

PROCESO PARA ELABORAR ENSILAJES TROPICALES ENRIQUECIDOS CON LA BACTERIA ACIDO LÁCTICA EPIFÍTICA *Lactobacillus plantarum* RGM 2503.

DESCRIPCIÓN

5 SECTOR TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un proceso de elaboración de ensilajes tropicales enriquecidos con bacterias ácido lácticas epifíticas específicamente la cepa *Lactobacillus plantarum* denominada LBB1 y depositada en la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos (CChRGM) con número de depósito RGM 2503.

10

OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención se puede incluir en el sector de conservación de forraje verde. En particular, la presente invención tiene por objetivo proponer un proceso que permita, partiendo de especies vegetales tropicales, mediante el uso de *Lactobacillus plantarum* previamente aislada e identificada, obtener ensilajes que favorezcan la ganancia de peso de los animales.

15

La presente invención tiene como objetivo proponer un proceso adecuado de ensilar forrajes verdes tropicales, con el uso de aditivos biológicos como las bacterias ácido lácticas epifíticas (BALE) aisladas de las condiciones del trópico colombiano, del género *Lactobacillus plantarum* RGM 2503, con el fin de garantizar su preservación en condiciones adecuadas, por más tiempo, evitar el deterioro aeróbico, estabilizar rápidamente el pH y mantener su calidad nutricional, para garantizar la ganancia de peso de los animales, como es el caso de los ovejoes.

20

25

ESTADO DE LA TÉCNICA

La conservación de forrajes tropicales en forma de ensilajes se considera como una estrategia para tratar de mitigar los efectos negativos de la escasez de forrajes que normalmente se observan en los sistemas de producción agropecuaria en la época seca. En condiciones tropicales, la diversidad vegetal existente por condiciones naturales presenta una alta capacidad buffer que, bajo las condiciones agroecológicas del trópico, no logra estabilizarse en las condiciones anaeróbicas que se requiere rápidamente al interior del ensilaje, acelerando el deterioro aeróbico, la proteólisis y generando pérdidas de calidad nutricional. La proteólisis del forraje cosechado es

30

35

causada por una fermentación que no cumple con las características de anaerobiosis y baja ostensiblemente la calidad nutricional.

Las investigaciones en el mundo buscan aditivos biológicos que ayuden a obtener fermentaciones que garantice la calidad y cantidad del producto final alargando la duración y estabilidad del mismo conservando óptimas condiciones anaeróbicas. Dentro del uso de aditivos biológicos se encuentran las bacterias ácido lácticas y las enzimas. La mayoría de las bacterias ácido lácticas que se encuentran de manera comercial en los países tropicales han sido aisladas países donde se encuentran. las cuatro estaciones. Estas bacterias se han aplicado y evaluado mayoritariamente en forrajes de zonas templadas, esto difiere en gran medida de las condiciones tropicales, es por esto casi la totalidad de los productos que se emplean en estas zonas como aditivos biológicos para la elaboración de ensilajes no entregan productos con elevadas características nutricionales ni estables en el tiempo debido a que las condiciones de la fermentación no evitan la proliferación de microorganismos indeseables que afectan la calidad del ensilaje.

Es por esto, que la mayoría de los productos comerciales, que se emplean como aditivos provienen de otros países, no se han. probado con los forrajes. tropicales y no logran tener una efectividad tal, por las características del producto y la variabilidad en la dosificación del mismo, esto hace que los forrajes ensilados, no cumplan con los parámetros de fermentación y las adecuadas características nutricionales, que favorezca la preservación del forraje sin presentación del deterioro aeróbico que daña el ensilaje.

Hasta el momento se han propuesto algunos métodos de conservación de forraje verde, en general se describe el uso de especies vegetales específicas las cuales presentan retos diferentes a las especies tropicales. En el documento US4528199 se describe un método para la producción de ensilaje a partir de un sustrato de forraje fermentable mediante la adición y mezcla de bacterias *Lactobacillus plantarum* 2B con el sustrato fermentable. La bacteria se añade en una cantidad eficaz para reducir el pH al cual el forraje fermentado se estabiliza hasta que este se encuentra prácticamente libre de bacterias productoras de ácido butírico. En este documento no se describen las etapas para obtener el ensilaje no revela las variedades de forraje utilizado.

También se encuentra el documento US2011142991 el cual describe un método para tratar el ensilaje de pienso para rumiantes, mediante el cual el ensilaje se mezcla con un microorganismo y la mezcla de ensilado de alimentación y el microorganismo se almacena en un recipiente cerrado durante al menos 30 días, el pienso ensilado se mezcla con al menos dos microorganismos seleccionados del grupo que consiste en *Enterococcus faecium* (DSM 3530), *Lactobacillus brevis* (DSM 19456), *Lactobacillus plantarum* (DSM 19457), *Lactobacillus kefir* (DSM 19455), *Trichosporon spec. nov.* (DSM 14153), *Trichosporon mucoides* (DSM 14156), *Trichosporon dulcitum* (DSM 14162) y *Eubacterium* (DSM 11798). Como se comentó anteriormente las características particulares del forraje tropical impiden el uso de cualquier tipo de bacteria, que por su poca adaptación a los forrajes tropicales pueda generar ambientes propicios para bacterias no deseables que afecten la calidad nutritiva del ensilaje, poniendo en riesgo la productividad e incluso la vida del animal.

Debido a estas limitaciones en las tecnologías existentes es importante establecer un procedimiento adecuado para ensilar especies forrajeras tropicales, que permita obtener ensilajes de alta calidad nutricional para el ganado.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención describe un proceso para elaborar ensilajes tropicales enriquecidos con bacterias ácido lácticas epifíticas a partir de la mezcla de forrajes tropicales compuesto de sorgo dulce forrajero (*Sorghum bicolor* L. (Moench) variedad. Corpoica JJT18) y soya forrajera (*Glycine max* variedad Panorama 29), caracterizado porque comprende las etapas de cosecha y procesamiento del forraje, inoculado del forraje procesado con *Lactobacillus plantarum* RGM 2503, elaboración del ensilaje, fermentación anaeróbica del ensilaje y finalmente el ensilaje se oferta a los animales.

En otra realización de la invención, se refiere a que la composición del forraje tropical descrito anteriormente está compuesta por una mezcla de 65% a un 70% de sorgo dulce forrajero y un 30% a 35 % de soya.

En otra realización de la invención, se refiere a que el procesamiento de del forraje comprende las etapas de pre-secado del forraje para elaborar el ensilaje tropical hasta obtener un material con un mínimo de 30% de materia seca y una posterior molienda de

la mezcla sorgo dulce forrajero y soya hasta un tamaño de partícula que esta entre 1 cm a 3 cm.

En otra realización de la invención la inoculación con la bacteria acido láctica epifítica *Lactobacillus. plantarum* RGM 2503 se adiciona en forma de caldo el cual es previamente preparado y homogenizado, a razón de 1 a 3.5×10^5 UFC/g.

En otra realización de la invención, la elaboración del ensilado descrita anteriormente comprende los pasos de introducir el forraje previamente inoculado con el caldo en las bolsas de ensilaje, las cuales posteriormente compactan el material, finalmente estas bolsas se les extrae la mayor cantidad de aire con el fin de generar vacío, en la bolsa de ensilaje y prepara el producto para la posterior etapa de fermentación y estabilización.

En otra realización de la invención, la elaboración del ensilado donde la fermentación del ensilado se lleva a cabo en condiciones anaerobias y la cinética del pH es la siguiente:

Ensilaje	pH día 0	pH día 3	pH día 90
Ensilaje Sorgo/ soya+ <i>Lactobacillus plantarum</i> RGM	5.3-5.7	4.0-4.49	4.0-4.36
Ensilaje Sorgo /soya+ Sil-all® 4x4	5.0-5.41	4.3-4.84	4.1-4.54
Ensilaje Sorgo /soya Control (Sin aditivo)	5.3-5.7	4.4-4.83	4.0-4.48

Tabla 1 cinética de pH de diversos ensilajes

En la tabla 1 se puede apreciar la estabilidad del pH en la mezcla a la cual se le adicionó *Lactobacillus plantarum* RGM 2503, para los ensilajes es deseable que el pH baje lo más rápido posible durante los tres primeros días, con el fin de evitar la proteólisis, garantizar la colonización de las bacterias acido lácticas, formación de ácido láctico e inhibir el crecimiento de los microorganismos indeseables. La bacteria adicionada (*Lactobacillus plantarum* RGM 2503) logró aprovechar de manera eficiente los carbohidratos solubles presentes en el forraje, para transformarlos en ácido láctico y así

lograr que el pH pudiera disminuir a una condición rápida en el menor tiempo, pudiendo llegar al rango deseable de 4.0 a 4.2, este rango de pH limita la proteólisis (como se ve evidencia en la tabla 2 con valor del nitrógeno amoniacal), inactiva las proteasas vegetales y limita el crecimiento de los microorganismos indeseables. Es importante resaltar que el nivel de pH deseable no fue alcanzado en los otros tratamientos.

En otra realización de la invención, la etapa de estabilización del ensilaje se lleva a temperatura ambiente y se deja en fermentación por un período de 90 días. El almacenamiento del ensilaje se realiza a temperatura 20 a 30 °C y por un periodo de entre 60 a 90 días.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por la inventora, que pone de manifiesto la efectividad del procedimiento descrito en la presente invención.

El valor nutricional de los ensilajes obtenidos por efecto de los aditivos biológicos y la emisión de metano se presenta a continuación:

Aditivo	Materia Seca MS (%)	Digestibilidad In vitro materia seca DIVMS (%)	Proteína Cruda PC (%)	Fibra en detergente Neutro FDN (%)	Nitrógeno amoniacal como % N total	Emisión de metano (mL/d)*
Ensilaje Sorgo/soya + Control (sin aditivo)	30.6	69.7	10.5	51.4	0.125	5.23
Ensilaje Sorgo/soya + BALE RGM 2503	33.5	70.4	10.8	51.0	0.068	5.31
Ensilaje Sorgo/soya + Sil-all®4x4	32.2	70.2	10.6	52.4	0.101	6.57

Tabla 2 valores nutricionales de ensilajes (expresados como porcentaje de la materia seca) y emisión de metano (mL/d)

*Emisión de metano obtenida en el Sistema *in vitro* de Simulación Ruminal (Rusitec).

De la tabla 2 se puede evidenciar que todos parámetros nutricionales son superiores a las tecnologías existentes disponibles actualmente en el mercado, la adición del caldo inoculado con la BALE RGM 2503 al forraje y el proceso de obtención del ensilaje revelado en este documento generan un producto final (ensilaje) con características nutricionales mejoradas. Se resalta que la adición de la BALE RGM 2503 es quién limita principalmente la proteólisis, al tener el más bajo nivel de nitrógeno amoniacal, lo cual evidencia la conservación adecuada del ensilaje, favoreciendo su calidad nutricional.

En la misma tabla 2, se puede observar que la emisión de metano se vio aumentada por el tipo de aditivo, siendo más alta con la adición del Sil-all@4x4 (compuesto por cuatro microorganismos comerciales: tres bacterias ácido lácticas comerciales (*Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici* y *Lactobacillus salivarius*) y *Enterococcus faecium*, además, de cuatro enzimas: amilasa, hemicelulasa, celulasa y xilanas) como producto comercial, dado que el sustrato (mezcla de forrajes) era el mismo, mientras que el inóculo con la BALE RGM 2503 reduce considerablemente la emisión, como una opción favorable para mitigar el cambio climático y ayudar en la reducción de dichas emisiones derivadas de las actividades ganaderas, cuando se ofrece en la alimentación animal como una alternativa ambientalmente sostenible.

Posteriormente el ensilaje suministrado con los inóculos de las bacterias ácido lácticas epifíticas fue evaluado por un período de 5 meses (147 días) en ovinos, para evaluar la ganancia de peso:

Ensilaje	Peso inicial (kg)	Peso final (kg)	Ganancia de peso (g/animal/d)
Ensilaje Sorgo /soya Control (Sin aditivo)	10,6-14,6	18,15-22,15	51,36
Ensilaje Sorgo /soya+ BALE RGM 2503	10,13-14,13	19,19-27,17	61,63
Ensilaje Sorgo /soya+ Sil-all@4x4	10,95-14,95	19,16-23,60	55,85
Animales sin suministro de	9,45-13,11	15,89-19,89	43,8

Tabla 3. Resultados de ganancia de peso (g/animal/d) en ovinos (diversos ensilajes)

Finalmente se puede apreciar en la tabla 3 que el ensilaje inoculado con BALE RGM 2503 contribuye en mayor medida a la ganancia de peso en ovinos alimentados por un periodo de 147 días. Esta es una ventaja fundamental de la presente invención porque permite tener un alimento de buena calidad nutritiva aprovechando de mejor manera el forraje disponible para producir el ensilaje y con más bajas emisiones de gas metano.

A continuación, se muestra un esquema del proceso que se utiliza para obtener

