



(19) ES	(11) NUMERO	(10) AI
	461694	
	(21) FECHA DE PRESENTACIÓN	
	17 AGO. 1977	

- 6 NOV. 1978

Concedido el D.º de acuerdo con la Ley de Patentes de Invención según el contenido de la Memoria adjunta.

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES:		
(31) NUMERO	(32) FECHA	(33) PAIS
76 24943	17 de Agosto de 1.976	Francia
77 15417 (adición)	18 de Mayo de 1.977	Francia
(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	A23K	
(54) TITULO DE LA INVENCION		
PROCEDIMIENTO DE CONSERVACION Y VALORACION DE VEGETALES EN ESTADO VERDE.		
(71) SOLICITANTE (S)		
Société DERAL, S. A., entidad francesa		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
14 Garnier, 92200 NEUILLY-sur-SEINE, Francia.		
(72) INVENTOR (ES)		
Louis OSTRE		
(73) TITULAR (ES)		
(74) REPRESENTANTE		
D. JOSE MIGUEL GOMEZ-ACEBO Y POMBO		

La presente invención se refiere a la conservación y la valoración de vegetales frescos, a fin de permitir su consumo bajo una forma apetecible a medida de las necesidades, ulteriormente a su fecha de recolecta; particularmente se refiere a un nuevo procedimiento de conservación por ensilado de vegetales, que utiliza una mezcla de capas bacterianas definidas y de enzimas específicas, sobre soportes apropiados; igualmente se refiere a los productos y medios necesarios para la realización del procedimiento. La invención se aplica igualmente a los sub-productos húmedos de las industrias agroalimenticias.

El problema de la conservación de los vegetales, en particular de los forrajes para la alimentación del ganado, se ha planteado desde hace tiempo, puesto que se refiere esencialmente a la conservación del forraje recolectado durante los meses de producción y que debe ser consumido todo a lo largo del año. El hombre trata de alimentar su ganado con alimentos que han mantenido sus cualidades organolépticas, por ende con alimentos frescos y apetecibles, y ello durante todo el año, siempre que los costos sean modestos.

Todas las acciones de conservación de los vegetales tienen como finalidad bloquear ó destruir proliferaciones intempestivas de microorganismos que se encuentran normalmente en la superficie de estos vegetales; estas proliferaciones permiten la elaboración de enzimas de origen bacteriano, en particular gasógenos, putrefacientes y alcalinizantes, que conducen a la putrefacción del vegetal, haciéndolo inapetente, incluso tóxico para el animal al que está destinado, y consecuentemente impropio para el consumo animal.

Así pues se conocen ya tratamientos por calor, frío ó desecación pero estos tratamientos son caros.

5 El ensilado es uno de los procedimientos que permiten conservar los vegetales en forma húmeda y apetecible, a un precio de costo pequeño; sin embargo la realización de esta técnica presenta un cierto número de dificultades que la presente invención contribuye a resolver. El ensilado radica en el principio de la conservación de vegetales frescos durante un periodo más ó menos largo, en un recinto cerrado y estanco, en medio ácido, con el fin de impedir el desarrollo de los gérmenes putrefacientes, alcalinizantes y gasógeno no desarrollándose estos gérmenes en medio ácido. La realización de un buen ensilado es difícil y se tropieza con numerosos obstáculos, siendo los principales la formación de productos de fermentación, peligrosos para la salud de los animales.

10

15

Para una mejor comprensión de las prácticas básicas de una buena conservación, a continuación se describe esquemáticamente las diferentes fases que se derivan como consecuencia de la recolecta de los vegetales y después en el silo. Desde el momento mismo que el forraje es cortado, las enzimas de la planta actúan sobre los glúcidos y las proteínas. Estos glúcidos son transformados rápida y completamente en otros azúcares que sirven de principales fuentes de energía de los microorganismos. Una parte de las proteínas es transformada más lentamente hasta un estadio de ácido aminados; esta transformación se detiene cuando el pH desciende por debajo de 4,5. La planta continúa respirando después de su colocación en el silo, mientras el aire aprisionado en la masa del forraje contenga oxígeno: esta respiración produce gas carbónico y agua, lo que ocasiona una disminución de los azúcares

20

25

30

necesarios para el desarrollo ulterior de las bacterias lácticas. Conviene por tanto reducir estos efectos por cierre rápido y estanco del silo. Los microorganismos, situados en la superficie de la planta verde, se desarrollan en el silo, utilizando como materia nutritiva el jugo de las células vegetales, liberado desde el momento mismo que las células mueren por falta de oxígeno. En las primeras horas que siguen a la colocación en el silo, son las bacterias las que tienen necesidad de oxígeno, las que se desarrollan: concurren en la degradación de las proteínas; es pues importante impedir la proliferación de los gérmenes mediante cierre rápido del silo. Se desarrollan entonces microorganismos que son a la vez aerobios y anaerobios. Estos microorganismos transforman los azúcares de la planta en ácido acético principalmente, alcohol, ácido láctico y gas carbónico, acidificando así el medio. Dejan de vivir desde el momento mismo que el pH del medio cae por debajo de 5,5. No hay más interés en que estas bacterias se desarrollen. Las bacterias lácticas actúan entonces cuando el medio es anaerobio; producen a partir de los azúcares solubles disponibles, ácido láctico si son del tipo homofermentario y un poco de alcohol y de ácido acético si son del tipo heterofermentario. Estas bacterias se desarrollan si hay cantidad suficiente de azúcares a su disposición; el ensilado se acidifica así rápidamente, para alcanzar un pH inferior ó igual a 4. Entonces se estabiliza, a condición de que el aire no penetre en el silo, puesto que a estos pH débiles y en presencia de aire puede todavía haber desarrollo de mohos. Si la proliferación de las bacterias lácticas es insuficiente, el pH desciende bastante rápidamente a 4, y las bacterias butíricas, anaerobias pueden desarrollarse; estas bacterias atacan los azúcares residuales y los transforman en ácido butírico y acético, en gas carbónico y en hidrógeno. Atacan igualmente al ácido láctico, para formar los mismos derivados, además, estas

difícil en su realización. En efecto numerosos obstáculos se oponen a la realización de un buen ensilado: elección de cepas, rapidez de su cultivo, antagonismos bacterianos que conducen a su neutralización recíproca, crecimiento de bacterias indeseables, aportadas por los vegetales. Las bacterias propuestas por el arte anterior son casi siempre de la industria lacte, que no se desarrollan a la temperatura ordinaria, en un medio exento de leche ó de sub-producto de la misma, como se describe en la patente francesa 1.534.166; la siembra directa de bacterias lácticas en el ensilado no puede tener éxito más que respetando las condiciones complejas de las series de reacciones físicas y químicas descritas anteriormente, y en función de las condiciones del medio, esencialmente pH, temperatura, presencia de oxígeno. Además, estas bacterias utilizan esencialmente la lactosa, raramente la maltosa y jamás el almidón ó la celulosa.

Igualmente se han descrito procedimientos, en los que se añade en el silo una materia prima rica en glúcidos, por ejemplo melasas, pulpas de remolacha deshidratadas con el fin de proporcionar glúcidos a las bacterias lácticas. Los resultados obtenidos son irregulares, puesto que los glúcidos aportados, particularmente sacarosa, son relativamente poco utilizados por las bacterias lácticas naturales. Esta aportación no tiene influencia en las selecciones bacterianas y actúa más por un aumento de la proporción en materia seca, que es un factor que favorece el crecimiento de las bacterias butíricas. La incorporación de estas sustancias es difícil, incluso imposible si nó se dispone de una instalación particularmente adaptada. Las pulpas deshidratadas son muy costosas para una aportación nutricional pequeña. Dicho procedimiento se describe en la patente alemana 1.492.903: consiste en añadir, en el medio a ensilar, una mezcla de cebada y de malta.

Este procedimiento depende estrechamente de las propiedades diastásicas de la malta que son variables y difíciles de controlar por el usuario. De otro lado, esta acción es lenta a la temperatura ordinaria, y las cantidades necesarias de cebada, fuente de almidón, son grandes, y su incorporación en el medio de ensilado es muy costosa y difícil de realizar. El rendimiento de transformación del almidón en ácido láctico final es pequeño y la reacción se establece muy lentamente.

Así pues, en las técnicas de ensilado conocidas actualmente sólo los azúcares solubles, contenidos en los vegetales, son utilizados en la producción de ácido láctico. Cuando se tiene que realizar a vegetales pobres en glucidos, en particular los del tipo leguminosas, el ensilado es prácticamente imposible de realizar en buenas condiciones; las bacterias lácticas no tienen suficiente elemento nutritivo para multiplicarse, el medio es insuficientemente acidificado, y se desarrollan productos tóxicos rápidamente que hacen el forraje impropio para el consumo.

El nuevo procedimiento según la invención permite obtener una fermentación láctica en detrimento de otras reacciones biológicas indeseables, creando las condiciones indispensables para esta fermentación, es decir, puesta a disposición de las bacterias lácticas de elementos nutritivos de los que tienen necesidad para su crecimiento, sin aportación de elementos exteriores, y destrucción de las bacterias indeseables. Este procedimiento se aplica en la conservación en estado fresco, de cualesquiera tipos de especies vegetales, tan variada y difíciles de tratar como, por ejemplo, la col, la alfalfa ó la remolacha.

La presente invención aporta un perfeccionamiento en la estabilización de vegetales por acidificación,

que no solo se aplica a todos los vegetales utilizables, sino -además- aumenta su valor nutritivo. El procedimiento según la invención permite por lo demás contener completamente toda fermentación butírica, prolonga la duración posible de conservación que hace prácticamente independiente de la temperatura y, mejora, en una gran medida, la utilización del nitrógeno vegetal por los animales.

El nuevo procedimiento, según la invención, que comprende la adición en el forraje u otro vegetal a ensilar de al menos una capa bacteriana, capaz de producir ácido láctico a partir de azúcares fermentescibles presentes, se caracteriza porque se añade, al mismo tiempo, un factor de degradación de glúcidos superiores en azúcares fermentescibles.

Así pues, conforme a la invención, glúcidos superiores, en particular celulosa, pentosano, almidón, etc. presentes en el vegetal a almacenar, son transformados en azúcares para ser puestos a disposición de las bacterias que operan la fermentación láctica; ésta no puede por tanto ser insuficiente y no disminuye la proporción en azúcares fermentescibles del vegetal.

El factor de degradación de glúcidos superiores puede estar constituido por bacterias capaces de atacar estos glúcidos y/o por enzimas apropiadas.

Una de las formas de ejecución del nuevo procedimiento según la invención consiste en introducir en el ensilado, en el momento de la ejecución de éste, al menos dos tipos de bacterias: unas elegidas entre las que son capaces de degradar los glúcidos superiores en azúcares fermentescibles, y otras susceptibles de transformar en ácido láctico estos azúcares fermentescibles.

Más particularmente, el adyuvante de los vegetales ó del forraje, según la invención, comprende al menos una cepa microbiana capaz de degradar el almidón en maltosa, y al menos una segunda cepa microbiana, que transforma la maltosa en ácido láctico.

Así pués, contrariamente al arte anterior, la presente invención permite poner siempre a disposición de los micro-organismos, productores de ácido láctico, cantidades de azúcar fermentescible suficientes para esta producción láctica; cualquiera que sea la especie vegetal tratada, se llega así a tener bastante maltosa para que la formación de ácido láctico pueda tener lugar hasta un pH inferior a 4,5. Esta formación es acelerada cuando se añade enzimas para degradar los glúcidos superiores.

En efecto, según un aspecto facultativo, pero preferido de la invención, el forraje es igualmente adicionado de una ó de varias enzimas de acción complementaria susceptibles de romper los glúcidos en particular la celulosa, los almidones, los pentosanos, etc., en azúcares fermentescibles; en particular la hemi-celulasa y las amilasas, la amiloglucosidasa son muy útiles desde este punto de vista para asegurar la formación de maltosa, necesaria en la producción del ácido láctico por las bacterias. Se entiende por hemi-celulasa un complejo hemicelolítico de origen fúngico de acción enzimática sacarificante del tipo galactomanasa, pectinasa, beta-glucanasa, xilanasa y celulasa. Actúa sobre los constituyentes glucídicos de las membranas celulares y las dextrinas en zonas de pH comprendidas entre 5,5 y 2. Las amilasas son de varios tipos y orígenes. Las α - y β -amilasas - de origen fúngico hidrolizan las uniones α (1-4) de los almidones produciendo principalmente maltosa, pero igualmente triosas y

destrinas límites (polímeros que contienen de 5 a 8 moléculas de osas), no siendo fraccionados los enlaces (1-6) por esta amilasa. Esta amilasa actúa sobre el almidón de los granos de almidón estallado; en efecto, la periferia del grano de almidón está formada por una membrana constituida de pentosanos y de glúcidos superiores no atacados por la amilasa α ó β . Además, actúa en un campo de pH comprendido entre 4 y 6,4. Su acción se para por tanto cuando el pH del silo desciende por debajo del valor 4.

Para completar la acción hidrolizante de esta amilasa fúngica, se ha añadido en la preparación destinada a la conservación de los vegetales, y este punto forma parte de la invención, una amilasa de origen bacteriana. Esta enzima actúa sobre los almidones licuados por acción de las anteriores amilasas y produce esencialmente maltosa. Esta enzima actúa en un campo de pH comprendido entre 5 y 8.

A fin de fraccionar las uniones 1-6, no atacadas por las anteriores enzimas, se ha añadido una tercera enzima amilolítica, objeto de la invención, en el producto de ensilado. Se trata de la amiloglucosidasa que es un complejo enzimático sacarificante, catalizador de hidrólisis de las uniones α (1-4) y sobre todo α (1-6) de las cadenas finales del almidón, que produce esencialmente d-glucosa a partir de las dextrinas límites. Esta amilasa actúa a un pH comprendido entre 3 y 6,8.

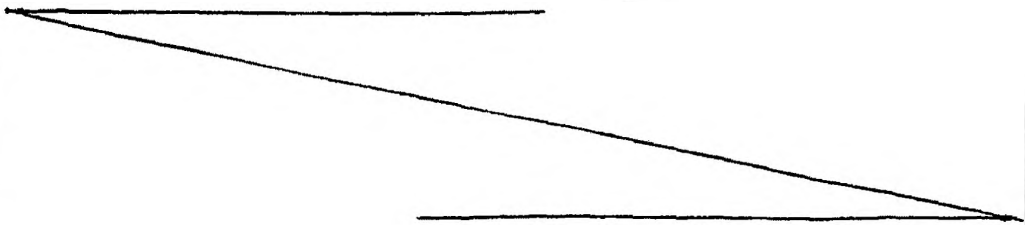
Estas enzimas presentadas en formas de mezcla tienen así una acción complementaria por su actividad sobre los glúcidos más complejos hasta los más simples, en zonas de pH que podrían ir de 7 a 2; la máxima actividad para cada enzima se alcanzaría a medida de la disminución del pH el cual no

descienden por debajo de 3,5 en el silo, y en intervalos de temperatura que varían de 10 a 30°C, compatibles con las condiciones del silo.

5 Merced a la invención, el ácido láctico se produce en detrimento de los glúcidos superiores, en lugar de los azúcares inferiores de gran valor nutritivo. Esta transformación de los glúcidos complejos en azúcares asimilables y fermentescibles aumenta el valor nutritivo del vegetal ensilado: permite mejores rendimientos zootécnicos, por la utilización
10 directa de estos últimos azúcares, ó por lo menos por la activación de las bacterias del rumen, a las que estos aportan un suplemento de energía.

15 Las cepas de bacterias, utilizadas según la invención, presentan las características comunes siguientes: son todas susceptibles de hacer fermentar la glucosa, el reactivo VP (Voges-Proskauer) y la oxidasa, mientras que no tienen acción sobre el inositol, sorbitol, citrato, urea y no producen H_2S .

20 Aunque sea posible utilizar conjuntos elegidos entre numerosos micro-organismos, conocidos, aplicando el principio de la invención enunciado más arriba, se obtienen resultados particularmente favorables con ciertas bacterias, Gram +, en particular cocci y bacilos. El cuadro siguiente dá las características de dichas bacterias.



CUADRO I
=====

		Cocci Gram +			Bacilos Gram +			
		1	2	3	4	5	6	7
	Glucosa	+	+	+	+	+	+	+
5	Mannitol	-	+	+	-	+	+	+
	Inositol	-	-	-	-	-	-	-
	Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-
	Rhamnosa	-	+	+	-	+	+	+
	Sacarosa	+	-	+	-	+	+	+
10	Mélibiosa	-	+	+	-	+	-	-
	Amigdalina	+	+	+	-	+	+	+
	Arabinosa	-	+	+	-	+	+	+
	Maltosa	+	+	+	+	-	+	-
	Almidon	-	-	-	-	+	-	+
15	Gelatina	-	-	-	-	+	-	-
	Catalasa	-	-	-	-	+	+	+
	O N P G (B galactosidasa)	-	+	-	-	+	+	+
	A D H (arginina dihidrolasa)	-	-	+	-	-	-	+
	L D C (lisina decarboxilasa)	-	-	-	-	-	-	-
20	T D A (triptofana desaminasa)	-	-	-	-	-	-	-
	Citrato	-	-	-	-	-	-	-
	H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-
	Ura	-	-	-	-	-	-	-
	Indola	-	-	-	-	-	-	-
25	VP (Voges Proskauer)	+	+	+	+	+	+	+
	Nitratos	-	-	-	-	+	+	+
	Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+

Se puede ver según las características del cuadro anterior que los dos tipos de bacterias empleadas ejercen acciones complementarias. Así pues los cocos (nº 1 a 3) hacen fermentar la mayor parte de los glúcidos simples y sobre todo las glucosas, sacarasas y maltosa. Proliferan por tanto abundantemente en tanto estos azúcares estén presentes en el forraje: ello se traduce por la formación de ácido láctico y un descenso rápido del pH hacia 4,5, por ende por una parada completa de la fermentación butírica. Sin embargo, esta proliferación de los cocci conduciría a un descenso grande de la cantidad de azúcares simples indicados; por el contrario, el almidón presente en el vegetal, permanecería inutilizado, en razón de la inaptitud de estos cocos en atacarle: pero entonces interviene la proliferación de los bacilos (número 5 a 7) que fraccionan el almidón en azúcares asimilables por las otras bacterias del mismo grupo (números 4 y 6).

Las bacterias, utilizables en el procedimiento según la invención, pueden ser cultivadas de forma clásica sobre gelosa con un medio nutritivo que comprende harinas de cereales. Son tales como por ejemplo *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesentérico* (*Betacoccus*) etc. ...

Las cantidades de mezcla sobre soporte de las bacterias en cuestión empleadas por toneladas de forraje cortado, son aproximadamente de 10 a 15 Kg, encerrando esta mezcla seca una cantidad del orden de 100.000 a 1.000.000 de cocci y 100.000 a 1.000.000 de bacilos/g. En el momento el que pH de aproximadamente 3,8 a 4,2 se alcanza en la materia ensilada, sembrada con estas bacterias, el número de gérmenes vivos, por gramo de materia, es del orden de 10^9 .

Han sido efectuados ensayos en silos de 4 m³ de capacidad sobre dactyle Lucifer recolectado en Junio, al comienzo de la espigación. Este forraje era cortado finamente y sometido al almacenamiento en tres condiciones diferentes:

- 5
- A) sin ningún tratamiento,
- B) tratado con tres litros de ácido fórmico/m³, de forma conocida y,
- C) adicionado de 7 Kg de cultivo de 7 bacterias sobre soporte, cuyas características están indicadas más arriba (nº 1 a 7).
- 10

Después de 90 a 120 días, en análisis de los tres ensilados condujo a los siguientes resultados (cuadro II).

15

Se puede ver que es el tratamiento según la invención el que conduce al pH más bajo y a la proporción en ácido láctico más fuerte; presenta la ventaja de no dar lugar ni a la formación del ácido propiónico, ni a la del ácido butírico y solamente a aproximadamente la mitad del ácido acético que se forma en los otros procedimientos.

20

CUADRO II

=====

	pH	N del NH ₃ % del N total	N soluble % del total	Acidos organicos y alcoholes g/Kg MS				
				lac-tico	Acé-tico	Pro-pio-nico	Buti-rico	Alco-holes
A no tratado	4,34	14,1	49,8	77,6	29,1	2,5	0	7,8

	pH	N del NH ₃ % del N total	N soluble % del total	Acidos organicos y alcoholes g/Kg MS				
				lac-tico	Acé-tico	Pro-pio-nico	Buti-rico	Alco-holes
B tratamiento formico	4,05	7,7	42,7	69,9	25,3	0,8	0	6,7
C tratado según la invención	4,02	7,7	48,1	95,0	14,7	0	0	11,0

5

La digestibilidad y la ingestibilidad de estos ensilados han sido medidas sobre carneros; se ha encontrado después del tratamiento con ácido fórmico la proporción 0,68 UF/Kg, mientras que el tratamiento según la invención condujo a 0,74 UF/Kg.

10

El balance del nitrógeno sobre animales en desarrollo conduce igualmente a resultados que ponen de manifiesto el interés del tratamiento según la invención, como se puede ver en el cuadro III.

CUADRO III

=====

	N ingerido g/j	N Fécal		N urinario		N retenido	
		g/j	% N ingerido	g/j	% N ingerido	g/j	% N ingerido
A: no tratado	20,3	7,45	36,8	12,70	62,7	0,12	0,6
B: tratamiento formico	18,7	7,16	38,3	10,50	56,4	1,02	5,5
C: tratado según la invención	16,7	6,28	37,7	8,24	49,5	2,14	12,8

15

Así pues, el nitrógeno retenido es más del doble del que se obtiene después del tratamiento fórmico.

5 Para preparar una composición que comprenda a la vez bacterias y enzimas, se puede efectuar una mezcla de las bacterias necesarias, depositadas sobre soporte como se ha indicado más arriba, con la mezcla de las enzimas preconizadas. Una forma preferida de la invención consiste en añadir estas enzimas depositadas a su vez sobre un soporte de cereales (trigo, cebada, cebada germinada) tomados preferentemente en forma finamente triturada; el almidón contenido en el soporte se añade así al almidón y los glúcidos contenidos en los vegetales; es degradado en azúcares fermentescibles que aumentan así el valor nutritivo del ensilado.

15 La composición de la mezcla bacterias soportadas, y de mezcla de enzimas depositadas ó no sobre soportes de cereales puede comprender proporciones diferentes de cada uno de los constituyentes. Esta mezcla seca encierra una cantidad del orden de 100.000 a 1.000.000 de cocci y de 100.000 a 1.000.000 de bacilos/g.

20 Las cantidades de hemi-celulasa, de amilasas y de amiloglucoxidasa pueden ser variables; se calcula en función de la naturaleza del forraje a tratar. Pero estas proporciones están en general comprendidas entre 0,05 a 0,20% en peso del vegetal ensilado, es decir aproximadamente 35.000 U.I/g de hemi-celulasa, entre 0,05 a 0,20% es decir 250 unidades/g de amilasa bacteriana; entre 0,10 a 0,20% es decir 50.000 unidades PS 50/g de amilasa fúngica y entre 0,10 y 0,70%, es decir 200 unidades AG/g de amiloglucosidasa.

Cuando las encimas son depositadas sobre soporte de cereales según la forma preferida de la invención, el producto a incorporar en el ensilado puede contener 1 Kg de enzimas para 9 Kg de soporte aproximadamente.

5

Las cantidades empleadas de bacterias y enzimas soportadas son de 10 a 15 Kg aproximadamente por tonelada de forraje.

10

Ensayos preliminares a la introducción de la mezcla bacterias enzimas soportadas en el silo, han sido efectuados a fin de poner en manifiesto la acción de cada una de las enzimas sobre el almidón crudo.

15

Se mezcla a 1.000 g de harina de cebada triturada con martillo, la enzima estudiada (estando indicado el porcentaje en los cuadros IV y V) y 100 mg de zisasan como antibiótico. Se añade entonces 100 g de agua dulce (22 T.H.) a temperatura ambiente: se obtiene una pasta relativamente consistente.

20

Después de 72 horas (para los ensayos de la primera serie) y 56 horas (para los ensayos de la segunda serie) a temperatura ambiente, la pasta (que de partida tiene un pH de 5,3) es dispersada en agua destilada y el volúmen es completado hasta 500 ml. Se filtra esta dispersión, y se efectúa sobre los filtrados las dosificaciones de los otros reductores, así como la dosificación de la glucosa.

25

Durante estos ensayos, se produce una modificación física de la pasta que resulta muy fluida con la amiloglucosidasa, fluida con amilasa bacteriana y es poco modificada con respecto al testigo con la amilasa fúngica.

CUADRO IV

1ª Serie de ensayos : 72 horas				
	% enzima	pH al final del ensayo	% azúcares reductores en glucosa	% glucosa cierta
Testigo	-	5,40	8,6	4,3
Amilasa fungica	2	4,55	12,6	7,1
Amilasa bacteriana	1	5,30	16,7	6,6
Amilasa bacteriana + Amilasa fungica	1	4,60	19,2	10,8
Amiloglucosidasa	1	5,20	29,3	12,-

CUADRO V

2ª serie de ensayos : 56 horas				
	% enzima	pH al final del ensayo	% azuceres reductores en glucosa	% glucosa cierta
Testigo	-	5,30	8,4	4,3
Amilasa fungica	0,2	5,30	10,0	5,2
Amilasa bacteriana	0,1	5,35	14,1	6,2
Amiloglucosidasa	0,1	5,25	18,8	12,8
Amilasas bact. y fung. + hemicelulosa + Amiloglucosidasa	0,1	5,25	21,35	19,49

Estos cuadros permiten comparar la actividad propia de cada enzima sobre los almidones crudos, y la misión complementaria en la acción sinérgica de la mezcla de las cuatro enzimas; se vé igualmente que los rendimientos en azúcares reductores y glucosa verdadera son superiores con la amiloglucosidasa puesto que esta es capaz de fraccionar las uniones α (1-6).

Ensayos han sido efectuados sobre col, estando acompañado el cultivo de las bacterias añadidas de una pequeña adición de α - y β -amilasa de origen fúngico y de hemicelulasa. En estas condiciones, se ha comprobado una disminución marcada de la proporción en celulosa bruta en el ensilado tratado según la invención, como se puede ver en el cuadro siguiente:

CUADRO VI

	A no tratado	B tratamiento fórmico	C tratado se- gún la in- vención
Agua	92,67	88,22	91,26
Materiales minerales	1,37	1,19	1,44
Proteínas brutas	2,07	2,80	1,94
Celulosa bruta	1,72	1,66	1,02
Nitrogeno amoniacal	0,095	0,074	0,055
Relación NH_3/N	28,8	16,5	17,7
Acido lactico	0,06	0,08	1,74
Acido butyrico	0,02	0,007	
Acido propionico	0,09	0,06	
Acido acético	0,21	0,50	0,23
pH	5,30	4,55	3,95

Ensayos han sido efectuados en silos de 4 m³ de capacidad sobre la alfalfa recolectada en Junio. Este forraje era cortado finamente y sometido al almacenamiento con las dos condiciones siguientes:

5 A) tratado con 3 litros de ácido fórmico/m³, de la forma conocida,

10 B) adicionado de 7 Kg de una mezcla constituida de las 7 bacterias sobre soporte cuyas características son descritas más arriba, y enzimas siguientes (amilasas de origen fúngico, amilasas de origen bacteriano, amiloglucosidasa, he mi-celulasa) depositadas sobre un soporte de cebada finamente triturado, en las porporciones indicas anteriormente.

15 Después de 90 a 120 días, el análisis de los dos ensilados conduce a los resultados siguientes (cuadro VII).

20 Se puede ver que es el tratamiento según la invención el que conduce al pH más bajo y a la proporción en ácido láctico más fuerte; presenta la ventaja de no dar lugar ni a la formación de ácido propiónico ni a la del ácido butírico.

CUADRO VII

	Silo tratado con ácido fórmico	Silo tratado según la invención
Materia seca %	23,70	24,08
PH	4,20	3,80
25 NNH ₃ /N total	8,02	6,67
N total	6,36	6,30

	Silo tratado con ácido fórmico	Silo tratado según la invención
N. amoniacal	0,51	0,42
Acido acético	6,08	5,92
Acido propionico	trazas	trazas
Acido butirico	1,62	trazas
Acido lactico	18,60	25,50

5

10

El cuadro VIII, que sigue, indica las características de dos grupos de bacterias Gram +, Bacilli B8 a B14 y Streptococos S4 a S7, que convienen para la realización de la invención. Estas bacterias han sido aisladas de una harina de cebada por el método sobre gelosa UF en tubos largos y estrechos con aislamiento por agotamiento; así como por el método de la anaerobiosis en caja de Pétri, sobre gelosa (ver cuadro VIII).

15

20

Los bacilos B8 y B9 son *Lactobacillus plantarum*, B10 y B11 son bacilos largos, B12 muy largos, mientras que los B13 y B14 son bacilos achaparrados. El Streptococo S4 es un coco especial, diferente de los otros; S5 es el Streptococo láctico, mientras que los S6 y S7, a igualdad de reacciones bioquímicas, se presentan ambos en muy finas colonias, pero difieren entre sí en el sentido de que el Strepto S6 aparece en el Gram bajo la forma de cadenas cortas, mientras que S7 forma pequeños montones de gruesos cocos.

25

Por cultivo de estas cepas se obtienen los productos, según la invención, a mezclar al forraje en el momento de la puesta en silo. Aunque el cultivo pueda ser efectuado de forma conocida de por sí, es preferible conducirlo de la siguiente manera.

CUADRO VIII

		Bacilos							Estreptococos				
		B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	S4	S5	S6	S7	
5	Azucares	Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		Mannitol	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	
		Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		Rhammose	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
		Sacarosa	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
		Melibiososa	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-
		Amigdalina	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		Arabinosa	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
15	Acciones enzimaticas	Gelatina	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
		Catalasa	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
		C N P G	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
		A D H	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
		L D C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		C D C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		F D A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		20	Citrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		indola	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		25	V.P.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitratos	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		

bastante rico en proteínas, por ejemplo en g/l:

	extracto aminado de levadura de cerveza:	10
	peptona pancreatica o caseina :	1,25
	peptona Chapoteaut :	10
	glucosa :	4
5	NaCl :	5
	leche desnatada :	5

El medio, debe por el contrario, ser fuertemente tamponado a pH 7-7,2; su constitución puede ser la de una patilla glucosada ordinaria, por ejemplo (en g/l):

10	extracto aminado de levadura de cerveza:	3,75
	peptona pancreática :	1,25
	peptona chapoteaut :	10
	NaCl :	5
	Glucosa :	4
15	fosfato monopotásico :	0,7
	fosfato disódico :	8,3

Los cultivos obtenidos son preferentemente, empleados en estado seco, en particular liofilizados.

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento de conservación y valori-
zación de vegetales en estado verde, por acidificación láctica
con ayuda de bacterias añadidas antes del ensilado, caracteri-
zado porque las bacterias capaces de provocar la fermentación
láctica son acompañadas de un factor de degradación de glúcidos
superiores, en particular de la celulosa y del almidón, en azú-
cares fermentescibles, utilizables por las bacterias que produ-
cen la fermentación láctica.

10 2. Procedimiento según la reivindicación
1, caracterizado porque el factor de degradación de los glúci-
dos superiores está constituido por bacterias susceptibles de
hacer fermentar la glucosa, el reactivo VP y la oxidasa, mien-
tras que no tienen acción alguna sobre el inositol, sorbitol,
15 citrato y urea, y no conducen a la formación de H_2S .

20 3. Procedimiento según la reivindicación
1, caracterizado porque el factor de degradación de los glúci-
dos superiores está constituido por una ó varias enzimas, en
particular amilasa de origen fúngico y/o bacteriano hemi-celula-
sa y/o amiloglucoxidasa.

25 4. Procedimiento según una de las reivin-
dicaciones 1 a 3, caracterizado porque las bacterias capaces de
producir la fermentación láctica son empleadas conjuntamente con,
a la vez, bacterias susceptibles de atacar los glúcidos superio-
res y las enzimas que pueden degradar estos glúcidos.

5. Procedimiento según una de las reivin-
dicaciones 1 a 4, caracterizado porque las bacterias, utilizadas

5 con vistas a la fermentación láctica, presentan igualmente las características de la reivindicación 2, es decir que pueden hacer fermentar la glucosa, el reactivo VP y la oxidasa, pero no tienen acción alguna sobre el inositol, sorbitol, citrato y urea, y no producen H_2S .

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque las bacterias empleadas son Gram + y pertenecen a las familias de los bacilos y de los cocos.

10 7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque las bacterias son bacilos, Streptococcus y/o Betacoccus, en particular Streptococcus lactis, Lactobacillus plantarum y Leuconostoc mesentéroides.

15 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque las bacterias utilizadas se obtienen por cultivo de cepas aisladas de cereales, en particular cebada.

20 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la cantidad de cultivo bacteriano con su soporte, en estado seco, añadida por tonelada de vegetales a ensilar, es aproximadamente de 10 a 15 Kg, conteniendo este aditivo 100.000 a 1.000.000 de gérmenes vivos por gramo.

25 10. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque las enzimas tienen una acción complementaria frente a los glúcidos superiores que degradan, y porque actúan en un campo de pH igualmente complementario que va de 7 a 3,5 y en zonas de temperatura comprendidas entre 10

a 30°C, que corresponden a las condiciones del silo.

5 11. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 10, caracterizado porque la mezcla de enzimas está constituida por 0,05 a 0,20 por millar en peso del vegetal a ensilar, es decir 250 unidades/g de amilasas bacterianas, por 0,10 a 0,20 por millar en peso, es decir 50.000 unidades PS 50/g de amilasas fúngicas, por 0,10 a 0,70 por millar en peso, es decir 200 unidades AG/g de amiloglucosidasa y por 0,05 a 10 0,20 por millar en peso, es decir aproximadamente 35.000 U.I./g de hemi-celulasa.

12. Procedimiento según las reivindicaciones 1, 10 y 11, caracterizado porque la mezcla de enzimas se deposita sobre un soporte de cereales y preferentemente sobre harina de cebada finamente triturada.

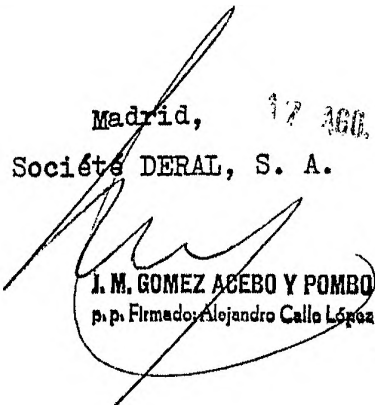
15 13. Procedimiento según las reivindicaciones 1, 10, 11, y 12, caracterizado porque la proporción de enzimas depositadas sobre soporte de cereales es variable; preferentemente es de 1 Kg de enzimas por 9 Kg de soporte.

20 14. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque se emplea de 10 a 15 Kg. de bacterias + enzimas, depositadas sobre soporte por tonelada de forraje.

25 15. Procedimiento de conservación y valorización de vegetales en estado verde, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 26 hojas, escritas
a máquina por una sola cara.

Madrid, 17 AGO. 1977
Societe DERAL, S. A.


J. M. GOMEZ ACEBO Y POMBO
p.p. Firmado: Alejandro Calle López