

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 999 300**

51 Int. Cl.:

A23K 10/12 (2006.01)
A23K 10/30 (2006.01)
A23K 10/38 (2006.01)
A23K 50/10 (2006.01)
A23K 50/30 (2006.01)
A23K 50/75 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2021 PCT/EP2021/073868**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.09.2022 WO22184285**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2021 E 21770181 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2024 EP 4301157**

54 Título: **Ingrediente de pienso derivado de biomasas de harina de soja**

30 Prioridad:

04.03.2021 EP 21160730

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.02.2025

73 Titular/es:

**HAMLET PROTEIN A/S (100.00%)
Saturnvej 51
8700 Horsens, DK**

72 Inventor/es:

**BRØKNER, CHRISTINE;
RASMUSSEN, PERNILLE, TOFT;
DICKOW, JONATAN y
THIRUP, LAILA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 999 300 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

Ingrediente de pienso derivado de biomásas de harina de soja

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un ingrediente de pienso derivado de harina de soja descascarillada y desgrasada y levadura de cerveza gastada, un método para su preparación, y el uso del ingrediente de pienso.

10 Antecedentes de la invención

Hay una necesidad para bioproductos que principalmente se pueden usar como alimento o pienso o como ingredientes en alimento o pienso. Los constituyentes básicos, en tales productos son proteínas, grasas e hidratos de carbono. Las biomásas adecuadas para tales productos son cultivos oleaginosos tal como semillas oleaginosas, cereales, y leguminosas. Los cereales tienen un contenido de proteína de hasta el 15%, por ejemplo, en trigo, y las leguminosas tienen un contenido de proteína de hasta el 40%, por ejemplo, en habas de soja, basado en la materia seca.

En particular la harina de soja se usa mucho en pienso animal como una fuente de proteína y energía. Las habas son ingredientes importantes en piensos animales debido al alto contenido de proteína. Sin embargo, las habas también son una fuente de energía debido a su contenido de aceite. El aceite típicamente se extrae y usa en otras aplicaciones, después las habas de soja desgrasadas se pueden usar como una fuente principal de proteína en pienso animal.

Las habas de soja también son ricas en fibra. En general, las fibras se han considerado como factores antinutricionales porque los animales monogástricos y en particular los animales jóvenes no son capaces de degradar la fibra debido a una microbiota gastrointestinal no madura. Las fibras son hidratos de carbono combinados por diferentes uniones moleculares, y estructuras moleculares, y colectivamente descritas como moléculas no digeridas en el intestino delgado, e incluyen polisacáridos no amiláceos (NSP). Las fibras se pueden degradar en la parte inferior de los sistemas digestivos por la microbiota huésped mediante el proceso fisiológico de fermentación incompleta. Originalmente se consideró que la fibra era un factor antinutricional ya que los animales no eran capaces de degradar los polisacáridos no amiláceos (NSP) y posteriormente utilizar los productos de degradación, por ejemplo, ácidos orgánicos.

Aditivos de pienso nuevos y más avanzados en la forma de enzimas o probióticos en el pienso están ahora disponibles en pienso animal. El fin de algunos aditivos de pienso específicos es utilizar más de las habas y mediante eso minimizar excrementos y mejorar la utilización del haba. En algunos piensos animales, ahora es común añadir enzimas "exógenas" a la formulación de dieta final, pero la enzima no entra en acción antes de consumirse con el resto de la dieta, funcionando en el medio del intestino del animal (Kiare et al 2013, Scapini et al 2018). El uso de levaduras como una ayuda de producción para degradar NSP y estructuras de proteínas de soja solo se ha descrito a un grado limitado.

Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado ahora, que cuando se trata una biomasa que comprende al menos el 50% en peso de soja con levadura añadida en una cantidad especificada, el proceso puede degradar NSP y estructuras proteicas; la levadura expresa enzimas dirigidas a/modificadoras de hidratos de carbono y proteínas.

Según esto, el objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo ingrediente de pienso fermentado que tiene un mayor contenido de NSP soluble que la harina de soja después de procesarla con levadura.

Otro objeto es proporcionar un producto que tiene una distribución de tamaño de péptido beneficiosa. Al alimentar un animal con el producto de la invención, se absorberá más proteína en el intestino delgado de modo que menos proteína eludirá el intestino delgado y se excretará en las heces.

Aun otro objeto es proporcionar un producto nuevo que produce ácidos orgánicos cuando se alimenta al animal y proporciona más energía a los animales.

También es un objeto proporcionar un método para preparar el nuevo ingrediente de pienso.

Por último, es un objeto proporcionar rendimiento de crecimiento mejorado y mejor uniformidad de peso en animales predestetados como respuesta a la mejor utilización del ingrediente de pienso.

Estos objetos se cumplen con el producto de la presente invención. El documento WO 2006/102907 A1 describe productos ricos en proteína fermentada en base a legumbres fermentadas y levadura, en donde la fermentación está seguida por una etapa de calentamiento.

Compendio de la invención

Según esto, en un primer aspecto la presente invención se refiere a un ingrediente de pienso fermentado derivado de levadura de cerveza gastada y una biomasa de partes vegetales proteináceas, donde dicha biomasa comprende el

50% en peso o más de harina de soja descascarillada y desgrasada, en donde el contenido de proteína cruda de dicho ingrediente de pienso está en el intervalo del 35% al 65% en peso en base a la materia seca, y en donde del 2% al 8% en peso en base de la materia seca de la proteína deriva de levadura, y en donde el ingrediente de pienso comprende al menos el 10% más de polisacáridos no amiláceos (NSP) solubles que la biomasa de la que deriva el ingrediente de pienso.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método para preparar un ingrediente de pienso fermentado según la invención, el método comprende mezclar una biomasa de partes vegetales proteináceas, donde dicha biomasa comprende el 50% en peso o más de harina de soja descascarillada y desgrasada con levadura de cerveza gastada en una proporción de biomasa a levadura de 100:2 a 100:8 en peso de materia seca, y agua, a un contenido de materia seca de reacción del 44% al 53% y alimentar la mezcla resultante a un recipiente de reacción, donde después la mezcla se incuba durante 8-20 horas a 24-35°C, opcionalmente se trata con calor, y se seca a una humedad del 3% al 10%.

Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado que cuando aplican levadura de cerveza gastada en una cantidad especificada, las enzimas - que tienen actividad carbohidrasa (tal como actividad NSP-asa) y actividad proteasa - pueden modificar las estructuras de los NSP y las proteínas en harina de soja (SBM) de una manera favorable. Por tanto, cuando una biomasa que comprende predominantemente harina de soja, por ejemplo, con al menos el 50% en peso de SBM, se procesa con levadura de cerveza gastada es posible solubilizar una parte de los NSP insolubles en la biomasa proporcionando de esta manera un nuevo ingrediente de pienso que tiene un mayor contenido de NSP solubles que la harina de soja. La degradación de los NSP en las habas de soja y la producción de ácidos orgánicos cuando se alimentan a los animales proporcionan más energía a los animales, en lechones, así como otros animales (de granja y domésticos), y también proporciona rendimiento de crecimiento mejorado y mejor uniformidad de peso en animales predestetados como respuesta a una mejor utilización del ingrediente de pienso.

Además de aumentar la solubilidad de los NSP, el nuevo producto tiene sorprendentemente más características de producto mejorado cuando se compara con su materia prima en la forma de una distribución de tamaño de péptido beneficiosa de la proteína.

En un tercer aspecto, la invención además proporciona un producto de pienso o un suplemento nutricional para animales de producción que contienen desde el 0,5 al 99% en peso del ingrediente de pienso de la invención, tal como un producto de pienso para uso en una dieta para animales de producción, preferiblemente animales recién nacidos y jóvenes, tal como lechones, terneros, y aves de corral.

En un 4º aspecto, la invención se refiere al uso de un ingrediente de pienso fermentado según la invención para la fabricación de un producto de pienso procesado para consumo animal.

Se describe un ingrediente de pienso fermentado derivado de levadura de cerveza gastada y una biomasa de partes vegetales proteináceas, donde dicha biomasa comprende el 50% en peso o más de harina de soja descascarillada y desgrasada, en donde el contenido de proteína cruda de dicho ingrediente de pienso está en el intervalo del 35% al 65% en peso en base a la materia seca, y en donde del 2% al 8% en peso en base a la materia seca de la proteína deriva de levadura.

Definiciones

En el contexto de la presente invención, se pretende que los siguientes términos comprendan lo siguiente, a menos que se definan en otro lugar en la descripción.

Biomasa:

Comprende material biológico producido por la fotosíntesis y que se puede usar en la producción industrial. En el presente contexto, biomasa se refiere a partes vegetales proteináceas – por ejemplo, que comprende el 50% en peso o más de harina de soja descascarillada y desgrasada. Las partes vegetales proteináceas restantes se pueden, por ejemplo, seleccionar de semillas, cereales, legumbres, hierbas, tal como habas, guisantes, y lucerna, y mezclas de las mismas.

Productos de soja:

Se refiere a materia vegetal en la forma de productos de soja, en particular productos de habas de soja, y mezclas de los mismos. La soja puede ser de cualquier fuente de soja, tal como de América del Sur o Norte o Asia o Europa, y puede ser de origen génico modificado (GMO) o de origen génico no modificado (no GMO). La harina de soja (SBM) es soja descascarillada y desgrasada.

Fibras alimentarias

Las fibras alimentarias comprenden polisacáridos no amiláceos (NSP) solubles e insolubles y pueden comprender oligosacáridos, lignina, y almidón resistente. Las biomásas crudas seleccionadas en el contexto de la presente invención solo contienen cantidades minoritarias de oligosacáridos y almidón resistente, o están sustancialmente libres de almidón resistente. Se usan cuatro métodos analíticos principales para describir las fibras en piensos animales. El análisis de fibras alimentarias es la metodología más detallada y descriptiva para identificar diferentes fracciones de fibras. La metodología cuantifica el contenido de polisacáridos no amiláceos (NSP) tanto solubles como insolubles (Englyst et al. 1994).

Levadura de cerveza gastada

El experto en la materia conoce la levadura de cerveza gastada y es un subproducto de la fabricación de cerveza. La levadura de cerveza gastada puede, por ejemplo, pertenecer a las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Productos de pienso

Comprenden pienso listo para usar o ingredientes de pienso para animales de producción tal como lechones, terneras, aves de corral, animales de peletería, y ovejas.

El término “comprender” se debe interpretar como que especifica la presencia de parte(s), etapa(s), característica(s), composición(es), sustancia(s) química(s), o componente(s) indicado(s), pero no excluye la presencia de una o más partes, etapas, características, composiciones, sustancias químicas o componentes adicionales. Por ejemplo, una composición que comprende un compuesto químico puede así comprender compuestos químicos adicionales, etc.

La invención se ilustra en los dibujos, en donde:

La figura 1 muestra resultados de cribado del contenido de NSP soluble e insoluble en cinco lotes diferentes (lotes 1-5) de la invención procesados con levadura de cerveza gastada y productos de SBM (cruda sin tratar) correspondientes (SBM 1-5).

La figura 2a muestra la producción de ácidos orgánicos en el animal después de alimentación con un producto de la invención en comparación con alimentación con SBM sin tratar.

La figura 2b muestra el aumento en energía metabolizable (ME) en el animal después de alimentación con un producto de la invención en comparación con alimentación con SBM sin tratar.

La figura 3 muestra el rendimiento de crecimiento (peso corporal/edad) en terneras después de alimentación con un producto de la invención en comparación con alimentación con SBM sin tratar.

La figura 4 muestra la uniformidad de peso en terneras predestetadas después de alimentación con un producto de la invención en comparación con alimentación con SBM sin tratar.

Las figuras 5 y 6 muestran el rendimiento de crecimiento y la uniformidad de peso en corderos después de alimentación con un producto de la invención en comparación con alimentación con SBM sin tratar.

Las figuras 7 y 8 muestran la distribución relativa de tamaño de péptido en cinco lotes diferentes (lotes 6-10) de la invención procesados con levadura de cerveza gastada y productos de SBM (cruda sin tratar) correspondientes (SBM 6-10).

La figura 9 muestra la distribución de tamaño de péptidos en la fase soluble de dos lotes diferentes de la invención y productos de SBM (cruda sin tratar) correspondientes.

La figura 10 muestra el análisis de plasma para aminoácidos individuales en muestras de sangre después de alimentación con un producto de la invención y SBM sin tratar, respectivamente, originados del mismo lote de soja. Las muestras de sangre se recogieron en puntos de tiempo de 0, 30, 60, 90, 120, 180 y 360 minutos después de la alimentación.

Descripción detallada de la invención

En su primer aspecto, la invención se refiere a un ingrediente de pienso fermentado derivado de levadura de cerveza gastada y una biomasa de partes vegetales proteináceas, donde dicha biomasa comprende el 50% en peso o más de harina de soja descascarillada y desgrasada, en donde el contenido de proteína cruda de dicho ingrediente de pienso está en el intervalo del 35% al 65% en peso en base a la materia seca, y en donde del 2% al 8% en peso en base a la materia seca de la proteína deriva de levadura, y en donde el ingrediente de pienso comprende al menos el 10% más de polisacáridos no amiláceos (NSP) solubles que la biomasa de la que deriva el ingrediente de pienso.

En una forma de realización de la invención en su primer aspecto, la levadura de cerveza gastada puede, por ejemplo, estar presente en una cantidad desde el 2 al 8%, tal como el 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5, 5%, 6%, 7%, u 8% en peso de materia seca.

5 En cualquiera de las formas de realización de este aspecto, la biomasa de parte vegetal proteínica puede comprender el 50% en peso o menos de parte vegetal proteínica diferente de harina de soja descascarillada y desgrasada.

10 También se divulga en el presente documento, en un quinto aspecto, un ingrediente de pienso fermentado derivado de levadura de cerveza gastada y una biomasa de partes vegetales proteínicas, donde dicha biomasa comprende el 50% en peso o más de harina de soja descascarillada y desgrasada, en donde el contenido de proteína cruda de dicho ingrediente de pienso está en el intervalo del 35% al 65% en peso en base a la materia seca, y en donde del 2% al 8% en peso en base a la materia seca de la proteína deriva de levadura.

15 En una forma de realización de la invención en su quinto aspecto, la levadura de cerveza gastada puede, por ejemplo, estar presente en una cantidad desde el 2 al 8%, tal como el 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5, 5%, 6%, 7%, u 8% en peso de materia seca.

20 En cualquiera de las formas de realización de este aspecto, la biomasa de parte vegetal proteínica puede comprender el 50% en peso o menos de parte vegetal proteínica diferente de harina de soja descascarillada y desgrasada.

25 En cualquiera de las formas de realización de la invención, la biomasa de parte vegetal proteínica puede comprender al menos el 55% en peso de harina de soja descascarillada y desgrasada, tal como al menos el 60% en peso, tal como al menos el 65% en peso, tal como al menos el 70% en peso, tal como al menos el 75% en peso, tal como al menos el 80% en peso, tal como al menos el 85% en peso, tal como al menos el 90% en peso, tal como al menos el 95% en peso, o tal como al menos el 99% en peso de harina de soja descascarillada y desgrasada.

30 En cualquiera de las formas de realización de la invención, la biomasa de parte vegetal proteínica puede comprender harina de soja descascarillada y desgrasada en el intervalo desde el 50% al 100% en peso, tal como en el intervalo desde el 60% al 100% en peso, tal como en el intervalo desde el 70% al 100% en peso, tal como en el intervalo desde el 80% al 100% en peso.

35 En cualquiera de las formas de realización de la invención, el contenido de proteína cruda del ingrediente de pienso puede estar en el intervalo desde el 40% al 65% en peso en base a la materia seca, tal como en el intervalo desde el 45% al 65% en peso en base a la materia seca, o tal como en el intervalo desde el 50% al 65% en peso en base a la materia seca.

40 En cualquiera de las formas de realización de la invención, desde el 2% al 6% en peso en base a la materia seca de la proteína puede derivar de levadura, o tal como desde el 2% al 5% en peso en base a la materia seca de la proteína puede derivar de levadura.

45 Que el ingrediente de pienso comprenda al menos el 10% más de polisacáridos no amiláceos (NSP) solubles que la biomasa de donde deriva el ingrediente de pienso significa que la cantidad de NSP en el ingrediente de pienso es al menos el 10% mayor que la cantidad de NSP en la biomasa de la que deriva el ingrediente de pienso. El contenido de NSP solubles e insolubles en el ingrediente de pienso y en la biomasa específica de la que deriva el ingrediente de pienso se puede determinar por análisis según el análisis de fibra alimentaria (Englyst et al. 1994). Los datos divulgados en el presente documento muestran que el ingrediente de pienso comprende al menos el 10% más de polisacáridos no amiláceos (NSP) solubles que la biomasa de donde deriva el ingrediente de pienso. Por tanto, ha habido una modificación de la estructura de los NSP producida por enzimas NSP-asa activas expresadas por la levadura de cerveza gastada.

50 En cualquiera de las formas de realización de la invención, el ingrediente de pienso puede comprender al menos el 15% más de NSP solubles que la biomasa de donde deriva el ingrediente de pienso.

55 En cualquiera de las formas de realización de la invención, el ingrediente de pienso puede comprender al menos el 20% más de NSP solubles que la biomasa de donde deriva el ingrediente de pienso.

60 En cualquiera de las formas de realización de la invención, el ingrediente de pienso puede comprender en el intervalo desde el 10% al 50% más de NSP solubles que la biomasa de donde deriva el ingrediente de pienso.

65 En cualquiera de las formas de realización de la invención, el ingrediente de pienso puede tener al menos el 2% (MJ/kg DM) cantidad aumentada de energía metabolizable (ME) comparada con la cantidad de ME en la biomasa de donde deriva el ingrediente de pienso.

En cualquiera de las formas de realización de la invención, el ingrediente de pienso puede tener una cantidad aumentada de energía metabolizable (ME) en el intervalo desde el 1,5% al 10% (MJ/kg DM) comparada con la cantidad de ME en la biomasa de donde deriva el ingrediente de pienso.

5 En cualquiera de las formas de realización de la invención, el ingrediente de pienso puede comprender al menos el 5% menos de NSP insolubles que la biomasa de donde deriva el ingrediente de pienso.

10 En cualquiera de las formas de realización de la invención, el ingrediente de pienso puede tener una fracción mayor de péptidos solubles por debajo de 20 kDa comparada con la fracción de péptidos solubles por debajo de 20 kDa en la biomasa de donde deriva el ingrediente de pienso.

15 En cualquiera de las formas de realización de la invención, el ingrediente de pienso puede tener una fracción mayor de péptidos solubles por debajo de 20 kDa del 6-10% comparada con la fracción de péptidos solubles por debajo de 20 kDa en la biomasa de donde deriva el ingrediente de pienso.

20 El producto de la invención se puede preparar por un método en donde una biomasa que comprende el 50% en peso o más de harina de soja descascarillada y desgrasada se mezcla con levadura de cerveza gastada en una proporción de 100:2 a 100:8 de harina de soja:levadura en peso de materia seca, y agua, a un contenido de materia seca de reacción del 44% al 53% en peso y alimentar a un recipiente de reacción, donde después la mezcla se incuba durante 8-20 horas a 24-35°C, opcionalmente se trata con calor, y después se seca a una humedad del 3% al 10%.

25 Según esto, en su segundo aspecto, la invención se refiere a un método para preparar un ingrediente de pienso fermentado según cualquiera de las reivindicaciones 1-12 que comprende mezclar una biomasa de partes vegetales proteináceas, donde dicha biomasa comprende el 50% en peso o más de harina de soja descascarillada y desgrasada con levadura de cerveza gastada en una proporción de biomasa a levadura de 100:2 a 100:8 en peso de materia seca, y agua, a un contenido de materia seca de reacción del 44% al 53% en peso y alimentar la mezcla resultante a un recipiente de reacción, donde después la mezcla se incuba durante 8-20 horas a 24-35°C, opcionalmente se trata con calor, y se seca a una humedad del 3% al 10%.

30 En cualquier forma de realización del método de la invención, la proporción de biomasa a levadura puede ser, por ejemplo, 100:2, 100:3, 100:4, 100:5, 100:6, 100:7, o 100:8 en peso de materia seca.

35 En cualquiera de las formas de realización del método de la invención, el contenido de materia seca en la mezcla de reacción alimentada al recipiente de reacción, puede ser el 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52% o 53% en peso.

En cualquier forma de realización del método de la invención, el experto en la materia sería capaz de seleccionar una temperatura y tiempo de reacción.

40 Se describe un producto de pienso o un suplemento nutricional para animales de producción que contiene desde el 0,5% al 99% en peso del ingrediente de pienso de la invención.

45 En cualquier forma de realización de la invención en este aspecto, el producto de pienso o suplemento nutricional puede ser para uso en una dieta para animales de producción, tal como una dieta para mejorar el rendimiento en animales de producción, en particular animales recién nacidos y jóvenes, tal como lechones, terneras y aves de corral.

En otro aspecto de la invención, se divulga el uso de un ingrediente de pienso según la invención en una dieta para animales de producción, en particular animales recién nacidos y jóvenes, tal como lechones, terneros y aves de corral.

50 Ejemplos

Materiales y métodos

Ejemplo A

55 Se prepararon cinco lotes del producto de la invención a partir de cinco lotes de materia prima diferentes como sigue:

60 Se mezclaron cinco muestras de harina de soja descascarillada y desgrasada con levadura de cerveza gastada en una proporción de harina de soja:levadura de aproximadamente 100:2 a 100:5 en peso de materia seca, y agua, a un contenido de materia seca de reacción en la mezcla inicial de aproximadamente el 50% y se alimentó a un recipiente de reacción, donde después la mezcla se incuba durante al menos 8 horas a 24-35°C, opcionalmente se trata con calor, y después se seca a una humedad del 5% al 8%.

65 El contenido de proteína y la humedad de los cinco productos se determinaron a lo siguiente:

ES 2 999 300 T3

	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5
Proteína como está % en peso (Dumas)	56,65%	55,80%	55,00%	56,24%	58,17%
Humedad (103°C 4 h)	7,17%	7,40%	7,72%	6,92%	5,37%

Ejemplo 1:

5 Cribado a pequeña escala que muestra el efecto de la levadura sobre las fracciones de NSP solubles e insolubles en SBM

En este cribado, se determinó el contenido de NSP solubles e insolubles en el lote 1-5 del ejemplo A y cinco productos de SBM correspondientes (SBM 1-5) (productos de referencia – muestras correspondientes de harina de soja descascarillada y desgrasada). Los productos de referencia se originan de las mismas biomásas exactas usadas para producir los correspondientes lotes, por ejemplo, la biomasa usada para producir el lote 1 es la misma biomasa que SBM1 y así sucesivamente.

El contenido de NSP solubles e insolubles en los productos se analizó según el análisis de fibra alimentaria (Englyst et al. 1994).

Los resultados se ilustran en la *figura 1*, que muestra tanto el contenido de NSP solubles (S-NSP) como NSP insolubles (I-NSP) para cada cribado y la media de los resultados del cribado. Los resultados muestran que el contenido de S-NSP en los lotes es de media el 6,4% en peso, en comparación al 5,1% en peso en el producto de referencia de SBM sin tratar. Esto significa, de media, que aproximadamente el 25% más de los NSP se hicieron solubles durante el procesamiento de la SBM al producto de la invención por procesamiento con la levadura.

Nota: Durante el proceso de incubación de la biomasa, se perdió el 9% en peso de la biomasa (debido a pérdida de factores antinutricionales (ANF)), por lo cual los otros nutrientes se concentraron. Los productos comprendían aproximadamente el 55-56% en peso de proteína cruda. Las fracciones de NSP también se concentraron. Si el contenido aumentado de S-SNP era debido solamente a la concentración, el contenido sería:

5,1% en peso de S-SNP (en el producto de referencia de SBM)/0,91 (pérdida del 9% de biomasa) => 5,6%, que es menos que el resultado real del 6,4% en peso.

Esto muestra que ha habido una modificación de la estructura de los NSP causada por enzimas NSP-asa activas expresadas por la levadura de cerveza gastada.

Ejemplo 2

35 Muestra la producción mejorada de ácido orgánico debido a procesamiento con levadura de cerveza gastada

Se realizó un experimento para describir la producción aumentada de ácidos orgánicos en el sistema intestinal en terneras predestetadas y el correspondiente aumento en el valor de energía del ingrediente de pienso basado en ensayos ex vivo.

40 Procedimiento experimental:

Se usaron seis muestras del mismo lote de biomasa (soja): dos muestras de SBM sin tratar y cuatro muestras del producto de la invención divulgado en el presente documento. Las seis muestras de pienso se molieron a 1 mm, y 0,5 ± 0,030 g de cada una de las muestras de pienso se colocaron en un tarro de incubación de 100 ml (Duran®). Se hicieron cuatro replicados de cada pienso (n = 24) junto con cuatro tarros sin pienso (fermentación basal de inóculo, denominados blancos). Se juntaron fluido abomasal (340 ml de cada ternera) y ruminal (50 ml de cada ternera) reciente (pH 4,8-5,2) de 3 terneros macho, es decir un total de 390 ml de fluido de cada ternero. Los terneros tenían 3-6 semanas de edad, de la misma granja y alimentados la misma dieta, consistente principalmente en leche entera. Los rúmenes se transportaron directamente al laboratorio en cajas térmicas precalentadas (~39°C). El fluido abomasal y ruminal se filtró a través de una estameña de doble capa. Se preparó un medio tampón de rumen añadiendo el fluido abomasal y ruminal filtrado a una solución tampón estándar, que se preparó como se describe por Menke y Steingass (1988).

Todas las seis muestras y 90 ml del medio tampón de rumen se añadieron a cada botella, se enjuagaron con CO₂ e incubaron a 39°C durante 48 horas. Se registró la producción de gas acumulada cada 10 min usando el sistema ANKOMRF (ventilado a 51,71 mbar), como se describe por Cattani et al. (2014). La reacción se paró después de 48 horas colocando los tarros en hielo. El fluido filtrado de cada botella de incubación se recogió para análisis de ácidos orgánicos. Se calculó el contenido de energía (ME, MJ/kg DM) de los piensos basado en fermentación de 24 horas usando el sistema de evaluación de energía alemán (DLG, 2013).

Los resultados de la producción de ácidos orgánicos y la energía metabolizable se muestran en las figuras 2a y 2b, respectivamente. Como se puede ver de la figura 2a, entre el 18 y el 27% mayor producción de ácidos orgánicos en las terneras alimentadas en los productos de la invención en comparación a terneras alimentadas en SBM sin procesar. Esto corresponde a energía metabolizable un 3% mayor en el producto de la invención comparado con SBM. El sistema digestivo de animales jóvenes no está desarrollado por completo y por tanto tienen dificultades en digerir las fracciones de NSP insolubles mientras son capaces de digerir las fracciones de NSP solubles. Cuando los animales en este ejemplo se alimentan con el producto de la invención, que tiene una mayor cantidad de NSP solubles que la SBM sin tratar, los resultados muestran que tendrán mayor cantidad de ácidos orgánicos en el intestino que si se alimentan con la SBM sin tratar.

Ejemplo 3

Muestra el rendimiento de crecimiento animal mejorado con mayor contenido de energía en el pienso

Se realizó un experimento para describir el rendimiento de crecimiento mejorado y mejor uniformidad de peso en terneras predestetadas como respuesta a una mejor utilización del ingrediente de pienso.

Procedimiento experimental:

El ensayo se realizó en una granja comercial en los Países Bajos. Un total de 121 terneras llegaron el mismo día a 2 semanas de edad ($14,77 \pm 0,18$ días; $54,16 \pm 0,33$ kg de peso corporal [media \pm EEM; error estándar de la media]) y se destetaron a las 6-8 semanas de edad. Las terneras se alojaron en grupos.

Alimentación: Se formularon dietas según el sistema de recomendación de piensos holandés (20% de proteína cruda en el pienso de inicio), y se alimentaron dos tratamientos dietéticos:

- SBM = 13,75% de tasa de inclusión Control)
- Producto de la invención = 16,03% de tasa de inclusión

Las dietas se alimentaron para consumo a voluntad desde el inicio (2 semanas de edad) hasta la octava semana del ensayo (= 10 semanas de edad).

Medidas: el peso corporal (PC) se midió al inicio del ensayo (~semana 2 de edad), en la semana 10 y 15 de edad y en el sacrificio (= peso del cadáver). Los resultados se muestran en la figura 3.

Las terneras alimentadas con el producto de la invención eran pequeñas en el inicio del ensayo, pero a las 15 semanas de edad las terneras se volvieron significativamente más pesadas que las terneras alimentadas con SBM. En el sacrificio las terneras eran 5 kg más pesadas y el peso del cadáver era 2 kg más pesado que las terneras alimentadas con SBM. Se obtuvo mejor uniformidad de peso cuando se alimentó el producto de la invención. Al llegar a la granja, las terneras se separaron en dos grupos dependiendo de su peso por encima o por debajo de 54 kg. Las terneras pequeñas alcanzaron el mismo peso que las terneras más grandes en la semana 15 cuando se alimentaron con el producto de la invención, mientras las terneras pequeñas alimentadas con SBM sin tratar eran significativamente menores. La tendencia duró a lo largo del experimento entero. Estos datos indican que se proporcionaron más energía y nutrientes del producto de la invención y que los animales jóvenes se beneficiaron más de una alimentación predigerida. Los resultados se muestran en la figura 4.

Ejemplo 4

Muestra el rendimiento de crecimiento animal mejorado con mayor contenido de energía en el pienso

Se realizó un experimento para describir el rendimiento de crecimiento mejorado y mejor uniformidad de peso en corderos como respuesta a una mejor utilización del ingrediente de pienso.

Procedimiento experimental:

El ensayo se realizó en una granja de engorde comercial en Sudáfrica

Se realizaron dos ensayos idénticos con ovejas con las razas Dormer o Dohne Merino.

Los corderos se asignaron a uno de dos tratamientos (19,3% de proteína cruda; 11,9 MJ ME/kg):

Control: SBM (tasa de inclusión del 19,5% en el pienso de inicio)

Prueba: producto de la invención (tasa de inclusión de 15% en el pienso de inicio).

Los corderos se destetaron a la edad de 54 días, se pesaron en el nacimiento y en el destete.

Los corderos ganaron más peso cuando el producto de la invención comparado con SBM sin tratar. Los corderos alimentados con el producto de la invención eran más uniformes en peso. Los resultados se muestran en las figuras 5 y 6.

5 Ejemplo 5

Cambio en la distribución de tamaño de péptidos

10 Se prepararon cinco muestras de materias primas y correspondientes productos de SBM sin tratar en tampón de extracción PBS (solución al 10%). Después de 24 horas de extracción, todas las muestras se calentaron a 95°C durante 15 min y se centrifugaron. Los sobrenadantes se diluyeron en tampón de carga según Laemmli et al. (Laemmli et al., 1970) y se cargaron en geles preformados Criterion TGX (Bio-Rad) usando The Criterion Cell (Bio-Rad, 1656019). El gel se fijó y tiñó con azul brillante de Coomassie.

15 La cuantificación del gel proporciona los siguientes resultados:

Tamaño de proteína kDa	SBM 6	Lote 6	SBM 7	Lote 7	SBM 8	Lote 8	SBM 9	Lote 9	SBM 10	Lote 10
≥ 60	34,2%	34,7%	34,0%	34,6%	31,4%	32,0%	34,7%	35,0%	33,2%	33,9%
20-60	42,2%	40,2%	40,8%	38,6%	41,6%	39,0%	41,9%	38,9%	40,9%	39,1%
≤ 20	23,6%	25,1%	25,2%	26,8%	27,0%	29,0%	23,5%	26,1%	25,9%	27,0%

Los resultados se muestran en las figuras 7 y 8.

Tamaño de péptido kDa	Media de SBM	Media del producto de la invención
> 60	33,5	34,0
20-60	41,5	39,2
< 20	25,0	26,7

20 La cuantificación de SDS determina la fracción de proteína soluble total en un intervalo determinado de tamaños de péptidos. El producto de la invención contiene una fracción mayor de péptidos solubles por debajo de 20 kDa. Esto se ilustra en la figura 9. Además de la fracción aumentada de péptidos más pequeños, la composición de péptidos en cada categoría de tamaño parece ser más óptima para el producto de la invención ya que favorece la utilización en el animal. La utilización mejorada en el animal se ve por la velocidad de absorción aumentada en el intestino como se ilustra adicionalmente en el ejemplo 6.

Ejemplo 6

30 Muestra la absorción de aminoácidos mejorada como resultado de cambios en la distribución de tamaño de los péptidos

Se realizó un experimento para describir la absorción de lisina mejorada en lechones destetados.

35 Procedimiento experimental:

Un total de 7 cerdos cruzados (Landrace danés, Yorkshire x Duroc) con un peso corporal medio de $18 \pm 1,25$ kg se alimentaron con una dieta comercial antes del estudio. Los cerdos se equiparon con un catéter en la vena yugular 3 días antes del periodo experimental. Empezando con el día uno del ensayo, los cerdos se alimentaron con la dieta experimental (producto de la invención (lotes) como se enumera en ejemplo 5) por la mañana desde el día 4 al 5 durante 15 min y recibieron dieta comercial (SBM sin tratar como se enumera en el ejemplo 5) a voluntad por la tarde, seguido por retirada de pienso después de una hora desde la alimentación. Las dietas eran equilibradas en el 20% de proteína cruda. El producto de la invención y la SBM se originaron del mismo lote de soja. Se recogieron muestras de sangre en puntos de tiempo 0, 30, 60, 90, 120, 180 y 360 minutos después de alimentar. Se analizó el plasma para aminoácidos individuales. Los resultados se muestran en la figura 10.

Como se puede ver de los resultados, la absorción pico de aminoácidos esenciales es 60 min tras la alimentación en el producto de la invención y más aminoácidos esenciales están disponibles y se absorbieron más rápido. La absorción de aminoácidos y el posterior depósito en los músculos de los animales requiere energía. La energía viene de azúcar y almidón que se absorbe rápidamente (en una hora) por los animales, así al optimizar el tiempo de absorción tanto de la energía como los aminoácidos, el resultado es una mayor formación de músculo. En el producto de la invención, la concentración de aminoácidos es mayor lo que implicará que más aminoácidos se pueden depositar en los músculos del animal y por tanto el animal aumentará de peso más rápido.

55 **Referencias**

Englyst HN, Quigley ME y Hudson GJ (1994) Analyst, 119, 1497-1509.

Cattani, M., Tagliapietra, F., Maccarana, L., Hansen, H.H., Bailoni, L., Schiavon, S. 2014. In vitro total gas and methane production measurements from closed or vented rumen batch culture systems. *Journal of Dairy Science*, 97:1736-1741.

5 DLG, 2013. Arbeitskreises Futter und Fütterung: Leitfaden zur Berechnung des Energiegehaltes bei Einzel- und Mischfuttermitteln für die Schweine- und Rinderfütterung. DLG Verlag.

10 Menke, K.H., Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 10:7-55.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* vol. 227 680-685.

REIVINDICACIONES

1. Un ingrediente de pienso fermentado derivado de levadura de cerveza gastada y una biomasa de partes vegetales proteínáceas, donde dicha biomasa comprende el 50% en peso o más de harina de soja descascarillada y desgrasada, en donde el contenido de proteína cruda de dicho ingrediente de pienso fermentado está en el intervalo del 35% al 65% en peso en base a la materia seca, en donde del 2% al 8% en peso en base a la materia seca de la proteína deriva de levadura, y en donde parte de los polisacáridos no amiláceos (NSP) insolubles presentes en dicha biomasa se ha solubilizado por procesamiento con la levadura de cerveza gastada por lo cual dicho ingrediente de pienso fermentado comprende un contenido al menos el 10% mayor de polisacáridos no amiláceos (NSP) solubles que la harina de soja sin procesar en dicha biomasa.
2. El ingrediente de pienso fermentado según la reivindicación 1 en donde la biomasa de parte vegetal proteínácea comprende el 50% en peso o menos de parte vegetal proteínácea diferente de harina de soja descascarillada y desgrasada.
3. El ingrediente de pienso fermentado según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la biomasa de parte vegetal proteínácea comprende al menos el 55% en peso de harina de soja descascarillada y desgrasada, tal como al menos el 60% en peso, tal como al menos el 65% en peso, tal como al menos el 70% en peso, tal como al menos el 75% en peso, tal como al menos el 80% en peso, tal como al menos el 85% en peso, tal como al menos el 90% en peso, tal como al menos el 95% en peso, o tal como al menos el 99% en peso de harina de soja descascarillada y desgrasada.
4. El ingrediente de pienso fermentado según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la biomasa de parte vegetal proteínácea comprende harina de soja descascarillada y desgrasada en el intervalo desde el 50% al 100% en peso, tal como en el intervalo desde el 60% al 100% en peso, tal como en el intervalo desde el 70% al 100% en peso, tal como en el intervalo desde el 80% al 100% en peso.
5. El ingrediente de pienso fermentado según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el contenido de proteína cruda de dicho ingrediente de pienso fermentado está en el intervalo desde el 40% al 65% en peso en base a la materia seca, tal como en el intervalo desde el 45% al 65% en peso en base a la materia seca, o tal como en el intervalo desde el 50% al 60% en peso en base a la materia seca.
6. El ingrediente de pienso fermentado según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde desde el 2% al 6% en peso en base a la materia seca de la proteína deriva de levadura, o tal como desde el 2% al 5% en peso en base a la materia seca de la proteína deriva de levadura.
7. El ingrediente de pienso fermentado según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde dicho ingrediente de pienso fermentado comprende un contenido de NSP solubles al menos el 15% mayor que la harina de soja sin procesar en dicha biomasa, tal como un contenido al menos el 20% mayor.
8. El ingrediente de pienso fermentado según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde dicho ingrediente de pienso fermentado comprende un contenido de NSP solubles mayor en el intervalo desde el 10% al 50% que la harina de soja sin procesar en la biomasa.
9. El ingrediente de pienso fermentado según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde dicho ingrediente de pienso fermentado tiene una cantidad aumentada al menos el 2% (MJ/kg DM) de energía metabolizable (ME) comparada con la cantidad de ME en la biomasa de donde deriva el ingrediente de pienso.
10. El ingrediente de pienso fermentado según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde dicho ingrediente de pienso fermentado tiene una cantidad aumentada de energía metabolizable (ME) en el intervalo desde el 1,5% al 10% (MJ/kg DM) comparada con la cantidad de ME en la biomasa de donde deriva el ingrediente de pienso.
11. El ingrediente de pienso fermentado según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde dicho ingrediente de pienso fermentado comprende un contenido de polisacáridos no amiláceos (NSP) insolubles al menos el 5% menor que la harina de soja sin procesar en la biomasa.
12. El ingrediente de pienso fermentado según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde dicho ingrediente de pienso fermentado tiene una fracción mayor de péptidos solubles por debajo de 20 KDa comparada con la fracción de péptidos solubles por debajo de 20 KDa en la biomasa de donde deriva el ingrediente de pienso.
13. Método para preparar un ingrediente de pienso fermentado según cualquiera de las reivindicaciones 1-12 que comprende mezclar una biomasa de partes vegetales proteínáceas, donde dicha biomasa comprende el 50% en peso o más de harina de soja descascarillada y desgrasada con levadura de cerveza gastada en una proporción de biomasa a levadura de 100:2 a 100:8 en peso de materia seca, y agua, a un contenido de materia

ES 2 999 300 T3

seca de reacción del 44% al 53% en peso y alimentar la mezcla resultante a un recipiente de reacción, donde después la mezcla se incuba durante 8-20 horas a 24-35°C, opcionalmente se trata con calor, y se seca a una humedad del 3% al 10%.

- 5 14. Uso de un ingrediente de pienso fermentado según cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para la fabricación de un producto de pienso procesado para consumo animal, preferiblemente en donde el animal son animales de producción, más preferiblemente animales recién nacidos y jóvenes, tal como lechones, terneros, y aves de corral, en necesidad de oligosacáridos prebióticos.

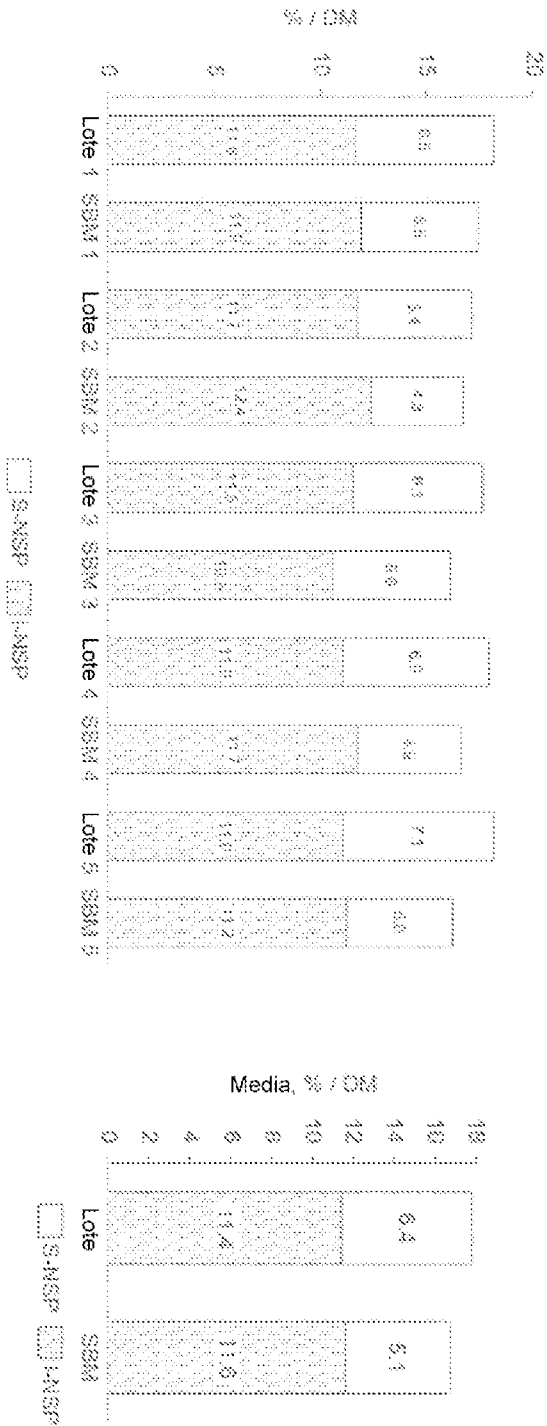


FIGURA 1

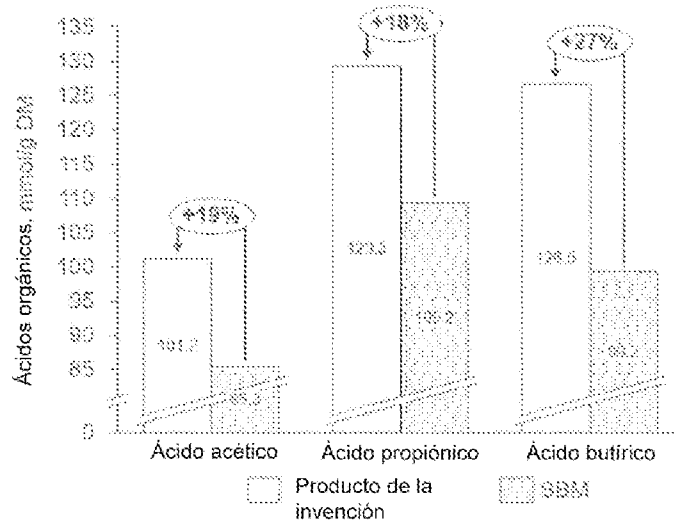


FIGURA 2a

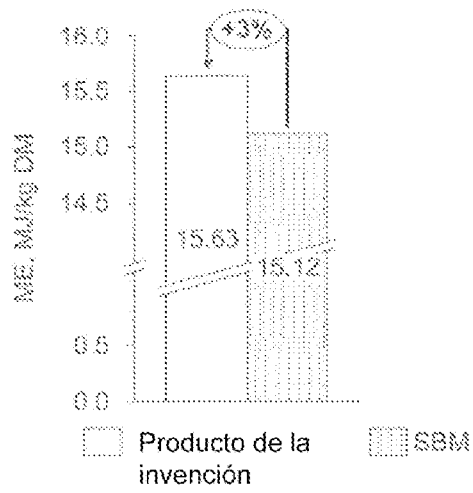


FIGURA 2b

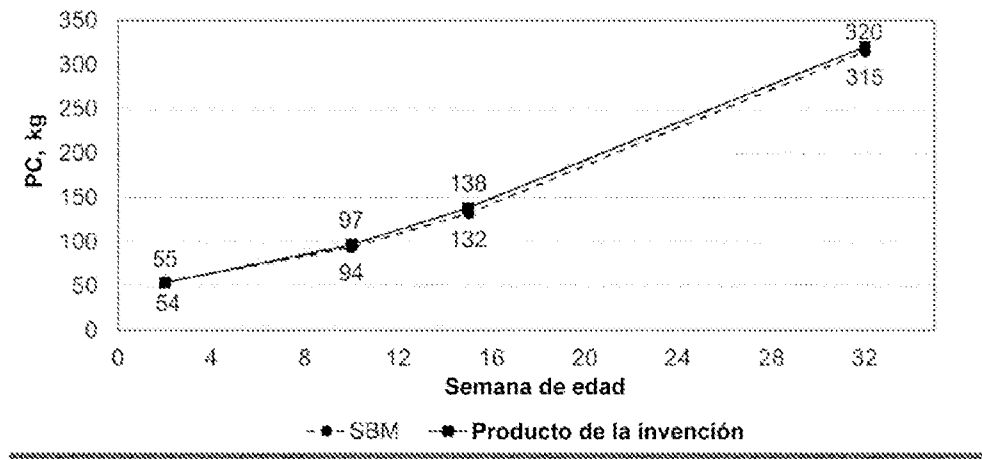


FIGURA 3

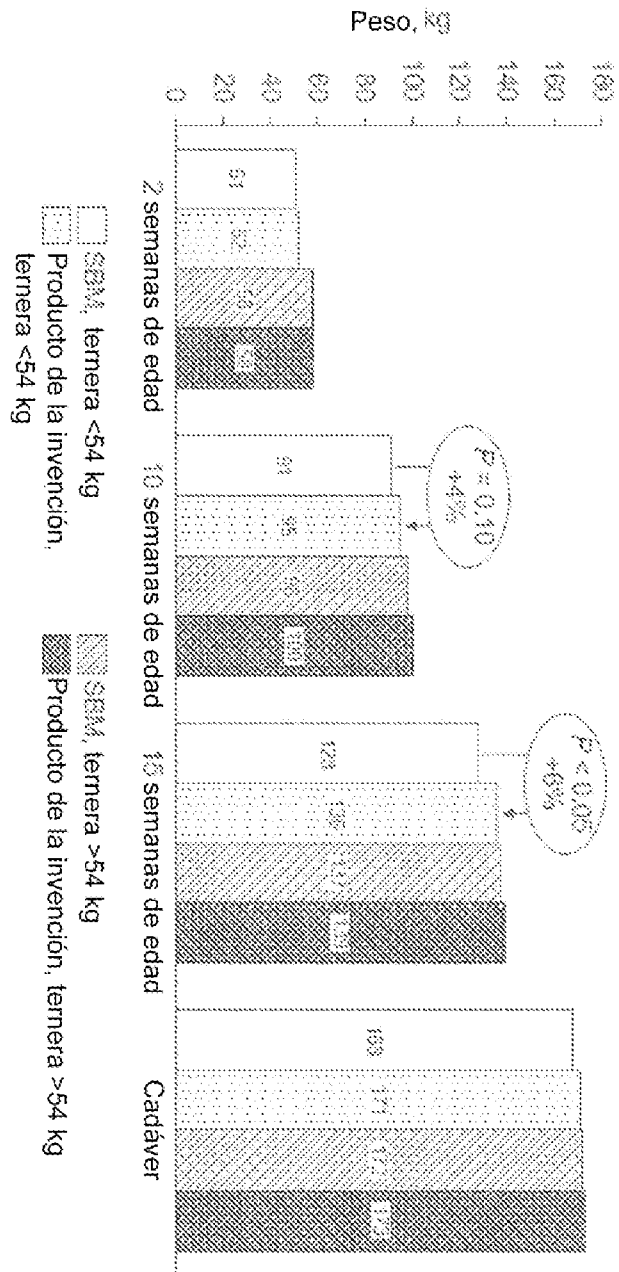


FIGURA 4

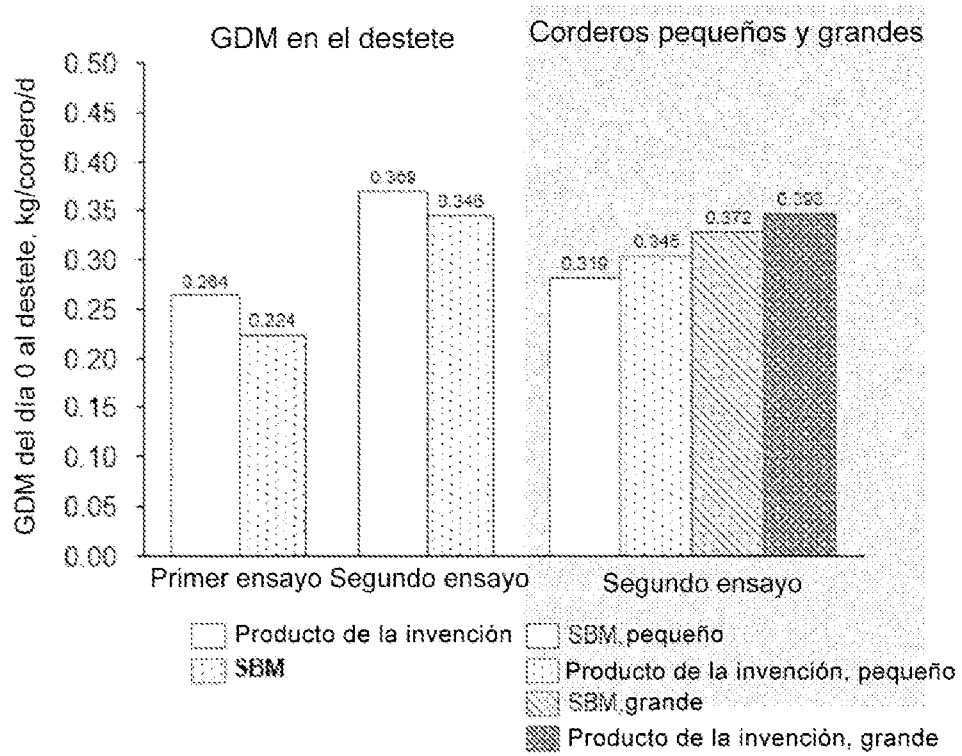


FIGURA 5

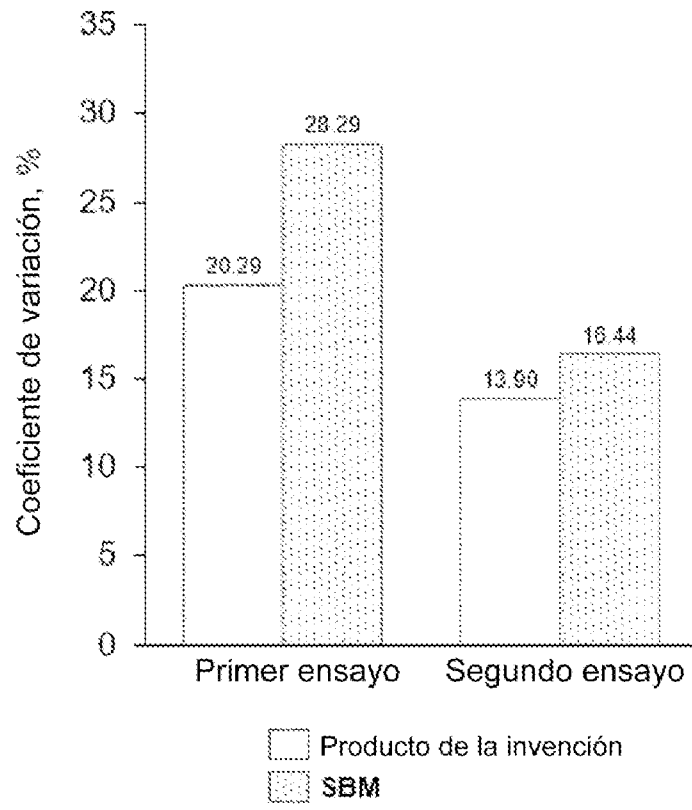


FIGURA 6

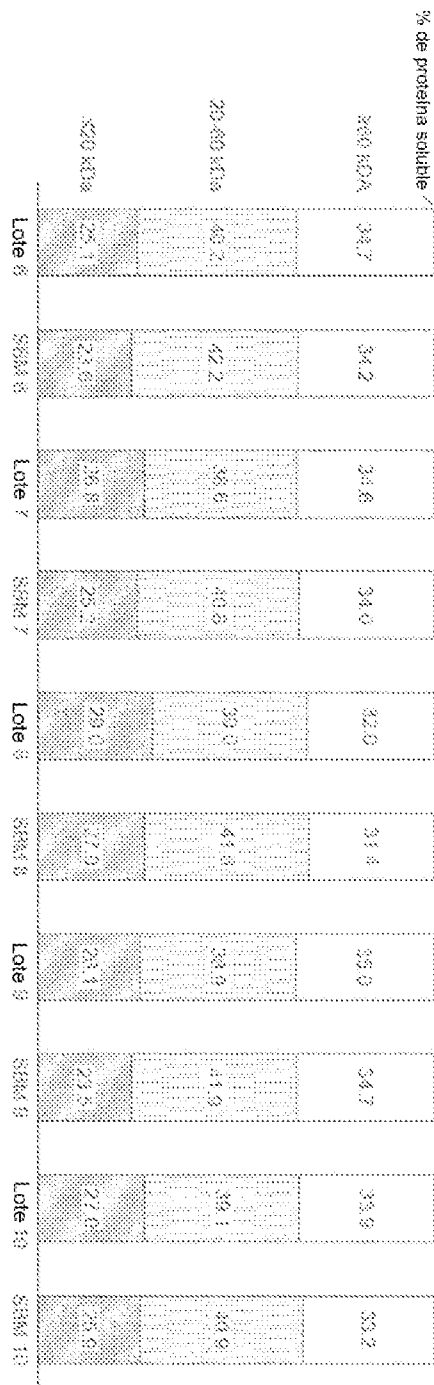


FIGURA 7

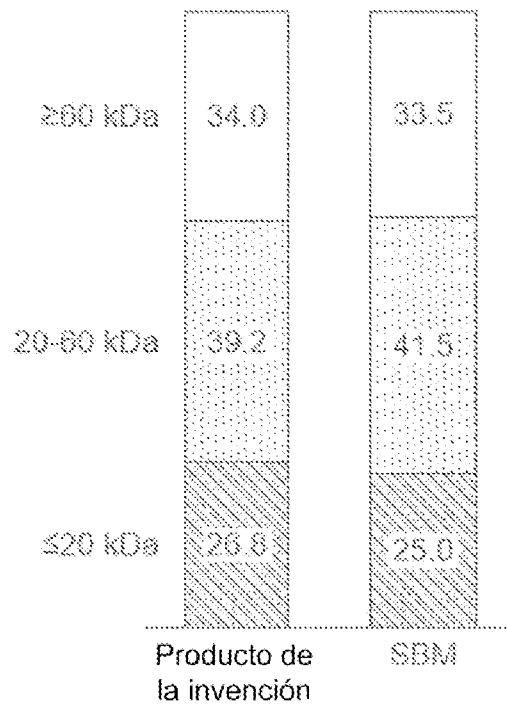


FIGURA 8

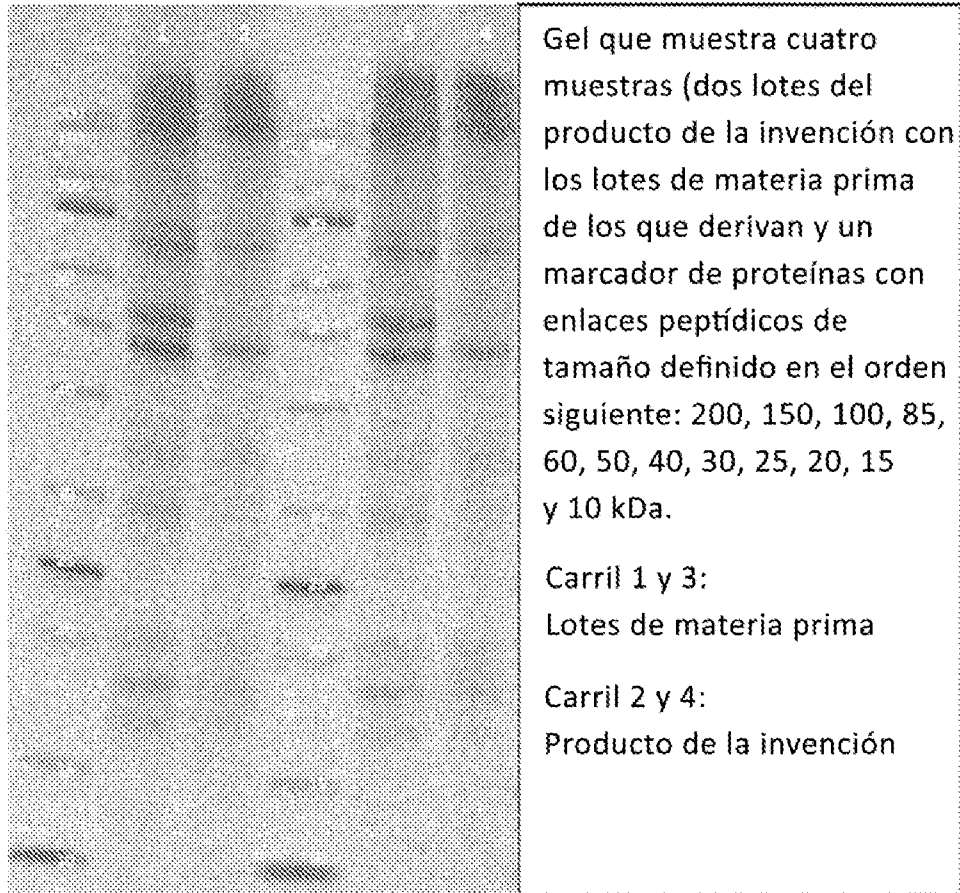


FIGURA 9

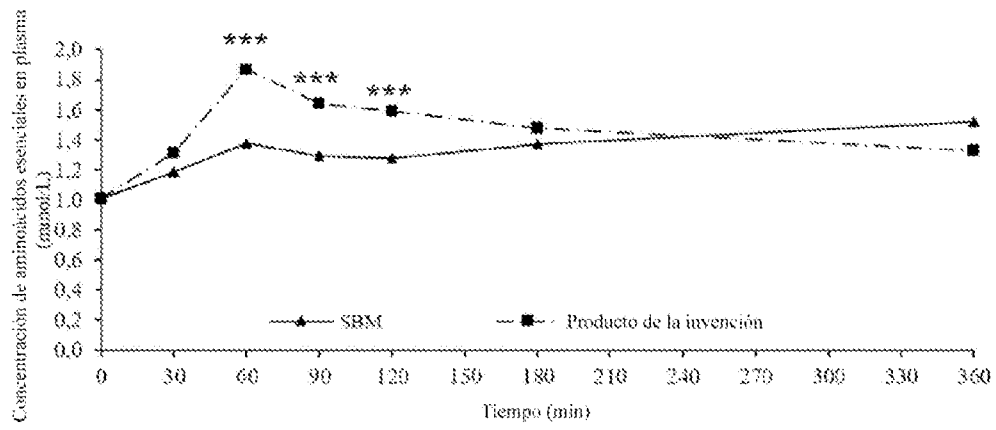


FIGURA 10