

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 014 044**

51 Int. Cl.:

A23K 10/30 (2006.01)
A23L 5/30 (2006.01)
A23K 10/37 (2006.01)
A23K 10/38 (2006.01)
A23K 50/10 (2006.01)
A23L 7/10 (2006.01)
A23L 19/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2016** **PCT/NL2016/050387**
87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016** **WO16195487**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2016** **E 16742026 (4)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2025** **EP 3302094**

54 Título: **Un método para incrementar el valor nutricional de materiales vegetales**

30 Prioridad:

29.05.2015 NL 2014888

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.04.2025

73 Titular/es:

AGRIFIRM NORTH WEST EUROPE HOLDING B.V.
(100.00%)
Landgoedlaan 20
7325 AW Apeldoorn, NL

72 Inventor/es:

WEURDING, ROELOF EDUARD y
VAN HEES, JOSEPHUS JOHANNES ANTONIUS

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 3 014 044 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

Un método para incrementar el valor nutricional de materiales vegetales

La presente invención se relaciona con un método de utilización de un material vegetal como pienso para rumiantes, sometiéndose dicho material vegetal a un calentamiento directo mediante radiación en el intervalo de radiofrecuencia, teniendo dicho material vegetal así tratado un valor nutricional aumentado. En otras palabras, la presente invención se relaciona con un método de tratamiento de un material vegetal para obtener un material vegetal con un valor nutricional aumentado y utilizarlo como pienso para rumiantes. El método de acuerdo con la presente invención está relacionado principalmente con el aumento de la utilización de proteínas, almidón y/o grasa del material por parte de animales (de granja), es decir, rumiantes.

Los documentos de la técnica anterior divulgan métodos para aumentar la utilización de proteínas en pienso proteínico para animales para rumiantes. Estos métodos incluyen: (a) tratamiento químico con tanino, como se divulga en la Patente de Estados Unidos No. 3,507,662, (b) tratamiento químico con formaldehído, como se divulga en la Patente de Estados Unidos No. 3,619,200, (c) añadir azúcares al pienso proteínico para animales y calentar la mezcla a una temperatura y condiciones de pH determinadas, como se divulga en la Patente de Estados Unidos No. 5,023,091, (d) mezclar el pienso proteínico para animales con una enzima carbohidrasa, seguido de calentar la mezcla a una temperatura, pH y porcentaje de humedad determinados; (e) calentar el pienso proteínico para animales utilizando presiones de compresión, es decir, calentar el producto mediante calor por fricción, para aumentar la utilización de proteínas al reducir la degradabilidad de dichos materiales como se divulga en la Patente de Estados Unidos No. 3,695,891; (f) radiación de microondas como se analiza en Dong. S. et al, Asian Australas. J. Anim. Sci. 18, 2005, 27-31; Sadeghi A. et al, Anim. Sci. 80, 2005, 369-375; Brodie G. et al, J. Microwave Power E. E. 46, 2012, 57-67.

Los métodos (a)-(d) implican la reacción del pienso proteínico para animales con un reactivo añadido. El método (e) tiene la desventaja de que existe el riesgo de un calentamiento excesivo que dé lugar a que la proteína en el pienso sea indigerible en el tracto posruminal. El método (f) tiene la desventaja de que el calentamiento no es homogéneo y solo se calienta suficientemente la capa exterior del material de tratamiento, generándose grandes productos no homogéneos, y conlleva el inconveniente de que este método no es aplicable a gran escala ya que el calor tiene que penetrar en el resto del producto por medio de convección y/o conducción.

Los documentos de la técnica anterior divulgan métodos para aumentar la utilización del almidón en pienso para animales, que contienen almidón para rumiantes: Dong. S. et al, Asian Australas. J. Anim. Sci. 18, 2005, 27-31; Sadeghi A. et al, Anim. Sci. 80, 2005, 369-375 y Brodie G. et al, J. Microwave Power E. E. 46, 2012, 57-67, por ejemplo, demostraron que la digestibilidad del almidón y de las proteínas aumenta al calentar el forraje animal mediante microondas, a una frecuencia de 2.45 GHz y una potencia que oscila entre 750 W y 6 kW.

El documento JP S49 12709 B1 describe la eliminación de olor y sabor astringente de una torta de soja desgrasada mediante extracción a baja temperatura irradiando la torta durante varios minutos con radiación de frecuencia 40-2450 MHz. El documento NL 9 300 976 A se relaciona con un método para cambiar la cinética de una reacción en donde está involucrada al menos una macromolécula, en donde la al menos una macromolécula se trata con energía electromagnética de una frecuencia en el intervalo de 0.1-350 MHz. Oberndorfer et al. (The effect of rapeseed treatment by microwave and radio-frequency application on oil extraction and quality, Fat Science Technology, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, DE, vol. 101, no. 5, 1 May 1999, pages 164-167) informaron que el pretratamiento de la colza con energía de microondas y radiofrecuencia condujo a un aumento evidente de la tasa de explotación y a una influencia en los parámetros de calidad del aceite. El documento US 2014/011742 A1 divulga un proceso para tratar una proteína antes de la digestión hidrolítica, comprendiendo el proceso exponer la proteína a al menos un ciclo de irradiación de microondas para producir una proteína tratada con microondas que contiene uno o más péptidos bioactivos. El documento DE 10 2009 038624 B3 divulga un método para el tratamiento de semillas oleaginosas para pienso con el fin de mejorar la utilización de los componentes valiosos, implicando el tratamiento calentamiento por microondas. El documento WO 01/72143 A1 divulga el procesamiento de una mezcla de granos y maíz en donde los productos se someten a una exposición repetida a rayos UV con una longitud de onda de 230-240 nm durante un período que varía de 1 a 300 minutos y la mezcla de granos y cultivos se acondiciona consecutivamente de 5 a 72 horas.

Existe una necesidad en el campo de la preparación de pienso de un método eficiente, seguro y confiable para tratar un material vegetal con el fin de aumentar el valor nutricional y aumentar el valor de dicho material en la fabricación de pienso para rumiantes.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para aumentar el valor nutricional de material vegetal que se utiliza como pienso para rumiantes en el que únicamente se utiliza calentamiento directo.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar un método para incrementar el valor nutricional de material vegetal que se utiliza como pienso para rumiantes sin la necesidad de utilizar reactivos químicos.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método para aumentar el valor nutricional de un material vegetal que es adecuado para uso como pienso para rumiantes o para su procesamiento como pienso para estos.

- 5 Uno o más de los objetos citados anteriormente se logran mediante los diversos aspectos y realizaciones de la presente invención como se analiza a continuación.

Resumen de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se relaciona con un método de acuerdo con la reivindicación 1.

- 10 La clave de la presente invención es aumentar el valor nutricional de un material vegetal mediante el uso de calentamiento por medio de radiación en el intervalo de radiofrecuencia (también llamado calentamiento por RF en la presente invención).

La invención se relaciona con un método para aumentar el valor nutricional de un material vegetal mediante el sometimiento de un material vegetal a calentamiento por medio de radiación en el intervalo de radiofrecuencia y mediante el uso de dicho material tratado como pienso para rumiantes.

En una realización, el intervalo de radiación de radiofrecuencia es de 27.12 MHz $\pm$ 0.6 %.

- 15 En una realización, el material vegetal se selecciona entre granos, tubérculos y materiales vegetales residuales y una o más combinaciones de estos.

- 20 En una realización, el material vegetal residual es un residuo del procesamiento de granos o tubérculos. En una realización, el material vegetal residual es un residuo del procesamiento de semillas de colza, soja o girasol o una combinación de estas. En una realización, el material vegetal residual se selecciona del grupo que consiste en harina de colza, harina de soja, harina de semilla de girasol, harina de alfalfa deshidratada, harina de pasto deshidratado, maíz DDGS y una o más combinaciones de estas.

En una realización, los granos se seleccionan del grupo que consiste en granos de cereales, legumbres y semillas oleaginosas, más preferiblemente maíz, guisantes, altramuces dulces, soja, colza, trigo, cebada y una o más combinaciones de estos.

- 25 En una realización, los tubérculos se seleccionan del grupo que consiste en patata, tal como el subproducto proteína de patata, ñame, batata, mandioca y una o más combinaciones de los mismos.

En una realización, el material se somete a radiación por RF para alcanzar una temperatura de entre 110 ° C y 165 ° C, tal como entre 120 ° C y 165 ° C, incluso más preferiblemente entre 130 ° C y 165 ° C, lo más preferiblemente entre 130 y 150 ° C.

- 30 En una realización, el tiempo de procesamiento del material vegetal sometido a calentamiento por medio de radiación en el intervalo de radiofrecuencia está comprendido entre 10 minutos y 1.5 horas, tal como entre 20 minutos y 1 hora, más preferiblemente entre 20 minutos y 50 minutos, tal como entre 20 minutos y 45 minutos, o entre 20 y 35 minutos.

Dibujos

- 35 La Figura 1 es un gráfico que muestra el efecto del tratamiento RF de la harina de soja sobre el contenido de proteína de la leche de vacas lactantes.

Definiciones

En la presente descripción se utilizan las siguientes definiciones.

- 40 "Material vegetal residual" según se utiliza en la presente solicitud significa: un material que queda después de que una materia prima vegetal ha sido procesada para obtener uno o más productos primarios; por ejemplo: un residuo después del procesamiento de granos o tubérculos; o un residuo después del uso de materiales vegetales para obtener biocombustibles, tales como los llamados granos de destilería secos y solubles (DDGS).

- 45 "Harina", tal como se utiliza en la presente solicitud, significa: el material vegetal residual que queda después del procesamiento de los granos. Es un subproducto que se obtiene después de la extracción química del aceite (harina extraída) o después del prensado para obtener aceite (harina por expulsor). La harina según la presente invención incluye tanto harina extraída como harina por expulsor.

"Tratamiento por radiofrecuencia" o "tratamiento por RF" o "calentamiento por RF" tal como se utiliza en la presente solicitud significa: someter un material a un campo electromagnético alterno de radiación de RF. Con el tratamiento de radiofrecuencia la polaridad del campo eléctrico cambia varios millones de veces por segundo.

Esta rápida inversión y realineación constante de las moléculas dentro del producto generará calor (energía térmica).

"Calentamiento indirecto", tal como se utiliza en la presente solicitud, significa: un método de calentamiento en el que el calor se genera externamente a un material y luego se transfiere a su superficie externa por conducción, convección y/o radiación.

"Calentamiento directo", tal como se utiliza en la presente solicitud, significa: un método de calentamiento en el que el calor se genera dentro del propio material, como por ejemplo el calentamiento por radiofrecuencia (RF).

"Fracción resistente al rumen" tal como se utiliza en la presente solicitud significa: la fracción del material de pienso que pasa por el rumen sin degradarse. A esto a veces también se le llama fracción no degradada del rumen.

"Técnica de la bolsa de nailon *in situ*": es la técnica estándar utilizada para medir la degradación de materiales en el rumen y/o los intestinos. En esta técnica se introducen bolsas de nailon rellenas de un material en el rumen y/o los intestinos de las vacas.

"Tiempo de procesamiento", (t_p) como se utiliza en la presente solicitud significa: el tiempo necesario para llevar un material desde una temperatura inicial, por ejemplo, temperatura ambiente, a una temperatura final (T_f) mediante el uso de radiación por RF.

"Tiempo de retención", (t_r) como se utiliza en la presente solicitud significa: el tiempo durante el cual un material se mantiene a una temperatura específica, por medio, por ejemplo, de un horno. Durante el tiempo de retención no se aplica radiación por RF.

Descripción detallada de la invención

Radiofrecuencia

La radiación por RF tiene frecuencias de trabajo en el intervalo de decenas de megahercios. La frecuencia más utilizada en los equipos industriales es de aproximadamente 27 MHz, que corresponde a una longitud de onda de aproximadamente 11 m; aunque también se suele utilizar una frecuencia de aproximadamente 13 MHz. Las radiofrecuencias se pueden utilizar para calentar de forma endógena un gran volumen de un producto, es decir, capas en el intervalo de un metro. Por el contrario, las microondas sólo pueden penetrar capas pequeñas, del orden de centímetros.

Mediante el uso de radiofrecuencia, la energía para el tratamiento requerido se aplica mediante un par de electrodos, cuya geometría está diseñada y ajustada de acuerdo con la forma y tamaño del producto, recibiendo dicha energía del generador. Los electrodos son en realidad las placas opuestas de un condensador y el producto entre ellas es el dieléctrico que, dependiendo de sus características fisicoquímicas, absorbe la energía de manera uniforme y difusa, independientemente de su forma y tamaño. El tratamiento por radiofrecuencia es un método de calentamiento directo.

La presente invención utiliza normalmente RF que se encuentran en las denominadas bandas de radio (porciones del espectro de radio) industriales, científicas y médicas (ISM) que están reservadas internacionalmente para fines industriales, científicos y médicos distintos de las telecomunicaciones. Las bandas ISM están definidas por la ITU-R en 5.138, 5.150 y 5.280 del Reglamento de Radio. En una realización específica, la RF es 27.12 MHz $\pm 0.6\%$ (entre 26.957 MHz y 27.283 MHz). En otra realización específica, la RF es 13.56 MHz $\pm 0.05\%$ (entre 13.553 MHz y 13.567 MHz). En otra realización específica, la RF es 40.68 MHz $\pm 0.05\%$ (entre 40.66 MHz y 40.7 MHz).

Cabe señalar que, normalmente, un aparato está configurado para una radiofrecuencia específica con un cierto intervalo de variación. La frecuencia de trabajo utilizada depende de las regulaciones de cada país como se muestra arriba. Para los Países Bajos, en 2015, la radiofrecuencia permitida se establece en 27.12 MHz $\pm 0.6\%$.

En una realización, el material vegetal de partida se calienta mediante dicha radiación hasta una temperatura final de entre 110 ° C y 165 ° C, tal como entre 120 ° C y 165 ° C, incluso más preferiblemente entre 130 ° C y 165 ° C, lo más preferiblemente entre 130 ° C y 150 ° C. Estas temperaturas son las temperaturas del material vegetal. Estas temperaturas se alcanzan después de aplicar radiación al material, lo que aumenta la temperatura del material. La radiación se aplica de tal manera que la temperatura final que alcanza el material sea la temperatura especificada anteriormente. La temperatura se mide utilizando medios conocidos, por ejemplo, un termopar en uno o más lugares del material durante la irradiación.

La duración del tratamiento por RF (tiempo de procesamiento) depende del equipo utilizado y puede ser determinada por una persona experimentada en la técnica. El presente inventor consideró que la duración del

tiempo de retención no tenía ningún efecto real sobre los resultados; sólo se encontró que el tiempo de procesamiento y la temperatura tenían un efecto real sobre los resultados. Sin embargo, si por alguna razón se desea un tiempo de retención determinado. Está dentro del alcance de la invención aplicar dicho tiempo de retención después del tratamiento por RF. A modo de ejemplo no limitativo, la duración de la irradiación es de al menos 10 minutos, tal como entre 10 minutos y 1.5 horas, tal como entre 20 minutos y 1 hora, más preferiblemente entre 20 minutos y 50 minutos, tal como entre 20 y 45 o entre 20 minutos y 35 minutos. Sin embargo, en función de los ajustes y la eficiencia del aparato utilizado, la intensidad de la radiación, la cantidad de material irradiado y otros factores, una persona experimentada en la técnica podrá determinar una duración óptima en función de la temperatura final deseada. La potencia o intensidad de la radiación también puede variar y depende en parte del producto tratado y de la eficiencia del aparato utilizado. Puede estar, por ejemplo, entre 0.1 y 0.2 kWh/kg de material de partida.

Materiales vegetales para utilizar como material de partida

El material vegetal utilizado en el método de acuerdo con la presente invención se selecciona preferiblemente entre granos, tubérculos y materiales vegetales residuales y una o más combinaciones de estos. Cabe señalar que los "granos" también incluyen "semillas", como se analiza más adelante en la sección con respecto a los granos.

Granos como material de partida

Los granos pueden utilizarse como material de partida para el presente método. En otras palabras, los granos pueden ser sometidos a un tratamiento de radiación utilizando radiación por RF.

En una realización, los granos se seleccionan del grupo que consiste en granos de cereales, legumbres y semillas oleaginosas.

En una realización, los granos de cereales pueden seleccionarse del grupo que consiste en cebada, avena, arroz, centeno, espelta, teff, triticale, trigo, maíz, sorgo y mijo. También se pueden utilizar otros granos de cereales conocidos en la técnica. Estos pueden usarse como tales o en forma de granulados, copos, molidos o en otras formas.

En una realización, las legumbres (también llamadas pulsos) pueden seleccionarse del grupo que consiste en soja, altramuces (dulces), habas, guisantes, garbanzos, frijoles comunes y lentejas. También se pueden utilizar otras legumbres conocidas en la técnica. Estos pueden usarse como tales o en forma de granulados, copos, molidos o en otras formas.

En una realización, las semillas oleaginosas pueden seleccionarse del grupo que consiste en semillas de colza (incluida la canola), semillas de cártamo, semillas de girasol y semillas de lino (también llamadas linazas). También se pueden utilizar otras semillas oleaginosas conocidas en la técnica. Estos pueden usarse como tales o en forma de granulados, copos, molidos o en otras formas.

En una realización, los granos de acuerdo con la presente invención que se someten a radiación por RF se seleccionan del grupo que consiste en: maíz, soja, colza, trigo, cebada y una o más combinaciones de estos. Estos pueden usarse como tales o en forma de granulados, copos, molidos o en otras formas.

Tubérculos como material de partida

En otra realización, se pueden utilizar tubérculos como materiales de partida, ejemplos de tubérculos de tallo tales como patatas y ñames, y tubérculos de raíz, tales como batata, mandioca y combinaciones de estos.

Material vegetal residual como material de partida

El material vegetal residual puede utilizarse como material de partida para el presente método. En otras palabras, los materiales vegetales residuales pueden ser sometidos a un tratamiento de radiación mediante radiación por RF.

En una realización, el material vegetal residual es un residuo del procesamiento de granos, preferiblemente un residuo del procesamiento de colza, soja, trigo, cebada o maíz y una o más combinaciones de estos, más preferiblemente harina de colza, harina de soja, harina de semilla de girasol, pienso de gluten de maíz, salvado de trigo y una o más combinaciones de estos.

En otra realización, el material vegetal residual es un residuo del procesamiento de tubérculos, preferiblemente un residuo del procesamiento de patatas, ñame, batata, mandioca (para obtener tapioca) y combinaciones de estos.

En otra realización, los materiales vegetales residuales comprenden residuos después del uso de materiales vegetales para la obtención de biocombustibles, los denominados DDGS, por ejemplo, DDGS de maíz.

En otra realización, los materiales vegetales residuales comprenden forrajes secos como harina de pasto (deshidratada) y harina de alfalfa (deshidratada) o pellas de estos materiales.

Valor nutricional de los materiales vegetales

- 5 Los materiales vegetales utilizados como materiales de partida en el método de acuerdo con la presente invención tienen composiciones variables. El método de acuerdo con la invención es adecuado para todos ellos. Los resultados del tratamiento con RF difieren cuando se utilizan diferentes materiales de partida.

- 10 Algunos materiales, por ejemplo, la mayoría de los materiales residuales, tienen un contenido de proteínas relativamente alto y un pequeño contenido de almidón. Algunos materiales, por ejemplo, los granos de cereales tienen un contenido de almidón relativamente alto y un contenido de proteínas bajo. Otros materiales, como por ejemplo las semillas oleaginosas, tienen un contenido de proteínas y grasas relativamente alto. A continuación, se proporciona más información sobre el aumento del valor nutricional de las proteínas, almidón y grasas del material de partida. El presente método es capaz de aumentar el valor nutricional de uno o más de estos componentes, proteína, almidón y grasa.

Aumentar el valor nutricional de las proteínas

- 15 La presente invención se relaciona con la mejora del valor nutricional de materiales vegetales, por ejemplo, que comprenden proteínas. Los materiales vegetales que se consideran que contienen proteínas son los granos y el material residual. El contenido de proteína de estos materiales de partida puede variar entre 6 y 50 % en peso sobre la base de materia seca para granos y entre 10 y 90 % en peso sobre la base de materia seca para materiales residuales. Sin embargo, también se pueden utilizar materiales de partida que tengan otros
20 contenidos de proteínas. El contenido de proteína del material de partida no es limitante para la presente invención.

Normalmente, el método de acuerdo con la presente invención no altera el contenido total de proteína del producto. Debido al calentamiento, el agua se evaporará, por lo que el contenido de proteína se determina en base a la materia seca (también llamado en base a la fracción seca del producto).

- 25 El método de tratamiento por RF de acuerdo con la presente invención tiene un efecto en el aumento del valor nutricional para los rumiantes, por ejemplo, disminuyendo la solubilidad de la proteína y aumentando la fracción de proteína que es resistente a la degradación microbiana en el rumen, pasando así al intestino delgado, lo que conduce a un mayor valor proteico absorbible y a un uso más eficiente de la proteína dietética.

- 30 La resistencia a la degradación microbiana en el rumen de un rumiante se determina *in situ* mediante la llamada prueba RUP (proteína no degradada del rumen). Sin embargo, estas pruebas son complicadas y de alto coste y, por lo tanto, los presentes inventores proponen una prueba de degradación ruminal de proteínas *in vitro* (también llamada prueba de Aufrère) que puede predecir los resultados de RUP. Esto reduce los costes y permite realizar una prueba sencilla para ver si un tratamiento de RF es más o menos exitoso que otro. En una realización, el RUP aumenta entre 10 y 60 unidades porcentuales.

- 35 Para tener una buena estimación de la digestión de proteínas en el intestino delgado, se lleva a cabo una prueba de digestibilidad proteica en el íleo *in vitro* (VIPD). El valor VIPD da una indicación de la fracción de proteína que se degrada enzimáticamente en el intestino delgado. Por lo tanto, sería beneficioso que el valor VIPD no disminuyera, lo que indica que no hay ningún efecto perjudicial sobre la digestión de proteínas en el intestino delgado.

- 40 El aumento del valor nutricional se puede determinar comparando la fracción de proteína que es resistente a la degradación microbiana en el rumen y la fracción de proteína que es digerible en el intestino. La fracción de resistencia ruminal se puede estimar mediante Aufrère *in vitro* o mediante la medición de la degradación ruminal *in situ* (RUP) y la fracción digestible se puede estimar mediante la digestibilidad proteica en el íleo *in vitro* (VIPD) o mediante la medición de la digestibilidad intestinal *in situ* (dRUP).

- 45 El valor nutricional se puede determinar comparando los valores de, por ejemplo, proteína digestible en el material de partida y en el producto tratado con RF. Los valores de proteína digestible o proteína digestible intestinal se estiman en función de la fracción de resistencia ruminal (estimada por Aufrère o *in situ* por RUP); y la digestibilidad de la fracción resistente al rumen en el intestino (estimada mediante digestibilidad proteica ileal *in vitro* (VIPD) o mediciones de digestibilidad *in situ* (dRUP). La digestibilidad del pienso en el intestino
50 delgado, que está directamente relacionada con la absorción de nutrientes por parte del animal, se determina determinando la cantidad de proteína que se digiere en el intestino.

- Se sabe que cuando un material que contiene proteínas se calienta, esto puede provocar una degradación de la lisina. Utilizando el método de acuerdo con la presente invención, el contenido de lisina del material vegetal puede disminuir dependiendo de la temperatura de calentamiento final. La lisina generalmente se considera un
55 aminoácido limitante para los rumiantes; por lo tanto, se prefiere limitar la disminución del contenido de lisina.

5 Cuanto mayor sea la temperatura utilizada (dentro de un cierto intervalo como se especifica anteriormente), mayor será el efecto en el aumento del valor nutricional de la proteína, pero también mayor será la disminución de la lisina. Esto conduce a una disminución simultánea del valor nutricional del material. Sin embargo, el presente inventor descubrió sorprendentemente que el valor nutricional general aún aumentaba debido al aumento de RUP. El presente inventor ha observado que debe existir un equilibrio entre el valor de RUP y el contenido de lisina seleccionando cuidadosamente la temperatura final y el tiempo de procesamiento. Esto se muestra con más detalle en los ejemplos.

Realizaciones para harina de soja, extraída

10 La harina de soja sin tratar, extraída, normalmente tiene un valor Aufrère de entre el 30 y el 55 %, por ejemplo, entre el 40 y el 53 %, dependiendo de las condiciones de producción en la planta de extracción. Se desea obtener un valor de Aufrère de entre 60 y 80 %, tal como entre 60 y 70 %, después del tratamiento de la presente invención.

Realizaciones para harina de colza, extraída

15 La harina de colza sin tratar, extraída, normalmente tiene un valor Aufrère de entre 60 y 65 %, dependiendo de las condiciones de producción en la planta de extracción. Se desea obtener un valor de Aufrère de entre 70 y 85 %, tal como entre 70 y 75 %, después del tratamiento de la presente invención.

Realizaciones para harina de colza, por expulsor

20 La harina de colza sin tratar, por expulsor, normalmente tiene un valor Aufrère de entre 20 y 35 %, dependiendo de las condiciones de producción en la planta de extracción. Se desea obtener un valor de Aufrère de entre 60 y 85 %, tal como entre 60 a 65 %, después del tratamiento de la presente invención.

Realizaciones para soja entera

La soja sin tratar suele tener un valor Aufrère de entre 10 y 20 %. Se desea obtener un valor de Aufrère de entre 40 y 75 %, preferiblemente entre 50 % y 65 % después del tratamiento de la presente invención.

Realizaciones para maíz entero

25 El maíz no tratado suele tener un valor Aufrère de entre 70 y 75 %. Se desea obtener un valor de Aufrère de entre 75 % y 85 % después del tratamiento de la presente invención.

Realizaciones para trigo entero

El trigo no tratado suele tener un valor Aufrère de entre 45 y 55 %. Se desea obtener un valor de Aufrère de entre 55 % y 70 %, tal como entre 60 % y 70 %, después del tratamiento de la presente invención.

30 Realizaciones para cebada entera

La cebada sin tratar suele tener un valor Aufrère de entre 55 y 65 %. Se desea obtener un valor de Aufrère de entre 70 % y 85 %, después del tratamiento de la presente invención.

Aumentar el valor nutricional del almidón

35 Además de los ingredientes del pienso que contienen proteínas, varios materiales para pienso también contienen almidón. El presente inventor descubrió sorprendentemente que el calentamiento por RF también tiene un efecto beneficioso sobre el almidón. Por lo tanto, también es un aspecto de la presente invención utilizar calentamiento por RF para aumentar el valor nutricional del almidón de materiales vegetales para su uso como pienso para rumiantes.

40 Los materiales vegetales que se consideran que contienen proteínas y almidón son los siguientes: granos de cereales, la mayoría de las legumbres, tubérculos y residuos de estos. El contenido de proteína de estos materiales puede variar entre 8 y 70 % en peso sobre la base de materia seca. El contenido de almidón de estos materiales de partida puede variar entre 12 y 80 % en peso sobre la base de materia seca. Sin embargo, también se pueden utilizar materiales de partida que tengan otros contenidos de almidón y/o proteínas. El contenido de almidón y/o proteína del material de partida no es limitante para la presente invención.

45 Normalmente, el método de acuerdo con la presente invención no altera el contenido total de proteína y/o almidón del producto. Debido al calentamiento, el agua se evaporará, por lo que el contenido de proteína y/o almidón se determina en base a la materia seca.

50 En la mayoría de los sistemas de evaluación de pienso holandeses, el valor del almidón dietético aumenta cuando más almidón escapa a la degradación en el rumen y se digiere enzimáticamente en el intestino delgado. El almidón se hidroliza en moléculas de glucosa y éstas se absorben en el intestino delgado y sirven como

nutrientes glucogénicos, lo que generalmente conduce a una producción de leche (proteína) más eficiente. Por lo tanto, sería beneficioso aumentar la fracción de almidón no degradable del rumen (RUS) sin efectos perjudiciales sobre la digestión del almidón en el intestino delgado.

Aumentar el valor nutricional de las grasas

- 5 Además de los ingredientes del pienso que contienen proteínas o almidón, varios materiales para alimentos también contienen grasa. El presente inventor descubrió sorprendentemente que el calentamiento por RF también tiene un efecto beneficioso sobre la grasa. Por lo tanto, también es un aspecto de la presente invención utilizar calentamiento por RF para aumentar el valor de la grasa nutricional de materiales vegetales para uso como alimento para rumiantes.
- 10 Los materiales vegetales que se consideran ricos en proteínas y grasas son los siguientes: soja, colza, semillas de lino (linaza), semillas de cártamo y de girasol. El contenido de proteína de estos materiales puede variar entre 10 y 40 % en peso sobre la base de la materia seca. El contenido de grasa de estos materiales de partida puede variar entre el 20 y el 50 % en peso respecto a la materia seca. Sin embargo, también se pueden utilizar materiales de partida que tengan otros contenidos de grasa y/o proteína. El contenido de grasa y/o proteína del material de partida no es limitante para la presente invención.
- 15

Normalmente, el método de acuerdo con la presente invención no altera el contenido total de proteína y/o grasa del producto. Debido al calentamiento por RF, el agua se evaporará, por lo que el contenido de proteína y/o grasa se determina en base a la materia seca. Sería beneficioso si la fracción de grasa no degradable del rumen (RUF) aumentara sin efectos perjudiciales sobre la digestión de la grasa en el intestino delgado.

- 20 El valor de la grasa dietética aumenta cuando la grasa está protegida en el rumen.

Análisis

Análisis químicos

Se han llevado a cabo varios análisis químicos en laboratorios para proporcionar información sobre los materiales de partida, así como los productos. Estas técnicas se discutirán con más detalle a continuación.

- 25 Contenido de humedad: Esto se relaciona con la cantidad de agua. Existe una diferencia en el contenido de humedad del material de partida y del producto, ya que debido al calentamiento el agua se evapora. El contenido de humedad del material de partida depende del tipo y la fuente del material de partida. El contenido de humedad se determina mediante el método de acuerdo con el EU Regulation (EC) No. 152/2009, Annex III, L54/12-14 (2009).
- 30 Contenido de proteína cruda: El contenido de proteína se determina mediante el llamado método de proteína cruda (N x 6.25). El contenido de proteína puede determinarse tanto para el material de partida y/o el producto. La determinación se realiza partiendo del supuesto de que las proteínas contienen un 16 por ciento de nitrógeno. El análisis se lleva a cabo según el método descrito en EU Regulation (EC) No. 152/2009, Annex III, L54/15-19 (2009).
- 35 Contenido de almidón: El contenido de almidón se determina utilizando la norma ISO 15914:2004 "Enzymatic determination of total starch content". El contenido de almidón se determina tanto para el material de partida y/o para el producto.
- Contenido de lisina (g/kg) se determina de acuerdo con el método de aminoácidos totales divulgado en la norma ISO13903 (2005).
- 40 Contenido de grasa: EU guideline 152/2009 27 januari 2009; appendix III H L54 /37-39.

Análisis *in vitro*

Se han llevado a cabo varios análisis *in vitro* en laboratorios con el fin de obtener una estimación del aumento del valor nutricional de los materiales vegetales tratados con RF de acuerdo con la invención. Estas técnicas simulan el comportamiento de los nutrientes en el animal y se discutirán con más detalle a continuación.

- 45 Degradación de proteínas en el rumen *in vitro*: Esto se relaciona con la proteína no degradada en el rumen (RUP). Se utiliza la prueba de Aufrère, que es una técnica enzimática de laboratorio estandarizada para determinar la degradabilidad de las proteínas con el fin de evaluar y predecir la degradabilidad ruminal de diversas fuentes de proteínas (Aufrère and Cartailier, 1988; Aufrère et al., 1991; Cone et al., 1996). En la presente descripción, el valor RUP y Aufrère se utilizan como sinónimos. En la presente invención se utiliza el método Aufrère tal como se especifica aquí:
- 50

Esta prueba se basa en la medición de la hidrólisis de proteínas. Las muestras se hidrolizan con una proteasa en un regulador básico. Se prepara un regulador de borato-fosfato (pH 8.0) utilizando 21.6 g de

5 dihidrogenofosfato de sodio y 17.8 g de tetraborato de sodio disueltos en 1.5 L de agua en donde el pH se ajusta utilizando NaOH 4M. Se prepara una solución de tetraciclina de 10 mg/ml en dicho regulador. Se mezclan una solución de 12.3 mg de proteasa (de *Streptomyces griseus*), 10 mg de nistatina suspendidos en una pequeña cantidad de regulador borato-fosfato, 10 ml de solución de tetraciclina con el regulador hasta alcanzar 1 litro. La solución enzimática se debe llevar a 40 ° C y se pesan con precisión aproximadamente 500 mg de la muestra a medir en un recipiente de vidrio y se agregan 50 ml de la solución enzimática. Como blanco se toma únicamente la solución enzimática sin muestra. Las muestras se incuban durante un período de 24 horas a 40 ° C en un baño de agua. La muestra se agita suavemente a las 1, 6 y 23 horas durante 4 minutos a 60 rpm. El vidrio que contiene la muestra se transfiere cuidadosamente a un baño de hielo durante 10 minutos y luego la muestra se filtra sobre un filtro de papel. Del filtrado se toman 25 ml y se añaden dos comprimidos Kjeldahl C (5 g K₂SO₄ + 0.1 g CuSO₄·5H₂O) y se añaden 20 ml de ácido sulfúrico al 96 % para destruir los aminoácidos. Éste se calienta/evapora a 150 ° C durante 1 noche. La cantidad de nitrógeno restante en la muestra se determina mediante el método Kjeldahl utilizando un Kjeltac 2400KT de Foss de acuerdo con el EU Regulation (EC) No. 152/2009, Annex III, L54/15-19 (2009). Para calibrar un lote específico de proteasa utilizado, se debe probar una muestra que tenga una cantidad conocida de nitrógeno.

Digestibilidad en el íleo *in vitro* de proteínas (VIPD): Esta característica se relaciona con la digestibilidad de las proteínas en el intestino delgado de los animales. Esta prueba comprende un tratamiento enzimático estandarizado de laboratorio del material vegetal, y la digestibilidad proteica ileal *in vitro* del material vegetal es luego dada por la fracción proteica del material que se disuelve mediante el tratamiento enzimático.

20 En la presente invención, la prueba VIPD se realiza a 39 ± 0.5 ° C y comprende dos fases principales, es decir: 1) simulación del estómago; implica la digestión de proteínas por pepsina a pH 3 durante 1 hora; 2) simulación del intestino delgado; implica la digestión de proteínas por pancreatina (incluyendo actividad de amilasa, quimotripsina, tripsina y lipasa) a pH 6.5 durante 2 horas.

Las etapas específicas de esta prueba son las siguientes:

- 25 (i) preparar una suspensión de 1 g del material vegetal a probar y 40 mL de una solución acuosa de pepsina con una concentración de 0.081 % m/v;
- (ii) mezclar la cantidad de ácido clorhídrico 1M necesaria para acidificar la suspensión a pH 3.0;
- (iii) dejar que la suspensión reaccione durante 1 hora a aproximadamente 39 ° C agitándola cada 15 minutos con una varilla de vidrio;
- 30 (iv) añadir 2.5 ml de regulador de fosfato 1 M pH 6.6 y 2.5 ml de una suspensión preparada utilizando 24 g de pancreatina (de cerdo) y 0.15 g de sales biliares en 150 ml de agua;
- (v) dejar reaccionar la suspensión durante 2 horas a aproximadamente 39 ° C agitándola cada 15 minutos con una varilla de vidrio;
- (vi) añadir 5 ml de solución de carbonato de sodio al 10 % p/v y agitando con una varilla de vidrio;
- 35 (vii) filtrar la suspensión sobre un filtro de vidrio P-2 (con Filteraid® de aproximadamente 1.5 cm en la parte superior del filtro);
- (viii) complementar el filtrado con agua para obtener un volumen total de 250 ml y mezclar;
- (ix) mezclar 50 ml del filtrado, dos comprimidos Kjeldahl C (5 g K₂SO₄ + 0.1 g CuSO₄·5H₂O) y añadir 20 ml de ácido sulfúrico al 96 % para destruir la proteína. Éste se calienta/evapora a 150 ° C durante 1 noche;
- 40 (x) determinar la cantidad de nitrógeno en el filtrado mediante el método Kjeldahl utilizando un Kjeltac 2400KT de Foss de acuerdo con el EU Regulation (EC) No. 152/2009, Annex III, L54/15-19 (2009);
- (xi) para corregir la cantidad de proteína agregada por las enzimas utilizadas, se debe tomar una muestra en blanco para la prueba;
- (xii) Luego se calcula la digestibilidad proteica *in vitro* (VIPD) como la cantidad relativa de proteína que se ha solubilizado durante esta prueba.

45 *Análisis in situ (in sacco)*

Se han llevado a cabo análisis *in situ* en animales por institutos especializados.

50 Degradación ruminal *in situ*: la cantidad de un nutriente que se degrada (por ejemplo, proteína (RUP), almidón (RUS) o grasa (RUF)), después de someter una muestra de un material a la prueba de degradación *in situ*, medida de acuerdo con el Protocolo Holandés de 2003 para Incubaciones Ruminales *In Situ*: Determinación de la tasa de degradación y fracciones lavables de proteínas, almidón, paredes celulares y fracción orgánica

residual (en holandés: Protocol voor in situ pensincubatie: bepaling van afbraaksnelheid en uitwasbare fracties van eiwit, zetmeel, celwanden en organische restfractie; 10 december 2003, Centraal Veervoederbureau, Lelystad, pages 1-14). La cantidad del nutriente que no se degrada en esta prueba se define como no degradable en el rumen, es decir, RUP para proteína no degradable en el rumen, RUS para almidón no degradable en el rumen y RUF para grasa no degradable en el rumen. Para este método se utiliza una técnica de bolsa de nailon *in situ*. Se utilizaron vacas de prueba que tenían una cánula ruminal. Se utilizaron al menos 5 tiempos de incubación diferentes en el rumen; se incubaron de 20 a 35 bolsas de nailon por vaca. Después de la incubación en el rumen, el material que contenía las bolsas de nailon se colocó en agua helada; seguido de su congelación. Posteriormente, después de descongelar las bolsas, se lavaron utilizando una lavadora estándar con agua a temperatura ambiente, sin centrifugar. Después de lavar el material que contenía las bolsas de nailon, se liofilizaron. El material residual de las bolsas se reunió por animal y se molió a través de mallas de 1 mm; los residuos se analizaron para determinar el contenido de nutrientes específico.

Digestibilidad intestinal *in situ* (dRUP): Esta es la cantidad de proteína que se digiere en los intestinos. Se utilizó la técnica de bolsa de nailon *in situ* y como punto de partida se utilizaron bolsas de nailon que fueron sometidas a la prueba de degradación de proteínas ruminales *in situ* (16 horas) y posterior tratamiento con pepsina-HCl para simular el paso por el abomaso. El presente estudio *in situ* proporciona información valiosa sobre la cantidad de proteína que se absorbe en los intestinos; un aumento de este valor significa un aumento del valor nutricional del material para pienso. El dRUP se expresa en un porcentaje (%) de la cantidad de RUP y se estima utilizando el método divulgado en Animal (2014), 8:11, pp 1839-1850: "The energy and protein value of wheat, maize and blend DDGS for cattle and evaluation of predicting methods" by J. L. De Boever, M. C. Blok, S. Millet, J. Vanacker and S. De Campeneere. Se calcula por vaca de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\frac{(\text{adentro(gramo)} * \text{CPC}) - (\text{Afuera(gramo)} * \text{CPC})}{\text{Adentro(gramo)} * \text{CPC}}$$

$$\text{Adentro(gramo)} * \text{CPC}$$

En donde "In(gramo)" es la suma de todos los residuos ruminales pesados, siendo el contenido de las bolsas de nailon que quedaron después de la prueba de degradación de proteínas ruminales *in situ* (16 horas) en gramos. En donde el CPC representa el contenido de proteína cruda y es la fracción del peso total que es proteína (por ejemplo, un contenido de proteína del 16 % da un CPC de 0.16). En donde "afuera(gramo)" es la suma de todos los residuos intestinales pesados, siendo el contenido de las bolsas móviles de nailon que quedaron después de la prueba de digestibilidad intestinal *in situ* en gramos. Se utilizaron vacas que tenían una cánula en T en la parte superior del duodeno. Se incubaron diez bolsas por residuo por vaca. Inmediatamente antes de la inserción en el duodeno, las bolsas se sumergieron en una solución de pepsina-0.1 N HCl a 39 ° C para simular la digestión en el abomaso. Cada 20 minutos se incubaron cuatro bolsas en el duodeno. Después de su paso por los intestinos, las bolsas se recuperaron casi directamente de las heces, se enjuagaron y se congelaron. Tras descongelarlos se lavaron intensamente en máquina de lavado al menos cuatro veces utilizando agua a 40 ° C y finalmente centrifugando a 700 rpm. Después de la liofilización, la agrupación por animal y la molienda a través de 1 mm, los residuos se analizaron para determinar el contenido de proteína cruda.

Ejemplos

Como se ha especificado anteriormente, la presente invención se relaciona con un método para incrementar el valor nutricional de un material vegetal residual y utilizar dicho material tratado como un pienso para rumiantes. Para aumentar el valor nutricional de dicho material vegetal residual, dicho material se calienta mediante radiación en el intervalo de radiofrecuencia.

En la siguiente sección los ejemplos están numerados de acuerdo con el material vegetal utilizado. Ejemplos 1 utilizan harina de soja, extraída (SME); Ejemplos 2 utilizan harina de colza, extraída (RME); Ejemplos 3 utilizan harina de soja, por expulsor (SMP); Ejemplos 4 utilizan harina de colza, por expulsor (RMP); Ejemplos 5 utilizan soja entera; Ejemplos 6 utilizan colza entera; Ejemplos 7 utilizan maíz molido; Ejemplos 8 utilizan maíz entero; Ejemplos 9 utilizan trigo molido; Ejemplos 10 utilizan trigo entero; Ejemplos 11 utilizan cebada entera; Ejemplos 12 utilizan proteína de patata (PP); Ejemplos 13 utilizan guisantes (P); Ejemplos 14 utilizan altramuces dulces (SL); Ejemplos 15 harina de pasto deshidratado (DGS), Ejemplos 16 utilizan harina de alfalfa deshidratada (DAM), Ejemplos 17 utilizan pienso de gluten de maíz (CGF), Ejemplos 18 utilizan salvado de trigo (WM), Ejemplos 19 utilizan harina de semilla de girasol extraída (SSME); Ejemplos 20 utilizan DDGS de maíz (DDGSC). Los ejemplos con un asterisco son ejemplos comparativos que no están tratados, esto se denota con "-" en la columna de Temperatura Final.

En todos los ejemplos, el material vegetal fue sometido a radiación en el intervalo de radiofrecuencia, a una frecuencia de 27.12 MHz. La temperatura máxima a la que se calentaron las muestras mediante radiación de RF se denomina "temperatura final" (T_f), y el tiempo necesario para alcanzar dicha 'Temperatura Final', o el tiempo de irradiación se denomina 'Tiempo de Procesamiento' (t_p). Durante este tiempo de procesamiento el material vegetal se irradia con RF. Cabe señalar que, con ajustes constantes del equipo de RF, cuanto mayor sea el tiempo de procesamiento, mayor será la temperatura final.

Primeras pruebas: prueba de concepto *in vitro*

En los ejemplos 1-10, se sometieron dos kilogramos de un material vegetal a radiación de RF. Estos experimentos muestran el efecto del tratamiento por RF sobre el valor nutricional y muestran el efecto de diferentes temperaturas finales/tiempos de procesamiento. Para cada uno de estos ejemplos, se determinaron la proteína cruda seca (CP seca; es decir, la cantidad de proteína en gramos por kilogramo de materia seca del material) y el valor de Aufrère (unidades porcentuales %) para el material sin tratar (*); los ejemplos comparativos; y después del tratamiento por RF a cuatro temperaturas finales diferentes: 90 ° C (a); 110 ° C (b); 130 ° C (c); y 150 ° C (d). Los resultados se muestran en las Tablas 1a-1c a continuación.

Es claro de la Tabla 1a que, para la harina de soja, extraída (Ejemplo 1), harina de colza, extraída (Ejemplo 2) y harina de soja, por expulsor, el valor de Aufrère aumenta significativamente; más pronunciado a una temperatura final de 150 ° C. Además, el contenido de proteína cruda prácticamente no se ve afectado. Todos estos ejemplos sirven para preparar un material tratado con RF que luego se utilizará como pienso para rumiantes.

Tabla 1a

Ej.	Material [#]	T _f (° C)	t _p (min)	CP seco (g/kg DM)	Aufrère (%)
1*	SME	-	-	514	41.8
1a	SME	90	13.5	510	39.1
1b	SME	110	15.5	512	43.4
1c	SME	130	25	510	61.1
1d	SME	150	36	509	70.3
2*	RME	-	-	394	65.1
2a	RME	90	8.5	392	63.7
2b	RME	110	11.5	389	64.6
2c	RME	130	19.5	390	67.6
2d	RME	150	30	391	76.3
3*	SMP	-	-	448	53.9
3a	SMP	90	12	446	60.3
3b	SMP	110	13.5	446	60.6
3c	SMP	130	18	447	64.5
3d	SMP	150	26	445	65.3
# SME = Harina de soja, extraída; RME = Harina de colza, extraída; SMP = Harina de soja, por expulsor.					

Tabla 1b

Ej.	Material [#]	T _f (° C)	t _p (min)	CP seco (g/kg/DM)	Aufrère (%)
4*	RMP	-	-	382	23.9
4a	RMP	90	12	381	23
4b	RMP	110	14	379	29.9
4c	RMP	130	22.5	377	34.7
4d	RMP	150	31	378	61.6
5*	S	-	-	396	11.5

ES 3 014 044 T3

5a	S	90	12.5	399	35.9
5b	S	110	17	400	44.5
5c	S	130	22	404	50.8
5d	S	150	25	400	58.1
6*	R	-	-	210	34.5
6a	R	90	22	211	32.4
6b	R	110	26.5	211	33
6c	R	130	34	211	39.4
6d	R	150	44.5	210	59.2
7*	CG	-		80	72.7
7a	CG	90	13.5	83	76.2
7b	CG	110	22	83	76.5
7c	CG	130	38	82	79.9
7d	CG	150	56	81	84.0
# RMP = Harina de colza, por expulsor; S = Soja; R = Colza; CG = Granos de maíz molidos					

Es claro de la Tabla 1b que, para la harina de colza, por expulsor (Ejemplo 4), soja entera (Ejemplo 5), colza entera (Ejemplo 6) y el maíz molido (Ejemplo 7) el valor de Aufrère aumenta significativamente; más pronunciado a una temperatura final de 150 ° C. Además, el contenido de proteína cruda prácticamente no se ve afectado.

5

Tabla 1c

Ej.	Material [#]	T _f (° C)	t _p (min)	CP seco (g/kg/DM)	Aufrère (%)
8*	CW	-	-	81	70.2
8a	CW	90	18	82	75.8
8b	CW	110	24	82	78.0
8c	CW	130	41	83	81.2
8d	CW	150	55	82	82.5
9*	WG	-	-	137	54.0
9a	WG	90	17	137	60.3
9b	WG	110	24.5	137	60.0
9c	WG	130	43	134	62.0
9d	WG	150	69	136	67.5
10*	WW	-	-	138	48.9
10a	WW	90	26	139	46.1
10b	WW	110	36.5	137	47.6
10c	WW	130	55	137	56.1

ES 3 014 044 T3

10d	WW	150	85	138	59.4
# CW = Granos de maíz enteros; WG = Trigo molido; WW = Trigo entero.					

Es claro de la Tabla 1c que, para los granos de maíz enteros (Ejemplo 8), trigo molido (Ejemplo 9) y trigo entero (Ejemplo 10) el valor de Aufrère aumenta significativamente; más pronunciado a una temperatura final de 150 ° C. Además, el contenido de proteína cruda prácticamente no se ve afectado. Por tanto, las Tablas 1a-1c muestran que, al utilizar el método de acuerdo con la presente invención, el valor de la resistencia a la degradación de proteínas *in vitro* (Aufrère) aumenta, sin un cambio en el contenido de proteína cruda. Esto significa que el valor nutricional aumenta. A continuación, se muestra más información sobre las pruebas *in situ*.

Pruebas *in situ* para la proteína no degradable del rumen, así como el contenido de lisina

Como se discutió anteriormente, es importante tener un porcentaje lo más grande posible de proteína que se desvíe del rumen para que pueda ser absorbida en los intestinos. Esto aumenta el valor nutricional del pienso. Además, dado que generalmente se considera que la lisina es un aminoácido limitante para los rumiantes, se prefiere limitar la disminución del contenido de lisina. Por lo tanto, es necesario aumentar el % de RUP, minimizando al mismo tiempo la disminución del contenido de lisina expresado como % de la proteína cruda.

Para tres materiales vegetales ya probados anteriormente (harina de soja, extraída/Ejemplo 1; harina de colza, extraída/Ejemplo 2, y harina de colza, por expulsor/Ejemplo 4) se determinó el contenido de lisina y el valor de RUP *in situ*; se utilizó el mismo lote de material que en los ejemplos divulgados en las Tablas 1. Dos kilogramos de material vegetal fueron sometidos a radiación por RF o se dejaron sin tratar (*). El contenido de lisina (g de lisina por kg de materia seca de muestra), porcentaje de lisina en la proteína cruda (Lys % CP), RUP (%) y la fracción de lisina no degradable en el rumen (RU lys seca) en base a la materia seca se calculan en base a RUP. La tabla 2 muestra los resultados. Es muy claro de la Tabla 2 que hay un aumento significativo en el valor de RUP, lo que indica que el valor nutricional aumenta significativamente. También está claro que el contenido de lisina en la materia seca disminuye ligeramente con el tratamiento por RF. Sin embargo, el contenido de RU Lys en la materia seca aumenta con el tratamiento por RF. Además, a partir de estos datos se puede concluir que la prueba de Aufrère, que ya indica un aumento de la proteína no degradable en el rumen en las Tablas 1, es un buen indicador *in vitro* del valor de RUP *in situ*.

Tabla 2

Ej.	Lys (g/kg dm)*	Lys % CP	RUP (%)	RU Lys seco (g/kg dm)*
1*	30.9	6.07	41.4	12.8
1c	29.8	5.86	56.0	16.7
1d	27.5	5.36	70.3	19.3
2*	21.4	5.49	48.7	10.4
2c	20.4	5.21	59.0	12.0
2d	17.6	4.50	74.5	13.1
4*	22.9	6.0	11.2	2.6
4c	21.8	5.7	20.0	4.4
4d	18.5	4.9	59.9	11.1
* g/kg dm = g/kg de materia seca				

Determinación del aumento del valor nutricional de proteínas, almidón y grasas

Se llevaron a cabo varias pruebas con un lote diferente (2 kg) de materiales (los mismos que se usaron en la Tabla 1, es decir, ejemplos sin acento' o lotes diferentes, es decir, ejemplos con acento'). Los resultados se muestran en la Tabla 3, incluyendo proteína cruda (CP sobre materia seca), almidón (sobre materia seca), resistencia a la degradación de proteínas *in vitro* (Aufrère), resistencia a la degradación de proteínas, almidón y grasa *in situ* (RUP, RUS y RUF respectivamente), digestibilidad de proteína no degradada en el rumen (dRUP) y digestión de proteínas en el íleo *in vitro*.

Tabla 3

Ej.	T _f (°C)	t _p (min)	CP seco (g/kg DM)	Almidón seco (g/kg)	Aufrère (%)	RUP (%)	RUS (%)	RUF (%)	dRUP (%)	VIPD (%)
1*	-	-	514	-	41.8	41.4	-	-	98.4	>99
1'a	130	10	510	-	61.1	56	-	-	99.1	>99
1'b	150	15	520	-	69.0	63.9	-	-	99.3	95
1'c	160	18	518	-	69.8	73.3	-	-	98.7	91
1'd	180	21	527	-	73.1	79.0	-	-	85.7	74
2*	-	-	394	-	65.1	48.7	-	-	84.8	93
2'a	130	19.5	390	-	67.6	59.0	-	-	88.2	95
2'b	150	30	391	-	76.3	74.5	-	-	89.3	81
4*	-	-	382	-	23.9	11.2	-	-	24.8	96
4'a	130	22.5	377	-	34.7	20.0	-	-	49.4	>99
4'b	150	31	378	-	61.6	59.9	-	-	84.1	>99
5' *	-	-	425	-	17.4	22.8	-	9.80	94.4	>99
5'a	140	9	431	-	53.2	40.1	-	25.1	98.5	91
5'b	160	13	431	-	62.8	46.3	-	32.5	98.8	92
5'c	180	23	443	-	68.2	53.9	-	41.0	84.8	70
8' *	-	-	90	703	71.6	42.4	31.3	-	93.0	87
8'a	120	11	90	720	78.8	52.3	34.3	-	93.3	94
8'b	160	22	88	699	83.1	63.3	42.7	-	85.6	82
8'c	180	31	89	707	85.9	69.5	46.6	-	77.4	67
10' *	-	-	125	683	50.9	20.5	5.2	-	65.8	89
10'a	120	11.0	125	672	60.3	43.4	15.8	-	92.9	92
10'b	160	24.0	126	676	63.8	58.5	28.6	-	94.4	90
10'c	180	34.0	126	672	61.0	64.3	32.4	-	90.3	83
11' *	-	-	106	630	59.0	24.6	10.4	-	74.5	90
11'a	140	12.5	109	621	73.5	47.1	17.5	-	90.3	88
11'b	160	17	107	622	76.1	50.8	21.2	-	91.2	80

Es claro de la tabla anterior que la prueba de Aufrère es un buen indicador de la fracción de proteína no degradable medida por RUP. La Tabla muestra que el método de acuerdo con la presente invención es muy adecuado para aumentar los valores nutricionales de los materiales vegetales para proteínas, almidón y grasas.

5

Determinación del efecto del tratamiento con RF en varios materiales vegetales diferentes

Se probaron varios materiales vegetales adicionales (es decir, proteína de patata, guisantes, altramuces dulces, harina de pasto deshidratado, harina de alfalfa deshidratada, pienso de gluten de maíz, salvado de trigo, harina

de semilla de girasol extraída y DDGS de maíz). Los resultados se muestran en la Tabla 4 para materiales sin tratar y tratados con RF (a varias temperaturas).

Es claro de la tabla anterior que la presente invención es muy adecuada para aumentar el valor nutricional de muchos tipos diferentes de materiales vegetales.

5

Tabla 4.

Ej.	T _f (°C)	t _p (min)	CP seco (g/kg)	Aufrère (%)
12*	-	-	819	93.5
12a	130	15	806	94.3
12b	150	30	808	94.5
12c	170	48	808	94.6
13*	-	-	195	23.3
13a	130	36	210	31.5
13b	150	46	209	40.4
13c	170	23	208	56.2
14*	-	-	368	15.8
14a	130	23	363	16.0
14b	150	35	366	14.8
14c	170	52	375	19.4
15*	-	-	216	37.0
15a	130	13	216	38.8
15b	150	15	220	49.5
15c	170	21	222	57.2
16*	-	-	177	57.9
16a	130	8	176	62.5
16b	150	10	177	63.2
16c	170	16	182	65.2
17*	-	-	209	33.5
17a	130	7	212	34.4
17b	150	8	209	36.4
17c	170	10	215	42.3
18*	-	-	173	47.2
18a	130	13	174	58.3
18b	150	25	171	61.7
18c	170	34	173	66.3
19*	-	-	312	21.3
19a	130	12	320	24.3

ES 3 014 044 T3

19b	150	19	319	26.8
19c	170	29	311	36.6
20*	-	-	311	69.2
20a	130	6	316	71.6
20b	150	7	316	76.1
20c	170	8	319	73.2

Determinación del efecto del tratamiento con RF sobre mezclas de materiales vegetales, análisis *in vitro*

Se han preparado y probado *in vitro* varias mezclas de materiales vegetales para Aufrère, los resultados se muestran en la Tabla 5. Se proporciona una mezcla rica en proteínas (mezcla A) a base de harina de soja, extraída y harina de colza, extraída (50/50 p/p). Se proporciona una mezcla que comprende material vegetal rico en proteínas y rico en almidón (Mezcla B) a base de harina de soja y trigo molido (50/50 p/p). Se proporciona una mezcla que comprende material vegetal rico en proteínas y que contiene almidón (Mezcla C) a base de harina de soja, extraída y pienso de gluten de maíz (50/50 p/p). Se proporciona un pienso en compuesto rico en proteínas (Mezcla D) a base de harina de soja, extraída; harina de colza, extraída; pulpa de cítricos, trigo molido, harina de palmiste y vinazas (45/10/20/20/4/1 p/p).

Tabla 5

Mezcla	T _f (°C)	t _p (min)	CP seco (g/kg DM)	Aufrère (%)
A	-	-	454	55.0
A	130	15	453	63.1
A	150	22	454	72.0
A	170	31	457	76.8
B	-	-	335	56.1
B	130	13	339	65.4
B	150	27	350	77.3
B	170	25	335	78.6
C	-	-	363	45.2
C	130	9	366	53.4
C	150	11	372	62.6
C	170	15	373	66.9
D	-	-	328	56.8
D	130	14	326	62.2
D	150	26	332	72.5
D	170	41	329	75.6

Es claro de la tabla anterior que la presente invención es muy adecuada para aumentar el valor nutricional de mezclas de diferentes tipos de materiales vegetales.

15 Ensayo en animales para determinar el efecto del pienso tratado con RF sobre la calidad de la leche

Se llevó a cabo un ensayo en animales utilizando harina de soja tratada y no tratada (extraída). Para el ensayo con animales, un lote de harina de soja se dividió en dos partes: una parte permaneció sin tratar y la otra fue tratada con RF.

5 En el ensayo con animales se utilizaron 32 vacas lecheras en lactancia del hato lechero de Dairy Campus en Lelystad (Países Bajos); las vacas se dividieron en dos grupos de 16 vacas, un grupo de prueba (pienso con harina de soja tratada con RF) y un grupo de control (alimentado con harina de soja sin tratar). Los resultados se muestran en la Figura 1 que tiene en el eje X el número de semanas y en el eje Y la producción de proteína de leche en gramos/vaca/día.

El período de prueba se dividió en los siguientes períodos:

- 10
- período de adaptación (2 semanas); las vacas se acostumbran al establo utilizado para el experimento;
 - pre-período (PP) (2 semanas; semana 3-4); todas las vacas recibieron la misma dieta;
 - período de transición (1 semana; semana 5); las vacas cambiaron gradualmente a los piensos experimentales (sin tratamiento o tratados);
- 15
- período principal (9 semanas, semana 6-15); las vacas de ambos grupos fueron alimentadas con piensos experimentales (sin tratamiento o tratados).

Las vacas recibieron una ración parcialmente mezclada (PMR) en contenedores RIC (Roughage Intake Control, Insentec, Marknesse). El PMR contenía un 7 % de harina de soja sin tratar o un 7 % de harina de soja tratada con RF (en base a materia seca). La composición del PMR se muestra en la siguiente tabla.

Ración mixta parcial (PMR)	Contenido de materia seca	% de peso en base a materia seca	
		control	prueba
Ensilaje de pasto	326	32.3	32.3
Ensilaje de maíz	365	48.5	48.5
Paja de trigo	900	10.8	10.8
Mezcla de minerales 1	990	0.75	0.75
Mezcla de minerales 2	990	0.54	0.54
Harina de soja sin tratar	890	7	
Harina de soja tratada con RF	976		7
Sal	990	0.22	0.22
Total		100	100

20 El experimento se realizó como un diseño de bloques completamente al azar con dos animales por bloque. Los datos de consumo de pienso y producción de leche del período anterior se utilizaron para asignar las vacas a los dos grupos de tratamiento para el período principal. Las vacas fueron asignadas a tratamientos dietéticos (y bloques) según la paridad, producción de proteína de leche (kg/día), días en leche y peso corporal.

25 Además del PMR, todas las vacas consumieron 0.9 kg de DM por vaca por día de un pienso en compuesto suministrado en la sala de ordeño y todas las vacas recibieron un pienso en compuesto adicional en comederos automáticos. Estos piensos en compuesto eran los mismos para todas las vacas. La cantidad de este pienso en compuesto adicional variaba por bloque, dependiendo del nivel de producción de leche de ese bloque. Dentro de un bloque de vacas la suplementación adicional de pienso en compuesto fue la misma. En promedio, las vacas consumieron 13.3 kg de materia seca de PMR por vaca por día, lo que corresponde a 0.93 kg/materia

30 seca de harina de soja (sin tratar o tratada con RF). En promedio, las vacas en ambos tratamientos consumieron 7.5 kg de materia seca adicional de pienso en compuesto mediante los comederos automáticos, lo que resultó en una ingesta diaria total promedio de pienso de 21.7 kg de materia seca.

35 Las vacas que recibieron harina de soja tratada con RF produjeron más proteína de leche (g/vaca/día) que las vacas que recibieron harina de soja no tratada (ver figura 1). En promedio, las vacas que recibieron harina de soja tratada con RF produjeron 49 gramos de proteína de leche por vaca por día más que las vacas que

recibieron harina de soja no tratada ($P = 0.056$). Esto muestra claramente el efecto beneficioso del tratamiento de la presente invención sobre el aumento del valor nutricional.

- 5 De los ejemplos se desprende claramente que el método de acuerdo con la presente invención aumenta el valor nutricional del material vegetal tratado que se utiliza como pienso para rumiantes y, por lo tanto, uno o más objetos de la presente invención se logran mediante el presente método, lo que se explica con más detalle en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para utilizar un material vegetal como un pienso para rumiantes disminuyendo la solubilidad proteica de dicho material vegetal y aumentando la fracción proteica resistente a la degradación microbiana en el rumen de los rumiantes, comprendiendo el método someter un material vegetal a un calentamiento directo por medio de radiación en el intervalo de radiofrecuencia (RF) y utilizar dicho material vegetal así tratado como pienso para rumiantes, comprendiendo dicho sometimiento de dicho material vegetal las etapas de:
 - i) proporcionar un material vegetal que tenga un valor de Aufrère inicial medido de acuerdo con el método en la descripción, y
 - ii) someter el material vegetal de i) a un calentamiento directo mediante radiación en el intervalo de radiofrecuencia obteniendo de esta manera un material vegetal tratado con RF,en donde en la etapa ii) el tiempo de procesamiento está entre 5 minutos y 1.5 horas y el intervalo de la radiación de radiofrecuencia está entre 10 MHz y 50 MHz para lograr una temperatura del material de entre 110 ° C y 170 ° C, de tal manera que el valor de Aufrère del material vegetal tratado con RF obtenido después de la etapa ii) medido de acuerdo con el método en la descripción se incrementa en comparación con el valor de Aufrère inicial del material vegetal de la etapa i).
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tiempo de procesamiento del material vegetal sometido a calentamiento por medio de radiación en el intervalo de radiofrecuencia está entre 10 minutos y 1.5 horas, tal como entre 20 minutos y 1 hora, más preferiblemente entre 20 minutos y 50 minutos, tal como entre 20 minutos y 35 minutos.
3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el intervalo de radiación de radiofrecuencia es 27.12 MHz $\pm$ 0.6 %.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el material vegetal se selecciona entre granos, tubérculos y materiales vegetales residuales y una o más combinaciones de estos.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el material vegetal residual es un residuo del procesamiento de granos, preferiblemente un residuo del procesamiento de colza, soja, trigo, cebada o maíz y una o más combinaciones de los mismos, más preferiblemente harina de colza, harina de soja, harina de semilla de girasol, harina de alfalfa deshidratada, harina de pasto deshidratado, DDGS de maíz y una o más combinaciones de los mismos o en donde los granos se seleccionan del grupo que consiste en granos de cereales, legumbres y semillas oleaginosas, más preferiblemente maíz, guisantes, altramuces dulces, soja, cebada, colza, trigo y una o más combinaciones de los mismos o en donde los tubérculos se seleccionan del grupo que consiste en ñame, patata, tal como proteína de patata, batata, mandioca y una o más combinaciones de los mismos.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el material se somete a radiación con RF para alcanzar una temperatura del material de entre 110 ° C y 165 ° C, tal como entre 120 ° C y 165 ° C, incluso más preferiblemente entre 130 y 165 ° C, lo más preferiblemente entre 130 y 150 ° C.

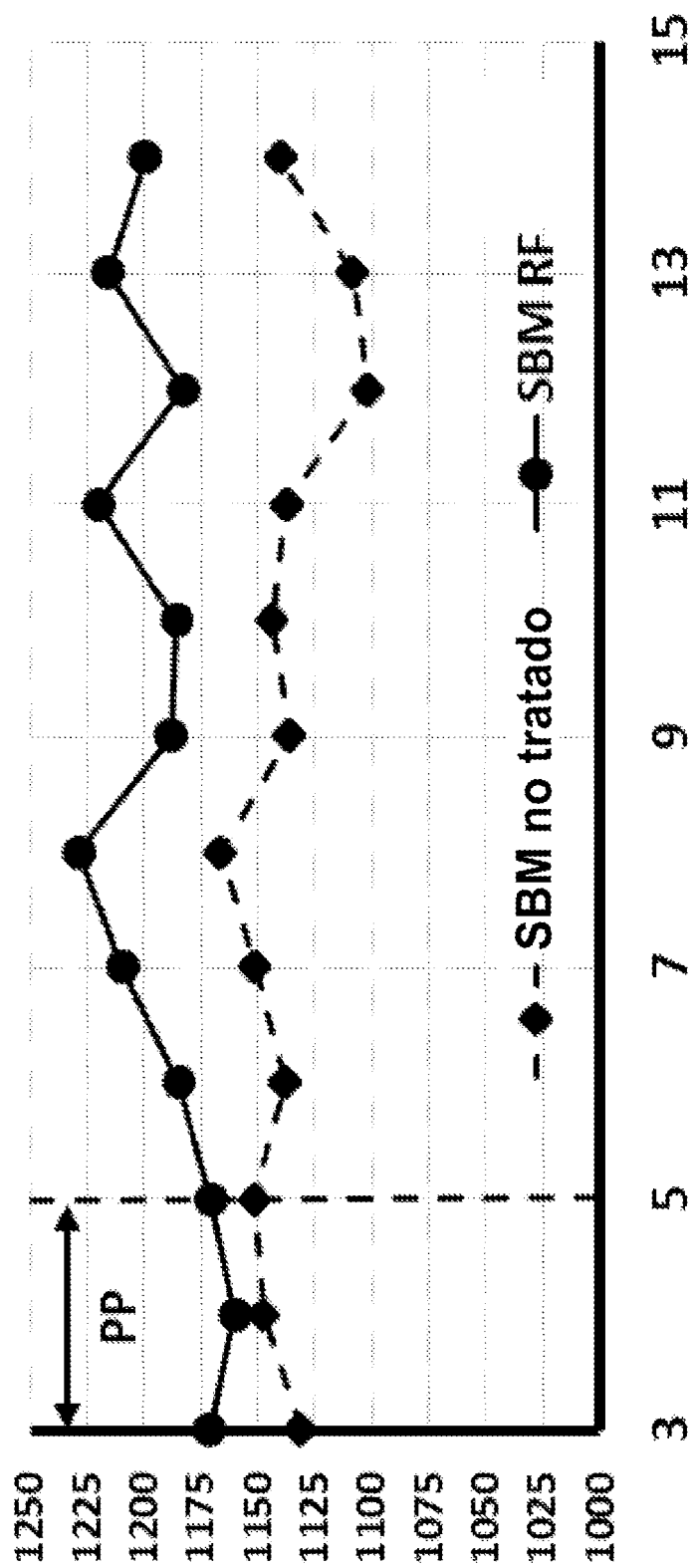


Fig. 1