

CONSERVANTE DE HENO Y MÉTODOS PARA LA CONSERVACIÓN DE HENO

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente descripción hace referencia a un conservante de heno. De manera más específica, a un conservante de heno para la conservación de heno en el heno de alta humedad almacenado y al método para utilizar el conservante de heno para la conservación de heno en el heno de alta humedad almacenado.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] El marchitamiento del heno a un nivel de humedad óptimo en el campo antes del prensado en pacas sería una situación óptima para reducir la pérdida de materia seca (SM), el crecimiento de moho y la respiración celular de la planta durante el prensado en pacas y almacenamiento del heno. Sin embargo, este proceso produce pérdidas nutricionales considerables debido a la respiración continua de las plantas, las hojas que se destrozan por el daño mecánico y la lixiviación debida a la lluvia. El reconocimiento de este hecho, y también debido a las condiciones climáticas impredecibles, ha llevado a que muchos productores de heno presen el heno en pacas con un contenido de humedad mayor que el óptimo (20-30%) para minimizar el riesgo de daño por lluvia y las pérdidas de hojas por maquinaria. No obstante, esta práctica produce pérdida debido a las actividades de levaduras y mohos, y a veces a las bacterias y al calentamiento y a la calidad nutritiva deficiente resultante del heno al momento de la alimentación.

[0003] Una forma simple de abordarlo ha sido la de rociar el heno húmedo al momento de su almacenamiento con un ácido orgánico, tal como, por ejemplo, ácido propiónico. Aunque los ácidos orgánicos son generalmente efectivos para evitar la proliferación fúngica en el heno húmedo, las tasas elevadas de aplicación, el aumento de costos del manejo de campo, así como las preocupaciones ambientales hacen que la mayoría de los productores sean renuentes a utilizarlos.

[0004] A pesar que la investigación muestra que los inoculantes a base de bacterias podrían reemplazar potencialmente a los ácidos orgánicos en la conservación del heno prensado en pacas por encima del contenido de humedad óptimo (Baah et al., Asian-Aust. J. Anim. Sci. 18:649-660, 2005), los resultados de otros estudios sobre el silaje y henolaje

no han sido consistentes (Zahiroddini et al., Asian-Aust. J. Anim. Sci. 19(10):1429-1436, 2006, Muck, Trans. ASAE 47:1011-1016, 2004). Existe una amplia evidencia para indicar que las inconsistencias aparentes en respuesta a los inoculantes se deben a las interacciones entre las especies microbianas en inoculantes individuales y a las poblaciones microbianas epifíticas (bacterias, levaduras y mohos) en el heno antes de la inoculación.

[0005] Sería altamente deseable disponer de un conservante de heno mejorado, con el fin de evitar y reducir, particularmente, el daño por calor del heno en el heno de alta humedad almacenado y con el fin además de conservar el mismo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0006] La presente descripción proporciona un método para la conservación de la calidad del heno en el heno de alta humedad almacenado. El método se basa en el uso de un conservante capaz de evitar y/o reducir el daño por calor en el heno de alta humedad almacenado. El conservante de heno que se utiliza evita y/o reduce el calor en el heno de alta humedad de forma similar a, o mejor que, los ácidos orgánicos.

[0007] En un aspecto, se proporciona un método para el tratamiento del heno con el fin de evitar y/o reducir el daño por calor en el heno de alta humedad y con el fin además de conservar el mismo. El método comprende agregar al heno un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor de al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa, ya sea sola o en combinación con una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor de una levadura del género *Pichia* o una bacteria del género *Pediococcus*.

[0008] En otro aspecto, se proporciona un método para el tratamiento del heno con el fin de evitar y/o reducir el daño por calor en el heno de alta humedad y con el fin además de conservar el mismo. El método comprende agregar al heno un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor de al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa.

[0009] En otro aspecto, se proporciona un método para el tratamiento del heno con el fin de evitar y/o reducir el daño por calor en el heno de alta humedad y con el fin además de conservar el mismo. El método comprende agregar al heno un conservante de

heno que comprende una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor de al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa en combinación con una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor de una levadura del género *Pichia*.

[0010] En otro aspecto, se proporciona un método para el tratamiento del heno con el fin de evitar y/o reducir el daño por calor en el heno de alta humedad y con el fin además de conservar el mismo. El método comprende agregar al heno un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor de al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa en combinación con una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor de una bacteria del género *Pediococcus*.

[0011] En otro aspecto, se proporciona un método para el tratamiento del heno con el fin de evitar y/o reducir el daño por calor en el heno de alta humedad y con el fin además de conservar el mismo. El método comprende agregar al heno un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor de una levadura del género *Pichia*.

[0012] En otro aspecto, se proporciona un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor de al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa.

[0013] En otro aspecto, se proporciona un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor de al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa en combinación con una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor de una levadura del género *Pichia* o una bacteria del género *Pediococcus*.

[0014] En otro aspecto, se proporciona un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor de al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa en combinación con una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor de una levadura del género *Pichia*.

[0015] En otro aspecto, se proporciona un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor de al menos una

enzima que tiene una actividad quitinasa en combinación con una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor de una bacteria del género *Pediococcus*.

[0016] En otro aspecto, todos los aspectos mencionados anteriormente pueden comprender además al menos una enzima que tiene una actividad pectin liasa, una actividad glucanasa o una mezcla de las mismas.

[0017] En otro aspecto, se proporciona un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor de una levadura del género *Pichia*.

[0018] En otro aspecto, se proporciona un heno de alta humedad que comprende una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor de una levadura de al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa, ya sea sola o en combinación con una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor de una levadura del género *Pichia* o una bacteria del género *Pediococcus*. El heno de alta humedad puede comprender además al menos una enzima que tiene una actividad pectin liasa, una actividad glucanasa o una mezcla de las mismas.

[0019] En otro aspecto, se proporciona un heno de alta humedad que comprende una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor de una levadura del género *Pichia*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0020] De esta manera, al haber descrito en general la naturaleza de la invención, ahora se hará referencia a las figuras adjuntas, que muestran a manera de ilustración, una modalidad preferida de la misma, y en las que:

[0021] La Figura 1 ilustra la temperatura media semanal durante el almacenamiento de pacas de heno de alfalfa tratadas con una levadura del género *Pichia* (*P. anómala*) o al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa (enzima), en comparación con las pacas de heno de alfalfa tratadas con ácido propiónico (Ácido Prop.) y las no tratadas;

[0022] 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 la conservación de heno y reducción de calor de una levadura del género *Pichia* (*PichChit*) o una bacteria del género *Pediococcus* (*Pedio pe*), en comparación con las pacas de heno de alfalfa tratadas con ácido propiónico (*PROP*) y las no tratadas;

[0023] La Figura 3 ilustra una gráfica del tiempo transcurrido en minutos por encima de los 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 las pacas de heno de alfalfa tratadas con ácido propiónico (Ácido Prop.) y las no tratadas (Control); y

[0024] La Figura 4 ilustra una gráfica del tiempo transcurrido en minutos por encima de los 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 las pacas de heno de alfalfa tratadas con una levadura de solo el género *Pichia* (*Pichia*), una bacteria de solo el género *Pediococcus* (*Pedio*), Ácido propiónico (Ácido Prop.) y las no tratadas (Control).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0025] Uno de los problemas con el heno de alta humedad es el deterioro y decaimiento provocado por el calor que se genera de manera espontánea. Estas pacas calientes son usualmente más deficientes en color, valor nutricional y tienen mayor moho visible. Una forma de abordarlo ha sido la de rociar el heno húmedo al momento de su almacenamiento con un ácido orgánico, tal como, por ejemplo, ácido propiónico. Aunque los ácidos orgánicos son generalmente efectivos para evitar la proliferación fúngica en el heno húmedo, las tasas elevadas de aplicación, el aumento de costos del manejo de campo, así como las preocupaciones ambientales hacen que la mayoría de los productores sean renuentes a utilizarlos.

[0026] A pesar que la investigación muestra que los inoculantes a base de bacterias podrían reemplazar potencialmente a los ácidos orgánicos en la conservación del heno prensado en pacas por encima del contenido de humedad óptimo, los resultados de otros estudios sobre el silaje y henolaje no han sido consistentes. Existe una amplia evidencia

para indicar que las inconsistencias aparentes en respuesta a los inoculantes se deben a las interacciones entre las especies microbianas en inoculantes individuales y a las poblaciones microbianas epifíticas (bacterias, levaduras y mohos) en el heno antes de la inoculación.

[0027] En su aspecto más amplio, la presente divulgación proporciona un método para la conservación de la calidad del heno y evitar o reducir el daño por calor en el heno de alta humedad almacenado, el método comprende tratar heno fresco bajo condiciones aeróbicas con un conservante de heno.

[0028] El conservante de heno comprende una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor de al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa. De manera sorprendente, se ha encontrado que el conservante de heno se mejora aún más desde el punto de vista de su efecto conservante y su capacidad para evitar 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 una bacteria del género *Pediococcus*. Cuando 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 la temperatura del heno de alta humedad se mejora significativamente mediante la combinación, en comparación cuando se utiliza cada componente de la combinación de manera individual, tal como se muestra en la Figura 4.

[0029] De manera alternativa, el conservante de heno puede comprender una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor de una levadura de solo el género *Pichia*.

[0030] El término “cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor” que se emplea en la presente se entenderá como a una cantidad que es al menos suficiente para la conservación de la calidad del heno. De esta manera, la cantidad es al menos suficiente para evitar y/o reducir el daño por calor en el heno de alta humedad, así como para la conservación del mismo.

[0031] El término “heno” que se emplea en la presente se entenderá para referirse a toda forma de heno, ya que el término se utiliza comúnmente en la agricultura. El heno se compone comúnmente de alfalfa, pasto o mezclas de alfalfa y de pasto cultivadas a un nivel de humedad objetivo inferior al 20%.

[0032] El método para el tratamiento del heno con el fin de evitar y/o reducir el daño por calor en el heno de alta humedad y con el fin además de conservar el mismo, puede incluir agregar al heno un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor de al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa. Como se menciona previamente, la al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa puede combinarse con una levadura del género *Pichia* o una bacteria del género *Pediococcus*.

[0033] En una modalidad, el método para el tratamiento del heno con el fin de evitar y/o reducir el daño por calor en el heno de alta humedad y con el fin además de conservar el mismo, puede incluir agregar al heno un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor de al menos una enzima que tiene actividad quitinasa en combinación con una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor de una levadura del género *Pichia*.

[0034] En otra modalidad, el método para el tratamiento del heno con el fin de evitar y/o reducir el daño por calor en el heno de alta humedad y con el fin además de conservar el mismo, puede incluir agregar al heno un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor de al menos una enzima que tiene actividad quitinasa en combinación con una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor de una bacteria del género *Pediococcus*.

[0035] De manera alternativa, el método para el tratamiento del heno con el fin de evitar y/o reducir el daño por calor en el heno de alta humedad y con el fin además de conservar el mismo, puede incluir agregar al heno un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor de una levadura de solo el género *Pichia*.

[0036] La levadura del género *Pichia* incluye, pero no se limita a, *Pichia* anómala sp. En una modalidad, la levadura del género *Pichia* puede ser una *Pichia* anómala sp que tiene todas las características de identificación de la *Pichia* anómala que tiene el número de acceso de cepa DBVPG 3003. Se entenderá que se incluye cualquier aislado que tenga las características de identificación de la *Pichia* anómala que tiene el número de acceso de cepa DBVPG 3003, incluidos sus subcultivos y variantes que tengan las características de identificación y la actividad que se describe en la presente. La *Pichia* anómala que tiene en

número de acceso de cepa DBVPG 3003 se depositó en la “Industrial Yeast Collection DBVPG del Dipartimento di Biologia Vegetale e Biotecnologie Agroambientali e Zootecniche, Sezione di Microbiologia Agroalimentare ed Ambientale”, <http://www.agr.unipg.it/dbvpg>, Universidad de Perugia, Italia.

[0037] La bacteria del género *Pediococcus* incluye, pero no se limita a, *Pediococcus pentosaceus* sp. En una modalidad, la bacteria del género *Pediococcus* puede ser de un *Pediococcus pentosaceus* sp que tiene todas las características de identificación de la cepa BTC328 del *Pediococcus pentosaceus* (que tiene el número de acceso NCIMB 12674). En una modalidad adicional, la bacteria del género *Pediococcus* puede ser de un *Pediococcus pentosaceus* sp. que tiene todas las características de identificación de la cepa BTC401 del *Pediococcus pentosaceus* (que tiene el número de acceso NCIMB 12675). Se entenderá que se incluye cualquier aislado que tenga las características de identificación de la cepa BTC328 o BTC401 del *Pediococcus pentosaceus*, incluidos sus subcultivos y variantes que tengan las características de identificación y la actividad que se describe en la presente. Las cepas *Pediococcus pentosaceus* que tienen en número de acceso NCIMB 12674 y 12675 se depositaron en el “National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria Ltd, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA”.

[0038] En una modalidad del método, el margen del tratamiento para el heno es comúnmente de 105 a 1015 organismos viables de la levadura o la bacteria por tonelada de heno, de preferencia de 107 a 1013 organismos viables de la levadura o la bacteria por tonelada de heno y de mayor preferencia de 109 a 1012 de organismos viables de la levadura o la bacteria por tonelada de heno. El término “tonelada” que se emplea en la presente se entenderá como una tonelada métrica (1000 kg).

[0039] La al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa puede tener una actividad quitinasa en un margen de aproximadamente 6 a aproximadamente 300 unidades (U) de enzima por tonelada de heno que ha de tratarse. En una modalidad, la actividad quitinasa puede encontrarse en un margen de aproximadamente 6 a aproximadamente 100 U por tonelada de heno que ha de tratarse. Una U se define como la cantidad de la enzima que produce una cierta cantidad de actividad quitinasa. Cada unidad (U) de enzima puede liberar aproximadamente 1,0 mg de N-acetil-D-glucosamina a partir de la quitina (g) por hora a un pH de 6,0 y a una temperatura de 25 °C en un ensayo de 2 horas.

[0040] El conservante de heno de acuerdo con la presente descripción puede comprender además al menos una enzima que tiene una actividad Pectin liasa, una actividad Glucanasa o una mezcla de las mismas.

[0041] El conservante de heno de acuerdo con la presente descripción puede encontrarse ya sea en forma líquida o sólida. El conservante de heno de acuerdo con la presente descripción puede comprender un portador adecuado o puede utilizarse tal cual se encuentra. En su forma sólida, el conservante de heno puede comprender portadores sólidos o diluyentes físicos. Este portador adecuado puede encontrarse en forma líquida acuosa o no acuosa o en forma sólida. Ejemplos no limitantes de portadores en forma líquida acuosa o no acuosa incluyen agua, aceites y parafina. Ejemplos no limitantes de portadores en forma sólida incluyen portadores orgánicos o inorgánicos tales como, por ejemplo, malto-dextrina, almidones, carbonato de calcio, celulosa, suero de leche, mazorcas de maíz molidas y dióxido de silicón. La forma sólida puede aplicarse directamente al heno en forma de un polvo ligero suelto, o si se distribuye en un portador líquido puede rociarse satisfactoriamente sobre el heno. Se entenderá que puede utilizarse cualquier otro portador adecuado para los fines de la presente descripción. También se entenderá que el conservante de heno de acuerdo con la presente descripción puede aplicarse al heno con el uso de técnicas estándar comunes para aquellos normalmente versados en la materia. El conservante de heno también puede aplicarse antes, durante y/o después del prensado en pacas. La presente invención se entenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, los cuales se proporcionan para ilustrar la invención en lugar de limitar su alcance.

EJEMPLOS

Ejemplo 1:

Heno, condiciones de tratamiento y de prensado en pacas

[0042] El heno fue un tercer corte conformado por 90% de alfalfa y 10% de pasto bromo. El heno se cortó con una Discbine de New-Holland™ el 17 de septiembre de 2011 y se dejó secar sin acondicionamiento ni alteración. El nivel de humedad se determinó con el uso de un probador de humedad de heno en hilera Farmex™ (1205 Danner Drive, Aurora, OH) cinco días después del corte y se encontró que oscilaba de 20 a 35%. Para este momento, los conservantes de heno se prepararon mediante el pesaje previo de los

inoculantes y la mezcla de cada uno de ellos en contenedores separados que contenían 6,5 L de agua destilada medida previamente y agitada durante 1 minuto. Se montó un tanque aspersor y un brazo aspersor con una sola boquilla en un prensador de pacas 4790 Hesston grande. El brazo se colocó de modo que el patrón de aspersión cubrió el 90% de la hilera con una desviación mínima.

[0043] Se prepararon dos pacas de prueba para determinar el tiempo en que se completa la aplicación del aditivo en una paca, el peso de la paca, así como una medición más precisa del contenido de humedad del material prensado en pacas. Se determinó la humedad de la paca con el uso de una sonda de heno. Se encontró que el tiempo promedio para la preparación de una paca (0,91 m x 1,22 m x 22,44 m) es de 2 minutos y 30 segundos y que el peso promedio de la paca es de 820 kg. La tasa de aplicación de *P. anómala* fue de 10^{11} CFU en 1 L por tonelada de heno. La enzima que tiene una actividad quitinasa se aplicó a una tasa de 1,5 g (suspendidos en 1 L de agua) por tonelada de heno, correspondiente a aproximadamente 6 U por tonelada de heno. Se aplicó el producto de ácido propiónico compuesto de ácido propiónico al 68% (vol/vol) a una tasa de 2,72 L/ton y se consideró como un control positivo. El control negativo fue agua y se aplicó a una tasa de 1 L por tonelada de heno. La *P. anómala* y la enzima que tiene una actividad quitinasa se obtuvieron de Lallemand Specialties Inc. (Milwaukee, WI, EE.UU.), mientras que el ácido propiónico fue de Wausau Chemical Corporation (Wausau, WI, EE.UU.). Se prepararon cinco pacas idénticas para cada tratamiento. Las muestras de *P. anómala* se tomaron después de cada aplicación para verificar la viabilidad y el número de organismos. Esto fue para hacer posible la confirmación de la tasa de aplicación para el organismo. Cada paca se etiquetó inmediatamente después de su salida del prensador de pacas con el uso de pintura en aerosol y luego con etiquetas unidas mediante amarres plásticos. Todas las pacas se pesaron un día después de su prensado y se tomó una muestra del núcleo. Las pacas se dejaron en el campo durante 2 semanas después de su prensado, con el fin de reducir el riesgo de combustión, antes de ser transportadas y almacenadas en una sola capa en un cobertizo de heno de lados abiertos. Las pacas se volvieron a muestrear en su núcleo el día 90 por 4 lados (excluyendo la parte superior e inferior de las pacas) y se volvieron a apilar encima de las otras (pilas de dos pacas). Las muestras del núcleo se tomaron de nuevo el día 180.

Determinación microbiológica química

[0044] Se llevaron a cabo análisis químicos y microbiológicos en muestras de heno recolectadas de 6 secciones diferentes del campo y en muestras compuestas del núcleo obtenidas de cuatro ubicaciones diferentes en cada paca el día 1, 90 y 180 de almacenamiento. Se emplearon los procedimientos indicados 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 de producción de ácido láctico (LAB), las levaduras y los mohos. Se determinó la materia seca (SM), la materia orgánica (OM) y la proteína cruda (CP) de acuerdo con los procedimientos de la AOAC (1990), y la fibra de detergente neutral (NDF), la fibra de detergente ácido (ADF) y el nitrógeno insoluble en detergente ácido (ADIN) descrito 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).

[0045] Tabla 1. Composición química (% DM), pH y composición microbiológica (cfu log₁₀) del heno 90 días después del tratamiento con diversos conservantes de heno en el prensado en pacas.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
NH3 (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 (%TN)	10,75	7,92 ^{ab}	6,23 ^c	7,16 ^{bc}	7,19 ^{bc}

¹PA=*Pichia anómala*; CE = enzimas con actividad quitinasa; BPA= ácido propiónico; CON=control.
²TB=bacterias no fastidiosas que crecen en el agar nutritivo; LAB= bacteria que crece en MRS que se presume son lactobacilos; OM=materia orgánica; NH₃= nitrógeno amoniacal; TN = nitrógeno total; LA = ácido láctico; ADF = fibra de detergente neutral; ADIN= nitrógeno insoluble en detergente ácido

[0046] La Tabla 1 muestra el efecto de los tratamientos de conservantes de heno en perfiles químicos y microbiológicos de muestras de heno recolectadas el día 0 (día de prensado en pacas) y 90 días posteriores al prensado en pacas. Además del ácido láctico y el nitrógeno insoluble en detergente ácido (ADIN), los diversos tratamientos no afectan ninguno de los factores evaluados, es decir, el pH, el nitrógeno total, el nitrógeno amoniacal y la ADF. La concentración de ácido láctico fue inferior en los tratamientos de P. anómala en comparación con otros tratamientos. En comparación con otros tratamientos, el nivel de ADIN (% DM) fue superior en el tratamiento de P. anómala. Las poblaciones de bacterias (bacterias no fastidiosas que crecen en el agar nutritivo), levaduras y mohos totales en el día 90 de las muestras de heno no se vieron afectadas por el tratamiento. En comparación con otros tratamientos, las poblaciones de lactobacilos fueron superiores en P. anómala y las pacas de control aumentaron de log₁₀ 3,80 CFU g⁻¹ en el día de prensado en pacas a log₁₀ 5,42 y log₁₀ 6,29 CFU g⁻¹, respectivamente el día 90.

Tabla 2. Composición química (% DM), pH y composición microbiológica (cfu log₁₀) del heno 180 días después del tratamiento con diversos inoculantes en el prensado en pacas.¹

Factor ²	PA	CE	BPA	CON
DM	87,89 ^a	87,72 ^{ab}	85,64 ^b	85,79 ^b
pH	6,00	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
NH3 (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 (%TN)	8,03	7,17	6,96	7,58

¹PA=*Pichia anómala*; CE = *enzimas con actividad quitinasa*; BPA= *ácido propiónico*; CON=control.
²TB=*bacterias no fastidiosas que crecen en el agar nutritivo*; LAB= *bacteria que crece en MRS que se presume son lactobacilos*; OM=*materia orgánica*; NH₃= *nitrógeno amoniacal*; TN = *nitrógeno total*; LA = *ácido láctico*; ADF = *fibra de detergente neutral*; ADIN= *nitrógeno insoluble en detergente ácido*

[0047] Además 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 otros tratamientos, el pH fue más bajo en la P. anómala (6,00). La población de levadura fue la más alta en las enzimas con un tratamiento de actividad de quitinasa.

Tabla 3. Concentraciones de ácidos grasos volátiles (AGV) en muestras del núcleo del heno después de 90 y 180 días posteriores al tratamiento con diversos aditivos en el prensado en pacas.¹

AGV		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
AGV Total (g kg⁻¹)					
	90 d	9,14	8,72	11,04	7,17
	180 d	9,87	9,76	8,89	7,42

¹PA=*Pichia anómala*; CE = *enzimas con actividad quitinasa*; BPA= *ácido propiónico*; CON=control

[0048] Con referencia ahora a la Tabla 3, las concentraciones de AGV (ácidos grasos volátiles) totales y de acetato tanto en las muestras del día 90 como en las del día 180 no se vieron afectadas por el tratamiento. Los AGV predominantes producidos después de 180 días de almacenamiento fueron los acetatos y esto represento del 94% al 98% de los AGV totales producidos en las pacas. Hubo una tendencia hacia más acetato y AGV totales en pacas tratadas con P. anómala y enzimas con una actividad quitinasa después de 180 días de almacenamiento. Las concentraciones de acetato y de AGV totales en pacas tratadas durante 180 días con P. anómala y enzimas con una actividad quitinasa fueron al menos 14% mayores que las concentraciones en los otros tratamientos, lo que indica que ambos de estos tratamientos inducen un mayor grado de fermentación microbiana anaeróbica en las pacas en comparación con los otros tratamientos. En comparación con el tratamiento de control, las concentraciones de AGV totales y de acetato fueron aproximadamente 32% mayores en pacas tratadas durante 180 días con P. anómala y enzimas con una actividad quitinasa. Como se espera, la concentración de propionato en las pacas tratadas con ácido propiónico fue mayor que las concentraciones en los otros tratamientos en las muestras de 90 d y 180 d, respectivamente (Tabla 3).

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

Factor de calidad	Paca #	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
	Medio	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
	Medio	11,2	10,7	6,8	4,8
GENERAL	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
	Medio	23,4	26	15,6	15,2
GRADO	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 anómala; CE=enzimas con actividad quitinasa; BPA= ácido propiónico; CON=control.

Color/Olor - con base en la ficha técnica de Maryland Cooperative Extension # 644 'Evaluación de la Calidad del Heno'

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

Color

El heno con color verde brillante tiene una calificación alta (15 a 20)

Los henos de color que va de amarillo dorado a amarillo tienen una calificación de 5 a 15

Los henos de color que va de café oscuro a café tienen una calificación de 0 a 5

OLOR

El olor del heno recién cortado tiene una calificación alta (15 a 20)

Los henos con olor rancio u otros olores desagradables tienen una calificación de 5 a 15

Los henos mohosos o inusualmente polvorientos tienen una calificación baja (0 a 5)

Grado

[0049] Todas las pacas se abrieron el día 180 y su calidad se evaluó con base en la ficha técnica de *Maryland Cooperative Extension #644*. Con base en la evaluación visual y sensorial, los tratamientos de control y ácido propiónico produjeron heno de la más baja calidad mientras que el resto de los tratamientos produjeron heno de una calidad promedio a una calidad buena (Tabla 4).

Estabilidad de la temperatura

[0050] La estabilidad de la temperatura de las pacas se monitoreo al medir continuamente la temperatura interior de cada paca con tres Dallas Thermochron iButtons (Embedded Data Systems, *Lawrenceburg, KY*) que se insertaron en los orificios del núcleo a la siguiente mañana después del prensado en pacas. Los iButtons se configuraron para registrar las temperaturas cada hora durante los primeros 60 días del periodo de almacenamiento. Debido a que las lecturas de temperatura no mostraron calentamiento adicional, las sondas no se volvieron a colocar dentro de las pacas después de 60 días. Las pacas se abrieron y se calificaron visualmente para determinar el grado de deterioro y moho al final del periodo de almacenamiento (d 180) con base en la ficha técnica de Maryland Cooperative Extension # 644 'Evaluación de la Calidad del Heno' (<http://www.extension.umd.edu/publications/pdfs/fs644.pdf>).

[0051] Como se muestra en la Figura 1, la temperatura ambiente semanal promedio (área de almacenamiento de la paca) se redujo desde 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 los 20 °C durante las primeras tres semanas del periodo de almacenamiento. La temperatura semanal más alta (aproximadamente 34 °C) se registró durante la semana 2 en las pacas de control. La temperatura promedio en las pacas de control durante las primeras 3 semanas fue de aproximadamente 30 °C. Las temperaturas en las pacas tratadas con enzimas con una actividad quitinasa fueron consistentemente inferiores a las de las pacas de control de la semana 1 a la semana 7 (Figura 1). Se observó una tendencia similar (excepto durante la semana 2) cuando el tratamiento se comparó con el tratamiento de ácido propiónico (Figura 2). Aunque todos los tratamientos tuvieron un efecto positivo en la reducción de la temperatura en las pacas durante el periodo de almacenamiento, el

tratamiento más efectivo, en comparación con tanto los tratamientos de control como los del ácido propiónico, fueron las enzimas con una actividad quitinasa. En comparación con las pacas de control y las tratadas con ácido propiónico, las temperaturas promedio en las pacas tratadas con enzimas con una actividad quitinasa fueron 6-8 °C y 4-5 °C inferiores a las temperaturas en las pacas de control y las tratadas con ácido propiónico, respectivamente, durante el mismo periodo.

Experimento en animales

[0052] La tasa y el grado *in situ* de la desaparición de DM y NDF de las muestras de heno de 180 días se determinó en tres vacas provistas con cánulas ruminales y alimentadas con una dieta de procedencia de corral de engorde estándar que consiste de 50% de heno Timothy más 50% de silaje de cebada (base de DM). Las submuestras de las muestras del núcleo de 180 días obtenidas de las pacas tratadas con el mismo conservante se combinaron y molieron para su paso a través de un tamiz de 4 mm. Se pesaron aproximadamente 4 g de cada muestra compuesta en bolsas Dracon y se incubaron por triplicado en cada vaca durante 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 hr. Las bolsas se fabricaron de una malla de poliéster de monofilamento (tamaño de poro de 53 µm, 5 cm x 20 cm, Ankom, Fairport, New York). Se dieron dos semanas a las vacas para adaptarse a sus dietas antes de iniciar las incubaciones. Inmediatamente después de la incubación, las bolsas se enjuagaron con agua de grifo fría hasta que todo el contenido de rumen en el exterior de las bolsas fue removido. Las bolsas se lavaron en una lavadora doméstica en agua fría durante tres minutos utilizando el ciclo de lavado delicado sin el uso de detergente o ciclo de centrifugado. El procedimiento de lavado se repitió una vez. Los conjuntos duplicados de bolsas no incubadas que contenían muestras de cada tratamiento se lavaron con las bolsas anteriores y se utilizaron para calcular la desaparición de 0 h para cada tratamiento. Posteriormente, todas las bolsas se secaron en un horno de aire forzado a 55 °C durante 48 hr. Los residuos de las bolsas triplicadas del mismo tratamiento incubadas en la misma vaca se agruparon y molieron para su paso a través de un tamiz de 1 mm antes que se analizaran para NDF según el método mencionado anteriormente. El porcentaje de desaparición de DM y NDF se calculó a partir de la proporción restante en las bolsas después de cada tiempo de incubación. Los datos de desaparición de DM y DNF se ajustaron a una versión modificada del modelo exponencial de Orskov y McDonald (1979) con una fase de latencia:

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

en donde, p es la desaparición (%) de DM o NDF después del tiempo en horas, a es la fracción que desaparece rápidamente (%), b es la fracción que desaparece lentamente (%) y c es la tasa fraccional de desaparición (h⁻¹) de la fracción b. Los parámetros se calcularon mediante un procedimiento no lineal interactivo (método de Marquardt) con el paquete de software de SAS (1990). La desaparición efectiva (EFFD, %) en 48 hr de incubación se calculó con base en una tasa de flujo de salida fraccional asumida de 6%.

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

Desaparición ³				
	PA	CE	BPA	CON
12 hr	66,65 ^a	62,92 ^c	62,20 ^c	61,38 ^c
24 hr	75,13 ^a	72,65 ^b	72,84 ^b	70,86 ^c
48 hr	78,37 ^a	77,22 ^a	78,57 ^a	75,62 ^b
Cinética				
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
Potencial	78,75 ^a	77,86 ^{ab}	79,72 ^a	76,48 ^b
Efectivo	62,92 ^a	60,40 ^b	59,97 ^b	59,09 ^b
¹ PA = <i>Pichia</i> anómala; CE = enzimas con actividad quitinasa; BPA = ácido propiónico; CON = control. ² Los medios en la misma fila con diferentes superíndices difieren (P < 0,05) Los parámetros calculados a partir de la ecuación ajustada: $p = a + b (1 - e^{-c(t - \text{latencia})})$ para $t > \text{latencia}$; donde, p es la proporción (%) de NDF que desaparece de las bolsas de nylon después del tiempo en horas de incubación; a es la fracción que desaparece rápidamente (%); b es la fracción que desaparece lentamente (%); c es la tasa fraccional de desaparición (h ⁻¹) de la fracción b				

Desaparición de materia seca *in sacco*

[0053] Los efectos de los conservantes en la desaparición de DM en 12, 24, y 48 hr, incluida la cinética de desaparición se ilustran en la Tabla 5. No hubo periodo de latencia en la desaparición de DM. Las muestras de heno tratadas con el aditivo microbiano (P. anómala) tuvieron mayor desaparición de DM en todos los puntos de tiempo de incubación (12, 24 y 48 hr) en comparación con los tratamientos de control y de ácido propiónico, excepto en las 48 hr cuando todos los aditivos (incluidas las enzimas con una actividad quitinasa y ácido propiónico) fueron mayores que el control. De manera similar,

tanto la tasa como la desaparición de DM efectiva fueron mayores en muestras de heno tratadas con los aditivos microbianos en comparación con los tratamientos de control y de ácido propiónico. En comparación con todos los otros tratamientos, las muestras de heno de las pacas tratadas con P. anómala tuvieron 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 observó en el tratamiento de ácido propiónico y en los tratamientos de control. Todos los aditivos aumentaron la fracción de DM potencialmente digerible, excepto las enzimas con una actividad quitinasa que tuvieron un valor similar al del control. A pesar de ello, la desaparición de DM efectiva en la muestra tratada con P. anómala fue mayor que en los tratamientos de control y de ácido propiónico.

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

Desaparición ³				
	PA	CE	BPA	CON
12 hr	41,06 ^a	37,28 ^c	39,04 ^{bc}	39,64 ^{bc}
24 hr	51,88 ^{ab}	49,22 ^b	51,88 ^{ab}	51,11 ^b
48 hr	58,23 ^b	56,07 ^c	60,19 ^{ab}	58,38 ^{ab}
Cinética				
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
Potencial	59,76 ^{bc}	57,57 ^c	62,70 ^a	60,34 ^b
Efectivo	39,87 ^b	36,66 ^b	38,84 ^b	38,94 ^b
¹ PA = <i>Pichia</i> anómala; CE = enzimas con actividad quitinasa; BPA = ácido propiónico; CON = control. ² Los medios en la misma fila con diferentes superíndices difieren (P < 0,05) Los parámetros calculados a partir de la ecuación ajustada: $p = a + b(1 - e^{-c(t - \text{latencia})})$ para $t > \text{latencia}$; donde, p es la proporción (%) de NDF que desaparece de las bolsas de nylon después del tiempo en horas de incubación; a es la fracción que desaparece rápidamente (%); b es la fracción que desaparece lentamente (%); c es la tasa fraccional de desaparición (h ⁻¹) de la fracción b				

[0054] 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 fue mayor en el heno tratado con P. anómala en comparación con todos los otros tratamientos (Tabla 6). El periodo de latencia más prolongado en la desaparición de NDF se observó en el heno tratado con enzimas con una actividad quitinasa (3,67 hr) mientras que el periodo de latencia más corto de 1,89 hr

se observó en el tratamiento con P. anómala. Aunque, el último periodo de latencia no fue diferente del de los otros tratamientos. La desaparición de NDF total en 12, 24 y 48 hr oscilo desde el 37,28% (el más bajo) en pacas tratadas con enzimas con una actividad de quitinasa hasta el 47,06% (el más alto) en el tratamiento con P.anomala con otros tratamientos que tienen valores intermedios. Una tendencia similar se observó en la desaparición de 24 hr. La desaparición de NDF después de 48 hr fue la más baja en los tratamientos con enzimas con una actividad de quitinasa en comparación con todos los otros tratamientos.

[0055] Los datos de desaparición de DM *in sacco* sugieren que la P. anómala aumentó la fracción potencialmente digerible, así como la tasa fraccional y la desaparición efectiva del heno en comparación con el control. De hecho, los valores de desaparición efectiva del heno tratado con P. anómala fueron superiores a los de los tratamientos de control y de ácido propiónico.

Ejemplo 2:

Heno, condiciones de tratamiento y de prensado en pacas

[0056] El heno fue heno de alfalfa y se cosecho el 15 de agosto del 2012 en Fort Macleod, Alberta, Canadá. El heno de alfalfa se dejó marchitar en campo a niveles de humedad entre aproximadamente 24% y aproximadamente 30%. La humedad de la paca se determinó como en el Ejemplo 1.

[0057] La tasa de aplicación de la combinación de P. anómala en combinación con la enzima que tiene una actividad quitinasa fue respectivamente de 10^{11} CFU y 1,5 g en 1L de agua por tonelada de heno. En consecuencia, la tasa de aplicación de la combinación de P. *pentosaceus* junto con la enzima que tiene una actividad quitinasa fue de 10^{11} CFU y 1,5 g en 1L de agua por tonelada de heno. Se aplicó el producto de ácido propiónico compuesto de ácido propiónico al 68% (vol/vol) a una tasa de 2,72 L/ton y se consideró como un control positivo. El control negativo fue agua, y se aplicó a una tasa de 1 L por tonelada de heno. Se prepararon cinco pacas redondas grandes de aproximadamente 800 kg de acuerdo con el Ejemplo 1 para cada tratamiento en el mismo día. Las muestras del núcleo de las pacas a través de todos los tratamientos se recolectaron en el día 80, 90 y 180 después del prensado en pacas, con el fin de analizar su valor nutricional, producto de fermentación y cambios microbianos.

[0058] Las muestras del núcleo recolectadas el día 0 y 90, 180 después del prensado en pacas se sometieron a análisis microbiológicos y químicos. Los análisis microbiológicos se realizaron para enumerar, aislar y caracterizar los microorganismos (bacterias, levaduras y mohos totales) en placas apropiadas a través de dilución serial.

Tabla 7. Conteos microbianos en heno de alfa tratado con diversos conservantes de heno en el prensado en pacas

TRATAMIENTO			Días	Control	<i>Pichia</i> + enzimas	Pedio+ enzimas	Ácido propiónico
Registro de bacterias totales cfu/g 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		

[0059] El perfil microbiológico del heno después de cada tratamiento fue similar en el prensado en paca para las bacterias, las levaduras y los mohos totales, incluso si se registraran las diferencias numéricas. Después de 90 días del prensado en pacas, el conteo total de bacterias se redujo por el tratamiento con enzimas que tienen una actividad quitinasa combinada con el *Pediococcus pentosaceus* cuando se compara con el tratamiento de control y de ácido Propiónico, mientras que el tratamiento con enzimas que tienen una actividad quitinasa combinada con *Pichia* anómala tendió a tener un conteo bacteriano inferior. La reducción numérica de levadura se reportó para los dos tratamientos con enzimas que tienen una actividad quitinasa combinada con *Pichia* anómala o *Pediococcus pentosaceus* en contraste con el tratamiento de control y de ácido Propiónico. El conteo de moho no se vio afectado por los tratamientos excepto después de 180 días donde el conteo de moho se redujo por el tratamiento de ácido Propiónico.

[0060] Los análisis químicos se realizaron para determinar el pH, DM, nitrógeno total, nitrógeno amoniacal, NDF, ADF, nitrógeno insoluble en detergente ácido (ADIN), carbohidratos solubles en agua, ácidos grasos volátiles (AGV) y ácido láctico (LA).

Tabla 8. Composición química del heno de alfalfa a los días 0,90 y 180 después del tratamiento con conservante de heno en el prensado en pacas

TRATAMIENTO	Días	Control	<i>Pichia</i> + 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

Enzimas que tienen una actividad quitinasa combinada con *Pichia* anómala o *Pediococcus pentosaceus*, enzimas que tienen una actividad quitinasa combinada con *Pichia* anómala o *Pediococcus pentosaceus*, enzimas que tienen una actividad quitinasa combinada con *Pichia* anómala o *Pediococcus pentosaceus*

Tabla 9. Producto de fermentación de alfa tratado con diferentes conservantes de heno en el prensado en pacas

TRATAMIENTO	Días	Control	<i>Pichia</i> + enzimas	Pedio+ enzimas	Ácido propiónico
pH	0	6,16 ^b	6,23a	6,23a	6,07c
	90	7,64 ^a	5,92b	5,87b	8,29a
	180	7,40 ^{ab}	6,15c	6,03c	7,80a
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
Propiónico	90	NA	NA	NA	0,08
	180	NA	NA	NA	0,04
AGV Total	90	0,04	0,31	0,33	0,50

	180	0,29	0,29	0,66	0,76
--	-----	------	------	------	------

[0061] El proceso de fermentación del heno no se impactó fuertemente por los tratamientos con las enzimas que tienen una actividad quitinasa combinada con *Pichia* anómala o *Pediococcus pentosaceus* debido a que este material de forraje tampoco es propenso a fermentación. Sin embargo, el pH inferior después de 90 días para el tratamiento con enzimas que tienen una actividad quitinasa combinado con *Pichia* anómala o *Pediococcus pentosaceus*.

[0062] Las muestras del núcleo se recolectaron el día 180 y se evaluaron para calidad nutricional con el uso de métodos *in situ* e *in vitro*.

[0063] Los experimentos *in situ* se llevaron a cabo para evaluar el efecto de los conservantes de heno en la tasa y el grado de digestión de las muestras de heno recolectadas 180 días después del prensado en pacas. Se utilizaron tres vacas provistas con cánulas ruminales y se alimentaron con una dieta de procedencia de corral de engorde estándar. Se pesaron aproximadamente 4 g de cada muestra compuesta de cada paca (réplica) por tratamiento en bolsas Dacron e incubaron por triplicado en cada vaca durante 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 hr. Las bolsas se recuperaron después de la incubación y se procesaron de acuerdo con LRC SOP para determinar la desaparición de DM y NDF ruminal *in situ*.

Tabla 11. Parámetros *in situ* para heno de alfa tratado con conservantes de heno en el prensado en pacas

TRATAMIENTO	Control	<i>Pichia</i> + enzimas	Pedio+ enzimas	Ácido propiónico
a	2 6,61 ^{bc}	30,05 ^{ab}	33,79 ^a	23,64°
b	46,80 ^{ab}	43,08 ^{bc}	39,67 ^c	51,69 ^a
c	0,05 ^c	0,06 ^{bc}	0,07 ^{ab}	0,04°
Latencia	1,80 ^{bc}	3,90 ^{abc}	4,30 ^{abc}	1,70°
a+b	73,4	73,1	73,5	75,3

a = la fracción degradable rápidamente
b = la fracción degradable lentamente
c = la tasa a la cual se degrada b (/h)
latencia = tiempo de latencia (h)

[0064] Los datos *in situ* que se muestran en la Tabla 11 revelan un material de heno más digerible para los tratamientos con enzimas que tienen una actividad quitinasa combinada con *Pichia* anómala o *Pediococcus pentosaceus*.

[0065] También se llevó a cabo el tratamiento *in vitro* para evaluar el efecto de los inoculantes microbianos en la producción de gas y de cinética a partir de muestras de heno de 180 días. Se realizaron dos ejecuciones por fluido de rumen mezclado a partir de tres vacas provistas con cánulas ruminales y alimentadas con una dieta de procedencia de corral de engorde estándar. Se pesaron aproximadamente 0,5 g de cada muestra compuesta de heno de 180 días por tratamiento en frasco y se incubó por triplicado en cada ejecución y se midió el gas durante 3, 6, 9, 12, 24 y 48 hr. Los frascos se recuperaron después de la incubación y se procesaron de acuerdo con LRC SOP para determinar la desaparición de DM ruminal, la producción de gas, el amonio y el AGV *in vitro*.

Tabla 12. Digestibilidad *in vitro* de heno de alfa tratado con conservantes de heno en el prensado en pacas

TRATAMIENTO	Control	<i>Pichia</i> + enzimas	Pedio+ enzimas	Ácido propiónico
DMD g/kg	426 ^d	470 ^b	488 ^b	431 ^d
a	174 ^c	188 ^{bc}	196 ^{ab}	177 ^c
c	6,4 ^c	7,7 ^{bc}	8,4 ^b	6,6 ^c
Latencia	0,54 ^a	008 ^b	0,06 ^b	0,48 ^a

a = producción de gas asintótica (mL g⁻¹ DM)
c = tasa de fermentación de la tasa de producción de gas fraccional (mL h⁻¹)
latencia = tiempo de latencia (h)

[0066] La digestibilidad y fermentabilidad *in vitro* del heno en el día 180 confirmó los resultados *in situ* de una digestibilidad mejorada para ambos tratamientos con enzimas que tienen una actividad quitinasa combinada con *Pichia* anómala o *Pediococcus pentosaceus*.

Estabilidad de la temperatura

[0067] La temperatura de las pacas individuales se monitoreó al medir continuamente la temperatura interior a través 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 cosecha (ilustrada en fotografías). La temperatura se registró en intervalos de 4 horas durante 10 semanas.

[0068] Como se muestra en la Figura 2, los tratamientos con enzimas que tienen una actividad quitinasa combinada con *Pichia anómala* o *Pediococcus pentosaceus* mostraron una temperatura promedio reducida durante un periodo de 60 días después del prensado en pacas. El tratamiento de ácido Propiónico tuvo la temperatura media más alta a lo largo del tiempo.

[0069] El efecto es particularmente significativo como se muestra en la Figura 3. La Figura 3 ilustra el tiempo transcurrido por encima de los 40 °C para cada tratamiento. Debido a que esta temperatura se reconoce en gran medida como el umbral para los daños de ADIN, esta ilustra la intensidad de la temperatura interior de las pacas de heno. El tratamiento de ácido Propiónico pasó el tiempo más prolongado por encima de los 40 °C. El tratamiento con enzimas que tienen una actividad quitinasa combinada con *Pediococcus pentosaceus* pasó el tiempo más corto por encima de los 40 °C, seguido por el tratamiento con enzimas que tienen una actividad quitinasa combinada con *Pichia anómala*, ambos tratamientos con enzimas que tienen una actividad quitinasa combinada con *Pichia anómala* o *Pediococcus pentosaceus* pasaron menos tiempo por encima de los 40 °C en comparación con el control.

[0070] En conclusión, la combinación de enzimas que tienen una actividad quitinasa con *Pichia anómala* o *Pediococcus pentosaceus* redujo la temperatura interior de las pacas de heno, del pH y de los números de bacterias totales en comparación con el control y el ácido Propiónico en el periodo de almacenamiento. También aumentaron la desaparición de materia seca *in situ* (DMD) y la tasa de digestión, así como la DMD *in vitro* y la tasa de producción de gas. Esto puede explicarse por el contenido de NDF y ADF inferior en estos dos tratamientos.

Ejemplo 3

[0071] Este ejemplo muestra que la enzima tiene una actividad quitinasa que incluso se mejora aún más desde el punto de vista de su efecto de conservante y su capacidad para evitar y/o reducir el daño por calor en el heno de alta humedad si al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa se combina con una levadura del género *Pichia* o

una bacteria del género *Pediococcus*. El heno se cosechó y se dejó marchitar en campo a niveles de humedad como en el ejemplo 2.

[0072] La tasa de aplicación de la combinación de *P. anómala* en combinación con la enzima que tiene una actividad quitinasa fue respectivamente 10^{11} CFU y 1,5 g en 1L de agua por tonelada de heno. En consecuencia, la tasa de aplicación de la combinación de *P. pentosaceus* en combinación con la enzima que tiene una actividad quitinasa de 10^{11} CFU y 1,5 g en 1L de agua por tonelada de heno. La tasa de aplicación de solo *P. anómala* fue de 10^{11} CFU en 1 L por tonelada de heno. La tasa de aplicación de solo *P. pentosaceus* fue de 10^{11} CFU en 1 L por tonelada de heno. La enzima que solo tiene una actividad quitinasa se aplicó a una tasa de 1,5 g (suspendida en 1 L de agua) por tonelada de heno. El producto de ácido propiónico consistió de ácido propiónico al 68% (vol/vol) y se aplicó a una tasa de 2,72 L/ton y consideró como un control positivo. El control negativo fue agua, y se aplicó a una tasa de 1 L por tonelada de heno. Se prepararon cinco pacas redondas grandes de aproximadamente 800 kg de acuerdo con el Ejemplo 1 para cada tratamiento en el mismo día.

[0073] Como en el ejemplo 2, la temperatura de las pacas individuales se monitoreó al medir continuamente la temperatura interior a través 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 cosecha (ilustrados en fotografías). La temperatura se registró en intervalos de 4 horas durante 10 semanas. Como se muestra en la Figura 4, cuando al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa se combina con *P. anómala* o *P. pentosaceus*, la reducción de la temperatura del heno de alta humedad se mejora sorprendentemente de forma significativa por la combinación, en comparación con el uso de cada componente de la combinación.

Ejemplo 4

Objetivo del ensayo

[0074] Este ensayo expande las implementaciones de una prueba de concepto para un aditivo de heno que reduciría el calentamiento de las pacas fabricadas bajo condiciones de cosecha desafiantes (contenido de humedad mayor que el óptimo). Fue seguido por un ensayo similar que utiliza un modelo a escala de laboratorio. El ensayo siguió el perfil de temperatura de las pequeñas pacas cuadradas (~25 kg, 79,9% DM) inoculadas con el uso

de diferentes combinaciones de dos microorganismos (*Pichia* anómala o *Pediococcus pentosaceus*) con dos enzimas (quitinasa pura o una enzima comercial que contiene actividades de pectin liasa, glucanasa y quitinasa).

Metodología.

[0075] El ensayo se llevó a cabo en pequeñas pacas cuadradas de mezcla de alfalfa-pasto (45:55), y que tienen un peso medio de 25,0 kg al momento de la cosecha. El nivel de humedad medio de las pacas fue de 79,9% DM, dentro del margen del nivel de materia seca esperado (80-83% DM). Las pacas se inocularon con el tratamiento diferente después de la aspersión del forraje en frente de la cámara de corte del prensador de pacas, mediante un aplicador de inoculante Dorhmann. El diseño experimental permitió la aplicación de un control y cuatro mezclas aditivas diferentes de los aditivos microbianos (ninguno, *Pichia* anómala + quitinasa, *Pichia* anómala + mezcla de enzimas, *Pediococcus pentosaceus* + quitinasa, *Pediococcus pentosaceus* + mezclas de enzimas).

[0076] Para cada tratamiento, se rociaron seis pacas cuadradas en tres bloques de dos pacas. Las pacas se transportaron al cobertizo de almacenamiento, se pesaron y colocaron en soportes, en un patrón completamente aleatorizado y predefinido de manera que ninguna superficie estuvo en contacto con otra paca. Cada paca se equipó con una sonda de temperatura en su núcleo geométrico. Las pacas se almacenaron durante 100 días.

Resultados

[0077] Generalmente, los tratamientos inoculados con *Pichia* anómala (#2, y 3 en la tabla 13) mostraron un efecto en el retraso del calentamiento de las pacas, pero el mezcla de *Pichia* anómala y quitinasa (#3) retrasó significativamente el calentamiento y el tiempo en que la temperatura de las pacas es de 5 °C y 10 °C sobre la temperatura ambiente (Tabla 13). Este tratamiento también mostró una temperatura inferior durante la fase entre 400 y 600 horas de incubación. La adición de la mezcla de enzimas con la cepa de *Pichia* anómala resulta en cierta mejora numérica a pesar que la mejora fue inferior que con la mezcla de quitinasa.

[0078] Las mezclas de *Pediococcus pentosaceus* (#4 y 5) permitieron un periodo más prolongado de calentamiento antes de que se inicie el calentamiento de las pacas. El uso

de ambos tipos de enzimas resultó en beneficios comparables con una reducción del tiempo transcurrido de 10 °C por encima de la temperatura ambiente (Tabla 13).

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

Número de tratamiento	Aditivo microbiano	Aditivo de Enzima	Tiempo 5 Celsius por encima de ambiente (h)	Tiempo 10 Celsius por encima de ambiente (h)
1	Ninguno	No	390,6	290,6 ^a
2	<i>Pichia anómala</i>	Mezcla de enzimas	295,2	193,9 ^{ab}
3	<i>Pichia anómala</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 EEM = 58,24	P=0,0394 EEM = 50,43

[0079] Aunque la invención se ha descrito junto con modalidades específicas de la misma, se entenderá que puede sufrir modificaciones adicionales y se pretende que esta descripción cubra cualesquier variaciones, usos o adaptaciones de la invención siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo tales desviaciones de la presente divulgación que entran dentro de la práctica conocida o personalizada dentro de la técnica a la cual pertenece la invención y como pueda aplicarse a las características esenciales establecidas en la presente, y como sigue en el alcance de las reivindicaciones anexas.

Señor Director

NUEVAS CREACIONES

Superintendencia de Industria y Comercio

E. S. D.

Referencia: Expediente No. NC2017/0005171

Asunto: Solicitud de patente para: CONSERVANTE DE HENO Y MÉTODOS
PARA LA CONSERVACIÓN DE HENO

Solicitante: DANSTAR FERMENT AG

Fecha de solicitud: 24 de mayo de 2017

RESPUESTA A PRIMER EXAMEN DE PATENTABILIDAD

ANDRÉS RINCÓN USCÁTEGUI, identificado como aparece al pie de mi firma, en mi condición de apoderado de la sociedad solicitante de la patente de la referencia, doy respuesta al Oficio No. 6893, notificado por fijación en lista el 06 de junio de 2018, estando en el plazo establecido para esto toda vez que solicité prórroga el 27 de agosto de 2018.

I. MODIFICACIONES AL CAPÍTULO REIVINDICATORIO

En respuesta al examen de patentabilidad apporto un Capítulo Reivindicatorio modificado conformado por 17 reivindicaciones en las que se han incluido las siguientes modificaciones:

- Se eliminó el término “*aproximadamente*” de las Reivindicaciones 2 y 11.
- Imprecisiones en la traducción del preámbulo de las Reivindicaciones 1 a 9 fueron corregidos, de manera que este ahora reclama “*Un conservante de heno (...)*”.

- La expresión “(...) una cantidad efectiva de conservación de heno (...)”, fue corregida a “(...) una cantidad efectiva para la conservación de heno (...)” en las Reivindicaciones 1, 7, 8 y 10.
- El error ortográfico del término “*reducción*” fue corregido en la Reivindicación 10.
- Se modificó el preámbulo de la Reivindicación 17 a fin de reclamar “*Una mezcla de heno y conservante de heno*”, de acuerdo con los Párrafos [0007] - [0011] del Capítulo Descriptivo adjunto a este memorial.

Me permito resaltar que estas modificaciones se ajustan completamente a lo establecido por el Artículo 34 de la Decisión 486 de 2000, ya que no constituyen una ampliación de la protección que correspondería a la divulgación contenida en la solicitud inicial.

II. MODIFICACIONES AL TÍTULO

A partir una revisión detallada la traducción de la solicitud, se modifica el título de la misma a fin de reflejar de manera clara y concisa el objeto de la invención. De esta manera el nuevo título de la solicitud se lee como:

“CONSERVANTE DE HENO Y MÉTODOS PARA LA CONSERVACIÓN DE HENO”

Lo anterior se realiza sin ninguna contravención de lo requerido en el Artículo 34 de la Decisión 486 de 2000, teniendo en cuenta que no constituye una ampliación de la protección que correspondería a la solicitud inicial.

III. EN CUANTO A LA CLARIDAD Y CONCISIÓN

El Examinador indica que las Reivindicaciones 1 a 11 no son claras debido a que presentan una redacción deficiente y errores de traducción respecto de la patente original.

Sobre este particular, me permito indicar que las imprecisiones de traducción en dichas reivindicaciones ha sido corregida, de tal manera que el objeto de la invención resulte claro para una persona normalmente versada en la técnica y refleje adecuadamente la

materia reclamada en la solicitud internacional. De acuerdo con lo anterior, el preámbulo de las Reivindicaciones 1 a 9, ahora reclama *“Un conservante de heno (...)”*. Así mismo, la expresión modificada *“(...) una cantidad efectiva para la conservación de heno (...)”* (Reivindicaciones 1, 7, 8 y 10) permite apreciar que el conservante de heno se agrega en una cantidad tal que se obtenga un efecto de conservación del heno y reducción de la temperatura del mismo. Adicionalmente, se corrigió el error ortográfico en el término *“reducción”* de la Reivindicación 10. Respecto de la expresión *“(...) la al menos una enzima aislada que tiene una actividad quitinasa tiene una actividad quitinasa en el margen de (...)”* (Reivindicaciones 2 y 11) señalo que dicha expresión corresponde a una traducción fiel de la solicitud internacional, a partir de la cual resultaría claro para una persona normalmente versada en la materia el rango de actividad establecido para la enzima presente en el conservante de heno.

El Examinador señala que la expresión *“(...) una cantidad efectiva de (...)”* es imprecisa y por tanto señala que las Reivindicaciones 1, 7 – 8 y 10 no son concisas.

A este respecto deseo una vez más enfatizar que dicha expresión resulta clara para la persona normalmente versada en la materia, quien apreciaría que la invención comprende una cantidad de conservante de heno suficiente para mantener la calidad del heno y al mismo tiempo reducir el daño por calor en el heno, de esta manera conservando el mismo, tal y como lo indica el Párrafo [0030] del Capítulo Descriptivo adjunto a este memorial:

“El término “cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor” que se emplea en la presente se entenderá como a una cantidad que es al menos suficiente para la conservación de la calidad del heno. De esta manera, la cantidad es al menos suficiente para evitar y/o reducir el daño por calor en el heno de alta humedad, así como para la conservación del mismo.”

– Capítulo Descriptivo, Párrafo [0030].

El Examinador considera que las Reivindicaciones 1 y 10 carecen de claridad y sustento, en cuanto señala que abarcan posibilidades aún no exploradas por la Solicitante.

En relación con este señalamiento, me permito indicar que la materia reclamada en las reivindicaciones mencionadas cuenta con debido soporte a lo largo del Capítulo Descriptivo adjunto a este memorial, particularmente en los Párrafos [0007], [0009], [0010], [0013] y [0016] entre otras. De esta manera, teniendo en cuenta que el Artículo 30 de la Decisión 486 señala que la materia reclamada debe tener debido soporte en el Capítulo Descriptivo de la solicitud, considero como superada la objeción señalada, en vista de que la legislación vigente no establece como requerimiento legal la presentación de evidencia experimental respecto de cada una de las realizaciones abarcadas bajo el alcance de una solicitud. En este sentido señalo que la posición del Examinador respecto de la falta de soporte de las Reivindicaciones 1 y 10, carece de fundamento en la Decisión 486 de 2000, ya que como se mencionó anteriormente, la materia reclamada cuenta con debido soporte en el Capítulo Descriptivo.

Asimismo, el Examinador indica que las Reivindicaciones 9 y 16 no cuentan con sustento en la solicitud presentada y argumenta que dichas reivindicaciones sugieren que el conservante de heno puede comprender una enzima con actividad enzimática pectin liasa y gluconasa, por separado o en combinación, lo cual señala que son posibilidades no exploradas por la Solicitante.

Respecto de lo anterior, una vez más enfatizo que la legislación vigente no establece como requerimiento legal la presentación de evidencia experimental respecto de cada una de las realizaciones abarcadas bajo el alcance de una solicitud. En vista de lo anterior y teniendo en cuenta que la materia reclamada en las Reivindicaciones 9 y 16 tiene debido soporte en los Párrafos [0016], [0018] y [0019] y en el Ejemplo 4, entre otros, del Capítulo Descriptivo adjunto a este memorial; considero como superada la objeción arriba mencionada.

El Examinador señala que las Reivindicaciones 1 – 2, 7 – 11 y 16 no son claras debido al uso de expresiones tales como “*al menos*” y “*aproximadamente*”.

En cuanto a la objeción referente a la expresión “*al menos*”, me permito resaltar que su utilización en dichas reivindicaciones delimita la materia reclamada de manera clara para una persona normalmente versada en la materia, toda vez que permite abarcar la totalidad del concepto inventivo de la solicitud, y es evidente su significado. De esta

forma, la expresión “*al menos*” en el contexto de las Reivindicaciones 1 – 2, 7 – 11 y 16, implica que como mínimo el conservante de heno contiene una enzima aislada con actividad quitinasa; sin embargo, realizaciones que comprenden más de una enzima aislada con actividad quitinasa caben dentro del concepto inventivo de la solicitud, por lo que fijar un valor en esta característica se constituiría en una limitación injustificada del alcance de la invención, dejando por fuera del alcance de la invención realizaciones que comparten el mismo concepto inventivo. Por lo tanto, una delimitación como lo sugiere el Examinador permitiría que terceros emplearan impunemente el desarrollo realizado por la Solicitante.

Amablemente solicito que la objeción respecto del término “*aproximadamente*” sea considerada como superada, teniendo en cuenta que el mismo ha sido eliminado del Capítulo Reivindicatorio adjunto, tal y como lo detallé en el numeral I de este memorial.

Adicionalmente, el Examinador señala que las Reivindicaciones 2 y 11 no son claras toda vez que comprenden resultados a alcanzar, los cuales no son considerados como una definición válida del producto.

Sobre este particular, me permito indicar que la expresión “*tiene una actividad quitinasa en el margen de 6 U a 300 U por tonelada de heno*” no constituye un resultado a alcanzar por la invención, sino una característica técnica que delimita el alcance de la misma, toda vez que dicha reivindicación excluye de la materia reclamada realizaciones que comprendan enzimas con un nivel de actividad fuera del estipulado, es decir que conservantes de heno caracterizados por que comprenden una enzima con un nivel de actividad quitinasa inferior o superior al mencionado no serían protegidos bajo el alcance de la reivindicación. De esta manera, dicha expresión delimita y da claridad a la materia reclamada.

Aún si en vista de lo anterior el Examinador considera como un resultado a alcanzar la expresión arriba mencionada, me permito indicar que la *Guía para Examen de Solicitudes de Patente de Invención y Modelo de Utilidad* establece claramente que este tipo de lenguaje es aceptable si la invención es también definida por sus características

estructurales¹. De esta manera, las reivindicaciones citadas dependen respectivamente de las Reivindicaciones 1 y 10, las cuales definen, un conservante de heno que comprende: al menos una enzima aislada que tiene actividad quitinasa, y una cantidad efectiva de una levadura del género *Pichia* o de una levadura del género *Pediococcus* (Reivindicación 1); así como, un método para tratar heno caracterizado por que comprende las etapas de i) proporcionar un conservante de heno en una cantidad efectiva para reducir la temperatura del heno y conservar el mismo, y, ii) adicionar el heno (Reivindicación 10). Con base en lo anterior, una persona normalmente versada en la materia apreciaría que la materia comprendida en las Reivindicaciones 2 y 11, está debidamente definida en reivindicaciones precedentes, y por tanto incluirían las características estructurales previamente dichas. Por consiguiente, el enunciado de las Reivindicaciones 2 y 11, se lograría únicamente mediante la realización de la materia comprendida en las reivindicaciones independientes.

Por último, considero como superada la objeción respecto del preámbulo de la Reivindicación 17, toda vez que este reclama “*Una mezcla de heno y conservante de heno (...)*”, en concordancia con la sugerencia del Examinador.

IV. EN CUANTO AL CAPÍTULO DESCRIPTIVO

De conformidad con las observaciones del Examinador, junto con este memorial presento un Capítulo Descriptivo modificado en el cual se han corregido imprecisiones en la traducción del documento inicialmente aportado. Lo anterior con el fin único de subsanar errores involuntarios en la traducción del mismo y con el objeto de que el Capítulo Descriptivo aportado exponga de manera clara el problema técnico y la solución aportada por la invención, así como las ventajas de la misma respecto de divulgaciones previas. Lo anterior se realiza sin ninguna contravención de lo señalado en el Artículo 34 de la Decisión 486, toda vez que esta modificación de ninguna manera corresponde a una ampliación de la materia divulgada en la solicitud inicial.

¹ Superintendencia de Industria y Comercio (2014) *Guía para Examen de Solicitudes de Patente de Invención y Modelo de Utilidad*. (Sección 2.6.5.8., pp. 79).

V. ESTADO DE LA TÉCNICA

El Examinador indica que los siguientes documentos son relevantes para la patentabilidad del Capítulo Reivindicatorio de la presente solicitud:

No.	Documento	Título	Fecha de Publicación	Reivindicaciones Afectadas
D1	Art. 1	<i>“Ensiling alfalfa with additives of lactic acid bacteria and enzymes”²</i>	Marzo, 1991	Nivel inventivo: 1 – 2, 5 – 6, 8 – 9.
D2	Art. 2	<i>“Characterization of a chitinase with antifungal activity from a native Serratia marcescens B4A”³</i>	Septiembre, 2011	Nivel inventivo: 1 – 2, 5 – 6, 8 – 11, 14 – 17.
D3	US4820531	<i>“Bacterial treatment to preserve hay quality by addition of microorganisms of the genus Bacillus”⁴</i>	11 de abril de 1989	Nivel inventivo: 10 – 11, 14 – 17.

VI. EN CUANTO A LA SUPUESTA FALTA DE NIVEL INVENTIVO

El Examinador señala que la materia reclamada en el Capítulo Reivindicatorio carece de nivel inventivo respecto de las enseñanzas de D1, D2 y D3. El Examinador se refiere a D1 y D3 cómo el arte previo más cercano a la materia reclamada en las Reivindicaciones 1 y 10 respectivamente.

Sobre este particular discrepo respetuosamente y señalo que D1 divulga un aditivo de ensilaje que contiene bacterias ácido-lácticas y enzimas para ensilar alfalfa. El componente enzimático mencionado en D1 se describe como un coctel de enzimas tales como celulosa, hemicelulosa y pectinasa; el cual, junto con junto un inóculo de bacterias ácido-lácticas de los géneros *Pediococcus*, *Lactobacillus* y *Streptococcus spp*, proveen un tratamiento enzimático adecuado para el ensilaje en condiciones anaeróbicas.

² Tengerdy, R P; Weinberg, Z G; Szakacs, G; Wu, M; Linden, J C; Henk, L L; Johnson, D E. 1991. Ensiling alfalfa with additives of lactic acid bacteria and enzymes. Journal of the Science of Food and Agriculture. Volume 55, Issue 2. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740550207>

³ Zarei, M; et al. 2011. Characterization of a chitinase with antifungal activity from a native Serratia marcescens B4A. Braz J Microbiol. 2011 Jul-Sep; 42(3): 1017–1029.

⁴ <https://patents.google.com/patent/US4820531A/en?q=US4820531>.

Por el contrario, la presente invención provee un conservante de heno que se relaciona con la preservación del mismo en condiciones aeróbicas, el cual comprende al menos una enzima con actividad quitinasa junto con un inóculo de bacteria del género *Pediococcus*, o de la levadura del género *Pichia*. De acuerdo con lo anterior, a pesar de que D1 menciona el género *Pediococcus* como una de las bacterias ácido-lácticas empleadas en el aditivo, no existe ninguna enseñanza particular en D1 que sugiera como beneficiosa la selección de *Pediococcus* por encima de los otros dos géneros de microorganismos mencionados. Adicionalmente, los inóculos divulgados en D1 se emplean en un medio anaeróbico, con base en lo cual una persona normalmente versada en la materia no se vería particularmente motivada a seleccionar específicamente *Pediococcus spp* de los 3 posibles géneros de bacterias ácido-lácticas mencionados y emplearlo en un medio aeróbico con base en D1.

Por otro lado, D3 describe un método que comprende tratar el heno fresco en condiciones aeróbicas, logrando conservar el heno y reduciendo el calor al emplear una cantidad efectiva de *Bacillus pumilus* o mutantes del mismo. En la Reivindicación 8, D3 menciona que el método puede ser empleado junto con otros microorganismos seleccionados de: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, y *Pediococcus*. De esta manera, la mención puntual de *Pediococcus* se realiza en una realización particular de la invención, la cual presenta una característica técnica que no hace parte del concepto inventivo central de dicha solicitud. Aún si la persona normalmente versada en la materia decidiera tomar en cuenta los microorganismos mencionados en la Reivindicación 8 de D3, no hay ninguna enseñanza particular en el arte previo citado que sugiera como beneficiosa la selección de *Pediococcus* por encima de los otros dos géneros de microorganismos mencionados dentro de dicha reivindicación, tal y como sucede en D1. Por el contrario, dicha selección se deriva de un proceso experimental detallado a partir del cual se elucidaron las características técnicas esenciales de la presente invención.

Con base en lo anterior, señalo que ninguno de los documentos D1 o D3 puede ser considerado como el arte previo más cercano al objeto reclamado en el presente Capítulo Reivindicatorio, teniendo en cuenta que ninguno de estos dos documentos señala en sí mismo el uso exclusivo de una cantidad efectiva de *Pediococcus* (o *Pichia*), la cual en conjunto con enzimas quitinasas permita alcanzar el efecto sorprendente de conservación de heno y disminución de la temperatura del mismo, evidenciado en la presente solicitud.

De igual manera, a pesar de que D2 menciona el uso de enzimas con actividad quitinasa, no presenta enseñanzas particulares o generales que puedan guiar a una persona normalmente versada en la materia a emplear una enzima con actividad quitinasa, en conjunto con microorganismos aislados del género *Pediococcus* o *Pichia* en un medio aeróbico. Particularmente, D2 menciona el uso de enzimas quitinasas con el fin de evaluar la actividad antifúngica de las mismas en el contexto de control biológico. Por el contrario, la presente invención evidencia que el uso de estas enzimas en conjunto con los microorganismos mencionados provee un efecto inesperado relevante para la conservación del heno y a su vez reduce la temperatura del mismo. De acuerdo con lo anterior, enfatizo que la persona normalmente versada en la materia no se vería motivada a emplear enzimas quitinasas en conjunto con dichos microorganismos a partir de las enseñanzas de D2 en conjunto con D1 o D3, ya que dicho documento resuelve un problema técnico que no se relaciona con el abordado por la presente invención y por tanto no sugiere o permite anticipar de ninguna manera el efecto técnico sorprendente de la presente invención, como se evidencia en el Párrafo [0028] del Capítulo Descriptivo adjunto a este memorial:

“De manera sorprendente, se ha encontrado que el conservante de heno se mejora aún más desde el punto de vista de su efecto conservante y su capacidad para evitar 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 una bacteria del género Pediococcus. Cuando 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 la temperatura del heno de alta humedad se mejora significativamente mediante la combinación, en comparación cuando se utiliza cada componente de la combinación de manera individual, tal como se muestra en la Figura 4.” – Capítulo Descriptivo, Párrafo [0028]

Con base en lo anterior, señalo que las enseñanzas de D2 no subsanan las deficiencias de D1 y D3, ya que lo revelado en dicho documento en combinación con las divulgaciones de D1 o D3 no sugieren ni anticipan un conservante de heno que incluya una cantidad efectiva de *Pichia* o *Pediococcus* junto con enzimas quitinasas, el cual logre obtener un

efecto de conservación de heno sorprendente y una reducción significativa de la temperatura del mismo como se evidencia en la Figura 4 de la presente solicitud. Es decir, la aproximación del Examinador evidencia un análisis en retrospectiva, en donde se hace una mención simple y no relacionada de algunas características en el arte previo, intentando encontrar las características esenciales de la invención reivindicada en porciones dispersas del arte previo, como un rompecabezas, las cuales no orientan inmediatamente la persona medianamente versada en la materia a obtener la invención reclamada con los efectos específicos conseguidos. Con base en todo lo anterior, indico que las reivindicaciones independientes y dependientes de la presente solicitud son inventivas respecto del arte previo citado.

VII. EN CUANTO A LA SUPUESTA FALTA DE UNIDAD DE INVENCION

En cuanto a la objeción referente a una supuesta falta de unidad de invención, deseo recalcar que los argumentos detallados en el numeral VI. de este memorial, evidencian que el concepto inventivo de la solicitud tiene nivel inventivo respecto del arte previo citado, cumpliendo así con dicho requisito. En consecuencia, no hay una razón sólida para objetar una supuesta falta de unidad de invención de la presente solicitud *a posteriori*, como lo establece el Examinador. Con base en lo anterior, considero como superada dicha objeción, toda vez que el uso de microorganismos aislados del género *Pediococcus spp.* o *Pichia spp.* en un conservante de heno de acuerdo a la presente invención, alcanzaría el efecto técnico central del concepto inventivo de esta solicitud, es decir, que el efecto sorprendente de conservación de heno y reducción de la temperatura del mismo, será alcanzado indistintamente ya sea que se emplee una cantidad efectiva de un microorganismo aislado de *Pediococcus spp.* o *Pichia spp.* en conjunto con una cantidad efectiva de al menos una enzima con actividad quitinasa.

VIII. PETICIÓN

1. Puesto que se ha dado respuesta a todas las objeciones formuladas por la Dirección de Nuevas Creaciones, solicito proceder al otorgamiento de la solicitud de patente.

2. De manera subsidiaria, y en caso de que su Despacho considere que la modificación introducida al Capítulo Reivindicatorio amerita revisión adicional, solicito un tercer examen de patentabilidad de conformidad con lo dispuesto en el Artículo 2 de la Resolución 3719 de 02 de febrero de 2016, para lo cual realizo el pago de tasa correspondiente.

IX. ENTREVISTA CON EXAMINADOR

Además de este memorial de respuesta, he solicitado una entrevista en las oficinas de la Dirección de Nuevas Creaciones con el fin de discutir con el Examinador temas que Considero de importancia para el trámite. Atentamente solicito no se resuelva este expediente hasta después de llevar a cabo dicha reunión.

X. ANEXOS

1. Capítulo Reivindicatorio modificado conformado por 17 reivindicaciones.
2. Capítulo Descriptivo modificado.
3. Recibo de pago en línea por concepto de examen de patentabilidad adicional.

Señor Director,

ANDRÉS RINCÓN USCÁTEGUI

C.C. 79.780.910 de Bogotá

T.P. 114.908

LGV\LGV\ID-302632\WPC15213

CAPÍTULO REIVINDICATORIO MODIFICADO

1. Un conservante de heno caracterizado por que comprende una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor, de al menos una enzima aislada que tiene una actividad quitinasa, en combinación con una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor, de una levadura aislada del género *Pichia* o una bacteria aislada del género *Pediococcus*.
2. El conservante de heno de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado además por que la al menos una enzima aislada que tiene una actividad quitinasa tiene una actividad quitinasa en el margen de 6 U a 300 U por tonelada de heno a tratar.
3. El conservante de heno de conformidad con la Reivindicación 1 o 2, caracterizado además por que la levadura aislada del género *Pichia* es de una *Pichia anomala* sp.
4. El conservante de heno de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, caracterizado además por que la levadura aislada del género *Pichia* es de una *Pichia anomala* sp que tiene todas las características de identificación de la cepa de aislada *Pichia anomala* que tiene el número de acceso DBVPG 3003.
5. El conservante de heno de conformidad con la Reivindicación 1 ó 2, caracterizado además por que la bacteria aislada del género *Pediococcus* es de un *Pediococcus pentosaceus* sp.
6. El conservante de heno de conformidad con la Reivindicación 1, 2 ó 5, caracterizado además por que la bacteria aislada del género *Pediococcus* es *Pediococcus pentosaceus* sp que tiene todas las características de identificación de *Pediococcus pentosaceus* BTC328 aislada que tiene el número de acceso NCIMB 12674 o la cepa BTC401 que tiene el número de acceso NCIMB 12675.

7. El conservante de heno de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado además por que la al menos una enzima aislada que tiene una actividad quitinasa se encuentra en combinación con cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor, de *Pichia anomala* sp aislada.

8. El conservante de heno de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado además por que la al menos una enzima aislada que tiene una actividad quitinasa se encuentra en combinación con una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor, de *Pediococcus pentosaceus* sp aislada.

9. El conservante de heno de conformidad con la Reivindicación 1 a 8, caracterizado además por que comprende al menos una enzima aislada que tiene una actividad pectin liasa, una actividad glucanasa o una mezcla de las mismas.

10. Un método para tratar heno para evitar y/o reducir el daño por calor en heno de alta humedad así como para conservar el mismo, el método caracterizado por que comprende i) proporcionar un conservante de heno que comprende una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor, de al menos una enzima aislada que tiene una actividad quitinasa en combinación con una cantidad efectiva para la conservación de heno y reducción de calor, de una levadura aislada del género *Pichia* o una bacteria aislada del género *Pediococcus*, y ii) adicionar al heno el conservante de heno.

11. El método de conformidad con la Reivindicación 10, caracterizado además por que la al menos una enzima aislada que tiene una actividad quitinasa tiene una actividad quitinasa en el margen de 6 U a 300 U por tonelada de heno a tratar.

12. El método de conformidad con la Reivindicación 10 u 11, caracterizado además por que la levadura aislada del género *Pichia* es de la especie *Pichia anomala*.

13. El método de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 10 a 12, caracterizado además por que la levadura aislada del género *Pichia* es de la especie *Pichia anomala* que tiene todas las características de identificación de la cepa aislada *Pichia anomala* que tiene el número de acceso DBVPG 3003.
14. El método de conformidad con la Reivindicación 10 u 11, en donde la bacteria aislada del género *Pediococcus* es la especie *Pediococcus pentosaceus*.
15. El método de conformidad con la Reivindicación 10, 11 ó 14, caracterizado además por que la bacteria aislada del género *Pediococcus* es de la especie *Pediococcus pentosaceus* que tiene todas las características de identificación de *Pediococcus pentosaceus* BTC328 aislada que tiene el número de acceso NCIMB 12674 o la cepa BTC401 que tiene el número de acceso NCIMB 12675.
16. El método de conformidad con las Reivindicaciones 10 a 15, caracterizado además por que adicionalmente comprende al menos una enzima aislada que tiene una actividad pectin liasa, una actividad glucanasa o una mezcla de las mismas.
17. Una mezcla de heno y conservante de heno, en donde el conservante de heno está definido de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9.