la composición enzimática en la alimentación de bovinos jóvenes de engorde, que era posible mejorar en un 10% el promedio de ganancia de peso diaria (DAWG). Esto se expresa por un peso de la canal en sacrificio, mejorada en un 2% en el lote de animales suplementados con la composición enzimática según la invención.

Este ejemplo muestra que proveer la composición enzimática según la invención permite mejorar los resultados zootécnicos de crecimiento de los bovinos de engorde.

Ejemplo 4: Medición del efecto de la composición enzimática según la invención en los resultados de producción y la actividad de rumia de vacas lecheras

En este ejemplo, el efecto de la composición enzimática según la invención se describe en los resultados de producción de una manada de vacas lecheras de alta productividad y sobre la actividad de rumia de los animales.

Materiales y métodos

36 vacas lecheras y altamente productivas de la raza Prim'Holstein fueron distribuidas en dos grupos. La dosificación de los animales se llevó a cabo según los criterios de producción de leche, peso vivo, rango de lactancia y período de lactancia en días. La prueba duró 85 días.

Los animales recibieron una ración completa y mezclada, que consiste principalmente de ensilado de maíz, heno de alfalfa, heno ballico, pienso de gluten de maíz, concentrado de producción y agua. La composición detallada se da en la Tabla 6.

La composición enzimática, preparada de acuerdo con el método de producción descrito en el Ejemplo 1, se estandarizó como una premezcla para garantizar una buena homogeneidad de la composición y facilitar su uso durante la etapa de distribución a los animales (tal distribución como “alimentación superior”). La premezcla obtenida se mezcló en una ración total a fin de proporcionar 4500 BGU/animal/día. Las características de la premezcla de este modo estandarizada son: 400 AXC/g, 270 BGU/g y 69 CMC/g.

La actividad de rumia de las 36 vacas se registró diariamente con un detector acústico (RuminAct, Milkline, Italia).

Tabla 6: Composición de la ración completa mixto de las vacas de leche

Ensilaje de maíz	kg	22,0
Concentrate ¹ + Torta de algodón	kg	6,0
Mezcla de copos de cepada-harina de gluten de maíz (60:40)	kg	6,8
Agua	kg	8,0
Heno ballico	kg	1,1
Heno de alfalfa	kg	4,4

¹: tortas de soja 44%: 41,2%; torta de algodón: 33%, torta de girasol: 7,21%; harina de gluten de maíz: 7,21%; CaCO₃: 2,68%; NaHCO₃: 2,68%; MgO: 1,00%; CaHPO₄: 0,67%; NaCl: 0,67%; ZnSO₄: 0,10%; Premezcla: 0,54%.

Se analizaron los valores nutricionales de la ración completa y mezclada: materia seca 48,69%, proteína cruda: 15,75%/materia seca (seco); Grasas: 2,70%/seco; Celulosa cruda: 18,45%/seco; FDN: 37,86%/seco; ADF: 21,15%/seco y Almidón: 25,57%/seco.

No hubo diferencias entre ambos lotes ingestión durante esta prueba.

Resultados

Los resultados de producción de leche de ambos grupos se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7: Resultados de producción de leche (kg/animal/día) de los lotes y estadísticas

Períodos	Control	Tratamiento	Tratamiento vs. Control	Efecto del tratamiento P =	Efecto del período P =	Interacción (tratamiento x período) P =
D0 - D21	36,7 ± 8,5	37,5 ± 8,4	+0,8	0,7840	0,0001	0,9896
D21 - D37	36,9 ± 8,4	38,3 ± 8,6	+1,4	0,6135	0,0001	0,4114
D37 - D53	35,6 ± 9,2	37,6 ± 8,1	+2,0	0,4786	0,0001	0,1807
D53 - D69	34,1 ± 8,7	35,5 ± 8,1	+1,4	0,6024	0,1024	0,9907
D69 - D85	33,7 ± 9,2	35,0 ± 8,0	+1,3	0,6424	0,0001	0,9938
D21 - D85	35,1 ± 8,9	36,6 ± 8,3	+1,5	0,5795	0,0001	0,9472

La producción de leche disminuyó durante el ensayo de acuerdo con la etapa de lactancia. Durante la prueba, el lote que recibió la composición

enzimática según la invención mostró una mejora en la producción de leche de +1,5 kg de leche por día y por animal, en comparación con el grupo de control.

Los resultados de la composición de la leche (grasas y proteínas) se detallan en la Tabla 8.

Tabla 8: Composición de la leche de los lotes y estadísticas

Día	Tratamiento	Control	Tratamiento vs control	Efecto del tratamiento P =	Error estándar
butirosas nivel de la leche (%)					
D0	3,99 ± 0,52	3,87 ± 0,54	-0,12	0,5102	0,1251
D21	4,01 ± 0,74	4,00 ± 0,58	-0,01	0,9421	0,1558
D37	3,98 ± 0,49	4,02 ± 0,49	+0,04	0,7988	0,1162
D53	4,12 ± 0,73	4,34 ± 0,61	+0,22	0,3368	0,1581
D69	4,15 ± 0,54	4,30 ± 0,69	+0,15	0,4860	0,1462
D85	4,09 ± 0,62	4,21 ± 0,55	+0,12	0,5305	0,1376
Producción de grasas de leche (kg/día)					
D0	1,42 ± 0,33	1,38 ± 0,29	-0,04	0,7318	0,0731
D21	1,42 ± 0,25	1,47 ± 0,31	+0,05	0,5751	0,0662
D37	1,44 ± 0,23	1,51 ± 0,27	+0,07	0,4430	0,0585
D53	1,38 ± 0,29	1,51 ± 0,33	+0,13	0,2094	0,0729
D69	1,37 ± 0,31	1,48 ± 0,26	+0,11	0,2739	0,0675
D85	1,26 ± 0,23	1,34 ± 0,22	+0,08	0,2790	0,0535
Nivel de proteína de la leche (%)					
JD0	3,57 ± 0,40	3,46 ± 0,31	-0,11	0,3732	0,0844
D21	3,60 ± 0,45	3,78 ± 0,22	+0,18	0,1243	0,0832
D37	3,66 ± 0,32	3,80 ± 0,43	+0,14	0,2724	0,0887
D53	3,66 ± 0,33	3,87 ± 0,22	+0,21	0,0324	0,0671
D69	3,67 ± 0,30	3,84 ± 0,23	+0,17	0,0659	0,0624
D85	3,69 ± 0,31	3,82 ± 0,31	+0,13	0,2092	0,0727
Producción de proteínas de leche (kg/día)					
D0	1,26 ± 0,19	1,24 ± 0,22	-0,02	0,7599	0,0490
D21	1,29 ± 0,23	1,42 ± 0,35	+0,13	0,2103	0,0705
D37	1,34 ± 0,30	1,41 ± 0,19	+0,07	0,4245	0,0590

D53	1,24 ± 0,27	1,37 ± 0,35	+0,13	0,2293	0,0729
D69	1,23 ± 0,32	1,34 ± 0,29	+0,11	0,2692	0,0708
D85	1,15 ± 0,253	1,23 ± 0,24	+0,08	0,3567	0,0579

Durante la prueba, el nivel de butirosas se mantuvo estable en el lote de control mientras que aumentó en el lote con tratamiento (suplementado con la composición enzimática según la invención). El nivel de butirosas fue siempre superior en el lote de vacas con tratamiento que en el lote de las vacas de control. Después de 85 días de prueba, las vacas del lote con tratamiento tuvieron un mayor nivel de butirosas en 0,12 puntos al de las vacas del lote de control.

Durante la prueba, el nivel de proteína de la leche aumentó más rápidamente en el lote con tratamiento que en el lote de control. Estadísticamente, los inventores notaron un aumento significativo en el nivel de proteína en D53 y D69 en +0,21 y +0,17 puntos respectivamente. Esto también se expresa por una mayor exportación de proteínas (+0,08 kg/día al final de la prueba).

La actividad de rumia es de gran importancia para la actividad metabólica de las vacas lecheras y puede ser una herramienta útil para el seguimiento de la salud animal. La rumia estimula la producción de saliva y por lo tanto asegura las condiciones óptimas para la actividad celulolítica en el rumen.

Los datos promedio de actividad de rumia diarias se dan en la Tabla 9. La actividad de rumia se expresa en el número de minutos de rumia por día y por animal.

Tabla 9: La actividad de rumia de los animales (minutos de la rumia/animal/día)

Período s	Contro l	Tratamient o	Tratamient o vs. Control	Efecto del tratamient o P =	Efecto del períod o P =	Interacción (tratamient o x período) P =
D0 - D21	500,6	511,6	+11,0	0,6513	0,0001	0,4360
D21 -	497,0	515,8	+18,8	0,4730	0,0001	0,6990

D37						
D37 - D53	458,3	497,8	+39,5	0,1858	0,0001	0,2840
D53 - D69	482,3	528,1	+45,9	0,1210	0,0322	0,3747
D69 - D85	471,7	523,9	+52,2	0,1019	0,0001	0,0132
D21 - D85	477,3	516,4	+39,1	0,1657	0,0001	0,0066

Ambos grupos no muestran ninguna diferencia estadística en el comienzo de la prueba (500,6 vs. 511,6 min/día/animal para los lotes de control y tratamiento, respectivamente). Sin embargo, después de 16 días de pruebas, la actividad de rumia numéricamente aumenta en el lote con tratamiento. En el último período de la prueba (D69-D85), la interacción (tratamiento x período) es significativa (P = 0,0132) con una actividad de rumia del lote con tratamiento mayor que la del lote de control (+52,2 minutos/día/animal). El análisis estadístico durante el período D21-D85 muestra el mismo efecto de la interacción con los 39 min/día/animal de la actividad de rumia en las vacas del lote con tratamiento.

Este ejemplo demuestra que proveer la composición enzimática según la invención permite mejorar los resultados zootécnicos en la producción de leche (producción diaria de leche, producción de proteínas de leche y de grasas de leche), una mejor valorización de la ración de alimentación de vacas lecheras de alta productividad y una actividad mejorada de rumia.

Ejemplo 5: Medición del efecto de la composición enzimática según la invención en fermentaciones ruminales in vitro (liberación de gas)

En este ejemplo, el efecto de la composición enzimática según la invención se describe en las fermentaciones ruminales *in vitro*, en particular, la liberación de gas y, en particular, la producción de metano.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron dos vacas sacrificadas con cánulas al rumen. Durante toda la duración del experimento *in vitro*, los animales fueron alimentados con una mezcla de hierba haylage (4 kg), ensilado de maíz (5 kg/d), paja picada (1 kg) y concentrado (1 kg).

Ingredientes

Se estudiaron cuatro piensos *in vitro*: heno de hierba, ensilado de hierba, ensilado de maíz y torta de soya. La composición química de los ingredientes experimentales se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10: Composición química de los ingredientes utilizados

Ingredientes	MAT ¹ (%)	FDN (%)	Almidón (%)	Energía bruta (kcal/kg MS)
Soja	55,37	15,18	N/A ²	4636,92
Haylage	17,90	44,72	N/A	4106,45
Maíz	5,07	53,53	19,5	4546,62
Heno	6,89	65,93	N/A	4306,68

¹MAT: Total de material conteniendo nitrógeno

²N/A: No aplicable

Los diferentes ingredientes se liofilizaron y son molidos hasta 1 mm mediante un molino de laboratorio.

La composición enzimática preparada de acuerdo con el método de producción descrito en el Ejemplo 1 mediante el uso de una cepa de *Aspergillus niger*, se estandarizó como una premezcla, a fin de garantizar una buena homogeneidad de la composición y facilitar su utilización durante la etapa de distribución a los animales en “alimentación superior”. La premezcla obtenida se mezcló en la ración total a fin de proporcionar 3375 BGU/animal/día. Las características de la premezcla estandarizada de esta manera son: 70 AXC/g, 213 BGU/g y 28 CMC/g.

Las fermentaciones *in vitro* se consiguen de acuerdo con el método descrito por Menke y Steingass (1988). El inóculo consistió de 1/3 de fluido ruminal recogido en 2 vacas canuladas y 2/3 de un tampón Menke y Steingass (Menke

KH, Steingass H. (1988) "Estimación del valor de alimentación de energía obtenida a partir de análisis químico y en la producción de gas *in vitro* utilizando un fluido ruminal". *Animal Research Development* 28, 7-55). 200 mg de sustrato fueron incorporados en jeringas de vidrio de 100 ml en presencia del inóculo. La lectura del volumen de gas se llevó a cabo con regularidad.

Se tomaron muestras del fluido ruminal en los animales sometidos a una dieta de alimentación normal (control) y, luego, en los mismos animales después de 3 semanas de adaptación a una dieta suplementada con la composición enzimática según la invención (Prueba) en una cantidad de 1 g/kg de producto alimenticio (~ 15 g/d/animal).

El esquema experimental fue el siguiente: 4 sustratos × 2 tratamientos (Control o Prueba) × 3 jeringas + 3 vacías = 27 jeringas por serie. Se llevaron a cabo dos series (por lo tanto 54 jeringas) para la determinación de la producción de metano (CH₄) y del nitrógeno amoniacal (N-NH₃).

Las fermentaciones de la serie dedicada a la producción de CH₄ y N-NH₃ se llevaron a cabo durante 24 h. Al final de la 24 horas, una muestra de la fase de gas de las botellas de fermentación fue medida para determinar la producción de CH₄ por cromatografía de gas y una muestra de la fase líquida para determinar la producción de N-NH₃. Al iniciar las fermentaciones, 3 muestras de inóculo también se centrifugaron y se analizaron su contenido de N-NH₃.

Las producciones de CH₄ se relacionaron con la g de MS del conjunto de sustrato para fermentar y los valores fueron corregidos según los inóculos y para los espacios en blanco.

Resultados

Desde el punto de vista de la cantidad de metano producido después de 24 h de fermentación, aparece una tendencia a producir menos metano con la composición enzimática según la invención para los ingredientes de pienso (heno, haylage y ensilado de maíz) y una mayor uso de amoníaco por el microbiot ruminal (menor contenido de NH₃), como se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11: Producción de metano y de amonio después de la fermentación *in vitro* durante 24 h con pienso de fluido ruminal, ya sea en presencia o no de la composición enzimática según la invención (N = 6)

		CH ₄	cambio/control	NH ₃	Cambio/control
--	--	-----------------	----------------	-----------------	----------------

		(mmol/g)	(%)	(mg/g)	(%)
Heno	Control	1,779		27,50	
	Prueba	1,623	-8,8	26,90	-2,2
Ensilado de maíz	Control	2,293		21,40	
	Prueba	2,274	-0,8	20,70	-3,3
Ensilado de hierba	Control	1,428		28,90	
	Prueba	1,391	-2,6	25,80	-10,7
Tortas de soja	Control	2,315	0	67,70	0
	Prueba	2,513	8,6	68,00	0,4
SEM		0,075		2,90	

Tras las mediciones llevadas a cabo, después de 24 h (metano y NH₃), los inventores pudieron observar una tendencia consistente para todos los piensos de fibra (forrajes: heno, ensilaje de maíz y hierba haylage) con la reducción de la producción de metano y con un mayor uso del amoniaco del tampón de fermentación por los microorganismos del rumen. Esto significa que en las primeras horas de fermentación, los piensos incubados en presencia de la composición enzimática según la invención pueden promover un mejor crecimiento de las bacterias y, por lo tanto, garantizar un mejor suministro de proteínas y aminoácidos de origen microbiano en las vacas.

Este ejemplo muestra que al proporcionar la composición enzimática según la invención se permite reducir la producción de metano por los microorganismos contenidos en el rumen de los rumiantes.

Ejemplo 6: Medición del efecto de la composición enzimática según la invención sobre la digestibilidad de los piensos *in sacco* para rumiantes

En este ejemplo, el efecto de la composición enzimática según la invención se describe por la degradabilidad *in sacco* de diversas materias primas y comunes en la alimentación de los rumiantes.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron dos vacas sacrificadas y con cánulas al rumen. Durante toda la duración del experimento *in sacco*, los animales fueron alimentados con una mezcla de hierba haylage (4 kg), ensilado de maíz (5 kg/j), paja picada (1 kg) y concentrado (1 kg).

Ingredientes

Cuatro piensos fueron estudiados *in sacco*: Hierba de heno, Ensilaje de heno, Ensilaje de maíz y Torta de soya. La composición química de los ingredientes experimentales se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12: Composición química de los ingredientes utilizados

Ingredientes	MAT ¹ (%)	FDN (%)	Almidón (%)	Energía bruta (kcal/kg MS)
Soja	55,37	15,18	N/A ²	4636,92
Haylage	17,90	44,72	N/A	4106,45
Maíz	5,07	53,53	19,5	4546,62
Heno	6,89	65,93	N/A	4306,68

¹MAT: Total de material conteniendo nitrógeno

²N/A: No aplicable

Los diferentes ingredientes se liofilizaron y se muelen hasta 1 mm por medio de un molino de laboratorio.

La composición enzimática preparada de acuerdo con el método de producción descrito en el Ejemplo 1, mediante el uso de una cepa de *Aspergillus neoniger*, se estandariza como una premezcla para garantizar una buena homogeneidad de la composición y facilitar su uso durante la etapa de distribución a los animales como “alimentación superior”. La premezcla obtenida se mezcló en la ración total a fin de proporcionar 3375 BGU/animal/día. Las características de la premezcla estandarizada de esta manera son: 70 AXC/g, 213 BGU/g y 28 CMC/g.

A fin de estudiar los cambios inducidos por la composición enzimática según la invención sobre el metabolismo ruminal en el animal, las 2 vacas lecheras canuladas y secadas se utilizaron para la realización de un experimento *in sacco* con el uso de la técnica con bolsas de nylon (Ørskov, E. R., Hovell, D y Mould, F. L. (1980) “Uso de la técnica de bolsa de nylon para la evaluación de los

piensos" Tropical Animal Production 5: 195-213). Dos series de digestibilidad *in sacco* se realizaron en los cuatro alimentos probados: una serie con los animales sometidos a la dieta de alimentación descrita anteriormente (Control), seguido de una serie realizada en los mismos animales después de 3 semanas de adaptación a una dieta suplementada (Prueba) con la composición enzimática según la invención en una cantidad de aproximadamente 1 g/kg de pienso (~ 15 g/d/animal). El esquema experimental fue el siguiente: 4 ingredientes × 2 tratamientos (Control o Prueba) × 4 bolsas × 7 tiempos de medición (0, 3, 6, 9, 12, 24, 48 h) = 224 bolsas. Los alimentos fermentados en las bolsas (0, 6, 12, 24, 48 h) se analizaron para determinar su contenido de proteína cruda, FDN, la energía y el contenido de almidón (almidón exclusivamente para el ensilado de maíz).

El contenido de materia seca y proteínas crudas de los ingredientes antes y después de la hidrólisis se determina mediante métodos de referencia (método 967,03; 981,10; "Métodos oficiales de análisis", AOAC, 1990, Ed. Kenneth Helrich.). El contenido de almidón del ensilado de maíz se determina mediante un método enzimático y colorimétrico (Megazyme Ltd, Irlanda). El contenido FDN (fibra detergente neutro) de acuerdo con el método de Van Soest *et al.* (Van Soest P. J., Robertson J. B., Lewis B. A. (1991): "Los métodos para la fibra dietética, fibra detergente neutro y polisacáridos no de almidón en relación con la alimentación animal", J. Dairy Sci, 74, 3583-3597) se determina mediante el uso de amilasa termoestable con el sistema ANKOM.

Al final de las digestiones *in sacco*, la digestibilidad de la materia seca, de las proteínas, de la energía, de la FDN y del almidón fueron calculados y los valores estadísticamente comparados de acuerdo con el ingrediente relevante y, ya sea con suplementación o no (N = 8), y la cinética de degradación modelada por medio del modelo de Orskov y McDonald (Orskov, ER y McDonald, Y. 1979). La degradabilidad de proteína en el rumen se estimó a partir de la determinación de la digestibilidad de los alimentos en el rumen. (Daynal Agricultural Science, Cambridge. 92: 499-503) La vaca se consideró como un factor aleatorio.

Resultados

La degradabilidad final de la materia seca de los ingredientes contenidos en las bolsas de nylon incubados en el rumen de las vacas canuladas no se alteró significativamente por la distribución de la composición enzimática según la invención en las vacas (Tabla 13). Sin embargo, la cinética de degradación fue realmente influenciada por los piensos y, en particular, respecto a la hierba

Tabla 14: La digestibilidad de FDN *in sacco* en presencia o no de la composición enzimática según la invención (N = 2) (g/g de alimento) después de 0, 6, 12, 24 y 48 h.

		Digestibilidad de la FDN (g/g de alimento, n = 2)				
Tiempo de fermentación (h)		0	6	12	24	48
Soja	Prueba	0,242	0,390	0,480	*	*
	Control	0,240	0,270	0,605	*	*
Ensilado de hierba	Prueba	0,028	0,080	0,270	0,685	0,765
	Control	0,028	0,060	0,200	0,370	0,730
Ensilado de maíz	Prueba	0,072	0,225	0,360	0,440	0,620
	Control	0,072	0,180	0,285	0,335	0,585
Heno	Prueba	0,028	0,045	0,120	0,285	0,455
	Control	0,028	0,100	0,125	0,220	0,430
*: No hay suficiente muestra en la bolsa de nylon para llevar a cabo el ensayo						
En negrita: diferencia significativa (p <0,05)						

Tabla 15: Digestibilidad del nitrógeno *in sacco* en presencia o no de la composición enzimática según la invención (N = 2) (g/g de alimento) después de 0, 6, 12, 24 y 48 h.

		Digestibilidad de la MAT (g/g de alimento, n = 2)				
Tiempo de fermentación (h)		0	6	12	24	48
Soja	Prueba	0,228	0,590	0,595	*	*
	Control	0,228	0,325	0,625	*	*
Ensilado de hierba	Prueba	0,303	0,665	0,720	0,910	0,955
	Control	0,303	0,640	0,740	0,785	0,935
Ensilado de maíz	Prueba	0,705	0,705	0,745	0,765	0,780
	Control	0,705	0,715	0,705	0,745	0,780
Heno	Prueba	0,303	0,420	0,395	0,525	0,655
	Control	0,303	0,375	0,415	0,475	0,655

*: No hay suficiente muestra en la bolsa de nylon para llevar a cabo el ensayo
En negrita: diferencia significativa (p <0,05)

Tabla 16: La digestibilidad de la energía en crudo *in sacco* en presencia o no de la composición enzimática según la invención (N = 2) (g/g de alimento) después de 0, 6, 12, 24 y 48 h.

		Digestibilidad de la energía en crudo (g/g de alimento, n = 2)				
Tiempo de fermentación (h)		0	6	12	24	48
Soja	Prueba	0,374	0,600	0,540	*	*
	Control	0,374	0,420	0,490	*	*
Ensilado de hierba	Prueba	0,199	0,435	0,660	0,806	0,838
	Control	0,199	0,415	0,505	0,678	0,827
Ensilado de maíz	Prueba	0,414	0,520	0,530	0,570	0,760
	Control	0,414	0,490	0,550	0,590	0,680
Heno	Prueba	0,199	0,240	0,285	0,415	0,490
	Control	0,199	0,220	0,285	0,350	0,515
*: No hay suficiente muestra en la bolsa de nylon para llevar a cabo el ensayo						
En negrita: diferencia significativa (p <0,05)						

La hipótesis de un impacto significativo de la composición enzimática según la invención en los piensos de fibra se confirma con estos en mediciones de degradabilidad *in sacco*. La composición enzimática según la invención acelera los procesos de degradación de 3 fibras de piensos para animales y permite significativamente la aceleración de la fermentación de la hierba haylage y, en particular, de su fracción en fibra (FDN). Las consecuencias en vacas lecheras podría ser una reducción en el volumen ruminal y un aumento en la capacidad del pienso que ingieren. Este efecto sería de particular interés para los animales en lactancia que tienen dificultades para satisfacer sus necesidades de alimentación mediante el consumo de piensos y que, por lo tanto, tienen que ser

suplementados de manera significativa, por lo que la producción de concentrados es más cara que los recursos de forraje.

Este ejemplo demuestra que proporcionar la composición enzimática según la invención permite una mejor valorización de los recursos de pienso por los animales y, por lo tanto, una mejor eficiencia en la alimentación.

Ejemplo 7: Medición del efecto de la composición enzimática según la invención sobre el metabolismo de los microbios del rumen en un reactor anaerobio con rebosadero (OAR) y en tubos de cultivo.

Los objetivos de este ejemplo son:

1) Cuantificar los efectos de la composición enzimática según la invención sobre el metabolismo de los microbios del rumen de especie bovina, cultivados en 6 reactores anaeróbicos de desbordamiento (OAR) en tres raciones característicos de ganado bovino. Los OAR son fermentadores continuos con doble efluente.

2) Especificar el modo de acción de la composición enzimática según la invención en las fermentaciones ruminales midiendo, en tubos de cultivo, el impacto de la composición enzimática en crudo, de sus fracciones solubles e insolubles y de la composición enzimática inactivada por autoclave en las producciones de ácidos grasos volátiles (VFA) y de gas, después de 24 h de incubación.

Materiales y métodos

Prueba en un reactor anaeróbico de desbordamiento (OAR)

Se utilizan seis fermentadores con un volumen de trabajo de 1 litro, ajustados a las tasas de renovación de fase sólida y de fase líquida en 0,03 y 0,06 h⁻¹, respectivamente. Estos fermentadores son inoculados con el contenido del rumen de vacas lecheras, filtrado en una malla de 1 mm. El pH de los fermentadores se mantiene por encima de 6,0 mediante infusión continua de soluciones tampón (carbonato y fosfato). El suministro de sustratos (piensos) se lleva a cabo a una hora determinada: a las 11h y 23h. Una fase de equilibrio de los fermentadores se lleva a cabo durante los primeros 5 días antes de la fase de las mediciones y muestreos.

La composición enzimática según la invención se introduce a un nivel de 10 g por kg de ración de MS. El suministro diario es de 0,25 g por fermentador. Dos

lotes de composición enzimática se preparan de acuerdo al método de producción descrito en el Ejemplo 1 mediante el uso de una cepa de *Aspergillus tubingensis* (n.º 1) por un lado y una cepa de *Aspergillus neoniger* (n.º 2) por otro lado. Las composiciones enzimáticas obtenidas de este modo tienen las siguientes características: para la versión n.º 1, AXC 1037/g, 1063 BGU/g y 262 CMC/g; para la versión n.º 2, AXC 3399/g, 3623 BGU/g y 846 CMC/g. Ambas composiciones obtenidas fueron estandarizadas como dos premezclas a fin de facilitar su incorporación en los fermentadores. Las características de las premezclas estandarizadas de esta manera son: 171 AXC/g, 225 BGU/g y 67 CMC/g para la versión n.º 1; 122 AXC/g, 280 BGU/g y 75 CMC/g para la versión n.º 2.

Las raciones contienen trigo y una torta de soja a fin de formular dietas iso-nitrogenadas e iso-energéticas.

Los diversos factores probados son:

- 1) El producto, factor en 3 niveles: ausencia/composición enzimática n.º 1/composición enzimática n.º 2
- 2) Las dietas, factor en 3 niveles: a base de ensilado de maíz/ensilado de hierba/heno de pasto ovillo

El plan experimental seleccionado es un plan en 3 bloques incompletos y balanceados (Tabla 17) que corresponden a 3 períodos experimentales de 7 días, cada uno comprende una fase de equilibrio de 5 días y una fase de mediciones y muestreos de 2 días.

Tabla 17: Plan experimental de las pruebas en OAR con dos versiones de composición enzimática y los diferentes piensos.

		Fermentadores					
		A	B	C	D	E	F
Bloque 1	Dieta	EH	EM	F	F	EM	EH
	Composición enzimática	n.º 1	n.º 1	0	n.º 2	0	n.º 2
Bloque 2	Dieta	F	EH	EH	EM	F	EM
	Composición enzimática	n.º 2	0	n.º 1	n.º 2	n.º 1	0
Bloque 3	Dieta	EH	EM	EM	F	EH	F
	composición	0	n.º 1	n.º 2	0	n.º 2	n.º 1

	enzimática						
--	------------	--	--	--	--	--	--

EH: ensilado de hierba; EM: ensilaje de maíz; F: heno de pradera

Las mediciones y muestreos realizados durante las pruebas son:

- pH, potencial redox.
- Contenido del fermentador para el conteo de protozoos y determinación de las facies de fermentación (AGV, nitrógeno amoniacal).
- Gas (recogido durante 2 días) para medir el volumen producido y su composición
- Los efluentes recolectados durante dos días, para obtener resultados de degradación de las raciones, la fermentación y la síntesis de proteínas microbianas.
- Bolitas microbianas por doble centrifugación de los efluentes frescos.

Los siguientes análisis se realizaron sobre las muestras:

- VFA (cromatografía) en los ensilajes, efluentes y contenido del fermentador
- Nitrógeno amoniacal (sonda específica)
- Gas (Cromatografía)
- MS, materia orgánica en los piensos y los efluentes liofilizados
- Almidón en los piensos y los efluentes liofilizados
- Fraccionamiento de las paredes según Van Soest (FDN, FDA, ADL) en los piensos y los efluentes liofilizados
- Nitrógeno (método Dumas) en los piensos, los efluentes liofilizados y los pellets microbianos.
- Bases nucleicos (cromatografía) en los efluentes liofilizados y los pellets microbianos.

Un análisis estadístico se lleva a cabo con un modelo de análisis de varianza de la siguiente manera: $Y_{ijkl} = P_i + R_j + P_i * R_j + B_k + e_{ijkl}$ con P, R, B y e siendo los factores del Producto y de la Dieta, el bloque y el error experimental, respectivamente.

Prueba en tubos de cultivo

60 tubos de cultivo de 72 ml, equipados con tapones con un tabique butil-teflón se inoculan con el contenido del fermentador muestreado 12h después del

último suministro de ración y se incubaron durante 24h según el procedimiento estándar. Los factores estudiados son:

1) El producto, factor P en 5 niveles: ausencia/composición n.º 2/fracción insoluble de la composición n.º 2/fracción líquida de la composición n.º 2 (sin el sustrato de fermentación)/composición enzimática inactiva por autoclave. La fracción líquida de la composición n.º 2 corresponde a las enzimas extraídas en una fase acuosa del resto de la composición n.º 2.

2) El inóculo, factor R en 3 niveles: adaptado a una dieta a base de ensilado de maíz/ensilado de hierba/heno dátilo y recibiendo la misma dieta en tubos de cultivo.

La composición enzimática según la invención n.º 2 se introduce con la ración a un nivel de 10 g por kg de ración de MS.

El plan experimental se organiza en 2 periodos de 2 días consecutivos para cada inóculo. Los inóculos se muestrean en OAR que no reciben la composición enzimática (nivel 0 del factor de producto en el plan experimental en OAR) después del período de equilibrio. Dos tubos de cultivo se inician por tratamiento (Producto x combinación de inóculo) y por día de incubación.

Las mediciones y muestreos realizados durante las pruebas son:

- El inóculo para determinar su composición VFA
- El medio de cultivo después de 24 h de incubación para los tubos, para determinar la composición de AGV.
- Gas para la medición de la cantidad producida después de 24 h de incubación y la determinación de su composición.

Los siguientes análisis se llevan a cabo en los muestreos:

- VFA (cromatografía) en los ensilajes, efluentes y contenido del fermentador
- Gas (cromatografía)

Un análisis estadístico se realizó con un modelo de análisis de varianza.

Este análisis muestra el efecto beneficioso de la composición enzimática según la invención sobre el metabolismo de los microbios del rumen, en comparación con el efecto de las enzimas aisladas del sustrato de fermentación en este metabolismo.

Ejemplo 8: Producción de una composición enzimática según la invención por fermentación en estado sólido

En este ejemplo se describe un método para la obtención de la composición enzimática según la invención por fermentación en estado sólido de un sustrato que consiste en una mezcla de torta de semilla de colza y salvado de trigo (sustrato principal) y de torta de germen de maíz (sustrato adicional) en presencia de una cepa de *Aspergillus tubingensis*.

Se forma un medio nutritivo con una mezcla de torta de semilla de colza con una harina de salvado de trigo y completada con una torta de germen de maíz, en la siguiente proporción de peso: 36% de torta de semilla de colza, 36% de salvado de trigo y 28% de torta de germen de maíz. Después la mezcla es pre-humidificada a 60% de materia seca y puesta en autoclave durante 35 min a 105 °C. Después de enfriar, el medio se inocula con una solución de esporas de *Aspergillus tubingensis*, a fin de obtener una concentración de 1×10^7 esporas por gramo de materia seca y una humedad inicial de 45%. El pH se ajusta a 4,9 por adición de ácido sulfúrico. El medio de cultivo obtenido de este modo se distribuye en viales de Erlenmeyer en una cantidad de 10 g de materia seca por vial. Los viales Erlenmeyer se incuban a 33 °C en condiciones aeróbicas, en la oscuridad durante 72 h sin agitación. El cultivo se detiene al producirse las primeras esporas en el medio de cultivo (ya que la presencia de esporas puede molestar a los animales durante la ingestión debido a su volatilidad, los productos fermentados están diseñados de manera que contenga tan poco como sea posible de éstas).

La mezcla obtenida al final de la fermentación se puede secar y se utiliza como tal en la alimentación de los animales o se extrae en agua a fin de que sea añadida en forma líquida.

Las características de la composición obtenida de este modo después de 72 h de fermentación son: 2650 AXC/g, 4808 BGU/g y 1050 CMC/g.

REIVINDICACIONES

1. Una composición enzimática que comprende un sustrato principal, seleccionado del grupo que consiste en trigo, salvado de trigo, torta de semilla de colza, una mezcla de trigo y salvado de trigo, una mezcla de trigo y torta de semilla de colza, una mezcla de salvado de trigo y torta de semilla de colza, y una mezcla de trigo, salvado de trigo y torta de semilla de colza, fermentado con una cepa de *Aspergillus* sección *Nigri*, CARACTERIZADA porque dicha composición enzimática presenta:

(i) una actividad de xilanasa igual o mayor a 500 AXC por gramo de composición,

(ii) una actividad β -glucanasa igual o mayor a 500 BGU por gramo de composición, y

(iii) una actividad de celulasa igual o mayor a 50 CMC por gramo de composición.

2. La composición enzimática según la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la cepa de *Aspergillus* sección *Nigri* es una cepa del clado *Aspergillus niger*.

3. La composición enzimática según la reivindicación 1 o 2, CARACTERIZADA porque la cepa de *Aspergillus* sección *Nigri* es una cepa del sub-clado *Aspergillus tubingensis*.

4. La composición enzimática de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, CARACTERIZADA porque la cepa de *Aspergillus* sección *Nigri* es una cepa de *Aspergillus tubingensis* o *Aspergillus neoniger*.

5. La composición enzimática de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, CARACTERIZADA porque la cepa de *Aspergillus* sección *Nigri* es una cepa de *Aspergillus tubingensis*.

6. La composición enzimática de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, CARACTERIZADA porque el sustrato se fermenta con la cepa de *Aspergillus* sección *Nigri* por fermentación en estado sólido.

7. La composición enzimática de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, CARACTERIZADA porque el sustrato consiste en una mezcla de salvado de trigo y torta de semilla de colza.

8. La composición enzimática según la reivindicación 7, CARACTERIZADA porque el salvado de trigo y la torta de semilla de colza están en proporciones de masa que van desde 20/80 a 50/50.

9. La composición enzimática de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, CARACTERIZADA porque presenta:

(i) una actividad de xilanasas igual o mayor a 1000 AXU por gramo de composición,

(ii) una actividad β -glucanasa igual o mayor a 800 BGU por gramo de composición, y

(iii) una actividad de celulasa igual o mayor a 120 CMC por gramo de composición.

10. Un método para la fabricación de una composición enzimática según la reivindicación 3, CARACTERIZADO porque comprende una etapa de fermentación en estado sólido de un sustrato principal, seleccionado del grupo que consiste en trigo, salvado de trigo, torta de semilla de colza, una mezcla de trigo y salvado de trigo, una mezcla de trigo y torta de colza, una mezcla de salvado de trigo y torta de colza, y una mezcla de trigo, salvado de trigo y torta de colza, con una cepa del sub-clado *A. tubingensis*, al menos hasta que el producto de fermentación presente los siguientes valores mínimos de la actividad enzimática:

(i) una actividad de xilanasas igual o mayor a 500 AXU por gramo de composición,

(ii) una actividad β -glucanasa igual o mayor a 500 BGU por gramo de composición, y

(iii) una actividad de celulasa igual o mayor a 50 CMC por gramo de composición.

11. El método de fabricación de acuerdo con la reivindicación 10, CARACTERIZADO porque la cepa del sub-clado *Aspergillus tubingensis* es una cepa de *Aspergillus tubingensis* o de *Aspergillus niger*.

12. El método de fabricación de acuerdo con la reivindicación 11, CARACTERIZADO porque la cepa del sub-clado *Aspergillus tubingensis* es una cepa de *Aspergillus tubingensis*.

13. Un aditivo para la alimentación de los rumiantes, CARACTERIZADO porque comprende la composición enzimática de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

14. Uso del aditivo según la reivindicación 13, CARACTERIZADO porque es como ingrediente de composiciones de pienso o de premezclas para pienso de rumiantes.

15. Una premezcla para pienso de rumiantes, CARACTERIZADA porque comprende un aditivo según la reivindicación 13.

16. Una composición de pienso para rumiantes, CARACTERIZADA porque comprende una cantidad eficaz de un aditivo complementado según la reivindicación 13 o de una premezcla según la reivindicación 15 en asociación con piensos adecuados para los rumiantes.

17. Un método para la fabricación de una composición de pienso suplementado para rumiantes, CARACTERIZADO porque comprende la mezcla de un aditivo según la reivindicación 13 o una premezcla según la reivindicación 15 con piensos adecuados para rumiantes.

18. Uso de una composición enzimática según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, de un aditivo según la reivindicación 13, de una premezcla según la reivindicación 15 o de una composición de pienso según la reivindicación 16, CARACTERIZADO porque es para mejorar los resultados zootécnicos de un rumiante .

19. El uso de acuerdo con la reivindicación 18, CARACTERIZADO porque es para aumentar la producción de leche, mejorar el índice de consumo y/o la eficiencia de alimentos, promover el aumento de peso y/o el aumento de la actividad de rumia, aumentar la digestibilidad de los piensos y concentrados y/o reducir la producción de metano.

20. Un método para mejorar los resultados zootécnicos de un rumiante, CARACTERIZADO porque se hace ingerir al rumiante, una cantidad eficaz de la composición enzimática de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, del aditivo según la reivindicación 13, de la premezcla según la reivindicación 15 o de la composición de pienso según la reivindicación 16.

RESUMEN

Uso de una composición enzimática en pienso de rumiantes

La presente invención se refiere a una composición enzimática que comprende un sustrato principal, seleccionado del grupo que consiste en trigo, salvado de trigo, torta de semilla de colza y una mezcla de éstos, fermentado con una cepa de *Aspergillus* sección *Nigri*, dicha composición enzimática tiene: (i) una xilanasa actividad igual o mayor a 500 AXC por gramo de composición, (ii) una actividad β -glucanasa de igual o mayor a 500 BGU por gramo de composición y (iii) una actividad de celulasa igual o mayor a 50 CMC por gramo de la composición; así como a su uso en la alimentación de rumiantes.

Figura: ninguno

TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS PCT/EP2015/051621

ADVANCE E-MAIL

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT

(règle 92bis.1 et instruction administrative 422 du PCT)

Destinataire :

BLOT, Philippe
Lavoix
2, place d'Estienne d'Orves
75009 Paris
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 24 juin 2016 (24.06.2016)	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire BET15P0195ST	NOTIFICATION IMPORTANTE
Demande internationale n° PCT/EP2015/051621	Date du dépôt international (jour/mois/année) 27 janvier 2015 (27.01.2015)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne :	
☐ le déposant ☒ l'inventeur ☐ le mandataire ☐ le représentant commun	
Nom et adresse DELORD, Benoît 11 rue des Préaux F-89140 Courlon Sur Yonne FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) Domicile (nom de l'Etat)
	n° de téléphone
	n° de télécopieur
	Address électronique
2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne :	
☐ la personne ☐ le nom ☒ l'adresse ☐ la nationalité ☐ le domicile	
Nom et adresse DELORD, Benoît 17, avenue de Royat 63122 Ceyrat FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) Domicile (nom de l'Etat)
	n° de téléphone
	n° de télécopieur
	Address électronique ☐ Autorisation de recourir au courrier électronique
3. Observations complémentaires, le cas échéant :	
4. Une copie de cette notification a été envoyée	
☒ à l'office récepteur	☐ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international
☒ à l'administration chargée de la recherche internationale	☒ aux offices désignés concernés
☐ [à l'] [aux] administration(s) indiquée(s) pour la recherche supplémentaire	☐ aux offices élus concernés
	☐ autre destinataire :

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse n° de télécopieur +41 22 338 89 75	Fonctionnaire autorisé Ulhaq Faizan e-mail pt05.pct@wipo.int n° de téléphone +41 22 338 74 05
--	--

TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS PCT/EP2015/051621

ADVANCE E-MAIL

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT

(règle 92bis.1 et instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire :

BLOT, Philippe
Lavoix
2, place d'Estienne d'Orves
75009 Paris
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 24 juin 2016 (24.06.2016)	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire BET15P0195ST	NOTIFICATION IMPORTANTE
Demande internationale n° PCT/EP2015/051621	Date du dépôt international (jour/mois/année) 27 janvier 2015 (27.01.2015)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne :	
☐ le déposant ☒ l'inventeur ☐ le mandataire ☐ le représentant commun	
Nom et adresse TOURNAT, Mathieu 6 rue Flore Thibault F-10150 Sainte-maure FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat)
	Domicile (nom de l'Etat)
	n° de téléphone
	n° de télécopieur
Address électronique	
2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne :	
☐ la personne ☐ le nom ☒ l'adresse ☐ la nationalité ☐ le domicile	
Nom et adresse TOURNAT, Mathieu 40, rue Lancelot du Lac 56000 Vannes FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat)
	Domicile (nom de l'Etat)
	n° de téléphone
	n° de télécopieur
Address électronique ☐ Autorisation de recourir au courrier électronique	
3. Observations complémentaires, le cas échéant :	
4. Une copie de cette notification a été envoyée	
☒ à l'office récepteur	☐ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international
☒ à l'administration chargée de la recherche internationale	☒ aux offices désignés concernés
☐ [à l'] [aux] administration(s) indiquée(s) pour la recherche supplémentaire	☒ aux offices élus concernés
	☐ autre destinataire :

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé Ulhaq Faizan
n° de télécopieur +41 22 338 89 75	e-mail pt05.pct@wipo.int
	n° de téléphone +41 22 338 74 05

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

137201

61



RECIBO DE CAJA

No. 16 - 0035260

Bogotá D.C., Abril 13 de 2016 - 15:48:24

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	735906253	13/04/2016	24.290.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	80.000.00	80.000.00
			\$80.000.00

=====

SON: **OCHENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

Superintendencia de Industria y Comercio



Radicado: NC2016/0000439 **Folios :** 0
Dependencia: 2020 **Fecha:** 2016-07-28 16:
Tipo aplicación: Solicitud PCT

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Abril 13 de 2016 - 15:48:35

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

137201

62



RECIBO DE CAJA

No. 16 - 0024418

Bogotá D.C., Marzo 11 de 2016 - 10:49:03

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	758599063	10/03/2016	55.796.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
10 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	40.000.00	400.000.00
			\$400.000.00

SON: **CUATROCIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

Superintendencia de Industria y Comercio



Radicado: NC2016/0000439 Folios : 0
Dependencia: 2020 Fecha: 2016-07-28 16:00
Tipo aplicación: Solicitud PCT

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 11 de 2016 - 10:49:11

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

63

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

Superintendencia de Industria y Comer



PI02-F08 (2009-11-18)

Radicado: NC2016/0000439

Folios: 63

Dependencia: 2020 Fecha: 2016-07-28 16:2

Tipo aplicación: Solicitud PCT