

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 864 217**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.11.2015 PCT/IB2015/059079**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.06.2016 WO16083996**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2015 E 15804608 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2020 EP 3224345**

54 Título: **Conservante de heno y métodos para la conservación de heno**

30 Prioridad:

24.11.2014 EP 14194567

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

13.10.2021

73 Titular/es:

**DANSTAR FERMENT AG (100.0%)
Poststrasse 30
6300 Zug, CH**

72 Inventor/es:

**SINDOU, JULIEN y
DURAND, HENRI**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 864 217 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

Conservante de heno y métodos para la conservación de heno

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente descripción se refiere a un conservante de heno. Más específicamente a un conservante de heno para conservar heno en heno de alta humedad almacenado y a un método de uso de conservante de heno para la conservación de heno en heno de alta humedad almacenado.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El marchitamiento del heno hasta un nivel de humedad óptimo en el campo antes del empacado sería una situación óptima con el fin de reducir la pérdida de materia seca (DM), el crecimiento de moho y la respiración de las células vegetales durante el empacado y el almacenamiento del heno. Sin embargo, este proceso da como resultado pérdidas nutricionales considerables debido a la respiración continuada de las plantas, la rotura de las hojas por daño mecánico y la lixiviación debido a la lluvia. El reconocimiento de este hecho, y también a causa de condiciones meteorológicas impredecibles, ha conducido a muchos productores de heno a empacar heno a un contenido de humedad mayor que el óptimo (el 20-30%) para minimizar el riesgo de daño por lluvia y pérdidas mecánicas de hojas. Sin embargo, esta práctica da como resultado pérdidas debido a las actividades de levadura y mohos, y en ocasiones bacterias y el resultante calentamiento y mala calidad nutritiva del heno en el momento de la alimentación.

Un enfoque simple ha sido pulverizar el heno húmedo en el momento del almacenamiento con un ácido orgánico, tal como, por ejemplo, ácido propiónico. Aunque los ácidos orgánicos son generalmente efectivos a la hora de impedir la proliferación fúngica en heno húmedo, las superiores tasas de aplicación, campo aumentado, costes de manipulación así como preocupaciones medioambientales hacen que la mayoría de los productores de heno sean reacios a usarlos.

Aunque la investigación muestra que inoculantes de base bacteriana podrían reemplazar potencialmente a los ácidos orgánicos en la conservación de heno empacado por encima del contenido de humedad óptimo (Baah *et al.*, Asian-Aust. J. Anim. Sci. 18:649-660, 2005.), resultados de otros estudios sobre ensilaje y henolaje han sido contradictorios (Zahiroddini *et al.*, Asian-Aust. J. Anim. Sci. 19(10):1429-1436, 2006, Muck, Trans. ASAE 47:1011-1016, 2004). Hay evidencia abundante para indicar que las aparentes contradicciones en las respuestas a inoculantes se deben a interacciones entre las especies microbianas en inoculantes individuales y las poblaciones microbianas epífitas (bacterias, levadura y mohos) en el heno antes de la inoculación.

Sería altamente deseable que se proporcionase un conservante de heno mejorado, particularmente para impedir y reducir el daño por calor del heno en heno de alta humedad almacenado y también para conservar el mismo.

Zahiroddini *et al.* pretenden proporcionar aditivos para ensilajes que contienen una variedad de especies bacterianas con o sin enzimas exógenas para potenciar la fermentación y la estabilidad aerobia del ensilaje de cebada.

Brurberg *et al.* dan a conocer técnicas de ingeniería genética que podrían usarse para introducir genes de quitinasa de *Serratia marcescens* en el inoculante de ensilaje de bacterias del ácido láctico con el fin de impedir el crecimiento fúngico, más específicamente en *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus plantarum*.

Weinberg *et al.* dan a conocer aditivos para ensilajes que contienen bacterias del ácido láctico para mejorar la eficiencia de conservación y para potenciar el rendimiento animal.

El documento US 4820531 da a conocer un conservante de heno que comprende *Bacillus pumilus* así como otros organismos seleccionados del grupo *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Pediococcus* y enzimas derivadas de hongos o bacterias.

Ozduven *et al.* pretenden proporcionar aditivos para ensilajes que contienen inoculantes bacterianos y/o enzimas (tal como enzimas celulosa, amilasa, hemicelulosa y pentosanasa) para mejorar la eficiencia de fermentación y para potenciar el rendimiento animal.

Tengerdy *et al.* es un artículo científico sobre el ensilaje con aditivos para ensilaje que contienen bacterias del ácido láctico y un cóctel de celulasas, hemicelulasas, pectinasas y/o amilasas para ensilar alfalfa

El documento EP0408220 da a conocer que cepas bacterianas antifúngicas y antimicrobianas de *Bacillus* y *Serratia* se usan en la preparación y conservación de piensos animales hechos a partir de forraje.

SUMARIO DE LA DIVULGACION

La presente divulgación proporciona un método de conservación de la calidad del heno en heno de alta humedad almacenado. El método se basa en el uso de un conservante de heno capaz de impedir y/o reducir el daño por calor

en heno de alta humedad almacenado. El conservante de heno usado impide y/o reduce el calor en heno de alta humedad igual o mejor que los ácidos orgánicos.

- 5 En un aspecto, se proporciona un método de tratamiento de heno para impedir y/o reducir el daño por calor en heno de alta humedad y también para conservar el mismo, comprendiendo el método añadir al heno un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa en combinación con una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de una levadura del género *Pichia* o bacteria del género *Pediococcus*, teniendo la al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa una actividad quitinasa en el intervalo de aproximadamente 6 U a 300 U por tonelada de heno que debe tratarse, y siendo la cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de una levadura del género *Pichia* o una bacteria del género *Pediococcus* de 10^5 a 10^{15} organismos viables de la levadura o la bacteria por tonelada de heno que debe tratarse, y liberando cada unidad de enzima (U) aproximadamente 1,0 mg de N-acetil-D-glucosamina a partir de quitina (g) por hora a pH 6,0 y a una temperatura de 25°C en un ensayo de 2 horas.
- 10
- 15 En un aspecto adicional, se proporciona un método de tratamiento de heno para impedir y/o reducir el daño por calor en heno de alta humedad y también para conservar el mismo, comprendiendo el método añadir al heno un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa.
- 20 En un aspecto adicional, se proporciona un método de tratamiento de heno para impedir y/o reducir el daño por calor en heno de alta humedad y también para conservar el mismo, comprendiendo el método añadir al heno un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa en combinación con una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de una levadura del género *Pichia*.
- 25
- 30 En un aspecto aún adicional, se proporciona un método de tratamiento de heno para impedir y/o reducir el daño por calor en heno de alta humedad y también para conservar el mismo, comprendiendo el método añadir al heno un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa en combinación con una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de una bacteria del género *Pediococcus*.
- 35 En otro aspecto, se proporciona un método de tratamiento de heno para impedir y/o reducir el daño por calor en heno de alta humedad y también para conservar el mismo, comprendiendo el método añadir al heno un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de una levadura del género *Pichia*.
- 40 En un aspecto adicional, se proporciona un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa.
- 45 En un aspecto aún adicional se proporciona un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa en combinación con una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de una levadura del género *Pichia* o bacteria del género *Pediococcus*, teniendo la al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa una actividad quitinasa en el intervalo de aproximadamente 6 U a 300 U por tonelada de heno que debe tratarse, y siendo la cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de una levadura del género *Pichia* o una bacteria del género *Pediococcus* de 10^5 a 10^{15} organismos viables de la levadura o la bacteria por tonelada de heno que debe tratarse, y liberando cada unidad de enzima (U) aproximadamente 1,0 mg de N-acetil-D-glucosamina a partir de quitina (g) por hora a pH 6,0 y a una temperatura de 25°C en un ensayo de 2 horas.
- 50 En un aspecto adicional, se proporciona un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa en combinación con una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de una levadura del género *Pichia*.
- 55 En un aspecto, se proporciona un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa en combinación con una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de una bacteria del género *Pediococcus*.
- 60 En un aspecto adicional, todos los aspectos mencionados previamente pueden comprender además al menos una enzima que tiene una actividad pectina liasa, una actividad glucanasa o una mezcla de las mismas.
- 65 En otro aspecto, se proporciona un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de una levadura del género *Pichia*.
- En un aspecto adicional, se da a conocer un heno de alta humedad que comprende una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de levadura de al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa, ya sea sola o en combinación con una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de una levadura del género

Pichia o bacteria del género *Pediococcus*. El heno de alta humedad puede comprender además al menos una enzima que tiene una actividad pectina liasa, una actividad glucanasa o una mezcla de las mismas.

En otro aspecto, se da a conocer un heno de alta humedad que comprende una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de una levadura del género *Pichia*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Por tanto, habiendo descrito en general la naturaleza de la invención, ahora se hará referencia a los dibujos adjuntos, que muestran a modo de ilustración una realización preferida de la misma, y en los que:

la Figura 1 ilustra la temperatura media semanalmente durante el almacenamiento de pacas de heno de alfalfa tratadas con una levadura del género *Pichia* (*P. anomala*) o al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa (Enzima); en comparación con pacas de heno de alfalfa tratadas con ácido propiónico (Ácido prop.) y no tratadas;

la Figura 2 ilustra la temperatura media diaria durante el almacenamiento de pacas de heno de alfalfa tratadas con al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa en combinación con una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de una levadura del género *Pichia* (PichChit) o bacteria del género *Pediococcus* (Pedio pe), en comparación con pacas de heno de alfalfa tratadas ácido propiónico (PROP) y no tratadas;

la Figura 3 ilustra un gráfico del tiempo pasado en minutos por encima de 40°C durante el almacenamiento (2012) de pacas de heno de alfalfa tratadas con al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa en combinación con una levadura del género *Pichia* (*Pichia* +Enz) o una bacteria del género *Pediococcus* (Pedio +Enz), en comparación con pacas de heno de alfalfa tratadas con ácido propiónico (Ácido prop.) y no tratadas (Control); y

la Figura 4 ilustra un gráfico del tiempo pasado en minutos por encima de 40°C durante el almacenamiento (2013) de pacas de heno de alfalfa tratadas con al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa en combinación con una levadura del género *Pichia* (*Pichia* +Enz) o una bacteria del género *Pediococcus* (Pedio +Enz), en comparación con pacas de heno de alfalfa tratadas con una levadura del género *Pichia* sola (*Pichia*), una bacteria del género *Pediococcus* sola (Pedio), ácido propiónico (Ácido prop.) y no tratadas (Control).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Uno de los problemas con el heno de alta humedad es la degradación y el deterioro provocados por calor generado de manera espontánea. Estas pacas calentadas son habitualmente peores en color, valor nutricional y tienen más moho visible. Un enfoque ha sido pulverizar el heno húmedo en el momento del almacenamiento con un ácido orgánico, tal como, por ejemplo, ácido propiónico. Aunque los ácidos orgánicos son generalmente efectivos a la hora de impedir la proliferación fúngica en heno húmedo, las superiores tasas de aplicación, campo aumentado, costes de manipulación así como preocupaciones medioambientales hacen que la mayoría de los productores de heno sean reacios a usarlos.

Aunque la investigación muestra que inoculantes de base bacteriana podrían reemplazar potencialmente a los ácidos orgánicos en la conservación de heno empacado por encima del contenido de humedad óptimo, resultados de otros estudios sobre ensilaje y henolaje han sido contradictorios. Hay evidencia abundante para indicar que las aparentes contradicciones en las respuestas a inoculantes se deben a interacciones entre las especies microbianas en inoculantes individuales y las poblaciones microbianas epífitas (bacterias, levadura y mohos) en el heno antes de la inoculación.

En su aspecto más amplio, la presente divulgación proporciona un método de conservación de calidad del heno y de impedir o reducir el daño por calor en heno de alta humedad almacenado, comprendiendo el método tratar heno fresco en condiciones aerobias con un conservante de heno.

El conservante de heno comprende una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa. Sorprendentemente, se ha encontrado que el conservante de heno se potencia incluso más desde el punto de vista de su efecto conservante y su capacidad a la hora de impedir y/o reducir el daño por calor en el heno de alta humedad si la al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa se combina con una levadura del género *Pichia* o bacteria del género *Pediococcus*. Cuando la al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa se combina con una levadura del género *Pichia* o una bacteria del género *Pediococcus*, la reducción de temperatura del heno de alta humedad se potencia significativamente mediante la combinación, en comparación con el uso de cada componente de la combinación solo tal como se muestra en la Figura 4.

Alternativamente, el conservante de heno puede comprender una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de una levadura del género *Pichia* sola.

El término “cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor”, cuando se usa en el presente documento, se entenderá que hace referencia a una cantidad que es al menos suficiente para conservar la calidad del heno. Por tanto, la cantidad es al menos suficiente para impedir y/o reducir el daño por calor en heno de alta humedad y también para conservar el mismo.

El término “heno”, cuando se usa en el presente documento, se entenderá que hace referencia a toda forma de heno tal como se usa el término comúnmente en agricultura. El heno está compuesto de la manera más común de alfalfa, pasto, o mezclas de alfalfa y pasto recogidos a un nivel de humedad objetivo menor del 20%.

El método de tratamiento de heno para impedir y/o reducir el daño por calor en heno de alta humedad y también para conservar el mismo puede incluir añadir al heno un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa. Tal como se ha mencionado previamente, la al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa puede combinarse con una levadura del género *Pichia* o bacteria del género *Pediococcus*.

En una realización, el método de tratamiento de heno para impedir y/o reducir el daño por calor en heno de alta humedad y también para conservar el mismo puede incluir añadir al heno un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa en combinación con una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de una levadura del género *Pichia*.

En otra realización, el método de tratamiento de heno para impedir y/o reducir el daño por calor en heno de alta humedad y también para conservar el mismo puede incluir añadir al heno un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa en combinación con una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de una bacteria del género *Pediococcus*.

Alternativamente, el método de tratamiento de heno para impedir y/o reducir el daño por calor en heno de alta humedad y también para conservar el mismo puede incluir añadir al heno un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de una levadura del género *Pichia* sola.

La levadura del género *Pichia* incluye, pero no se limita a, una *Pichia anomala* sp. En una realización, la levadura del género *Pichia* puede ser una *Pichia anomala* sp que tiene todas las características identificadoras de *Pichia anomala* que tiene el número de registro cepa DBVPG 3003. Se entiende que cualquier aislado que tenga las características identificadoras de *Pichia anomala* que tiene el número de registro cepa DBVPG 3003, incluyendo subcultivos y variantes de los mismos que tienen las características identificadoras y la actividad descrita en el presente documento está incluido. La *Pichia anomala* que tiene el número de registro cepa DBVPG 3003 se depositó en la Colección de levaduras industriales DBVPG del Dipartimento di Biologia Vegetale e Biotecnologie Agroambientali e Zootecnica, Sezione di Microbiologia Agroalimentare ed Ambientale, <http://www.agr.unipg.it/dbvpg>, Universidad de Perugia, Italia.

La bacteria del género *Pediococcus* incluye, pero no se limita a, una *Pediococcus pentosaceus* sp. En una realización, la bacteria del género *Pediococcus* puede ser de una *Pediococcus pentosaceus* sp que tiene todas las características identificadoras de la cepa BTC328 de *Pediococcus pentosaceus* (que tiene el número de registro NCIMB 12674). En una realización adicional, la bacteria del género *Pediococcus* puede ser de una *Pediococcus pentosaceus* sp que tiene todas las características identificadoras de la cepa BTC401 de *Pediococcus pentosaceus* (que tiene el número de registro NCIMB 12675). Se entiende que cualquier aislado que tenga las características identificadoras de la cepa BTC328 o BTC401 de *Pediococcus pentosaceus*, incluyendo subcultivos y variantes de los mismos que tienen las características identificadoras y actividad descritas en el presente documento está incluido. Las cepas de *Pediococcus pentosaceus* que tienen el número de registro NCIMB 12674 y 12675 se depositaron en la National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria Ltd, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA.

En una realización del método, el intervalo de tratamiento para el heno es normalmente de 10^5 a 10^{15} organismos viables de la levadura o bacteria por tonelada de heno, preferiblemente de 10^7 a 10^{13} organismos viables de la levadura o la bacteria por tonelada de heno, y más preferiblemente de 10^9 a 10^{12} organismos viables de la levadura o la bacteria por tonelada de heno. El término “tonelada”, cuando se usa en el presente documento, se entenderá que hace referencia a una tonelada métrica (1000 kg).

La al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa puede tener una actividad quitinasa en un intervalo de aproximadamente 6 a aproximadamente 300 unidades de enzima (U) por tonelada de heno que debe tratarse. En una realización, la actividad quitinasa puede estar en el intervalo de aproximadamente 6 a aproximadamente 100 U por tonelada de heno que debe tratarse. Una U se define como la cantidad de la enzima que produce una cierta cantidad de actividad quitinasa. Cada unidad de enzima (U) puede liberar aproximadamente 1,0 mg de N-acetil-D-glucosamina a partir de quitina (g) por hora a pH 6,0 y a una temperatura de 25°C en un ensayo de 2 horas.

El conservante de heno según la presente descripción puede comprender además al menos una enzima que tiene una actividad pectina liasa, una actividad glucanasa o una mezcla de las mismas.

El conservante de heno según la presente descripción puede estar en forma o bien líquida o sólida. El conservante de heno según la presente descripción puede comprender un portador adecuado o puede usarse tal cual. En forma sólida, el conservante de heno puede comprender portadores sólidos o extendedores físicos. El portador adecuado puede estar en forma líquida acuosa o no acuosa o en forma sólida. Los ejemplos no limitativos de portador en forma líquida acuosa o no acuosa incluyen agua, aceites y parafina. Los ejemplos no limitativos de portador en forma sólida incluyen portador orgánico o inorgánico tal como, por ejemplo, maltodextrina, almidones, carbonato de calcio, celulosa, suero de leche, mazorcas de maíz trituradas y dióxido de silicona. La forma sólida puede aplicarse directamente al heno en forma de un espolvoreado de polvo ligero, o si se esparce en un portador líquido puede pulverizarse satisfactoriamente sobre el heno. Se entiende que puede usarse cualquier otro portador adecuado para el propósito de la presente descripción. También se entiende que el conservante de heno según la presente divulgación puede aplicarse al heno usando técnicas estándar comunes para los expertos habituales en la técnica. El conservante de heno también puede aplicarse antes de, durante y/o después del empacado. La presente invención se entenderá más fácilmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que se facilitan para ilustrar la invención, en vez de para limitar su alcance.

EJEMPLOS

Ejemplo 1:

Heno, tratamientos y condiciones de empacado

El heno era un tercer corte que consistía en el 90% de alfalfa y el 10% de bromo veloso. El heno se cortó con una segadora New-Holland™ el 17 de septiembre de 2011 y se dejó secar de manera no acondicionada e inalterada. El nivel de humedad se evaluó usando un medidor de humedad de heno hilado Farmex™ (1205 Danner Drive, Aurora, OH) cinco días después del corte y se encontró que oscilaba entre el 20 y el 35%. En este momento se prepararon los conservantes de heno pesando previamente inoculantes y mezclando cada uno de ellos en jarras independientes que contenían 6,5 l de agua destilada medida previamente y agitadas durante 1 minuto. Un tanque pulverizador y una barra pulverizadora con una única boquilla se montó sobre una empacadora cuadrada grande 4790 Hesston. La barra se colocó de modo que el patrón de pulverización cubriera el 90% de la hilera con una deriva mínima.

Se prepararon dos pacas de ensayo para determinar el tiempo hasta la aplicación completa del aditivo en una paca, el peso de la paca así como una medida más precisa del contenido de humedad del material empacado. La humedad de la paca se determinó usando una sonda de heno. Se encontró que el tiempo promedio para preparar una paca (0,91 m x 1,22 m x 2,44 m) era de 2 minutos 30 segundos y se encontró que el peso promedio de la paca era de 820 kg. La tasa de aplicación de *P. anomala* era de 10^{11} UFC en 1 l por tonelada de heno. La enzima que tiene una actividad quitinasa se aplicó a una tasa de 1,5 g (suspendida en 1 l de agua) por tonelada de heno, correspondiendo a aproximadamente 6 U por tonelada de heno. El producto de ácido propiónico consistía en el 68% (vol./vol.) de ácido propiónico y se aplicó a una tasa de 2,72 l/tonelada y se consideró como control positivo. El control negativo era agua y se aplicó a una tasa de 1 l por tonelada de heno. La *P. anomala* y la enzima que tiene una actividad quitinasa se obtuvieron de Lallemand Specialties Inc. (Milwaukee, WI, EE. UU.), mientras que el ácido propiónico era de Wausau Chemical Corporation (Wausau, WI, EE. UU.). Se prepararon cinco pacas replicadas para cada tratamiento. Se tomaron muestras de la *P. anomala* después de cada aplicación para verificar la viabilidad y los números del organismo. Esto era para posibilitar la confirmación de la tasa de aplicación para el organismo. Cada paca se etiquetó inmediatamente tras su salida de la empacadora usando pintura en aerosol y después con etiquetas unidas a bridas de plástico. Todas las pacas se pesaron un día después del empacado y se muestrearon los núcleos. Las pacas se dejaron en el campo durante 2 semanas después del empacado, para reducir el riesgo de combustión, antes de transportarse y almacenarse en una sola capa en un cobertizo para heno de lados abiertos. Se tomaron muestras de los núcleos de las pacas de nuevo el día 90 desde 4 lados (excluyendo las partes superior e inferior de las pacas) y se volvieron a apilar encima o las otras (pilas de dos pacas). Se tomaron muestras de los núcleos de nuevo el día 180.

Determinación química-microbiológica

Se llevaron a cabo análisis químicos y microbiológicos en muestras de heno recogidas de seis secciones diferentes del campo y en muestras de núcleo compuestas obtenidas de cuatro ubicaciones diferentes en cada paca el día 1, 90 y 180 de almacenamiento. Se usaron los procedimientos esbozados por McAllister *et al.* (1995. Intake, digestibility and aerobic stability of barley silage inoculated with mixtures of *Lactobacillus plantarum* and *Enterococcus faecium*. Can. J. Anim. Sci. 75:425-432.) para enumerar las bacterias totales, las bacterias que producen ácido láctico (LAB), levaduras y mohos. Se determinaron la materia seca (DM), la materia orgánica (OM) y la proteína bruta (CP) según los procedimientos AOAC (1990), y la fibra detergente neutra (NDF), la fibra detergente ácida (ADF) y el nitrógeno insoluble en detergente ácido (ADIN) tal como se describe por Van Soest *et al.*, (1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74: 3583-3597.).

Tabla 1. Composición química (% de DM), pH y composición microbiológica (ufc log₁₀) de heno 90 días tras el tratamiento con diversos conservantes de heno en el empacado.¹

Factor ²	Día 0	PA	CE	BPA	CON
DM	81,95	87,32	86,59	86,08	84,68
pH	6,25	6,11	6,24	6,00	6,36
TB	-	7,14	6,60	6,10	7,51
LAB	3,80	5,42 ^{bc}	4,77 ^c	4,88 ^c	6,29 ^a
LEVADURA	6,48	5,57	5,94	5,38	6,20
MOHO	5,41	5,25	5,18	4,77	5,34
OM	87,89	88,10 ^a	85,28 ^c	88,27 ^a	88,02 ^a
NH ₃ , mg kg ⁻¹	0,336	0,479	0,841	0,583	1,017
TN	3,5	3,46	3,67	3,58	3,55
LA, (g kg ⁻¹)	-	0,051 ^b	0,094 ^a	0,099 ^a	0,129 ^a
NDF	45,52	-	-	-	-
ADF	33,19	31,23	30,79	30,49	31,86
ADIN	0,375	0,273 ^{ab}	0,229 ^b	0,254 ^b	0,255 ^b
ADIN, (% de TN)	10,75	7,92 ^{ab}	6,23 ^c	7,16 ^{bc}	7,19 ^{bc}

¹PA=*Pichia anomala*; CE = Enzimas con actividad quitinasa;

BPA=Ácido propiónico; CON=Control.

²TB=Bacterias no fastidiosas que crecen sobre agar nutritivo; LAB=bacterias que crecen sobre MRS de las que se supone que son *Lactobacilli*; OM= Materia orgánica;

NH₃=Nitrógeno de amoníaco; TN=Nitrógeno total; LA= Ácido láctico; ADF= Fibra detergente ácida; ADIN=Nitrógeno insoluble en detergente ácido

- 5 La tabla 1 muestra el efecto de los tratamientos con conservantes de heno sobre los perfiles químicos y microbiológicos de muestras del heno recogidas el día 0 (día del empacado) y 90 días tras el empacado. Aparte del ácido láctico y el nitrógeno insoluble en detergente ácido (ADIN), los diversos tratamientos no afectaron a ninguno de los factores evaluados, es decir, pH, nitrógeno total, nitrógeno de amoníaco y ADF. La concentración de ácido láctico era menor en los tratamientos con *P. anomala* en comparación con otros tratamientos. En comparación con otros tratamientos, el nivel de ADIN (% de DM) era mayor en el tratamiento con *P. anomala*. Las poblaciones de bacterias totales (bacterias no fastidiosas que crecen sobre agar nutritivo), levadura y moho en muestras de heno del día 90 no se vieron afectadas por el tratamiento. En comparación con otros tratamientos, las poblaciones de lactobacilos eran mayores en *P. anomala* y habiendo aumentado las pacas control desde log₁₀ 3,80 UFC g⁻¹ el día del empacado hasta log₁₀ 5,42 y log₁₀ 6,29 UFC g⁻¹, respectivamente el día 90.

Tabla 2. Composición química (% de DM), pH y composición microbiológica (ufc log₁₀) de heno 180 días tras el tratamiento con diversos inoculantes en el empacado.¹

Factor ²	PA	CE	BPA	CON
DM	87,89 ^a	87,72 ^{ab}	85,64 ^b	85,79 ^b
pH	6,00 ^b	6,14 ^a	6,11 ^a	6,17 ^a
NA	6,14	7,25	7,23	7,23
MRS	5,21	6,32	6,28	6,74
LEVADURA	5,25 ^{ab}	5,82 ^a	4,67 ^b	4,27 ^b
MOHO	5,48	5,37	6,24	6,08
OM	88,59	87,93	87,80	87,63
NH ₃ (mg.kg ⁻¹)	0,418	0,565	0,635	0,704
TN	3,26	3,57	3,56	3,53
LA (g.kg ⁻¹)	0,983	0,970	1,052	1,453
NDF	44,18 ^b	44,78 ^b	46,33 ^b	50,07 ^a
ADF	32,35 ^{bc}	32,76 ^b	32,72 ^b	34,55 ^a
ADIN	0,262	0,253	0,245	0,268
ADIN (% de TN)	8,03	7,17	6,96	7,58

¹PA=*Pichia anomala*; CE=Enzimas con una actividad quitinasa;

BPA=Ácido propiónico; CON=Control.

Factor ²	PA	CE	BPA	CON
² TB=Bacterias no fastidiosas que crecen sobre agar nutritivo; LAB=bacterias que crecen sobre MRS de las que se supone que son <i>Lactobacilli</i> ; OM=Materia orgánica; NH ₃ =Nitrógeno de amoníaco; TN=Nitrógeno total; LA=Ácido láctico; ADF= Fibra detergente ácida; ADIN=Nitrógeno insoluble en detergente ácido				

Aparte del pH y la población de levadura, no hubo diferencias entre los tratamientos en la composición química y microbiológica en las muestras del día 180 (véase la tabla 2). En comparación con todos los demás tratamientos, el pH era el menor en la *P. anomala* (6,00). La población de levadura era la mayor en el tratamiento con enzimas con una actividad quitinasa.

Tabla 3. Concentraciones de ácidos grasos volátiles (VFA) en muestras de núcleo de heno tras 90 y 180 días después del tratamiento con diversos aditivos en el empaquetado¹

VFA	PA	CE	BPA	CON
Acetato (g kg ⁻¹)				
90 d	8,95	8,55	10,53	6,97
180 d	9,69	9,58	8,38	7,28
Propionato (g kg ⁻¹)				
90 d	0,1333	0,1267	0,4667 ^a	0,1467
180 d	0,0675	0,080	0,426 ^a	0,052
VFA totales (g kg ⁻¹)				
90 d	9,14	8,72	11,04	7,17
180 d	9,87	9,76	8,89	7,42
¹ PA= <i>Pichia anomala</i> ; CE=Enzima con una actividad quitinasa; BPA=Ácido propiónico; CON=Control.				

Haciendo referencia ahora a la tabla 3, las concentraciones de VFA (ácidos grasos volátiles) totales y de acetato en las muestras tanto del día 90 como del día 180 no se vieron afectadas por el tratamiento. El VFA predominante producido después de 180 días de almacenamiento era acetato y este representaba del 94% al 98% de los VFA totales producidos en las pacas. Había una tendencia hacia acetato y VFA totales superiores en pacas tratadas con *P. anomala* y enzimas con una actividad quitinasa después de 180 días de almacenamiento. Las concentraciones de acetato y VFA totales en pacas del día 180 tratadas con *P. anomala* y enzimas con una actividad quitinasa eran al menos un 14% mayores que las concentraciones en los otros tratamientos, indicando que ambos de estos tratamientos inducían un mayor grado de fermentación microbiana anaerobia en las pacas en comparación con los otros tratamientos. En comparación con el tratamiento control, las concentraciones de VFA totales y acetato eran aproximadamente un 32% mayores en pacas del día 180 tratadas con *P. anomala*-enzimas con una actividad quitinasa. Como se esperaba, la concentración de propionato en las pacas tratadas con ácido propiónico era mayor que las concentraciones en los otros tratamientos en las muestras del d 90 y d 180, respectivamente (tabla 3).

Tabla 4. Evaluación de la calidad de heno tratado con diversos aditivos y almacenado durante 180 días.

Factor de calidad	Paca n.º	PA	CE	BPA	CON
COLOR	1	5	18	10	17
	2	17	18	5	5
	3	17	10	12	5
	4	5	-	10	10
	5	17	0	7	15
	Media	12,2	15,3	8,8	10,4
OLOR	1	2	12	12	12
	2	10	15	0	0
	3	17	5	12	0

	4	10	0	5	0
	5	17	0	5	12
	<i>Media</i>	11,2	10,7	6,8	4,8
GLOBAL	1	7	30	22	29
	2	27	33	5	5
	3	34	15	24	5
	4	15	0	15	10
	5	34	0	12	27
	<i>Media</i>	23,4	26	15,6	15,2
CALIDAD	1	P	G	P	A
	2	VG	G	VP	VP
	3	G	P	P	VP
	4	G	-	VP	VP
	5	G	-	P	P

PA=*Pichia anomala*; CE= enzimas con una actividad quitinasa;

BPA=Ácido propiónico; CON=Control.

Color/Olor – basado en la Hoja informativa de extensión cooperativa de Maryland n.º 644 “Evaluación de la calidad del heno”

(<http://www.extension.umd.edu/publications/pdfs/fs644.pdf>).

Color

5

El heno con color verde brillante tiene una puntuación alta (de 15 a 20).

Los henos de amarillo dorado a amarillo tienen una puntuación de 5 a 15 puntos

10 Los henos de marrón oscuro a negro tienen una puntuación de 0 a 5 puntos.

Olor

15

El olor de heno recién segado tiene una puntuación alta (de 15 a 20 puntos).

Los henos con olores a moho u otros malos olores tienen una puntuación de 5 a 15 puntos.

Los henos mohosos o inusualmente polvorientos tienen una puntuación muy baja (de 0 a 5 puntos)

20 Calidad

La calidad se basa en la evaluación global por parte del examinador, que incluía; muy pobre, pobre, promedio, buena, muy buena y excelente

25 Todas las pacas se abrieron el día 180 y se evaluó su calidad basándose en la Hoja informativa de extensión cooperativa de Maryland n.º 644. Basándose en la evaluación visual y sensorial, los tratamientos control y con ácido propiónico produjeron heno de la calidad más pobre, mientras que el resto de los tratamientos produjeron heno de calidad de promedio a buena (tabla 4).

30 Estabilidad a la temperatura

35 La estabilidad a la temperatura de las pacas se monitorizó midiendo de manera continua la temperatura interior de cada paca con tres Dallas Thermochron iButtons (Embedded Data Systems, Lawrenceburg, KY) que se insertaron en los agujeros de núcleo la mañana siguiente después del empacado. Los iButtons se configuraron para registrar temperaturas cada hora durante los primeros 60 días del periodo de almacenamiento. Dado que las lecturas de temperatura no mostraron ningún calentamiento adicional, las sondas no volvieron a colocarse en las pacas después de 60 días. Las pacas se abrieron y se puntuaron visualmente para el grado de degradación y moho al final del periodo de almacenamiento (180 d) basándose en la Hoja informativa de extensión cooperativa de Maryland n.º 644 “Evaluación de la calidad del heno” (<http://www.extension.umd.edu/publications/pdfs/fs644.pdf>).

40 Tal como se muestra en la Figura 1, la temperatura ambiental (área de almacenamiento de las pacas) promedio semanalmente disminuyó desde un máximo de aproximadamente 16°C durante la primera semana de almacenamiento hasta temperaturas bajo cero después de la semana 7. Sin embargo, las temperaturas en todas las

pacas permanecieron por encima de 20°C durante las primeras tres semanas del periodo de almacenamiento. La temperatura semanalmente más alta (aproximadamente 34°C) se registró durante la semana 2 en pacas control. La temperatura promedio en pacas control durante las primeras tres semanas fue de aproximadamente 30°C. Las temperaturas en pacas tratadas con enzimas con una actividad quitinasa fueron consistentemente menores que aquellas en pacas control desde la semana 1 hasta la semana 7 (Figura 1). Se observó una tendencia similar (excepto durante la semana 2) cuando el tratamiento se comparó con el tratamiento con ácido propiónico (Figura 2). Aunque todos los tratamientos tuvieron un efecto positivo sobre la disminución de la temperatura en pacas durante el periodo de almacenamiento, el tratamiento más efectivo; en comparación con los tratamientos tanto control como con ácido propiónico, fueron enzimas con una actividad quitinasa. En comparación con las pacas control y tratadas con ácido propiónico, las temperaturas promedio en pacas tratadas con enzimas con una actividad quitinasa fueron de 6 - 8°C y 4 - 5°C menores que las temperaturas en las pacas control y tratadas con ácido propiónico, respectivamente, durante el mismo periodo.

Experimento con animales

Se determinaron el grado y la tasa *in situ* de desaparición de DM y NDF de las muestras de heno del día 180 en tres vacas equipadas con cánulas ruminales y alimentadas con una dieta de recría de engorde estándar que consistía en el 50% de heno de Fleo más el 50% de ensilaje de cebada (base de DM). Se combinaron submuestras de las muestras de núcleo del día 180 obtenidas de pacas tratadas con el mismo conservante y se trituraron para pasar a través de un tamiz de 4 mm. Aproximadamente 4 g de cada muestra combinada se pesaron en bolsas Dacron y se incubaron por triplicado en cada vaca durante 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 h. Las bolsas estaban hechas de malla de poliéster monofilamentosa (53 µm de tamaño de poro, 5 cm x 20 cm, Ankorm, Fairport, Nueva York). Se les dio dos semanas a las vacas para que se adaptasen a sus dietas antes de iniciar las incubaciones. Inmediatamente después de la incubación, las bolsas se enjuagaron bajo agua del grifo fría, hasta que se hubieron retirado todos los contenidos del rumen en el exterior de las bolsas. Las bolsas se lavaron en una lavadora doméstica en agua fría durante tres minutos usando el ciclo de lavado delicado sin detergente ni ciclo de centrifugado. El procedimiento de lavado se repitió una vez. Conjuntos duplicados de bolsas no incubadas que contenían muestras de cada tratamiento se lavaron con las bolsas anteriores y se usaron para estimar la desaparición a las 0 h para cada tratamiento. Todas las bolsas se secaron entonces en un horno de aire forzado a 55°C durante 48 h. Los residuos de las bolsas por triplicado del mismo tratamiento incubadas en la misma vaca se agruparon y se trituraron para pasar a través de un tamiz de 1 mm antes de analizarse para NDF según el método indicado anteriormente. Se calcularon los porcentajes de desaparición de DM y NDF a partir de la proporción restante en las bolsas tras cada tiempo de incubación. Los datos de desaparición de DM y NDF se ajustaron a una versión modificada del modelo exponencial de Orskov y McDonald (1979) con una fase de latencia:

$$p = a + b(1 - e^{-c(t - \text{lat.})}) \text{ para } t > \text{lat.}$$

donde; p es la desaparición de DM o NDF (%) tras t horas, a es la fracción que desaparece rápidamente (%), b es la fracción que desaparece lentamente (%) y c es la tasa fraccionada de desaparición (h⁻¹) de la fracción b. Los parámetros se estimaron mediante un procedimiento no lineal iterativo (método Marquardt) con el paquete de software SAS (1990). La desaparición efectiva (EFFD, %) a las 48 h de incubación se estimó basándose en una tasa de flujo de salida fraccionada asumida del 6%.

Tabla 5. Efecto del conservante de heno¹ sobre la desaparición de DM *in situ* (%)² de heno de alfalfa-bromo incubado en el rumen de vacas Jersey

Desaparición ³				
	PA	CE	BPA	CON
12 h	66,65 ^a	62,92 ^c	62,20 ^c	61,38 ^c
24 h	75,13 ^a	72,65 ^b	72,84 ^b	70,86 ^c
48 h	78,37 ^a	77,22 ^a	78,57 ^a	75,62 ^b
<i>Cinética</i>				
a	34,13	34,65	33,34	34,37
b	44,62 ^{ab}	43,21 ^b	46,38 ^a	42,11 ^b
c, h ⁻¹	0,114 ^a	0,089 ^{bc}	0,083 ^c	0,087 ^c
<i>Potencial</i>	78,75 ^a	77,86 ^{ab}	79,72 ^a	76,48 ^b
<i>Efectiva</i>	62,92 ^a	60,40 ^b	59,97 ^b	59,09 ^b

¹PA=*Pichia anomala*; CE= enzimas con una actividad quitinasa BPA=Ácido propiónico; CON=Control.
²Las medias en la misma fila con diferentes superíndices difieren (P < 0,05).

Desaparición ³				
	PA	CE	BPA	CON

³Parámetros calculados a partir de la ecuación ajustada: $p = a + b[1 - e^{-c(t-lat.)}]$ para $t > lat.$; donde p es la proporción (%) de NDF que desaparece de bolsas de nailon tras t horas de incubación; a es la fracción que desaparece rápidamente (%); b es la fracción que desaparece lentamente (%); c es la tasa fraccionada de desaparición (h^{-1}) de la fracción b

Desaparición de materia seca *in sacco*

Los efectos de los conservantes sobre la desaparición de DM a las 12, 24 y 48 h, incluyendo las cinéticas de desaparición se ilustran en la tabla 5. No hubo tiempo de latencia en la desaparición de DM. Las muestras de heno tratadas con el aditivo microbiano (*P. anomala*) tenían una desaparición de DM mayor en todos los puntos de tiempo de incubación (12, 24 y 48 h) en comparación con los tratamientos control y con ácido propiónico; excepto a las 48 h cuando todos los aditivos (incluyendo enzimas con una actividad quitinasa y ácido propiónico) eran superiores al control. De manera similar, tanto la tasa como la desaparición de DM efectiva eran mayores en muestras de heno tratadas con los aditivos microbianos en comparación con los tratamientos control y con ácido propiónico. En comparación con todos los demás tratamientos, las muestras de heno de pacas tratadas con *P. anomala* tenían la tasa más rápida de desaparición de DM (0,114 h^{-1}). La tasa más baja de 0,083 h^{-1} y 0,087 h^{-1} se observaron en el tratamiento con ácido propiónico y los tratamientos control. Todos los aditivos aumentaron la fracción de DM potencialmente digerible, excepto enzimas con una actividad quitinasa que tenían un valor similar al del control. No obstante, la desaparición de DM efectiva en la muestra tratada con *P. anomala* era mayor que en los tratamientos control y con ácido propiónico.

Tabla 6. Efecto de conservantes de heno¹ sobre la desaparición de NDF *in situ* (%)² de heno de alfalfa-bromo incubado en el rumen de vacas Jersey

Desaparición ³				
	PA	CE	BPA	CON
12 h	41,06 ^b	37,28 ^c	39,04 ^{bc}	39,64 ^{bc}
24 h	51,88 ^{ab}	49,22 ^b	51,88 ^{ab}	51,11 ^b
48 h	58,23 ^b	56,07 ^c	60,19 ^{ab}	58,38 ^{ab}
<i>Cinética</i>				
a	19,28	19,90	19,11	18,80
b	40,48	37,67	43,59	41,54
c, h^{-1}	0,078	0,076	0,069	0,070
Latencia	1,89 ^b	3,67 ^a	2,87 ^{ab}	1,91 ^b
<i>Potencial</i>	59,76 ^{bc}	57,57 ^c	62,70 ^a	60,34 ^b
<i>Efectiva</i>	39,87 ^b	36,66 ^b	38,84 ^b	38,94 ^b

¹PA=*Pichia anomala*; CE=Enzimas con una actividad quitinasa; BPA=Ácido propiónico; CON=Control.
²Las medias en la misma fila con diferentes superíndices difieren ($P < 0,05$).
³Parámetros calculados a partir de la ecuación ajustada: $p = a + b[1 - e^{-c(t-lat.)}]$ para $t > lat.$; donde p es la proporción (%) de NDF que desaparece de bolsas de nailon tras t horas de incubación; a es la fracción que desaparece rápidamente (%); b es la fracción que desaparece lentamente (%); c es la tasa fraccionada de desaparición (h^{-1}) de la fracción b .

Aunque no hubo diferencias entre los tratamientos en términos de la tasa de desaparición de NDF, la fracción que desaparece rápidamente y la fracción que desaparece lentamente, la desaparición efectiva era la más alta en heno tratado con *P. anomala* en comparación con todos los demás tratamientos (tabla 6). El tiempo de latencia más largo en la desaparición de NDF se observó en heno tratado con enzimas con una actividad quitinasa (3,67 h), mientras que el tiempo de latencia más corto de 1,89 h se observó en el tratamiento con *P. anomala*. Sin embargo, el último tiempo de latencia no era diferente del de los otros tratamientos. La desaparición de NDF total a las 12, 24 y 48 h oscilaba entre el 37,28% (la más baja) en heno tratado con enzimas con una actividad quitinasa y el 41,06% (la más alta) en el tratamiento con *P. anomala*, teniendo otros tratamientos valores intermedios. Se observó una tendencia similar en la desaparición a las 24 h. La desaparición de NDF después de 48 h era mínima en tratamientos con enzimas con una actividad quitinasa en comparación con todos los demás tratamientos.

Los datos de desaparición de DM *in sacco* sugieren que *P. anomala* aumentaba la fracción potencialmente digerible, así como la tasa fraccionada y la desaparición efectiva del heno en comparación con el control. De hecho, los valores de desaparición efectiva de heno tratado con *P. anomala* eran superiores a los de los tratamientos control y con ácido propiónico.

Ejemplo 2:

Heno, tratamientos y condiciones de empaçado

El heno era heno de alfalfa y se recolectó el 15 de agosto de 2012 en Fort Macleod, Alberta, Canadá. El heno de alfalfa se dejó marchitar en el campo hasta niveles de humedad entre aproximadamente el 24% y aproximadamente el 30%. La humedad de las pacas se determinó como en el ejemplo 1.

La tasa de aplicación de la combinación de *P. anomala* en combinación con la enzima que tiene una actividad quitinasa era respectivamente de 10^{11} UFC y 1,5 g en 1 l de agua por tonelada de heno. Por consiguiente, la tasa de aplicación de la combinación de *P. pentosaceus* en combinación con la enzima que tiene una actividad quitinasa era de 10^{11} UFC y 1,5 g en 1 l de agua por tonelada de heno. El producto de ácido propiónico consistía en el 68% (vol./vol.) de ácido propiónico y se aplicó a una tasa de 2,72 l/tonelada y se consideró como control positivo. El control negativo era agua y se aplicó a una tasa de 1 l por tonelada de heno. Se prepararon cinco pacas redondas grandes de aproximadamente 800 kg según el ejemplo 1 para cada tratamiento el mismo día. Se recogieron muestras de núcleo de pacas de entre todos los tratamientos en el día 0, 90 y 180 después del empaçado para analizar su valor nutricional, producto de fermentación y cambios microbianos.

Las muestras de núcleo recogidas el día 0 y 90, 180 después del empaçado se sometieron a análisis microbiológico y químico. El análisis microbiológico se llevó a cabo para enumerar, aislar y caracterizar los microorganismos (bacterias totales, levaduras y mohos) en placas apropiadas a través de dilución en serie.

Tabla 7 Recuentos microbianos en heno de alfalfa tratado con diversos conservantes de heno en el empaçado

TRATAMIENTO	Días	Control	Pichia+ enzimas	Pedio+ enzimas	Ácido propiónico
Bacterias totales log ufc/g de DM	0	5,92	5,28	6,22	6,34
	90	7,79 ^{ab}	7,34 ^{bc}	6,69 ^c	8,49 ^a
	180	8,27 ^a	6,25 ^b	6,08 ^b	8,25 ^a
LEVADURA	0	4,94	4,98	5,86	5,49
	90	6,57	4,70	5,05	6,22
	180	5,13	4,69	4,40	4,89
MOHO	0	4,83	4,79	4,99	4,66
	90	5,89	5,81	5,85	5,91
	180	6,49 ^a	6,92 ^a	6,69 ^a	5,36 ^b

El perfil microbiológico del heno después de cada tratamiento era similar en el empaçado para bacterias totales, levadura y mohos, incluso si se registraban diferencias numéricas. Después de 90 días del empaçado, el recuento de bacterias totales se redujo mediante el tratamiento con enzimas que tienen una actividad quitinasa en combinación con *Pediococcus pentosaceus* cuando se compara con el tratamiento control y con ácido propiónico, mientras que el tratamiento con enzimas que tienen una actividad quitinasa en combinación con *Pichia anomala* tendía a tener un recuento bacteriano disminuido. La reducción numérica de levadura se notificó para los dos tratamientos con enzimas que tienen una actividad quitinasa en combinación con *Pichia anomala* o *Pediococcus pentosaceus* en oposición al tratamiento control y con ácido propiónico. El recuento de moho no se vio afectado por los tratamientos excepto después de 180 días, cuando el recuento de moho se redujo mediante el tratamiento con ácido propiónico.

El análisis químico se llevó a cabo para determinar el pH, DM, nitrógeno total, nitrógeno de amoníaco, NDF, ADF, nitrógeno insoluble en detergente ácido (ADIN), agua soluble carbohidratos, ácidos grasos volátiles (VFA) y ácido láctico (LA).

Tabla 8 Composición química de heno de alfalfa a los 0, 90 y 180 días tras el tratamiento con conservante de heno en el empaçado

TRATAMIENTO	Días	Control	Picha + enzimas	Pedio+ enzimas	Ácido propiónico
DM %	0	68,9 ^{ad}	76,5 ^{bc}	80,4 ^a	66,9 ^d
	90	82,6 ^b	85,6 ^a	87,3 ^a	79,8 ^c
	180	83,7 ^{bc}	87,9 ^a	88,5 ^a	80,1 ^c
NDF %	0	39,3	39,6	38,6	40,1
	90	55,5 ^a	47,7 ^{cd}	45,2 ^d	53,0 ^{ab}
	180	51,3	54,8	55,3	54,6
ADF %	0	28,3	29,4	28,9	28,7
	90	39,1 ^a	31,6 ^{cd}	30,5 ^d	37,1 ^{ab}
	180	33,7 ^c	37,6 ^{ab}	35,4 ^{bc}	38,2 ^a
TN %	0	3,7	3,7	3,5	3,9
	90	3,7	3,7	3,8	4,1
	180	3,8 ^b	3,8 ^b	3,8 ^b	4,2 ^a
ADIN % N	0	7,2 ^a	5,0 ^b	5,1 ^b	7,3 ^a
	90	17,8 ^a	10,6 ^b	8,7 ^b	18,8 ^a
	180	12,3 ^b	16,9 ^{ab}	15,4 ^b	20,1 ^a

- 5 enzimas que tienen una actividad quitinasa en combinación con *Pichia anomala* o *Pediococcus pentosaceus*, enzimas que tienen una actividad quitinasa en combinación con *Pichia anomala* o *Pediococcus pentosaceus*, enzimas que tienen una actividad quitinasa en combinación con *Pichia anomala* o *Pediococcus pentosaceus*

Tabla 9 Producto de fermentación de heno de alfalfa tratado con diferente conservante de heno en el empaçado

TRATAMIENTO	Días	Control	Pichia+ enzimas	Pedio+ enzimas	Ácido propiónico
pH	0	6,16 ^b	6,23 ^a	6,23 ^a	6,07 ^c
	90	7,64 ^a	5,92 ^b	5,87 ^b	8,29 ^a
	180	7,40 ^{ab}	6,15 ^c	6,03 ^c	7,80 ^a
LA g/kg DM	90	0,32	0,26	0,17	0,49
	180	0,26	0,11	0,10	0,17
Succínico	90	0,26	0,25	0,24	0,20
	180	0,23	0,23	0,24	0,28
Acético	90	0,04	0,31	0,29	0,42
	180	0,29	0,29	0,63	0,71
Prop.	90	NA	NA	NA	0,08
	180	NA	NA	NA	0,04
VFA totales	90	0,04	0,31	0,33	0,50
	180	0,29	0,29	0,66	0,76

El proceso fermentativo del heno no se vio afectado fuertemente por los tratamientos con las enzimas que tienen una actividad quitinasa en combinación con *Pichia anomala* o *Pediococcus pentosaceus*, dado que este material de forraje no es propenso a fermentar tampoco. Sin embargo, el pH menor después de 90 días para el tratamiento con enzimas que tienen una actividad quitinasa en combinación con *Pichia anomala* o *Pediococcus pentosaceus*

Se recogieron muestras de núcleo el día 180 y se evaluaron para la calidad nutricional usando métodos *in situ* e *in vitro*.

Se llevaron a cabo experimentos *in situ* para evaluar el efecto de los conservantes de heno sobre la tasa y el grado de digestión de muestras de heno recogidas 180 días después del empaçado. Se usaron tres vacas equipadas con cánulas ruminales y alimentadas con una dieta de recría de engorde estándar. Aproximadamente 4 g de cada muestra combinada de cada paca (replicado) por tratamiento se pesaron en bolsas Dacron y se incubaron por triplicado en cada vaca durante 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 h. Las bolsas se recuperaron después de la incubación y se procesaron según LRC SOP para determinar la desaparición de DM y NDF ruminal *in situ*.

Tabla 11 Parámetros *in situ* para heno de alfalfa tratado con conservantes de heno en el empaçado.

TRATAMIENTO	Control	Pichia+ enzimas	Pedio+ enzimas	Ácido propiónico
<i>a</i>	26,61 ^{bc}	30,05 ^{ab}	33,79 ^a	23,64 ^c
<i>b</i>	46,80 ^{ab}	43,08 ^{bc}	39,67 ^c	51,69 ^a
<i>c</i>	0,05 ^c	0,06 ^{bc}	0,07 ^{ab}	0,04 ^c
<i>Lat.</i>	1,80 ^{bc}	3,90 ^{abc}	4,30 ^{abc}	1,70 ^c
<i>a+b</i>	73,4	73,1	73,5	75,3

a= la fracción rápidamente degradable

b=la fracción lentamente degradable

c=la tasa a la que se degrada *b* (/h)

lat.=tiempo de latencia (h)

Los datos *in situ* mostrados en la tabla 11 revelan un material de heno más digerible para los tratamientos con enzimas que tienen una actividad quitinasa en combinación con *Pichia anomala* o *Pediococcus pentosaceus*.

También se llevó a cabo un experimento *in vitro* para evaluar el efecto de inoculantes microbianos sobre la producción de gas y las cinéticas de muestras de heno del día 180. Se llevaron a cabo dos series por fluido de rumen mezclado de tres vacas equipadas con cánulas ruminales y alimentadas con una dieta de recría de engorde estándar. Aproximadamente 0,5 g de cada muestra combinada de heno de 180 d por tratamiento se pesaron en un vial y se incubaron por triplicado en cada serie y se midió el gas para 3, 6, 9, 12, 24 y 48 h. Los viales se recuperaron tras la incubación y se procesaron según LRC SOP para determinar la desaparición de DM ruminal, la producción de gas, el amoníaco y VFA *in vitro*.

Tabla 12 Digestibilidad *in vitro* de heno de alfalfa tratado con conservantes de heno en el empaçado

TRATAMIENTO	Control	Pichia+ enzimas	Pedio+ enzimas	Ácido propiónico
DMD g/kg	426 ^d	470 ^b	488 ^b	431 ^d
<i>a</i>	174 ^c	188 ^{bc}	196 ^{ab}	177 ^c
<i>c</i>	6,4 ^c	7,7 ^{bc}	8,4 ^b	6,6 ^c
<i>lat.</i>	0,54 ^a	0,08 ^b	0,06 ^b	0,48 ^a

a= Producción de gas asintomática (ml g⁻¹ DM)

c= Tasa de producción de gas fraccionada/tasa de fermentación (ml h⁻¹)

lat.= tiempo de latencia (h)

La fermentabilidad y digestibilidad *in vitro* del heno en el día 180 confirmaron los desenlaces *in situ* de una digestibilidad potenciada para ambos tratamientos con enzimas que tienen una actividad quitinasa en combinación con *Pichia anomala* o *Pediococcus pentosaceus*.

Estabilidad a la temperatura

La temperatura de pacas individuales se monitorizó midiendo de manera continua la temperatura interior a lo largo del periodo de almacenamiento con tres (3) Dallas Thermochron iButtons (Embedded Data Systems, Lawrenceburg, KY) insertados en el interior de cada paca inmediatamente después de la recolección (ilustrado en las imágenes). La temperatura se registró a intervalos de 4 horas durante 10 semanas.

Tal como se muestra en la Figura 2, los tratamientos con enzimas que tienen una actividad quitinasa en combinación con *Pichia anomala* o *Pediococcus pentosaceus* presentaron ambos una temperatura promedio reducida a lo largo de un periodo de 60 días tras el empaçado. El tratamiento con ácido propiónico tenía la máxima temperatura media a lo largo del tiempo.

El efecto es particularmente significativo tal como se muestra en la Figura 3. La Figura 3 ilustra el tiempo pasado por encima de 40°C para cada tratamiento. Dado que esta temperatura se reconoce en gran medida como el umbral para daños de ADIN, ilustra la intensidad de la temperatura interior de pacas de heno. El tratamiento con ácido propiónico pasó el mayor tiempo por encima de 40°C. El tratamiento con enzimas que tienen una actividad quitinasa en combinación con *Pediococcus pentosaceus* pasó el menor tiempo por encima de 40°C, seguido del tratamiento con enzimas que tienen una actividad quitinasa en combinación con *Pichia anomala*, ambos tratamientos con enzimas que tienen una actividad quitinasa en combinación con *Pichia anomala* o *Pediococcus pentosaceus* pasaron menos tiempo por encima de 40°C que el control.

En conclusión, la combinación de enzimas que tienen una actividad quitinasa con *Pichia anomala* o *Pediococcus pentosaceus* redujo la temperatura interior de pacas de heno, el pH y los números de bacterias totales en comparación

con el control y ácido propiónico en el periodo de almacenamiento. También aumentaron la tasa de digestión y la desaparición de materia seca (DMD) *in situ* así como la tasa de producción de gas y la DMD *in vitro*. Esto puede explicarse mediante un contenido de NDF y ADF menor en estos dos tratamientos.

5 Ejemplo 3

Este ejemplos muestra que la enzima que tiene una actividad quitinasa se potencia incluso más desde el punto de vista de su efecto conservante y su capacidad a la hora de impedir y/o reducir el daño por calor sobre heno de alta humedad si la al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa se combina con una levadura del género *Pichia* o bacteria del género *Pediococcus*. El heno se recolectó y se dejó marchitar en el campo hasta niveles de humedad como en el ejemplo 2.

La tasa de aplicación de la combinación de *P. anomala* en combinación con la enzima que tiene una actividad quitinasa era respectivamente de 10^{11} UFC y 1,5 g en 1 l de agua por tonelada de heno. Por consiguiente, la tasa de aplicación de la combinación de *P. pentosaceus* en combinación con la enzima que tiene una actividad quitinasa es de 10^{11} UFC y 1,5 g en 1 l de agua por tonelada de heno. La tasa de aplicación de *P. anomala* sola era de 10^{11} UFC en 1 l por tonelada de heno. La tasa de aplicación de *P. pentosaceus* solo era de 10^{11} UFC en 1 l por tonelada de heno. La enzima que tiene una actividad quitinasa sola se aplicó a una tasa de 1,5 g (suspendidos en 1 l de agua) por tonelada de heno. El producto de ácido propiónico consistía en el 68% (vol./vol.) de ácido propiónico y se aplicó a una tasa de 2,72 l/tonelada y se consideró como control positivo. El control negativo era agua y se aplicó a una tasa de 1 l por tonelada de heno. Se prepararon cinco pacas redondas grandes de aproximadamente 800 kg según el ejemplo 1 para cada tratamiento el mismo día.

Como en el ejemplo 2, la temperatura de pacas individuales se monitorizó midiendo de manera continua la temperatura interior a lo largo del periodo de almacenamiento con tres (3) Dallas Thermochron iButtons (Embedded Data Systems, Lawrenceburg, KY) insertados en el interior de cada paca inmediatamente después de la recolección (ilustrado en las imágenes). La temperatura se registró a intervalos de 4 horas durante 10 semanas. Tal como se muestra en la Figura 4, cuando la al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa se combina con *P. anomala* o *P. pentosaceus*, la reducción de temperatura de heno de alta humedad se potencia sorprendentemente de manera significativa mediante la combinación, en comparación con usar cada componente de la combinación.

Ejemplo 4

Objetivo del ensayo.

Este ensayo expande las utilidades de una prueba de concepto para un aditivo de heno que reduciría el calentamiento de las pacas preparadas en condiciones de recolección exigentes (un contenido de humedad mayor que el óptimo). Siguió un ensayo similar usando un modelo a escala de laboratorio. El ensayo siguió el perfil de temperatura de las pacas cuadradas pequeñas (~25 kg, el 79,9% de DM) inoculadas usando diferentes combinaciones de dos microorganismos (*Pichia anomala* o *Pediococcus pentosaceus*) con dos enzimas (quitinasa pura o una enzima comercial que contiene actividades pectina liasa, glucanasa y quitinasa).

Metodología.

El ensayo se realizó en pacas cuadradas pequeñas de mezcla de alfalfa-pasto (45:55) y teniendo un peso medio de 25,0 kg en el momento de la recolección. El nivel de humedad medio de las pacas era del 79,9% de DM, dentro del intervalo de nivel de materia seca esperado (el 80-83% de DM). Las pacas se inocularon con el diferente tratamiento tras la pulverización del forraje delante de la cámara de corte de la empacadora, mediante un aplicador de inoculante Dorhmann. El diseño experimental permitió la aplicación de un control y cuatro mezclas de aditivos diferentes de los aditivos microbianos (ninguno, *Pichia anomala* + quitinasa, *Pichia anomala* + mezcla de enzimas, *Pediococcus pentosaceus* + quitinasa, *Pediococcus pentosaceus* + mezcla de enzimas).

Para cada tratamiento se pulverizaron seis pacas cuadradas en tres bloques de dos pacas. Las pacas se transportaron hasta el cobertizo de almacenamiento, se pesaron y se pusieron sobre palés, en un patrón aleatorizado completo predefinido de tal manera que ninguna superficie estuviera en contacto con otra paca. Cada paca se equipó con una sonda de temperatura en su centro geométrico. Las pacas se almacenaron durante 100 días.

Resultados.

Generalmente, los tratamientos inoculados con *Pichia anomala* (n.º 2 y 3 en la tabla 13) mostraron un efecto en el retardo del calentamiento de las pacas, pero mezclar *Pichia anomala* y quitinasa (n.º 3) retardó significativamente el calentamiento y el momento en el que la temperatura de las pacas era de 5°C y 10°C por encima de la temperatura ambiental (tabla 13). Este tratamiento también mostró una temperatura menor durante la fase entre 400 y 600 horas de incubación. La adición de la mezcla de enzimas con la cepa de *Pichia anomala* dio como resultado alguna mejora numérica, aunque la mejora fue menor que con la mezcla de quitinasa.

Las mezclas de *Pediococcus pentosaceus* (n.ºs 4 y 5) permitieron un periodo más largo antes de que empezara el calentamiento de las pacas. El uso de ambos tipos de enzimas dio como resultado beneficios comparables con una reducción del tiempo pasado a 10°C por encima de la temperatura ambiental (tabla 13).

5 *Tabla 13.* Descripción de tratamiento y datos relacionados con el tiempo en relación con el perfil de temperatura

Número de tratamiento	Aditivo microbiano	Aditivo enzimático	Tiempo 5 grados Celsius por encima del ambiente (h)	Time 10 grados Celsius por encima del ambiente (h)
1	Ninguno	No	390,6	290,6 a
2	<i>Pichia anomala</i>	Mezcla de enzimas	295,2	193,9 ab
3	<i>Pichia anomala</i>	Quitinasa	230,0	120,4 b
4	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Mezcla de enzimas	320,4	196,3 ab
5	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Quitinasa	329,6	224,4 ab
			P=0,0971 SEM = 58,24	P=0,0394 SEM = 50,43

10 Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones específicas de la misma, se entenderá que es capaz de modificaciones adicionales y que esta descripción pretende cubrir cualquier variación, uso o adaptación de la invención siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo tales desviaciones de la presente divulgación que entren dentro de la práctica conocida o habitual dentro de la técnica a la que pertenece la invención y como puedan aplicarse a las características esenciales expuestas anteriormente en el presente documento, y tal como sigue en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

15

REIVINDICACIONES

- 1.- Un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa, en combinación con una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de una levadura del género *Pichia* o una bacteria del género *Pediococcus*, teniendo la al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa una actividad quitinasa en el intervalo de aproximadamente 6 U a 300 U por tonelada de heno que debe tratarse, y siendo la cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de una levadura del género *Pichia* o una bacteria del género *Pediococcus* de 10^5 a 10^{15} organismos viables de la levadura o la bacteria por tonelada de heno que debe tratarse, y liberando cada unidad de enzima (U) aproximadamente 1,0 mg de N-acetil-D-glucosamina a partir de quitina (g) por hora a pH 6,0 y a una temperatura de 25°C en un ensayo de 2 horas.
- 2.- El conservante de heno según la reivindicación 1, en el que la levadura del género *Pichia* es de una *Pichia anomala* sp.
- 3.- El conservante de heno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la levadura del género *Pichia* es de una *Pichia anomala* sp que tiene todas las características identificadoras de la cepa de *Pichia anomala* que tiene el número de registro DBVPG 3003.
- 4.- El conservante de heno según la reivindicación 1, en el que la bacteria del género *Pediococcus* es de una *Pediococcus pentosaceus* sp.
- 5.- El conservante de heno según la reivindicación 1 o 4, en el que la bacteria del género *Pediococcus* es de una *Pediococcus pentosaceus* sp que tiene todas las características identificadoras de *Pediococcus pentosaceus* BTC328 que tiene el número de registro NCIMB 12674 o la cepa BTC401 que tiene el número de registro NCIMB 12675.
- 6.- El conservante de heno según la reivindicación 1, en el que la al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa está en combinación con una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de *Pichia anomala* sp.
- 7.- El conservante de heno según la reivindicación 1, en el que la al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa está en combinación con una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de *Pediococcus pentosaceus* sp.
- 8.- El conservante de heno según la reivindicación 1 a 7, que comprende además al menos una enzima que tiene una actividad pectina liasa, una actividad glucanasa o una mezcla de las mismas.
- 9.- Un método de tratamiento de heno para impedir y/o reducir el daño por calor en heno de alta humedad y también para conservar el mismo, comprendiendo el método añadir al heno un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa, en combinación con una cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de una levadura del género *Pichia* o bacteria del género *Pediococcus*, teniendo la al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa una actividad quitinasa en el intervalo de aproximadamente 6 U a 300 U por tonelada de heno que debe tratarse, y siendo la cantidad efectiva para conservar el heno y reducir el calor de una levadura del género *Pichia* o una bacteria del género *Pediococcus* de 10^5 a 10^{15} organismos viables de la levadura o la bacteria por tonelada de heno que debe tratarse, y liberando cada unidad de enzima (U) aproximadamente 1,0 mg de N-acetil-D-glucosamina a partir de quitina (g) por hora a pH 6,0 y a una temperatura de 25°C en un ensayo de 2 horas.
- 10.- El método según la reivindicación 9, en el que la levadura del género género *Pichia* es la especie *Pichia anomala*.
- 11.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, en el que la levadura del género *Pichia* es la especie *Pichia anomala* que tiene todas las características identificadoras de la cepa de *Pichia anomala* que tiene el número de registro DBVPG 3003.
- 12.- El método según la reivindicación 9, en el que la levadura del género *Pediococcus* es la especie *Pediococcus pentosaceus*.
- 13.- El método según la reivindicación 9 o 12, en el que la levadura del género *Pediococcus* es la especie *Pediococcus pentosaceus* que tiene todas las características identificadoras de *Pediococcus pentosaceus* BTC328 que tiene el número de registro NCIMB 12674 o la cepa BTC401 que tiene el número de registro NCIMB 12675.
- 14.- El método según las reivindicaciones 9 a 13, que comprende además al menos una enzima que tiene una actividad pectina liasa, una actividad glucanasa o una mezcla de las mismas.

FIGURA 1

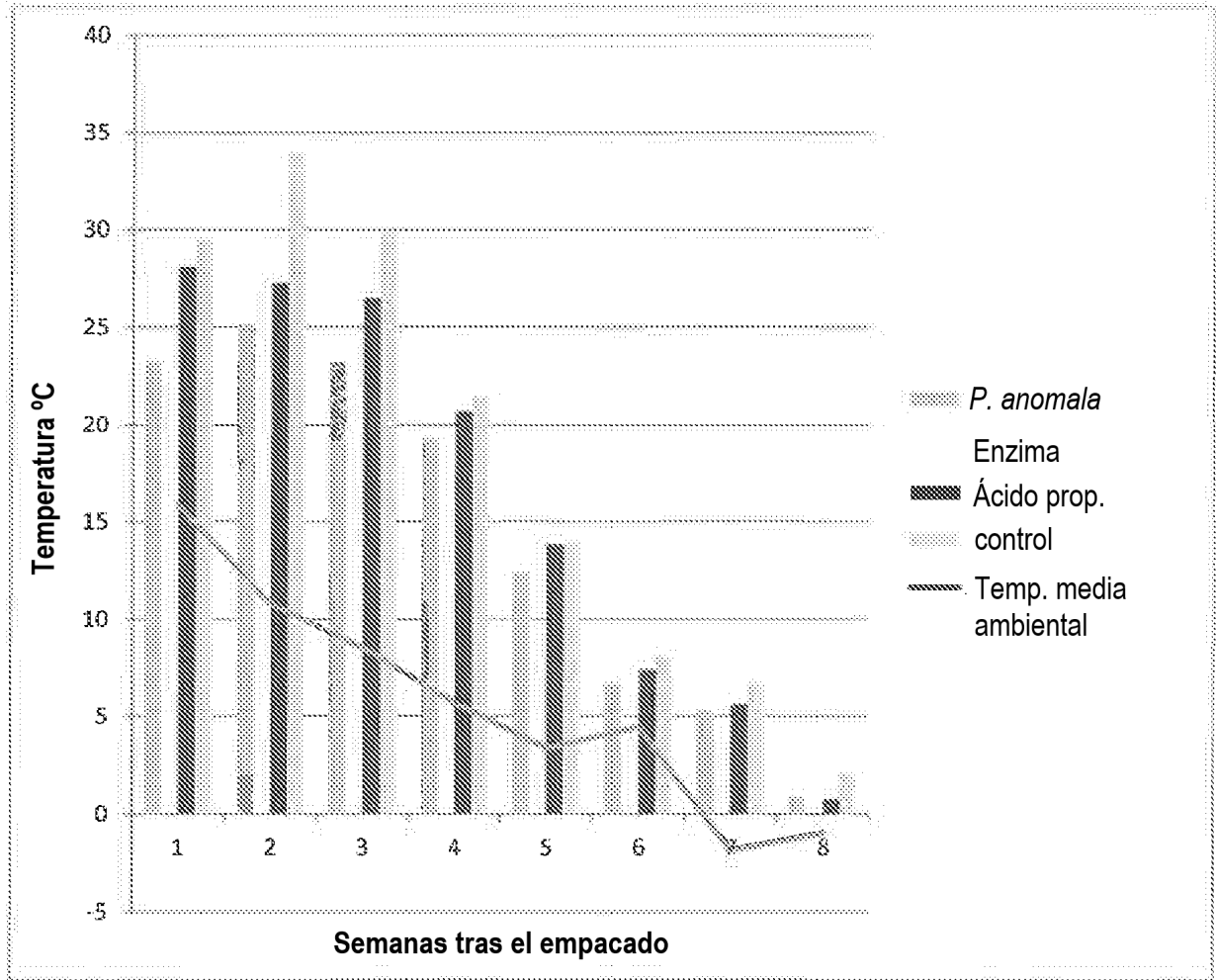


FIGURA 2

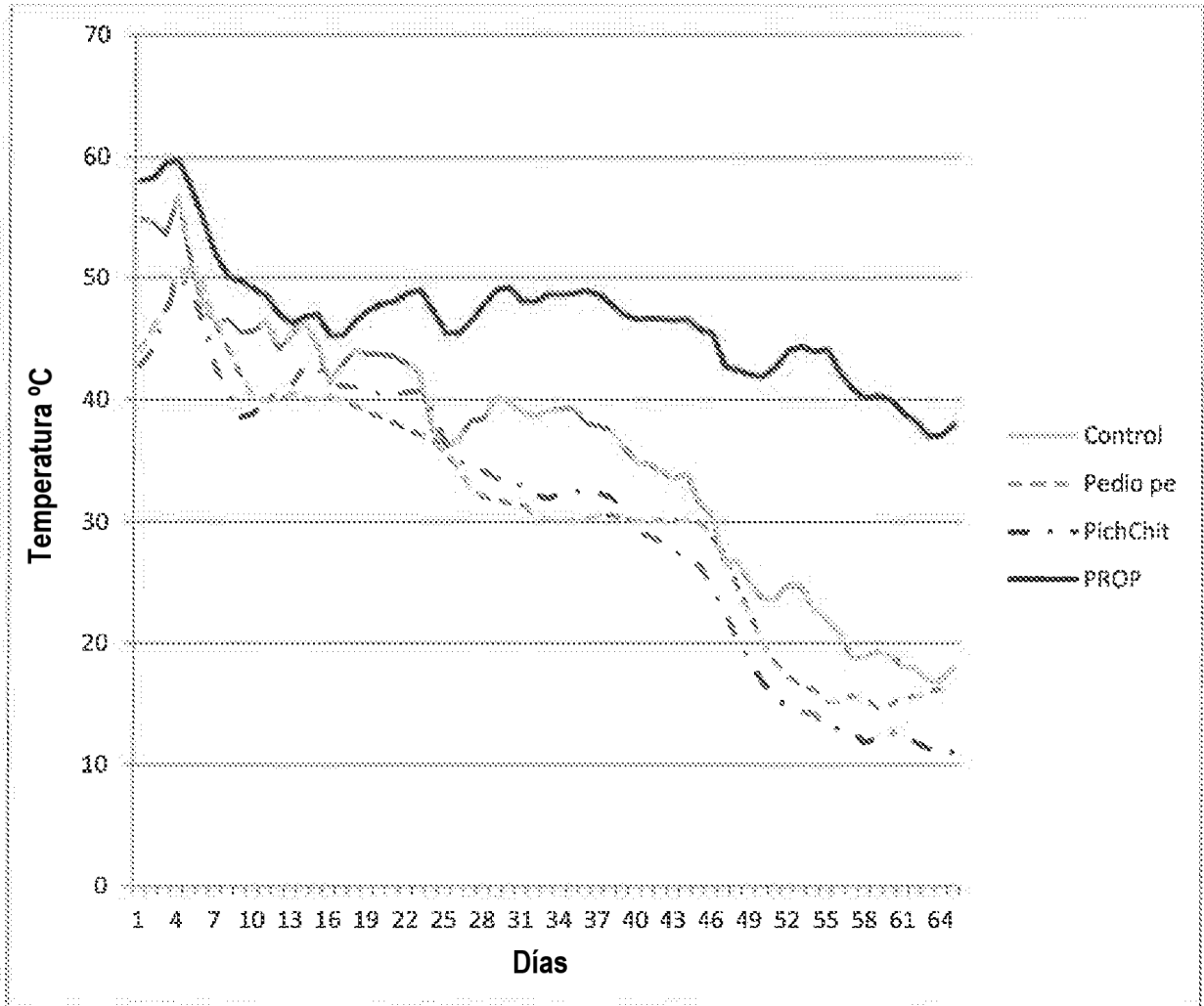


FIGURA 3

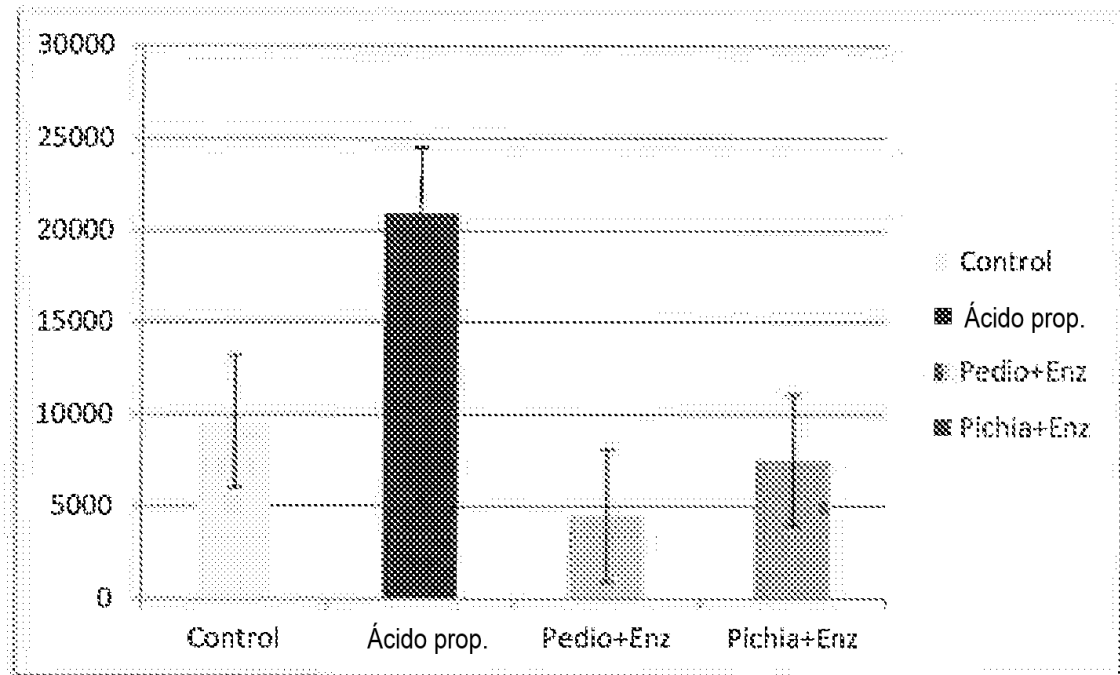


FIGURA 4

