

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 910 051**

51 Int. Cl.:

A23K 10/00 (2006.01)

A23K 10/10 (2006.01)

A23K 10/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2018 PCT/IB2018/057096**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2019 WO19102279**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2018 E 18793460 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.02.2022 EP 3713423**

54 Título: **Procedimiento para la producción de un aditivo multiplicador y modulador de la microbiota ruminal**

30 Prioridad:

23.11.2017 UY 37492

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

11.05.2022

73 Titular/es:

**BIOPREMIX TECHNOLOGIES LLC (100.0%)
1013 Centre Road Suite 403-A
Wilmington, Delaware 19805, US**

72 Inventor/es:

PATERNÓ, MARCELO ALEJANDRO

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 910 051 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de un aditivo multiplicador y modulador de la microbiota ruminal

5 **Campo de la invención**

La presente invención refiere al campo de la alimentación de animales rumiantes, más específicamente refiere a un aditivo multiplicador y modulador de la microbiota ruminal creado a partir de compuestos multienzimáticos exógenos, integrando procesos y dispositivos para cultivar y cosechar biomasa de especies fúngicas seleccionadas, ensamblar componentes activos de origen fúngico y por mezcla de insumos según especificaciones, conformando así un aditivo multiplicador y modulador de la microbiota ruminal adecuado para su aplicación (como parte de alimentos o vía dispositivos de distribución como suplemento nutricional) en la industria de alimentación de animales rumiantes.

15 **Antecedentes**

Los animales rumiantes, más comúnmente llamados poligástricos (bovinos, caprinos, ovinos, camélidos, cérvidos, etc.) tienen la capacidad de digerir la celulosa y hemicelulosa y ciertos componentes lignificados de la biomasa vegetal terrestre, pastos, pasturas naturales, implantadas, hojas, residuos vegetales en general, residuos lignocelulósicos y sus derivados etc., que las especies mono-gástricas (caninos, cerdos, aves, conejos, etc.) no están capacitadas para hacerlo. Por ello los rumiantes producen proteínas de alta calidad como la leche y la carne, a partir de estos compuestos presentes en la citada biomasa.

El problema a resolver es el aumento significativo y sostenible de la producción de carne y leche en todo el mundo y su consiguiente aumento de costos cuando las raciones destinadas a alimentación de animales son adicionadas con materias primas de alto costo, lo que desemboca en la mayoría de los casos en ecuaciones productivas anti-económicas. Consecuentemente, estudios realizados demuestran que la utilización en diferentes sistemas de alimentación para animales de forrajes con alto contenido de fibra y residuos lignocelulósicos combinados con la aplicación del aditivo multiplicador de la presente invención, permiten lograr un ahorro de casi el 40% de los costos de alimentación, transformando actividades productivas de carne y leche que de otra forma serían inviables, a esquemas productivos altamente rentables y mucho más amigables con el ambiente y de mucho menor impacto ambiental.

Una gran cantidad de detalles evolutivos explican las diferencias acumuladas en casi 20 millones de años de co-adaptación del animal hospedador (el rumiante) con especies de microorganismos integrantes de la flora microbiana o microbioma contenido en el rumen que lo nutre, donde estas especies se vinculan a través de uno de los tantos "comensalismos" que integran la vasta diversidad microbiológica que existe en la naturaleza. La presente invención se enfoca en un procedimiento para producir en forma consistente un aditivo nutricional con la capacidad de desarrollar un "atajo funcional" en el vínculo entre estas especies, multiplicando la efectividad del microbioma para degradar la fracción fibrosa del alimento suministrado al animal, y modular el balance entre los componentes con efecto prebiótico y probiótico que se incluyen en dichos alimentos.

Existen amplios antecedentes sobre la aplicación de aditivos en la nutrición de rumiantes, procurando mejorar la conversión y utilización de diferentes tipos de nutrientes y reducir problemas asociados al uso de biomasa de bajo valor nutritivo, como por ejemplo los indicados en las siguientes publicaciones:

Aasha ReKha, Rama Prasad and Ramana: Evaluations of Groundnut Haulms supplemented whit yeast culture (INDIAN JOURNAL OF ANIMAL NUTRITION 22-3).

Balci F., Dikmen, Orman, Turkmen 2007: The Effect of fibrolytic exogenous enzyme on fattening performance of steers (BULGARIAN JOURNAL VETERINARY MEDICINE).

Colombato D. Mould FL, Bhat, Morgavi and Owen 2003 – Influence of fibrolytic enzymes on the hydrolysis and fermentations of pure cellulose and xylan by mixed ruminal microorganisms in vitro. JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE 81: 1040-1050. US 2013/011384 A1 revela el uso de un material, producido a partir de la fermentación de hongos, como un suplemente alimenticio. WO 2012/147044 A1 revela un método para reducir la producción de metano en un animal rumiante. CN 104 60 51 62 A revela divulga el uso de aspergillus oryzae como aditivo alimentario para el ganado vacuno e inhibidor del metano en las heces. US 2005/0163823 A1 divulga un método y composición para reducir la excreción de fosforo rumiante.

El aditivo multiplicador y modulador de la microbiota ruminal a partir de compuestos multienzimáticos exógenos de la presente invención, tiene la capacidad de incrementar la degradación de la celulosa, hemicelulosa y ciertos componentes lignificados de la dieta animal, logrando un aumento de la productividad en leche y carne de especies rumiantes poligástricas, por un incremental directo en la eficiencia de metabolización de celulosas, hemicelulosas y ligninas. No es una tecnología aplicable a otras especies como las monogástricas.

Los análisis biométricos realizados han generado resultados positivos que confirman el significativo aumento de peso y producción de leche en animales rumiantes, bajo diferentes condiciones productivas. Se constata también un aumento significativo de todos los guarismos productivos, como mejoramiento de estados corporales en rodeos y

datos de cría, peso al destete, índices de preñez y demás patrones productivos mensurables en diferentes aplicaciones, tanto en rodeos de cría como alimentaciones intensivas multi-especies.

El aditivo multiplicador y modulador de la microbiota ruminal a partir de compuestos multienzimáticos exógenos de la presente invención permite utilizar cantidades superiores de fibra en los sistemas productivos a confinamiento o a campo abierto con y sin suplementación de balanceados o granos convencionales. Durante años se ha observado que en el estiércol de los animales hay abundante materia orgánica fermentable, lo que evidencia la ineficiencia en los procesos ruminales ante los sistemas semi-intensivos o intensivos existentes utilizando altos contenidos de concentrados.

Mediante el aditivo de la presente invención, se provee una solución que aumenta la eficiencia del uso de los forrajes fibrosos, o de residuos celulósicos, que aumenta la productividad de carne o leche sin el agregado de cereales y proteínas de origen vegetal de alto costo que compiten con el consumo humano directamente, permitiendo, reducir los costos de alimentación.

Asimismo, la demanda creciente de alimentos para el consumo humano va en franco aumento, (aumento de la producción de cerdos, aves para carne, aves para huevos), también está en aumento la producción de los derivados de almidones y azúcares del maíz para la fabricación de aditivos para la alimentación humana directa, a lo que tenemos que adicionar la fabricación de bio-etanol a partir del maíz también de consumo humano.

El aditivo multiplicador y modulador de la microbiota ruminal a partir de compuestos multienzimáticos exógenos de la presente invención, representa una tecnología sustentable, permitiendo que los animales rumiantes poligástricos no sean competidores del ser humano por el uso de cereales y derivados de la soja, lo que contribuye a una menor contaminación del ambiente estimándose una reducción significativa en la emisión de metano entérico a la atmosfera (-28%).

La utilización del aditivo aquí descrito aplicado a los feed lots industriales, reduce la utilización de maíz (o almidones en general) y proteínas de origen vegetal a menos de la mitad, aumentando los niveles de fibra, logrando los mismos resultados, y produciendo un 70 % menos de impacto en el ambiente, dicho aditivo aumenta la eficiencia del uso de compuestos celulósicos (forrajes, descartes celulósicos etc.) aumentando la tasa de rendimiento microbiano del rumen. Ya en las primeras pruebas y tests comparativos, se observó tanto en laboratorio (mediciones in-vitro), como en investigación aplicada a campo (mediciones in-vivo), con animales fistulados, una mejora en la tasa de digestión y aumento de la productividad.

La tasa de rendimiento microbiano aumento 5,33 veces respecto al control, esto es porque en mediciones realizadas sobre sustrato celulósico, con el agregado del aditivo de la presente invención, a la misma dieta control, se constató que el caudal de glucosa y sacarosa fue 5,33 veces más que el control en el mismo tiempo de degradación. Se logró con esto mayor rendimiento microbiano que con la dieta control.

La Tabla 1 muestra la diferencia que hay entre un Rendimiento Microbiano Normal (RMN) vs RMN sumado al efecto del aditivo objeto de la presente invención, considerando su diferencial de tasa de digestión sin el agregado de almidones o proteínas a la dieta.

Tabla 1.

Población bacteriana (sin aditivo)	Población bacteriana (con aditivo multiplicador y modulador de la microbiota ruminal)
Rendimiento microbiano natural (RMN) sobre fracción celulósica (perilla de algodón): 50 % de la dieta	RMN + aditivo sobre fracción celulósica (perilla de algodón): 50 % de la dieta
Cada 100.000 unidades formadoras de colonia (ufc)	Cada 100.000 unidades formadoras de colonia (ufc)
Tasa de digestión: 105 % / h1	Tasa de digestión: 560 % / h1

El 95% del microbioma ruminal asociado con el Rendimiento Microbiano Normal (RMN) está compuesto por bacterias que atacan, degradan e hidrolizan tanto la celulosa, hemicelulosa y una fracción de los compuestos lignificados. En estado natural, esa población bacteriana tiene una eficiencia de degradación del alimento suministrado al animal que no sobrepasa el 40% de utilización media, con una performance máxima cercana al 45%.

Como consecuencia, utilizando el aditivo de la presente invención se logra pasar de una performance del 45 % de eficiencia anteriormente mencionado, a valores cercanos al 88 %. El 5 % restante de ese universo ruminal, está constituido por una población de hongos en un 4% y un 1% de protozoarios.

El procedimiento de la presente invención incluye la producción de un componente activo multienzimático de origen fúngico (denominado en adelante como Componente Activo 1: C.A. 1) como parte del proceso de formulación del

aditivo multiplicador y modulador de la microbiota ruminal. La modulación del proceso de digestión de residuos celulósicos o forrajes con alto contenido fibroso es un paso fundamental para el funcionamiento de dicho aditivo, ya que sin la incorporación de una mezcla definida de insumos con efecto modulador (denominada en adelante como Componente Activo 2: C.A. 2) no se alcanza el punto de equilibrio buscado en el procesamiento de actividades celulosomáticas dentro del complejo digestivo retículo-ruminal.

Por ello es necesario incorporar en la formulación del aditivo el agregado de los insumos moduladores contenidos en el C.A. 1, para nutrir de manera especial al microbioma ruminal y conferir una tasa de reproducción más rápida, que permita aumentar el rango de valores de eficiencia ruminal hasta lograr una tasa de digestión 560 % superior respecto al valor obtenido mediante el consumo de forrajes o raciones sin aditar.

La actividad moduladora de insumos a ser mezclados (tales como levaduras, vitaminas, minerales, aminoácidos, mono-oligosacáridos) en las proporciones definidas dentro del C.A. 1 potencia los efectos catalizadores asociados con el C.A. 1 (que se obtiene por la aplicación industrial del proceso objeto de esta patente), logrando que el presente aditivo aumente la digestibilidad de las biomásas de baja calidad para alimentación animal.

Breve descripción de la invención

Mediante la implementación del procedimiento objeto de esta patente (producción de aditivo multiplicador y modulador de la microbiota ruminal a partir de compuestos multienzimáticos exógenos) se multiplican especies seleccionadas de hongos (asociadas a la degradación de la celulosa en la madera, descartes y residuos celulósicos o simplemente forrajes en diferentes estados fenológicos de crecimiento) logrando producir en forma sostenida biomasa de origen fúngico conteniendo exo-enzimas para suplementar el rumen con compuestos potenciadores de la microbiota del rumen en cuanto a su capacidad para formar complejos multienzimáticos asociados con la fracción fibrosa del alimento llamados celulosomas o dominios de cohesión entre las poblaciones microbianas presentes en el rumen y los componentes activos contenidos en el aditivo objeto de la presente invención.

La Figura 1 describe la Estructura del celulosoma. La fuente de la Figura 1 es Montoya et al, Acta biol. Colomb. , Vol. 12S, 2007, 55-74. Componentes estructurales y catalíticos, unidos simultáneamente a una célula del microorganismo que lo produce y al sustrato celulósico; dominios funcionales: SLH, homología con la capa S; CH I y CH II, cohesin I y II; DK I y DK II, Dockerin I y II; CBM, módulo de unión a celulosa; GH, Glicosil hidrolasa.

Las especies seleccionadas de hongos, que se recombinan en diferente proporción mediante el procedimiento de producción del aditivo, son cultivadas de manera separada en salas de cultivo y es partir del producto de la fructificación inducida sobre sustratos celulósicos -mediante las condiciones definidas en esta memoria descriptiva- que se obtienen el Componente Activo 1 de este aditivo, al que posteriormente se adicionan cultivo de levaduras, vitaminas, minerales, aminoácidos esenciales y otros excipientes en proporciones definidas (Componente Activo 2) para obtener el producto final (aditivo modulador de la microbiota ruminal), logrando un equilibrio en la nutrición microbiana natural del rumen.

Para determinar la proporción poblacional óptima entre la flora bacteriana ruminal y la composición del aditivo multiplicador y modulador de la presente invención, se realizaron numerosos ensayos utilizando tanto técnicas in-vitro como estudios a campo. Atendiendo a un tamaño bacteriano promedio de 2-5 μm versus 10-15 μm de una espora o resto conidial de un hongo, nos basamos en esta premisa para guardar una proporción en cuanto a la escala de los dominios catalíticos, sitios de cohesión y distribución poblacional. En base a esta premisa, por métodos experimentales se verificó la efectividad de la proporción indicada.

Luego de varios ensayos realizados hemos determinado que la proporción recomendada de componentes asociados en dichos dominios de cohesión ruminales es de 1 parte del aditivo multiplicador y modulador con 10 partes de microbiota bacteriana existente en el rumen. En dichas condiciones, utilizando como indicador un análisis de estiércol se verificó una reducción en la cantidad de materia orgánica fermentable residual (hasta -30% de materia orgánica), lo que indica una mayor digestión, mayor aprovechamiento de la celulosa, y por ende más producción.

En resumen, las ventajas del aditivo producido según el procedimiento objeto de la presente invención son:

a) Reducción de costos en la nutrición de rumiantes obtenidos ante la adición del aditivo multiplicador y modulador de la presente invención, con diversos beneficios vinculados con la reducción de costos a partir de las siguientes premisas:

- El uso de biomasa celulósica de bajo valor económico, no aprovechable por otras especies para la producción de carne y leche.
- El aprovechamiento de estas biomásas celulósicas para que el aditivo multiplicador y modulador promueva el equilibrio de la microbiota ruminal con capacidad para sacarificación de los compuestos celulósicos, hemicelulósicos y compuestos lignificados.
- Generación de energía altamente disponible para las bacterias del rumen para fabricar proteína microbiana.

Los puntos antes mencionados reflejan que el aditivo permite aumentar la proporción de materias primas menos costosas (fracciones de biomasa ricas en fibras), para de esa forma no utilizar concentrados como el maíz y la soja, bajando aún más los costos de manufactura.

5 La Figura 2 (Relación entre proporción de fibra / concentrado (rango viable) en dieta y costo) muestra que a medida que bajan los niveles de concentrados y aumentan los niveles de fibra, bajan los costos de producción. De esta forma es posible reducir los costos por kilogramo de leche o carne producidos con una determinada cantidad de alimento.

10 b) Tecnología verde y amigable con el ambiente:

Los dominios de cohesión (o complejos) que se forman a través de la interacción del aditivo multiplicador y modulador de la presente invención y la microbiota ruminal, logran que los productos finales en el rumen, luego de la degradación de los compuestos lignocelulósicos, sean glucosa y sacarosa, en lugar de celobiosa, produciendo así la
15 sacarificación de compuestos indigestos en condiciones naturales y logrando menor liberación de metano entérico a la atmósfera (valores de reducción en pérdida de energía como metano cercanos al -28 %, respecto al consumo de alimentos fibrosos sin incorporar el aditivo), con la consiguiente favorable mitigación de la contaminación atmosférica.

20 La Tabla 2 muestra el cálculo diferencial de la producción estimada de metano (CH₄) por contraste entre el consumo de dietas con alto concentrado vs. alta fibra vs. alta fibra + aditivo de la presente invención (producido por mezcla de los Componentes Activos 1 y 2, en las proporciones indicadas en el protocolo de formulación que se describe como paso 6 del procedimiento de producción del aditivo multiplicador y modulador de la microbiota ruminal). Siguiendo un modelo de regresión cuadrática, los siguientes componentes se relacionaron a través de la expresión:

25

$$Y = 1,62 \times 1 - 0,38 \times 2 + 3,78 \times 3 + 1,49 \times 4 + 1142$$

Tabla 2. Reducción de metano (CH₄) asociada con consumo del aditivo

			SIN ADITIVO	SIN ADITIVO	CON ADITIVO	
			Alto Conc.	Bajo Conc.	Bajo Conc.	
Constante			85 %	38 %	38 %	
Ko		FIBRA	15 %	62 %	62 %	
	1,62	x1	1	PCD	130,0	120,0 80,0
	0,38	x2	-1	GCD	60,0	80,0 10,0
	3,78	x3	1	FCD	140,0	90,0 63,0
	1,49	x4	1	ELND	1,0	5,0 2,0
	1.142		1		1.142,0	1.142
		VALOR		Y=	1860,49	1653,65 1508,92
					Joules	Joules
		1	Joule =		0,239005	Cal
				Y=	444,67	395,23 360,64
					Cal	Cal
R² = 0,896 (valor máximo explicable por consumo de concentrados altamente digestibles)				R² (valor explicable por consumo)=	0,63	0,45 0,32
DIFERENCIA: 85% CONCENTRADO (Sin Aditivo) vs 38% CONCENTRADO (Sin Aditivo)						29 %
DIFERENCIA: 38% CONCENTRADO (Sin Aditivo) vs 38% CONCENTRADO (Con Aditivo)						28 %

(continuación)

				SIN ADITIVO	SIN ADITIVO	CON ADITIVO	
							49 %
DIFERENCIA: 85% CONCENTRADO (Sin Aditivo) vs 38% CONCENTRADO (Con Aditivo)							
X1	PCD	Proteína Cruda Digestible					
X2	GCD	Grasa Cruda Digestible					
X3	FCD	Fibra Cruda Digestible					
X4	ELND	Extracto Libre Nitrógeno Digestible					

Como se observa en la Tabla 2, se produce una reducción significativa en la pérdida de energía como metano (estimado como Y) cuando el consumo de alimentos fibrosos reemplaza una parte del consumo de alimento concentrado, pero la reducción asociada con el uso del aditivo en este tipo de dietas es aún mayor, alcanzando un -49% respecto a los valores estimados para dietas con alta proporción de alimentos concentrados que no utilicen el aditivo: esto demuestra la utilidad industrial del aditivo tanto para dietas de alta o baja proporción de alimentos concentrados.

Más allá de facilitar la utilización de la fracción fibrosa de biomasa compuesta fundamentalmente por celulosa y hemicelulosa, se ha constatado que la incorporación del aditivo multiplicador y modulador de la presente invención, permite la utilización de una mayor proporción de subproductos con alto contenido lignocelulósicos (tales como cáscara de maní y chips de maderas) con resultados productivos alentadores, posibilitando ampliar las fronteras de la ganadería a zonas marginales para el rumiante. De esta forma, zonas o regiones, en todo el mundo que eran improductivas hasta hoy, podrían aumentar su receptividad y productividad, incorporando el uso del aditivo de la presente invención como parte de diferentes sistemas de preparación y distribución de alimentos fibrosos para animales rumiantes.

Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra la estructura del celulosoma.

La Figura 2 es una gráfica de la relación entre proporción de fibra / concentrado (rango viable) en dieta y costo.

La Figura 3 muestra la distribución de las bandejas en la sala de cultivo.

Breve descripción de las Tablas

Tabla 1: Efecto de asociativismo cooperativo sobre la población bacteriana.

Tabla 2: Reducción de metano (CH₄) asociada con consumo del aditivo

Tabla 3: Esquema del procedimiento para la producción de un aditivo multiplicador y modulador de la microbiota ruminal

Descripción detallada de la invención

Para explicitar mejor el procedimiento para la producción de un aditivo multiplicador y modulador de la microbiota ruminal a partir de compuestos multienzimáticos exógenos, demostrando sus características únicas y novedosas se presenta el siguiente diagrama de flujo y su correspondientes "Lay-out" constructivo y los protocolos de trabajo asociados para la obtención del producto de la presente invención.

La Tabla 3 es un esquema del procedimiento de producción de un aditivo multiplicador y modulador de la microbiota ruminal.

Tabla 3.

Pasos	Descripción	Localización	Producto
1	Multiplicación del banco seleccionado de hongos para la producción del Componente Activo 1 (C.A. 1)	• Laboratorio • Salas de cultivos: se requieren tantas salas de cultivo como la cantidad de especies fúngicas que se utilicen	• Estructuras miceliares para multiplicación en las salas de cultivo. • Insumos para ensamble de C.A. 1 (esporas y cuerpos de fructificación de las especies en cada sala / contenido enzimático (considerado como "Base") asociado con el conjunto de las especies fúngicas seleccionadas
2	Cosecha-dormancia-almacenamiento de cultivos fúngicos	• Bandejas tratadas para la cosecha micelar y enzimática base	• Banco de inoculante fúngico

(continuación)

Pasos	Descripción	Localización	Producto
3	Cultivo de especies y cruzamientos inter-especies (F1) de hongos seleccionados y multiplicados previamente (paso 1)	• Salas de cultivos: ☐ cinco salas diseñadas como las utilizadas en el Paso 1, para cultivar especies seleccionadas, ☐ dos salas aisladas para cultivar los cruzamientos inter-especies incluidos dentro del paso 1	• Insumos para ensamble de C.A. 1 (biomasa fúngica enriquecida de compuestos multienzimáticos exógenos)
4	Ensamble componente activo 1 (C.A.1)	• micromezcladora de acero inoxidable operada en un ambiente cerrado y limpio	• Componente Activo 1 (C.A. 1)
5	Ensamble componente activo 2 (C.A.2)	• micromezcladora de acero inoxidable operada en un ambiente cerrado y limpio	• Componente Activo 2 (C.A. 2)
6	Protocolo de formulación del aditivo multiplicador y modulador de la microbiota ruminal	• mezcladora de 50 kgs de capacidad	• Aditivo multiplicador y modulador de la microbiota ruminal, obtenido mediante procedimiento de producción objeto de esta patente.

PASO 1. Multiplicación del banco seleccionado de hongos para la producción del Componente Activo 1 (C.A. 1)

5 Este es el primer paso de la técnica de obtención de la multiplicación de las especies de hongos y los cruzamientos inter-especies (denominados como F1) que serán las responsables de la producción enzimática a posteriori. Las especies de hongos seleccionadas para validar la implementación del procedimiento descrito en esta patente, de naturaleza preferentemente fibrolítica, con capacidades diferentes para degradar la celulosa, hemicelulosa y lignina, pueden obtenerse de un banco de germoplasma, según especificaciones descritas en esta patente.

Laboratorio:

15 Se coloca el banco de especies a ser cultivadas por separado, en cultivo de placas de Petri sobre sustrato Agar-Agar, y se colocan en estufa a 28 °C hasta que se haya logrado la expansión del micelio en un porcentaje mayor al 90 % de cobertura de la placa de Petri.

20 Se retira la estructura micelar de la placa de Petri para trasladarla a bandejas de multiplicación en las salas de cultivo.

Salas de cultivo:

25 Se requieren tantas salas de cultivo como la cantidad de especies fúngicas que se utilicen para la producción del aditivo multiplicador y modulador objeto de la presente invención.

A los efectos de ilustrar las combinaciones de especies que pueden utilizarse, dentro del diagrama de flujo se presentan las especies fúngicas (ver lista de Especies Fúngicas en el paso 4) utilizadas como referencia para la implementación del procedimiento descrito en la presente memoria descriptiva.

30 Las salas de cultivo están diseñadas en una dimensión de 4 m de ancho por 4 m de largo y una altura máxima de 3 m, con piso de porcelanato antideslizante y revestimiento de paredes tipo Durlock plastificado con sistemas de ventilación controlada de apertura y cierre.

35 Estas salas están dotadas de dispositivos de apertura y cierre controlados por una computadora que regula ventilación de acuerdo con los niveles de lectura que vayan tomando los diferentes sensores ambientales que medirán parámetros de:

- 1-Humedad Relativa
- 2-Temperatura
- 3- Nivel de oxígeno
- 4- Niveles de amoníaco en atmósfera
- 5- Longitud de onda de luz específica para cada sala
- 6-pH (niveles de acidez o alcalinidad)
- 7- Tipo de sustrato

Las especies fúngicas utilizadas para validar el procedimiento de preparación del aditivo multiplicador y modulador de la microbiota ruminal descrito en la presente invención incluyeron 23 especies fibrolíticas con diferentes capacidades de degradar los diferentes tipos y formas de estructura de pared de los vegetales, donde algunas serán más afines a la degradación de celulosa, otras a la hemicelulosa, y otro tanto a los compuestos relacionados a la lignina.

En esta etapa se induce a la fase sexual en dichas especies. Las condiciones ambientales necesarias para alcanzarla son:

- Humedad Relativa: debe estar en el rango de 86% a 95% de HR. Esta condición se logra con el asperjado de manera automática. Los aspersores trabajan con picos aspersores cónicos de gotas ultrafinas de solución de agua pulverizada con una presión de 4,5 kg.
- Temperatura: valores comprendidos entre 23 a 28° C.
- Nivel de oxígeno: La concentración debe estar entre 10 a 15 % O₂, desplazado por nitrógeno amoniacal propio de atmosferas saturadas de escasa ventilación inducida para esta etapa.
- Luz (longitud de onda): radiación electromagnética ultravioleta en una longitud de onda de 400 - 410 nm. Su función es inducir el crecimiento de las fases sexuales de todas la especies fúngicas que se reproducen en cada una de las salas.
- pH: el nivel óptimo para su crecimiento y desarrollo es de un medio ácido con un pH entre 4,5 a 5,3.
- Sustrato: El sustrato se prepara sobre bandejas de plástico estéril de una medida de 30 cm por 40 cm con una altura de 8 cm.

La composición de dicho sustrato es una mezcla de:

- 10% Turba
- 10% Compost Orgánico compuesto a su vez con un 30% de materia orgánica
- 15% Levaduras vivas con un mínimo de 90 % de población viva
- 15% Azúcar blanca común
- 30% Biomasa lignocelulósica. Por Ejemplo, una mezcla de cascarilla de algodón y cáscara de caja de maní
- 5% De la especie fúngica correspondiente a cada sala multiplicadora (según diagrama de flujo indicado)
- 5% Urea
- 10% Carbonato de Calcio Dolomítico

Como se describe en la Figura 3 estos ingredientes se mezclan para luego llenar las bandejas con la mezcla, que se colocan en estanterías desde el piso hasta el techo de la sala, y se las inunda con agua para dar inicio al crecimiento de las especies fúngicas seleccionadas.

Este procedimiento se realiza a puertas cerradas de las salas correspondientes durante 10 días, observando crecimiento y desarrollo de especies. Al cabo de este tiempo, se obtendrán crecimientos de los hongos (tipo "sombrero") correspondientes en las bandejas de cultivo y restos micelares en el pie de las estructuras fúngicas, los que serán cosechados según especificaciones descritas en el paso 1, en lo que se resume como:

- Recolección y cosecha micelar y enzimática base / recolección y cosecha de especies fúngicas e híbridos inter-especies que serán combinadas para producir el Componente Activo 1 (C.A. 1).

Antes de proceder a la cosecha de las esporas y cuerpos de fructificación de las especies en cada sala, se procede a cosechar con peine de acero quirúrgico los micelios ubicados al pie de las estructuras reproductivas fúngicas; estos serán conservados posteriormente en placas de Petri, como se describió en el protocolo de inicio de multiplicación fúngica (Paso 1, Laboratorio).

Dicha estructura micelar produce un contenido enzimático (considerado como "Base") asociado con el conjunto de las especies fúngicas seleccionadas, y que se incorpora como parte del Componente Activo 1 (C.A.1) dentro del proceso de formulación del aditivo multiplicador y modulador de la microbiota ruminal objeto de la presente invención.

PASO 2. Cosecha-dormancia-almacenamiento de cultivos fúngicos

Corresponde a la implementación de las operaciones de cosecha y conservación de estructuras reproductivas fúngicas que serán utilizadas como insumos para desarrollar el siguiente paso, utilizando procesos y dispositivos que aseguren la combinación de propiedades enzimáticas asociadas con las diferentes especies de hongos seleccionados para su integración en el C.A. 1.

Almacenamiento y Banco de Inoculante

Este conjunto de operaciones asegura el almacenamiento del banco de inoculante fúngico que fue producido en condiciones compatibles con el siguiente paso del procedimiento de producción del aditivo multiplicador y modulador de la microbiota ruminal.

Sobre las mismas bandejas tratadas para la cosecha miceliar y enzimática base, se procede a la cosecha de esporas fúngicas y restos conidiales con sumo cuidado de aislarlas lo más posible del sustrato piso o base de cada bandeja.

Para tal fin, se colocan mantas de seda fina sobre la superficie del sustrato y de esa forma se recolectan las esporas fúngicas aisladas en placas de Petri para la etapa de "Almacenamiento y Banco de Inoculante". Estas placas de Petri también servirán como insumo para el siguiente Paso 2 (correspondiente al cultivo y propagación asexual de las especies e híbridos inter-especies que fueron multiplicadas en el Paso 1), e integrarán la materia prima base del Componente Activo 1 (C.A.1) dentro del procedimiento para la producción del aditivo multiplicador y modulador objeto de la presente invención.

Estas cajas de Petri, perfectamente identificadas según su procedencia de cada sala correspondiente a una especie o combinación híbrida inter-especies, contienen un preparado de tipo xerofítico con una base calcárea dolomítica y un aluminosilicato de Zinc, para de esa forma inducir a la interrupción del crecimiento del hongo.

Las condiciones requeridas para esta etapa de interrupción del crecimiento son:

Humedad Relativa: rangos de 9% a 11% de HR, que se logra mantener con la base adsorbente de calcárea dolomítica.

pH: valores de entre 6,5 a 7,5 son los indicados para controlar el crecimiento y desarrollo de los hongos.

Temperatura: entre valores de 10-15° C.

Luz: blanca común permanente.

Oxígeno: atmósfera sobresaturada de oxígeno, obtenido mediante ventilación forzada.

PASO 3. Cultivo de especies y cruzamientos inter-especies (F1) de hongos seleccionados y multiplicados previamente (paso 1), para cosechar biomasa enriquecida de compuestos multienzimáticos exógenos

Corresponde a la implementación de las operaciones diseñadas para lograr la combinación de biomasa de las especies seleccionadas para la producción del aditivo multiplicador y modulador de la microbiota ruminal a partir de compuestos enzimáticos exógenos, utilizando procesos y dispositivos que aseguren una combinación de las propiedades enzimáticas asociadas con las diferentes especies de hongos que se integran en el C.A. 1

A los efectos de lograr esto, en una batería de cinco salas exactamente diseñadas como las utilizadas en el Paso 1, se procede a aislar y cultivar grupos de a 5 especies, en tandas de producción mensual que correspondan a la combinación de número de especies involucradas (por ejemplo, 4 tandas de producción mensual para combinar 20 especies).

Habiendo observado una mejora en el aumento de la sacarificación de los compuestos lignocelulósicos como producto de la utilización de poblaciones interespecíficas, para potenciar una mejora en el proceso se requiere disponer de dos salas aisladas para el cultivo fúngico derivado de los cruzamientos inter-especies incluidos dentro del paso 1 (en particular *Trichoderma longibrachiatum* x *T. reesei*, *Trichoderma longibrachiatum* x *T. viridae*, y *Trichoderma reesei* x *Trichoderma viridae*), como parte del procedimiento de gestión del banco seleccionado de hongos para la obtención del Componente Activo 1.

En este paso del procedimiento se deben controlar la condiciones ambientales según los requisitos definidos para inducir a la fase asexual de los cultivos fúngicos, partiendo del estado alcanzado en el paso previo, a efectos de estimular la expresión de la actividad enzimáticas en las formas correspondientes (variedades anamórficas) de las especies de hongos seleccionadas para integrar el C.A.1 utilizado para la formulación del aditivo multiplicador y modulador de la microbiota ruminal que es objeto de la presente invención.

Las condiciones ambientales requeridas para llevar adelante este paso son las siguientes:

Humedad Relativa: alta saturación de humedad por asperjado de atomización de la gota de agua de tipo neblina que le confiere el lugar y medio ideal para estar en un rango de 89-98% HR.

pH: ácido. Niveles de pH en el rango 3,5-4,8 son los indicados.

Temperatura: entre 28-31 °C.
Luz: amarilla sódica de 589 nm.
Oxígeno: atmósfera normal.

5 **Sustrato para la confección de las bandejas utilizadas en el PASO 3:**

El sustrato se prepara sobre bandejas de plástico estéril de una medida de 30 cm x 40 cm con una altura de 8 cm. En ella se prepara un sustrato a base de una mezcla de:

- 10 - 30% Turba
- 15% Compost orgánico conteniendo un 30% de materia orgánica
- 5% Levaduras vivas de más de 90 % de población viva
- 5% Azúcar blanca común
- 10% Biomasa lignocelulósica. Por Ejemplo, mezcla de cascarilla de algodón y cascara de caja de maní
- 15 - 5% de la Especie Fúngica correspondiente a cada sala multiplicadora
- 15% Fosfato Diamónico
- 5% Carbonato de Calcio Dolomítico
- 10% Arroz Molido Fino Integral

20 Estas bandejas, se revisan a los 15 días, y bajo las condiciones ambientales descritas se cosechan las estructuras micelares y restos conidiales que integrarán el Componente Activo 1 (C.A.-1). La cosecha se realiza mediante barrido con peine de acero quirúrgico, y posterior envasado al vacío.

25 Las enzimas más destacables que están presentes en el aditivo multiplicador y modulador de la microbiota ruminal a partir de compuestos multienzimáticos exógenos, son:

Endoglucanasas, Exo-glucanasas (de cultivo puro o de cruzamientos), Xilanasas, Lacasa, CeloBio-Hidrolasas (CBHI, CBHII), Beta-Glucosidasas, Hemicelulasas, Pectinasa.

30 Las estructuras micelares y restos conidiales cosechados son almacenados y posteriormente mezclados como parte del C.A. 1.

Una vez producido el C.A. 1, para alcanzar las características distintivas del aditivo multiplicador y modulador de la presente invención y así lograr una mayor eficiencia de degradación de los compuestos lignocelulósicos, se requiere lograr un equilibrio entre:

- 35 - Enzimas fibrolíticas (asociadas con las especies fúngicas seleccionadas utilizadas)
- Restos conidiales de las especies fúngicas e híbridos inter-especies utilizadas
- Ingredientes moduladores que contribuyen a la nutrición microbiana del rumen y logran un equilibrio estequiométrico con mayor capacidad para degradar alimentos con alto contenido fibroso, al ser incorporados como insumos adicionales en la formulación del aditivo multiplicador y modulador de la microbiota ruminal.
- 40

PASO 4. Ensamble Componente Activo 1 (C.A.1)

45 El aporte funcional del C.A. 1 al aditivo multiplicador y modulador de la microbiota ruminal se logra mediante su actividad como iniciador de complejos catalíticos, celulosomas, involucrando alimentos fibrosos y bacterias celulolíticas del rumen. En este paso se procede a ensamblar dicho componente mediante la mezcla de biomasa fúngica enriquecida en compuestos multienzimáticos exógenos (proveniente del paso 3) con el material derivado de la cosecha micelar y enzimática base (proveniente del paso 1) conservado en las condiciones indicadas en el paso 2.

50

A efectos de lograr la mezcla descrita se procede a colocar en micromezcladora de acero inoxidable operada en un ambiente cerrado y limpio:

- 55 - 25 a 35 % de Complejo enzimático (proveniente del paso 1)
- 60 a 65% de Restos Conidiales (proveniente del paso 3)
- 5 a 10% de Celulosa Microcristalina (Base Excipiente)

Se mezclan estos principios activos durante 300 segundos, luego la mezcla se envasa al vacío y se termosellan los envases para su posterior almacenamiento.

60

La biomasa fúngica (cosecha micelar y enzimática base + restos conidiales) enriquecida en compuestos multienzimáticos exógenos proviene de las siguientes especies y sus posibles combinaciones híbridas inter-especies (indicadas mediante una X entre los nombres científicos de las especies correspondientes), producidas utilizando los procesos, dispositivos y condiciones de producción descritas en la presente memoria:

65

	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
	<i>Trichoderma reesei</i> (= <i>Hypocrea jecorina</i>)
	<i>Trichoderma viride</i> (= <i>T. harzianum</i> o <i>Hypocrea atroviridis</i>)
5	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> x <i>T. reesei</i>
	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> x <i>T. viridae</i>
	<i>Trichoderma reesei</i> x <i>Trichoderma viridae</i>
	<i>Trichoderma hirsuta</i>
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
10	<i>Chrysosporium lucknowense</i>
	<i>Agaricus bisporus</i>
	<i>Aspergillus terreus</i>
	<i>Aspergillus oryzae</i>
	<i>Aspergillus niger</i>
	<i>Aspergillus flavus</i>
15	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
	<i>Pyricularia oryzae</i>
	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>
	<i>Pleurotus ostreatus</i>
	<i>Pleurotus eryngii</i>
20	<i>Thanatephorus cucumeris</i>
	<i>Phlebia radiata</i>
	<i>Pycnoporus sanguineus</i>
	<i>Stropharia coronilla</i>

25 PASO 5. Ensamble componente activo 2 (C.A.2)

A los efectos de este paso, se considera como Moduladores (ó “estequio-reguladores de la microbiota ruminal”) a una determinada cantidad de productos naturales, orgánicos e inorgánicos que tienen por finalidad lograr un equilibrio funcional de la población microbiana del rumen asociado al ingreso de los compuestos multi-enzimáticos exógenos incluidos en la formulación del aditivo multiplicador y modulador descrito en la presente invención.

El ensamblado de moduladores de la microbiota del rumen (mediante mezcla de sus insumos en las proporciones definidas) facilita su posterior combinación con el componente activo 1, siendo un paso fundamental en el proceso de integración de procesos y dispositivos diseñados para cultivar y cosechar biomasa de especies fúngicas seleccionadas, según las especificaciones indicadas para producir un aditivo multiplicador y modulador de la microbiota ruminal con aplicación industrial en sistemas de alimentación para animales rumiantes.

Dicho procedimiento es considerado particularmente dinámico, dado que puede utilizarse para lograr diferentes combinaciones de las propiedades enzimáticas asociadas con las especies fúngicas seleccionadas, y por ser factible su incorporación a múltiples sistemas de alimentación de animales rumiantes, sea en forma directa como alimento o como suplemento nutricional a ser entregado a través de dispositivos existentes o a desarrollarse con dicha finalidad, y con impacto económico y ambiental positivo en los sistemas productivos ganaderos.

Los componentes identificados como moduladores de la microbiota ruminal se mezclan (en micromezcladora de acero inoxidable operada en un ambiente cerrado y limpio) para conformar el C.A. 2., en las siguientes proporciones:

Ingredientes del Componente Activo 2 (C.A.2)

Ingrediente	Proporción
Almidón de Maíz	10%
Azúcar Común	5%
Residuo del sustrato utilizado para el cultivo de Levaduras	3%
Trigo Burgol Molido	5%
Arroz Molido fino	3%
Celulosa Microcristalina	15%
Dolomita csp	8%
Vermiculita csp	7%
Residuo del cultivo de levadura (muertas)	12%

(continuación)	
Ingrediente	Proporción
Cultivo de levaduras (vivas protegidas)	8 %
Glucanos Mananos Oligo-Fructosanos (M.O.S.)	2%
Fitasa	1%
Isoleucina	0,5%
Lisina	0,3%
Leucina	0,3%
Metionina	0,4%
Treonina	0,7%
Triptófano	0,7%
Cloruro de Colina	0,7%
Selenio Orgánico	0,1%
Sacarosa	16%
Vitamina E	1%
Carbonato Calcio csp	0,3%

Esta mezcla de ingredientes (C.A. 2) se debe combinar con el C.A.-1, en proporciones definidas, como se describe en el paso 6.

PASO 6. Protocolo de formulación del aditivo multiplicador y modulador de la microbiota ruminal

Este paso corresponde a la mezcla (con períodos de 300 segundos) del componente multienzimático (C.A.1) y el componente modulador (C.A.2), a efectos de lograr las diferentes proporciones del aditivo multiplicador y modulador según las condiciones particulares de distribución del producto como suplemento para alimentación de animales rumiantes, donde dicha mezcla de C.A. 1 + C.A. 2 se realiza en una mezcladora de 50 kgs de capacidad.

La proporción de mezclado recomendada para la formulación del aditivo multiplicador y modulador de la microbiota ruminal destinado a su uso directo en preparación de alimentos para sistemas de producción ganadera es de: 15% a 20% de C.A.-1, y 75% a 80% de C.A.-2. En el intervalo correspondiente a estas proporciones se determinaron las mejoras en digestibilidad del alimento fibroso consumido, y se reportaron las reducciones de costos de alimentación (por mayor aprovechamiento del alimento fibroso consumido), asociadas también con una reducción significativa en la pérdida de energía asociada con liberación de metano ruminal.

El ensamble de los componentes C.A. 1 y C.A. 2 fue detallado en las secciones correspondientes (paso 4: C.A.1 y paso 5: C.A.2) , y su mezcla, en las proporciones definidas en este paso 6 para la formulación del aditivo multiplicador y modulador, se considera como parte integral del procedimiento objeto de esta patente.

Las evaluaciones funcionales realizadas incluyeron la utilización de diferentes vías para la distribución y utilización de dicha formulación, adecuadas a cada sistema de alimentación de animales rumiantes, incluyendo las siguientes:

- pre-mezclas vitamínicas minerales (tanto en formato de Sales en polvo como de Bloques Sólidos) y raciones terminadas (TMR) destinadas a la alimentación de rumiantes, cuando la proporción de dicho aditivo esté comprendida entre el 10% y 20% del total de la pre-mezcla.
- Dispositivos utilizados para la distribución de suplementos para la nutrición de rumiantes alimentados en condiciones estabuladas, semi-estabuladas o sistemas extensivos a campo, tales como comprimidos (obtenidos mediante un granulador, con un rango entre 8 – 18 mm de diámetro) formado por una matriz fibrosa lignocelulósica, conteniendo 1% del aditivo, y capaces de ser administrado a través de un aplicador intra-ruminal que permita la liberación lenta de los componentes incluidos en la formulación del aditivo objeto de la presente invención, para aplicaciones que requieran un periodo de efectividad mayor a 90 días.

Una realización es un método para preparar un primer ingrediente activo en un aditivo para la microbiota ruminal, en

donde el método comprende los pasos de:

(a) Multiplicar un banco de especies fúngicas para producir un complejo enzimático que comprende (i) estructuras miceliales y (ii) esporas y cuerpos de fructificación; en donde el banco de especies fúngicas es dos o más de las siguientes:

Trichoderma longibrachiatum; *Trichoderma reesei* (= *Hypocrea jecorina*); *Trichoderma viride* (= *T. harzianum* o *Hypocrea atroviridis*); *Trichoderma hirsuta*; *Phanerochaete chrysosporium*; *Chrysosporium lucknowense*; *Agaricus bisporus*; *Aspergillus terreus*; *Aspergillus oryzae*; *Aspergillus niger*; *Aspergillus flavus*; *Schizosaccharomyces pombe*; *Pyricularia oryzae*; *Pycnoporus cinnabarinus*; *Pleurotus ostreatus*; *Pleurotus eryngii*; *Thanatephorus cucumeris*; *Phlebia radiata*; *Pycnoporus sanguineus*; *Stropharia coronilla*;

(b) Cultivar cruzamientos inter-especies (F1) de determinadas especies de (a), para producir restos conidiales, en donde los cruzamientos inter-especies (F1) son uno o más de los siguientes:

Trichoderma longibrachiatum x *T. reesei*; *Trichoderma longibrachiatum* x *T. viridae*; o

Trichoderma reesei x *Trichoderma viridae*; y

(c) Mezclar los productos de (a) y (b) con una base excipiente para producir el componente activo.

Se revela un aditivo para la microbiota ruminal, en donde el aditivo comprende:

(a) un primer componente activo que comprende (i) estructuras miceliales, esporas y cuerpos de fructificación de un banco de especies fúngicas, en donde el banco de especies fúngicas incluye dos o más de las siguientes: *Trichoderma longibrachiatum*; *Trichoderma reesei* (= *Hypocrea jecorina*); *Trichoderma viride* (= *T. harzianum* o *Hypocrea atroviridis*); *Trichoderma hirsuta*; *Phanerochaete chrysosporium*; *Chrysosporium lucknowense*; *Agaricus bisporus*; *Aspergillus terreus*; *Aspergillus oryzae*; *Aspergillus niger*; *Aspergillus flavus*; *Schizosaccharomyces pombe*; *Pyricularia oryzae*; *Pycnoporus cinnabarinus*; *Pleurotus ostreatus*; *Pleurotus eryngii*; *Thanatephorus cucumeris*; *Phlebia radiata*; *Pycnoporus sanguineus*; *Stropharia coronilla*; y (ii) restos conidiales de uno o más de los siguientes cruzamientos inter-especies (F1): *Trichoderma longibrachiatum* x *T. reesei*, *Trichoderma longibrachiatum* x *T. viridae* and *Trichoderma reesei* x *Trichoderma viridae*; y

(b) un segundo componente activo que comprende dos o más de los siguientes: almidón, azúcar, trigo, arroz, celulosa, dolomita, vermiculita, levadura, glucanos mananos oligo fructosanos (M.O.S.), fitasa, isoleucina, lisina, leucina, metionina, treonina, triptófano, cloruro de colina, selenio, Vitamina E o carbonato de calcio; en donde la reducción en metano producida por un rumiante cuando ingiere el aditivo es de al menos 28 % cuando se comparar con el metano producido por un rumiante que no ingiere el aditivo.

Lo anterior es una descripción detallada de realizaciones particulares de la invención. Se reconoce que las desviaciones de las realizaciones descritas se pueden realizar dentro del alcance de la invención y que las modificaciones obvias se le ocurrirán a una persona experta en la técnica. Los expertos en la técnica deberían, a la luz de la presente descripción, apreciar que se pueden realizar muchos cambios en las realizaciones específicas que se describen en este documento y aún obtener un resultado parecido o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Todas las realizaciones descritas y reivindicadas en la presente pueden realizarse y ejecutarse sin una experimentación excesiva a la luz de la presente descripción.

REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de un primer componente activo en un aditivo para la microbiota ruminal, en donde el método comprende los pasos de:

(a) Multiplicar un banco de especies fúngicas para producir un complejo enzimático que comprende (i) estructuras miceliales y (ii) esporas y cuerpos de fructificación; en donde el banco de especies fúngicas es dos o más de las siguientes:

Trichoderma longibrachiatum
Trichoderma reesei (= *Hypocrea jecorina*)
Trichoderma viride (= *T. harzianum* o *Hypocrea atroviridis*)
Trichoderma hirsuta
Phanerochaete chrysosporium
Chrysosporium lucknowense
Agaricus bisporus
Aspergillus terreus
Aspergillus oryzae
Aspergillus niger
Aspergillus flavus
Schizosaccharomyces pombe
Pyricularia oryzae
Pycnoporus cinnabarinus
Pleurotus ostreatus
Pleurotus eryngii
Thanatephorus cucumeris
Phlebia radiata
Pycnoporus sanguineus
Stropharia coronilla;

(b) Cultivar cruzamientos inter-especies (F1) de determinadas especies de (a), para producir restos conidiales, en donde los cruzamientos inter-especies (F1) son uno o más de los siguientes:

Trichoderma longibrachiatum x *T. reesei*;
Trichoderma longibrachiatum x *T. viridae*; o
Trichoderma reesei x *Trichoderma viridae*; y

(c) Mezclar los productos de (a) y (b) con una base excipiente para producir el componente activo.

2. El método de la reivindicación 1, en donde la mezcla resultante del paso (c) comprende: 25 a 35 % del complejo enzimático; 60 a 65 % de los restos conidiales, y 5 a 10 % de la base excipiente.

3. El método de la reivindicación 1, que además comprende combinar el primer componente activo con un segundo componente activo, en donde el segundo componente activo comprende una mezcla definida de insumos con efecto modulador, de forma tal que el aditivo resultante, cuando se agrega a la microbiota ruminal, aumenta la tasa de digestión en la microbiota ruminal en al menos 5 veces.

4. El método de la reivindicación 3, en donde el segundo componente activo comprende dos o más de los siguientes: almidón, maíz, trigo, arroz, celulosa, dolomita, vermiculita, levadura, glucanos mananos oligo – fructosanos (M.O.S.), fitasa, isoleucina, lisina, leucina, metionina, treonina, triptófano, cloruro de colina, selenio, Vitamina E o carbonato de calcio.

5. El método de la reivindicación 3, en donde entre el 15 y el 20 % del primer componente activo es combinado con entre el 75 y el 80 % del segundo componente activo para producir el aditivo.

6. Un aditivo para la microbiota ruminal, en donde el aditivo comprende:

(a) un primer componente activo que comprende

(i) estructuras miceliales, esporas y cuerpos de fructificación de un banco de especies fúngicas, en donde el banco de especies fúngicas incluye dos o más de las siguientes: *Trichoderma longibrachiatum*; *Trichoderma reesei* (= *Hypocrea jecorina*); *Trichoderma viride* (= *T. harzianum* o *Hypocrea atroviridis*); *Trichoderma hirsuta*; *Phanerochaete chrysosporium*; *Chrysosporium lucknowense*; *Agaricus bisporus*; *Aspergillus terreus*; *Aspergillus oryzae*; *Aspergillus niger*; *Aspergillus flavus*; *Schizosaccharomyces pombe*; *Pyricularia oryzae*; *Pycnoporus cinnabarinus*; *Pleurotus ostreatus*; *Pleurotus eryngii*; *Thanatephorus cucumeris*; *Phlebia radiata*; *Pycnoporus sanguineus*; *Stropharia coronilla*; y

(ii) restos conidiales de uno o más de los siguientes cruzamientos inter-especies (F1): *Trichoderma longibrachiatum* x *T. reesei*, *Trichoderma longibrachiatum* x *T. viridae* and *Trichoderma reesei* x *Trichoderma viridae*; y

- 5 (b) un segundo componente activo que comprende dos o más de los siguientes: almidón, azúcar, trigo, arroz, celulosa, dolomita, vermiculita, levadura, glucanos mananos oligo fructosanos (M.O.S.), fitasa, isoleucina, lisina, leucina, metionina, treonina, triptófano, cloruro de colina, selenio, Vitamina E o carbonato de calcio;

10 en donde la reducción en metano producida por un rumiante cuando ingiere el aditivo es de al menos 28 % cuando se compara con el metano producido por un rumiante que no ingiere el aditivo.

7. El aditivo de la reivindicación 6, en donde la reducción en metano es de al menos 49 %.

15 8. Una formulación para ración para rumiantes que comprende el aditivo de la reivindicación 6.

9. La formulación de ración para rumiantes de la reivindicación 8, que además comprende sal.

20 10. La formulación de ración para rumiantes de la reivindicación 8, en donde el aditivo comprende entre el 10 y el 20 % de la formulación.

11. La formulación para ración para rumiantes de la reivindicación 8, en donde el aditivo se incorpora en una tableta que comprende una matriz fibrosa lignocelulósica.

25 12. La formulación para ración para rumiantes de la reivindicación 8, en la forma de una formulación de liberación extendida que es capaz de liberar el aditivo durante un período de al menos 90 días.

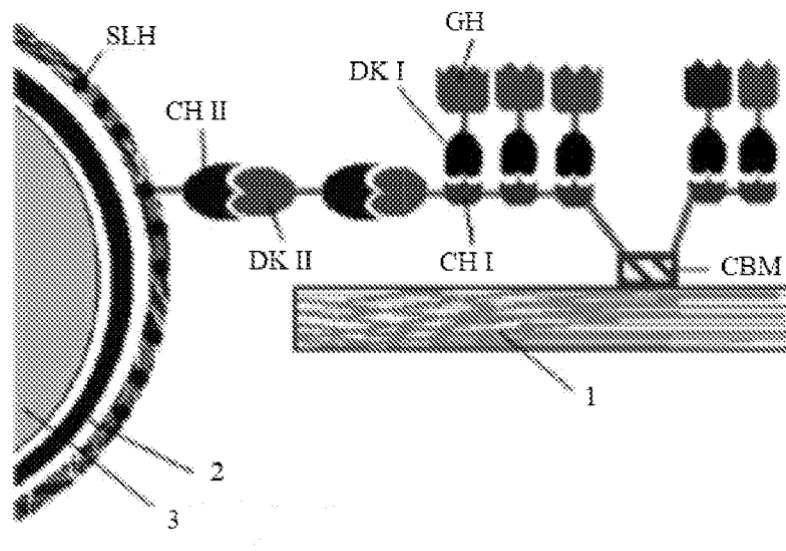


FIG.1

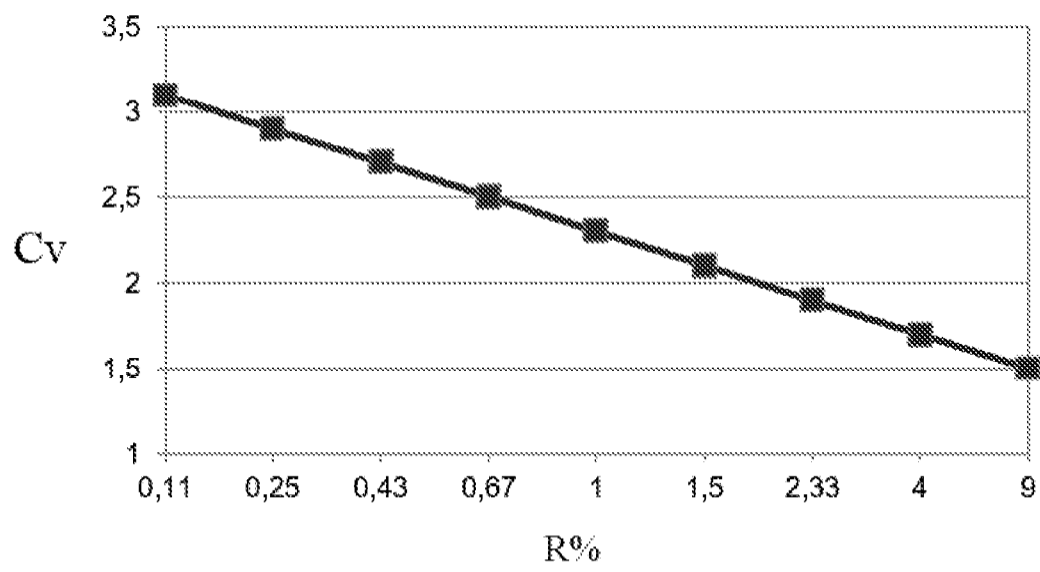


FIG.2

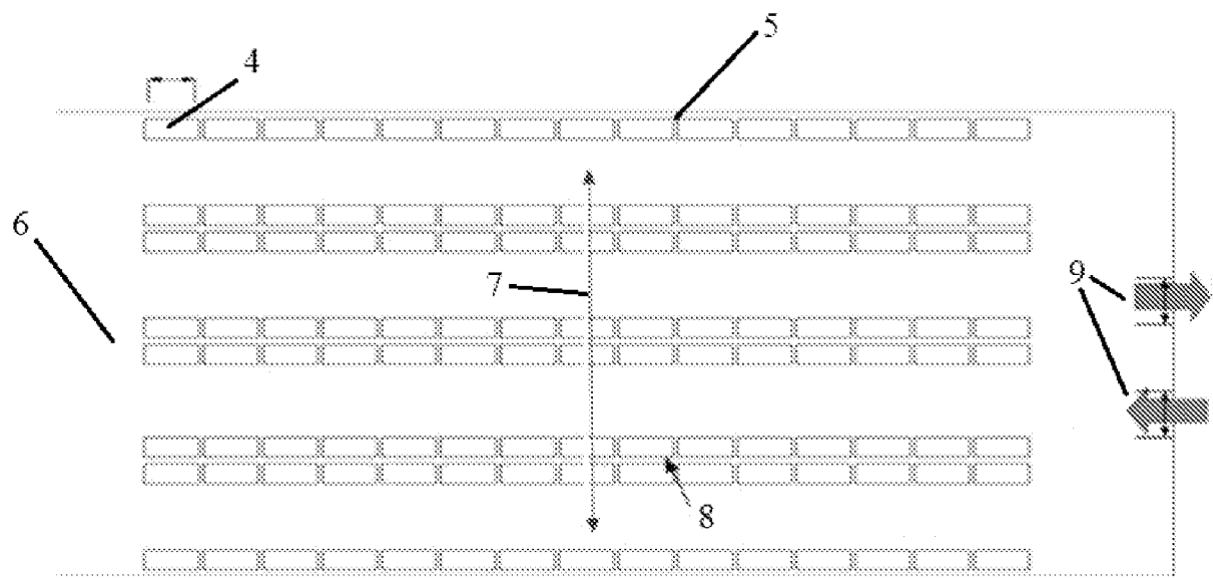


FIG.3