



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 225**

51 Int. Cl.:
A23K 1/165 (2006.01)
C12N 9/96 (2006.01)
C12N 9/98 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07726771 .4**
96 Fecha de presentación : **09.03.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1996028**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.12.2008**

54 Título: **Formulaciones enzimáticas sólidas y proceso para su preparación.**

30 Prioridad: **10.03.2006 EP 06004998**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.05.2011

73 Titular/es: **BASF SE**
67056 Ludwigshafen, DE

72 Inventor/es: **Lohscheidt, Markus;**
Betz, Roland;
Braun, Jörg y
Pelletier, Wolf

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 358 225 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

Formulaciones enzimáticas sólidas y proceso para su preparación.

5 La presente invención se refiere a formulaciones enzimáticas sólidas novedosas que comprenden mezclas de al menos una composición enzimática estabilizada con sal, al menos un vehículo en forma de partículas y al menos un líquido hidrofóbico. La invención se refiere además a métodos para la preparación de tales formulaciones enzimáticas sólidas así como a métodos para la preparación de alimentos para animales, productos alimenticios y complementos alimenticios que contiene tales formulaciones enzimáticas.

Antecedentes de la invención

10 Del estado de la técnica se conocen numerosas composiciones enzimáticas sólidas que se preparan, por ejemplo, por secamiento de aspersión de las soluciones líquidas de enzimas. Además se conoce que la estabilidad de la enzima en procesos semejantes de secamiento por atomización puede incrementarse significativamente mediante adición de sales estabilizantes como, por ejemplo, sulfato de magnesio. De esta manera se obtienen, por lo tanto, composiciones enzimáticas sólidas que también tienen una actividad enzimática porcentual alta después del secado por aspersión. A manera de ejemplo, en la EP-A-0 758 018 se describen composiciones enzimáticas sólidas estables durante el almacenamiento y el procesamiento, las cuales se obtienen por medio de secamiento de una solución que contiene al menos una enzima y una sal inorgánica soluble en agua. Las composiciones enzimáticas allí descritas encuentran aplicación preferiblemente como aditivo para composiciones sólidas de alimento para animales o forraje.

20 De la US 5,972,669 se conocen soluciones enzimáticas sólidas, estabilizadas con sal que pueden usarse en productos de alimento para animales en cuyo caso éstas pueden estar presentes en mezcla con otros componentes de alimento para animales como harinas y aceite de soya.

De la US 6,610,519 se conocen granulados sólidos de fitasa que se han estabilizado por medio de ácido láctico (de Corn Steep Liquor, o licor de maíz fermentado) y tienen opcionalmente un recubrimiento de grasa.

25 Para la preparación de tales composiciones de alimento para animales adicionadas con enzima es deseable que la enzima esté distribuida lo más homogéneamente posible en el preparado elaborado de alimento para animales. Puesto que los preparados enzimáticos secos contienen la enzima en alta concentración, en la mayoría de los casos para proveer la actividad enzimática deseada a la composición de alimento para animales es plenamente suficiente una adición de distintivamente menos de 1 % en peso respecto del peso total de la composición de alimento para animales. Cuanto más baja se la cantidad requerida de la enzima a dosificar, tanto más difícil es, sin embargo, lograr una distribución homogénea de la actividad enzimática en el preparado de alimento para animales ya elaborado. La misma dificultad también se observa por supuesto en la preparación de productos alimenticios y complementos alimenticios, cuyas composiciones enzimáticas sólidas altamente concentradas deben adicionarse distribuidas lo más homogéneamente posible.

35 Por lo tanto, el objetivo de la invención consiste en encontrar una manera que haga posible llevar composiciones enzimáticas sólidas altamente concentradas, que contienen esencialmente solo enzima y vehículo estabilizador, a una forma que garantice una dosificación homogénea y reproducible a los productos alimenticios y de alimentos para animales. Simultáneamente también debe garantizarse que las formulaciones usadas para esto posean buenas propiedades de procesamiento, como propensión reducida a la formación de polvo, buen comportamiento para fluir y distribución estrecha de tamaños de partículas.

40 Resumen de la invención

45 El problema de arriba pudo resolverse de manera sorprendente suministrando una formulación enzimática sólida según la reivindicación 1, la cual se obtiene mezclando una composición enzimática en forma de partículas, estabilizada con sal, un vehículo en forma de partículas así como un líquido hidrofóbico. En particular fue sorprendente que las formulaciones sólidas preparadas de acuerdo con la invención pueden manejarse particularmente bien ya que muestran una alta estabilidad ante la segregación, una propensión extremadamente baja a la formación de polvo y, a pesar de la adición de líquido hidrofóbico, un comportamiento excelente en el flujo.

Descripción de las figuras

La figura 1 ilustra una forma preferida de realización por medio de un diagrama de flujo, en particular la preparación de una formulación sólida de xilanasa. Para esto se mezcla un concentrado líquido que contiene xilanasa con sulfato

de magnesio, se seca en un dispositivo de secado por aspersión para obtener un polvo estabilizado que contiene xilanasa y se aglomera simultáneamente, en cuyo caso pueden obtenerse, por ejemplo, partículas con un tamaño en el rango de 50 hasta 250 μm . En un siguiente paso el polvo seco que contiene xilanasa se mezcla con un vehículo orgánico sólido y se asperge con aceite de soya simultáneamente o a continuación. De esta manera se obtiene una formulación que contiene xilanasa con una propensión baja a la formación de polvo y estabilidad alta frente a la segregación.

La figura 2 ilustra la preparación de otras formulaciones enzimáticas sólidas que contienen una mezcla de xilanasa y glucanasa en diferentes modalidades. Según una variante del método (a) se procede a partir de un concentrado mezclado de glucanasa y xilanasa, mientras que en una variante de método (b) primero se procede a partir de un concentrado líquido de glucanasa. Según la variante (a) del método se seca el concentrado mezclado de glucanasa y xilanasa como se describe en la figura 1 y se mezcla con un vehículo orgánico y se asperge con aceite de soya. Según la variante del método (b), por lo contrario, primero se procesa un concentrado líquido de glucanasa, de manera análoga como ya se describió arriba para el concentrado de xilanasa, para producir un polvo que contiene glucanasa. Este polvo se mezcla con un polvo de xilanasa preparado según la figura 1. Simultáneamente se efectúa el mezclado con el vehículo orgánico y una aspersión con aceite de soya, en cuyo caso también se obtiene una formulación enzimática que contiene xilanasa y glucanasa. Las formulaciones enzimáticas sólidas que contienen glucanasa y xilanasa que se obtienen también se caracterizan por una baja predisposición a formar polvo y un alta estabilidad frente a la segregación.

Descripción detallada de la invención

a) Formas preferidas de realización de la invención

Son objeto de la invención formulaciones enzimáticas sólidas que comprenden una mezcla de a) al menos una composición enzimática en forma de partículas, granulada, de al menos una enzima y al menos una sal orgánica o inorgánica de un catión de metal mono- o bivalente con b) de al menos un vehículo en forma de partículas, inorgánico u orgánico, fisiológicamente compatible y c) de al menos un líquido hidrofóbico con propiedades adhesivas y en particular un líquido hidrofóbico con un punto de fusión en el rango de $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, en particular de -50 a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, como por ejemplo de -40 a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ o de -30 a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$; en cuyo caso la proporción entre el diámetro promedio de partículas del vehículo y la composición enzimática se encuentra en el rango de aproximadamente 0,125 a 8 y en cuyo caso la proporción de mezcla entre la composición enzimática y el vehículo se encuentra en el rango de aproximadamente 1:1000 a 1:5 partes en peso.

En particular son objeto de la invención formulaciones de enzima que tipo designado arriba que comprenden

a) una composición enzimática en forma de partículas que contiene una enzima en mezcla con al menos una sal orgánica o inorgánica de un catión mono- o bivalente; o

b) una composición enzimática en forma de partículas que contiene al menos dos enzimas distintas una de la otra en mezcla con al menos una sal orgánica o inorgánica de un catión mono- o bivalente; o

c) al menos dos composiciones enzimáticas en forma de partículas, distintas una de otra, en cuyo caso ambas composiciones se distinguen porque contienen al menos una enzima diferente, en cuyo caso las enzimas se encuentran en cada composición en mezcla con al menos una sal orgánica o inorgánica de un catión mono- o bivalente.

En particular, la invención se refiere a formulaciones enzimáticas en donde la proporción entre el diámetro promedio de partícula del vehículo y la composición enzimática está en el rango de aproximadamente 0.25 a 4 o 0,5 a 2 o 1 a 1,5. En tal caso el tamaño promedio de partículas de la composición enzimática empleada y del vehículo empleado debe encontrarse en el intervalo de aproximadamente 50 a 500 μm o 150 a 350 μm . De manera conveniente la proporción de mezcla entre la composición enzimática y el vehículo se ajusta en el intervalo de aproximadamente 1:500 a 1:10 o 1:100 hasta 1:20 partes por peso.

La fracción del líquido hidrofóbico alcanza 0,1 hasta 5, 0,2 hasta 2, 0,3 hasta 1,5 o 0,3 hasta 0,7 % en peso, respecto del peso total de la formulación enzimática.

En las composiciones usadas de acuerdo con la invención la fracción de sal se encuentra en el intervalo de 1 hasta 30 % en peso, 5 hasta 25 % en peso o 10 hasta 20 % en peso, respecto del peso total de la composición enzimática.

La fracción porcentual de proteína – enzima en la composición enzimática es de aproximadamente 0,01 hasta 99 % en peso, como por ejemplo 0,01 hasta 80 % en peso, 10 hasta 80 % en peso, 20 hasta 75 % en peso o 30 hasta 60 % en peso.

5 Además de al menos una enzima y al menos una sal, la composición enzimática puede contener además otros componentes. Estos pueden servir como agente aglutinante (por ejemplo polímeros o azúcares), como agente de carga (por ejemplo, cal, arcilla, carbohidratos, azúcares, almidones), como colorante u otro estabilizante. Otros componentes de este tipo son conocidos de por sí del estado de la técnica y son corrientes para el especialista en la materia.

10 La humedad residual de la mezcla enzimática de acuerdo con la invención se encuentra en un intervalo de 5 hasta 30 % en peso, como por ejemplo de 5 hasta 20 % en peso, o de 7 hasta 16 % en peso.

La invención no se limita a una enzima determinada. Pero, en particular, las enzimas que pueden usarse se seleccionan entre hidrolasas (EC 3.), en particular glicosidasas (EC 3.2.1), peptidasas (EC 3.4) y ante todo xilanasas, glucanasas (hemicelulasas), celulasas, proteasas, queratinasas, amilasas, peptidasas y mezclas de las mismas.

15 En formulaciones enzimáticas preferidas se selecciona la enzima entre endo-1,4-β-xilanasas (EC 3.2.1.8), endo-1,4-β-glucanasas (EC 3.2.1.4) y mezclas de las mismas.

También son objeto de la invención formulaciones enzimáticas que tienen una más de las siguientes propiedades:

a) Valor gravimétrico de polvo (determinado según un método descrito en los ejemplos) en el intervalo de 0 hasta 0,5 o 0,001 hasta 0,3 o 0,001 hasta 0.2 o 0,01 hasta 0,2 % en peso;

20 b) Densidad aparente en el intervalo de 200 hasta 700, 300 hasta 500 o 350 hasta 450 g/l (determinada según DIN EN ISO 60)

c) Comportamiento de flujo (determinado según el ensayo de Schulze-Ringscher) con un valor f_f en el intervalo de 3 hasta 30, 5 hasta 15 o 6 hasta 10.

25 En particular son objeto de la invención formulaciones enzimáticas, en cuyo caso la formulación comprende una mezcla de

a) al menos de una composición enzimática, cuyo componente de enzima se selecciona entre xilanasas, glucanasas y mezclas de las mismas según la definición de arriba, en mezcla con sulfato de magnesio, en cuyo caso la fracción de sulfato de magnesio es de aproximadamente 5 hasta 25 o 15 hasta 20 % en peso respecto del peso total de la composición enzimática seca;

30 b) al menos un vehículo de harina forrajera de trigo, en cuyo caso la proporción de mezcla entre la composición enzimática y el vehículo se encuentra en el intervalo de 1 : 5 hasta 1 : 500 o 1:10 hasta 1:100;

35 c) aceite vegetal en una fracción de aproximadamente 0,1 hasta 1, o 0,3 hasta 0,6 % en peso respecto del peso final de la formulación enzimática, en cuyo caso el tamaño promedio de partícula de la composición enzimática y el vehículo se encuentra en el intervalo de aproximadamente 100 hasta 500 o 150 hasta 350 μm , y la fracción de xilanasas se encuentra en aproximadamente 3.000- 30.000 o 5.200 hasta 18.000 o 5.400 hasta 9.000 TXU/g de la formulación y la fracción de glucanasa se encuentra en aproximadamente 2.000 hasta 20.000 o 2.200 hasta 10.000 TGU/g de la formulación. La fracción porcentual de la xilanasas se encuentra en aproximadamente 1-20 % en peso, preferible 2-10 % en peso y en particular 2,5-5 % en peso y de glucanasa en aproximadamente 0,01-10 % en peso, preferible 0,1-6 % en peso y en particular 0,2-2 % en peso.

40 Particularmente se prefieren formulaciones que contienen una composición enzimática del tipo descrito arriba descrito, cuyo componente de enzima es una xilanasas.

Particularmente se prefieren formulaciones que contienen una composición enzimática del tipo arriba descrito cuyo componente de enzima es una glucanasa.

45 Particularmente se prefieren formulaciones que contienen una composición enzimática del tipo descrito arriba, cuyo componente de enzima es una mezcla de xilanasas y glucanasas.

Particularmente se prefieren formulaciones que comprenden dos composiciones enzimáticas de enzimas diferentes en cuyo caso uno de los componentes de enzima es una glucanasa y el otro es una xilanasa.

5 También son objeto de la invención métodos para la preparación de formulaciones enzimáticas sólidas según la definición de arriba, en cuyo caso se mezcla al menos composición enzimática en forma de partículas que comprende al menos una enzima y al menos una sal orgánica o inorgánica de un catión de metal mono- o bivalente, con un vehículo fisiológicamente compatible orgánico o inorgánico en forma de partículas y se humedece la mezcla con un líquido hidrofóbico (con un punto de fusión en el intervalo de -60 hasta 30 °C según la definición de arriba).

En particular son objeto de la invención métodos en cuyo caso

10 a) se suministra una composición enzimática en forma de partículas que contiene una enzima, en particular xilanasa o glucanasa, en mezcla con al menos una sal orgánica o inorgánica de un catión mono- o bivalente; o

b) una composición enzimática en forma de partículas que contiene al menos dos enzimas diferentes una de otra seleccionadas entre xilanasa y glucanasa en mezcla con al menos una sal orgánica o inorgánica de un catión mono- o bivalente; o

15 c) al menos dos composiciones enzimáticas distintas una de otra, en forma de partículas, en cuyo caso ambas composiciones se distinguen porque contienen al menos una enzima diferente, en cuyo caso las enzimas se encuentran en cada composición en mezcla con al menos una sal orgánica o inorgánica de una sal mono- o bivalente.

20 Métodos preferidos son aquellos en los que la composición enzimática se obtiene mediante secamiento por atomización o mediante secamiento por atomización y aglomeración de un líquido que contiene enzima en el cual se alberga al menos una sal orgánica o inorgánica de un catión mono- o bivalente.

También se prefieren métodos en los que se obtienen al menos dos composiciones enzimáticas de enzimas distintas una de otra mediante secamiento por atomización o mediante secamiento por atomización y aglomeración de al menos dos líquidos distintos que contienen enzima en los cuales se alberga al menos una sal orgánica o inorgánica de un catión mono- o bivalente, y en cuyo caso

25 a) cada una de las al menos dos composiciones enzimáticas se mezcla con un vehículo orgánico o inorgánico en forma de partículas, o

b) un vehículo orgánico o inorgánico en forma de partículas se mezcla con las al menos dos composiciones enzimáticas; y

la mezcla obtenida según la variante a) o la variante b) se humedece con un líquido hidrofóbico.

30 El líquido usado que contiene enzima comprende en tal caso al menos una xilanasa, al menos una glucanasa o una mezcla de las mismas.

En particular, en tal caso la fracción de sal en la composición enzimática usada se encuentra en el intervalo de 1 hasta 30 % en peso o en aproximadamente 10 hasta 25 o 15 hasta 20 % en peso respecto del peso total de la composición enzimática.

35 Además, en particular se usa un vehículo y una composición enzimática cuya proporción del diámetro promedio de partícula se encuentra en el intervalo de aproximadamente 0,125 hasta 8, preferiblemente 0,25 hasta 4 o 0,5 hasta 2 o 1 hasta 1,5.

40 El tamaño promedio de partícula de la composición enzimática usada y del vehículo usada se encuentra en el intervalo de aproximadamente 50 hasta 500 µm o 150 hasta 350 µm. La proporción de mezcla entre composición enzimática y vehículo se encuentra en el intervalo de aproximadamente 1:1000 hasta 1:5 o 1:500 hasta 1:10 o 1:100 hasta 1:20.

El tamaño promedio de partícula puede averiguarse según el tamaño de las partículas ya sea mediante un análisis de tamiz (por ejemplo, con una máquina tamizadora del tipo Vibro VS 1000 de la empresa Retsch) o también por medio de difracción de láser (por ejemplo, por medio de un Mastersizers de la empresa Malvern).

La fracción del líquido hidrofóbico es de 0,1 hasta 5 % en peso o 0,2 hasta 2, 0,3 hasta 1,5 o 0,3 hasta 0,7 % en peso, respecto del peso total de la formulación enzimática.

En particular es objeto de la invención un método para la preparación de una formulación enzimática sólida que comprende al menos una enzima seleccionada entre xilanasas, glucanasas y mezclas de las mismas, en cuyo caso

- 5 a) se seca por aspersión, o se seca por aspersión y se aglomera, al menos un líquido que contiene enzima hasta al menos una composición enzimática, en cuyo caso su componente de enzima se selecciona entre xilanasas, glucanasas y mezclas de las mismas, y este componente de enzima está contenido en la mezcla con sulfato de magnesio en el líquido y en cuyo caso la fracción de sulfato de magnesio es de aproximadamente 10 hasta 25 % en peso respecto del peso total de la composición enzimática seca;
- 10 b) la composición enzimática obtenida de esa manera se mezcla con un vehículo orgánico o inorgánico en forma de partícula; y
- c) la mezcla enzima/vehículo se humedece con un líquido hidrofóbico que tiene un punto de fusión entre -60 y 30 °C.

Variantes preferidas del método se caracterizan porque

- 15 a) se suministra una composición enzimática en forma de partículas que contiene al menos una xilanasas en mezcla con sulfato de magnesio; o
- b) se suministra una composición enzimática en forma de partículas que contiene al menos una glucanasa en mezcla con sulfato de magnesio; o
- c) se suministra una composición enzimática en forma de partículas, que contiene al menos una xilanasas y al menos una glucanasa en mezcla con sulfato de magnesio; o
- 20 d) se suministra al menos dos composiciones enzimáticas, en forma de partículas, distintas una de otra, en cuyo caso una de las composiciones contiene al menos una xilanasas y la otra de las composiciones contiene al menos una glucanasa, en cuyo caso las enzimas se presentan en cada composición en mezcla con sulfato de magnesio.

25 En una modalidad particular del método, se mezcla una composición enzimática con al menos un vehículo de harina forrajera de trigo, en cuyo caso la proporción de mezcla entre la composición enzimática y el vehículo se encuentra en el intervalo de 1 : 5 hasta 1 : 500 o 1:10 hasta 1:100.

30 Durante la mezcla, se adiciona en particular aceite vegetal en una fracción de aproximadamente 0,1 hasta 1 % en peso o 0,3 hasta 0,6 % en peso respecto del peso final de la formulación enzimática. El tamaño promedio de partícula de la composición enzimática usada y del vehículo usado se encuentra en tal caso en particular en el intervalo de aproximadamente 100 hasta 500 µm o 150 hasta 40 µm y la fracción de xilanasas es de aproximadamente 5.000 - 30.000 o 5.200 hasta 10.000 o 5.400 hasta 9.000 TXU/g de la formulación y/ o la fracción de glucanasa es de aproximadamente 2.000 hasta 10.000 o 2.200 hasta 6.000 TGU/g de formulación.

También es objeto de la invención el uso de una formulación enzimática secada según la definición de arriba para la preparación de un producto alimenticio, complemento alimenticio o un alimento para animales.

35 También es objeto de la invención métodos para la preparación de alimentos de animales, productos alimenticios o complementos alimenticios que contienen una formulación enzimática secada según la definición de arriba; en particular alimentos para animales, los cuales comprenden una formulación enzimática según la invención y su incorporación a continuación al alimento para animales, productos alimenticios, en particular en una fracción de aproximadamente 0,001 hasta 1 % en peso.

b) Enzimas

40 Las enzimas empleadas de acuerdo con la invención no se someten a limitaciones y pueden ser tanto de origen natural o recombinante. Pueden ser enzimas de vegetales, de hongos, de bacterias o levaduras. Se prefieren enzimas de fuentes microbiológicas como bacterias, levaduras u hongos. Se prefieren enzimas de fuentes microbiológicas como bacterias, levaduras u hongos. La enzima puede obtenerse del microorganismo respectivo según técnicas conocidas que comprenden de manera típica la fermentación del microorganismo que produce

45 enzima en un medio nutriente adecuado y la obtención a continuación de la enzima y del concentrado de enzima desde el medio de fermentación según técnicas estándar.

Si es necesario, para el ajuste del valor de pH de la solución de enzima o del concentrado de enzima a las formulaciones se adicionan sustancias usuales como búferes, bases, ácidos; los valores preferidos de pH son 3,5 hasta 7, particularmente preferible 3,5 hasta 5 y en particular 4 hasta 4,5.

5 Además pueden usarse mutantes de enzima o enzimas que tienen una elevada termoestabilidad como se proponen, por ejemplo, en las solicitudes WO 95/2997, 97/00020, 97/20920, 97/22691, 98/28410 o 03/062409.

Pero preferiblemente como enzimas se usan de acuerdo con la invención polipéptidos con actividad de xilanasas, polipéptidos con actividad de glucanasa y mezclas de las mismas.

b1) Polipéptidos con actividad de xilanasas

10 Estas son enzimas de la clase EC 3.2. 1.8 con la denominación oficial endo-1, 4-beta-xilanasas. El nombre sistemático es 1, 4-beta-D-xilanoxilanohidrolasa. También se usan otros nombres: endo- (1-4)-beta-xilanasas; (1-4)-beta-xilano 4-xilanohidrolasa; endo-1; 4-xilanasas; xilanasas; beta-1, 4-xilanasas; endo-1, 4-xilanasas; endo-beta-1, 4-xilanasas; endo-1, 4-beta-D-xilanasas; 1, 4-beta-xilano xilanohidrolasa; beta-xilanasas; beta-1, 4-xilano xilanohidrolasa; endo-1,4- beta-xilanasas; beta-D-xilanasas. La enzima cataliza la endohidrolasa de enlaces 1,4-beta-D- xilosídicos en xilanos.

15 La xilanasas puede derivarse, por ejemplo, de bacterias, como por ejemplo de aquellas de los géneros Clostridium, Streptomyces, Paenibacillus, Pseudomonas, Thermoascus, Thermotoga, Bacillus y, por ejemplo, xilanasas de las siguientes cepas Bacillus halodurans, Bacillus pumilus, Bacillus agaradhaerens, Bacillus circulans, Bacillus polymyxa, Bacillus sp., Bacillus stearothermophilus, o Bacillus subtilis.

20 Xilanasas de hongos se derivan por ejemplo de levaduras y hongos filamentosos, como por ejemplo de los siguientes géneros: Aspergillus, Aureobasidium, Emericella, Fusarium, Gaeumannomyces, Humicola, Lentinula, Magnaporthe, Neocallimastix, Nocardiosis, Orpinomyces, Paecilomyces, Penicillium, Pichia, Saccharomyces, Schizophillum, Talaromyces, Thermomyces, Trichoma, como por ejemplo Talaromyces emersonii.

25 La determinación de la actividad de xilanasas se efectúa en una manera conocida de por sí y se describe a manera de ejemplo en Engelen et al, Journal of AOAC International Vol. 79, No. 5, 1019 (1996). A diferencia del método allí descrito en lugar del sustrato de xilano a partir de las cáscaras de avena (Serva Feinbiochemia GmbH u. Co., Heidelberg) se usa arabinoxilano a partir de trigo (Megazyme, article P-WAXI, Irlanda). La preparación de la solución de sustrato se efectúa de manera fresca en cada caso por disolución, libre de grumos, de 1,000 g de arabinoxilano en 100,00 ml de agua por un lapso de tiempo de al menos 12 horas.

b2) Polipéptidos con actividad de glucanasa

30 Las endoglucanasas se clasifican como EC 3.2.1.4 y con frecuencia se denominan celulasas. Otras denominaciones son endo-glucanasa, endo-1, 4-beta-glucanasa, celulasa A o carboximetilcelulasa. Las enzimas catalizan la endohidrólisis de enlaces 1, 4-beta-D-glucosídicos en celulosa así como las 1, 4-conexiones en beta-D-glucanos, que contienen además 1, 3-conexiones.

35 La glucanasa puede derivarse, por ejemplo, de bacterias como, por ejemplo, de aquellas de los géneros Bacillus, Clostridium, Paenibacillus, Pseudomonas, Streptomyces, Thermoascus, Thermotoga. Glucanasas de hongos se derivan por ejemplo de levaduras y hongos filamentosos, como por ejemplo a partir de los siguientes géneros: Aspergillus, Aureobasidium, Emericella, Fusarium, Gaeumannomyces, Humicola, Lentinula, Magnaporthe, Neocallimastix, Nocardiosis, Orpinomyces, Paecilomyces, Penicillium, Pichia, Saccharomyces, Schizophillum, Talaromyces, Thermomyces, Trichoma, como por ejemplo Talaromyces emersonii.

40 La determinación de la actividad de glucanasa se efectúa de una manera conocida de por sí y se describe por ejemplo en Engelen et al, Journal of AOAC International Vol. 79, No. 5, 1019 (1996). A diferencia del método descrito allí se usa en lugar del sustrato de beta-glucano de cebada (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO: No. G-6513) beta-glucano de cebada (Megazyme, article P-BGBM, Irlanda). La preparación de la solución de sustrato se efectúa fresca en cada caso primero mediante la suspensión de 0,750 g de glucano en 20 ml de agua y disolución a posterior mediante adición de 20 ml de solución de hidróxido de sodio (2 mol/l) revolviendo por 15 minutos. Se
45 adicionan 42,5 ml de solución de ácido cítrico (1 mol/l), se ajusta el valor de pH por medio de solución de hidróxido de sodio (2 mol/l) o solución de ácido cítrico (1 mol/l) a 3,50 +/- 0,03 a 40,0 °C +/- 0,1 °C. Después de enfriar a temperatura ambiente se lleva el volumen con agua a 100,00 ml.

c) Sales estabilizantes

Como ejemplos de aditivos estabilizantes adecuados pueden nombrarse sales inorgánicas u orgánicas.

- 5 En particular éstas son sales metálicas, en particular sales de metales alcalinos y alcalinotérreos de ácidos orgánicos, como por ejemplo sales de Mg-, Ca-, Zn-, Na-, K- de ácidos carboxílicos mono- o bivalentes con 1 hasta 8 átomos de carbono, como por ejemplo citratos, acetatos, formiatos e hidroformiatos, además sales inorgánicas como por ejemplo sulfatos, carbonatos, silicatos o fosfatos de Mg-, Ca-, Zn-, Na- o K-; óxidos de metales alcalino térreos, como CaO y MgO; medios inorgánicos de búfer, como hidrofosfatos de metal alcalino, en particular hidrofosfatos de sodio y potasio, como por ejemplo K_2HPO_4 , KH_2PO_4 y Na_2HPO_4 . De forma particularmente preferible se usan las siguientes sales en las fracciones en peso indicadas respecto de la composición enzimática:

Sulfato de cinc (0,5 hasta 10 o 3 hasta 8 % en peso)

- 10 Sulfato de calcio (1 hasta 30 o 10 hasta 25 % en peso)

Sulfato de magnesio (5 hasta 30 o 10 hasta 25 % en peso)

Sulfato de sodio (1 hasta 30 o 10 hasta 20 % en peso)

d) Vehículos adecuados

- 15 Ejemplos de materiales de vehículo son carbohidratos, en particular azúcares y almidones, por ejemplo de maíz, arroz, patata, trigo y yuca; almidones modificados, por ejemplo anhídrido succinato de octilo; celulosa y celulosa microcristalina; minerales inorgánicos o barro, por ejemplo arcilla, carbones, kieselgur (diatomita), ácido silícico, talco y caolín; sémola, por ejemplo sémola de trigo, salvados, por ejemplo salvado de trigo o salvado de sémola de trigo, harinas; sales como sales metálicas, en particular sales de metal alcalino y de metal alcalino térreo de ácidos orgánicos, por ejemplo citrato, acetato, formiato e hidroformiato de Mg-, Ca-, Zn-, Na-, o K-, sales inorgánicas, por ejemplo sulfatos, carbonatos, silicatos o fosfatos de Mg-, Ca-, Zn-, Na-, K-; óxidos de metal alcalino térreo como CaO y MgO; medios inorgánicos de búfer como hidrofosfatos de metal alcalino, en particular hidrofosfatos de sodio y potasio, por ejemplo K_2HPO_4 , KH_2PO_4 y Na_2HPO_4 .
- 20

e) Líquidos hidrofóbicos adecuados

Como ejemplos de líquidos hidrofóbicos adecuados pueden nombrarse:

- 25 Fundamentalmente son útiles todos los líquidos hidrofóbicos (con un punto de fusión en el intervalo de -60 hasta 30 °C, que tienen una parte hidrófoba de molécula), siempre que sean adecuados como adición a productos alimenticios o a alimentos para animales. Naturalmente se prefieren líquidos vegetales o animales convencionales, como fosfolípidos y mono-, di- y triacilglicéridos y mezclas de las mismas.

- 30 Como ejemplos no limitantes pueden nombrarse lecitina de soya, aceites vegetales como, por ejemplo aceite de girasol, aceite de germen de maíz, aceite de soya, aceite de palma, aceite de colza, aceite de palmiste, aceite de semillas de algodón, aceite de cacahuete, aceite de babasú, aceite de cártamo, así como aceites animales como, por ejemplo, aceite de pez.

f) Preparación de la formulación

- 35 La preparación de las formulaciones enzimáticas de la invención se efectúa usando métodos conocidos de por sí, como por ejemplo se describe en Mollet et al, Formulierungstechnik (Tecnología de formulación), 2000, Verlag Wiley-VCH, Weinheim o Heinze, Handbuch der Agglomerationstechnik (Manual de la tecnología de aglomeración), 2000, Verlag Wiley-VCH, Weinheim.

f1) Secamiento

- 40 Para la preparación de las composiciones enzimáticas estabilizadas con sal, preferiblemente aglomeradas, mediante secamiento, se toman en consideración diversas tecnologías, como en particular

- Secamiento por atomización

- Granulación por lecho fluidificado
- Aglomeración por lecho fluidificado
- Tecnología FSD (secador por aspersor fluidificado)
- Tecnología Procell de Glatt (WO 2004/108911)

5 El secamiento puede efectuarse en tal caso de manera continua o discontinua (por lotes). Después del secamiento, opcionalmente el producto secado debe tamizarse, molerse o aglomerarse. También son posibles las combinaciones de los pasos nombrados.

10 La solución de enzima empleada de acuerdo con la invención para el secamiento por atomización o aglomeración contiene al menos una enzima útil como adición a productos alimenticios o a alimentos para animales, se disuelve o se suspende en una fase acuosa, como por ejemplo en el concentrado de enzima que puede obtenerse del proceso de preparación que consiste en fermentación y procesamiento. La solución posee una fracción de proteína en el intervalo de aproximadamente 1 hasta 50 % en peso, preferiblemente aproximadamente 10 hasta 35 % en peso, respecto del peso total de la solución. El valor de pH se encuentra generalmente en el intervalo de aproximadamente 3 hasta 9. Además de los estabilizantes en forma de sal nombrados arriba, como por ejemplo sales de metal alcalino o metal alcalino térreo, como sulfato de sodio o de magnesio, la solución puede contener opcionalmente otros aditivos usuales. Como ejemplos pueden nombrarse: búferes, como por ejemplo búfer de fosfato, solubilizante como, por ejemplo, etanol o productos tensioactivos y similares.

20 Para el caso que las propiedades adhesivas de la solución de enzima no sean suficientes para garantizar una adhesión estable de las partículas después de la aspersión, el uso adicional de un aglutinante es de ventaja. De esta manera se evita que los aglomerados se desmoronen de nuevo al secarse. En tales casos se prefiere asperger un aglutinante soluble o dispersable en medio acuoso al lecho fluidificado. Como ejemplos de aglutinantes adecuados pueden nombrarse: soluciones de carbohidratos, como por ejemplo glucosa, sacarosa, dextrina, entre otros, alcoholes de azúcar, como por ejemplo manitol, o soluciones de polímero como por ejemplo soluciones de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), polivinilpirrolidona (PVP), alcohol polivinílico (PVA), celulosa etoxilada (EC), etilcelulosa o propilcelulosa. Mediante selección dirigida de la cantidad y las propiedades adhesivas del aglutinante aspergido pueden prepararse aglomerados de tamaño y consistencia distintos.

25 Si el aglutinante se asperge en mezcla con la enzima, la porción de aglutinante se encuentra habitualmente en el rango de aproximadamente 0,5 hasta 20 % en peso, preferiblemente aproximadamente 1 hasta 10 % en peso, respecto del peso total de la solución.

30 Si el aglutinante se asperge como solución separada, entonces la porción de aglutinante de la solución se encuentra en el rango de aproximadamente 1 hasta 30 % en peso, respecto del peso total de la solución. El aglutinante también se encuentra disuelto en un medio acuoso, preferiblemente agua desalinizada, libre de gérmenes. Los aditivos usuales como, por ejemplo, búferes o solubilizantes, también pueden estar contenidos.

35 La porción del aglutinante en el producto final (es decir, en la composición enzimática) es según la invención de 0 hasta aproximadamente 20 % en peso, por ejemplo aproximadamente 1 hasta 6 % en peso. La cantidad óptima también depende del tipo del aglutinante seleccionado.

40 El secamiento por atomización de preparados de enzima líquidos puede realizarse de manera convencional. Para esto, la solución de enzima se bombea al atomizador en la torre de aspersión. La pulverización se efectúa por ejemplo mediante una boquilla de presión (boquilla para una sustancia), una boquilla de dos sustancias o un atomizador de centrifuga. El secamiento de las gotas se efectúa mediante una corriente de aire caliente conducida al secador por atomización. Al usar atomizadores de centrifuga el secamiento se efectúa preferiblemente a contracorriente. En las boquillas el secamiento también puede efectuarse en contra corriente o en corriente pulsatoria. El polvo puede descargarse de la torre o puede introducirse con la corriente de aire y se separa en un ciclón y/o filtro. Según el producto y el procedimiento puede ser necesario un post-secamiento que puede efectuarse en un lecho fluidificado interno, que rebordea el secador por atomización o en un lecho fluidificado externo.

50 A continuación de esto, el producto secado por atomización puede aglomerarse en un lecho fluidificado. Para esto se pone material en forma de polvo en un secador de lecho fluidificado, por ejemplo polvo de enzima obtenido mediante el secamiento por atomización de arriba. El remolino se efectúa, por ejemplo, alimentando aire precalentado. Se asperge a la capa fluidificada, por ejemplo, una solución que contiene enzima o una solución de aglutinante, por lo cual se humedece el polvo colocado con esta solución y se aglomera de manera creciente por sus

propiedades adhesivas. La atomización a la capa fluidizada puede efectuarse desde arriba (método de topspray) o desde abajo (método de bottomspray). Simultáneamente, desde el lecho fluidificado se descarga una cantidad parcial de aglomerado de manera simultánea o semi-discontinua, es decir de manera temporizada a intervalos. La descarga se clasifica con ayuda, por ejemplo, de un tamiz. El material grueso producido puede molerse y recircularse continuamente al lecho fluidificado. Las fracciones finas tales como, por ejemplo, del equipo de filtro de escape, también pueden recircularse de manera continua.

De acuerdo con otra variante del método, la preparación del aglomerado de enzima según la invención puede efectuarse de manera continua y más precisamente introduciendo continuamente al secador de lecho fluidificado una carga seca en forma de polvo como, por ejemplo, un polvo seco de enzima. Para esto son particularmente adecuados secadores de lecho fluidificado con varias zonas de atomización y, opcionalmente, de secamiento. En la primera zona se carga polvo seco de enzima, se crea el remolino y se asperge la solución de enzima y/o el aglutinante. El aglomerado formado en esta zona se transfiere a la siguiente zona. En esta, y opcionalmente en otra zona o en varias más, la solución de enzima y/o de aglutinante de igual o distinta composición también puede aspergerse. Por una corriente de aire alimentado común para todas las zonas, o por corrientes separadas de aire alimentado, las cuales se calientan de manera correspondiente, se retira el agua de la solución atomizada de enzima o de aglutinante. En una o varias de las últimas zonas aún es posible efectuar un post-secamiento. Aquí también se encuentra la descarga de producto. El procesamiento del producto se efectúa como se describió arriba.

Otra variante de método preferida comprende un secamiento por aspersión de la solución de enzima acoplado con la aglomeración que va a continuación del polvo de enzima secado por atomización. Esta puede realizarse de manera discontinua o continua. Se prefiere el procedimiento continuo.

Métodos de este tipo pueden realizarse usando equipos convencionales de secado por atomización. Pero la realización se efectúa de manera ventajosa en dispositivos que se conocen como FSD (Fluidized Spray Dryer), SBD (Spray Bed Dryer) o MSD (Multi Stage Dryer).

En este caso, la fracción fina resultante del polvo puede reincorporarse al proceso ya en el secador por atomización si esta se recircula a la zona húmeda del secador después de la segregación en un ciclón o filtro. La propia aglomeración tiene lugar entonces en otra etapa en un lecho fluidificado. Esta etapa puede integrarse al secador por atomización (lecho fluidificado interno) o puede realizarse en un aparato separado (lecho fluidificado adicional). Si se requiere para apoyar la aglomeración, al lecho fluidificado puede inyectarse más solución de enzima, una solución de enzima que contiene además aglutinante, o solo aglutinante en forma disuelta o dispersada, con secamiento simultáneo. Ejemplos de aglutinantes adecuados para la aglomeración son hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, polietilenglicoles y polímeros de bloques de polioxietileno y polioxipropileno. Pero preferiblemente los parámetros del método se ajustan de tal manera que no se requiere más dosificación adicional para la preparación de aglomerado. La composición y cantidad de los líquidos inyectados dependen de las propiedades de la solución atomizada, del tamaño de aglomerado a lograr y de las condiciones de proceso. Según la cantidad atomizada puede requerirse un post-secamiento en otra etapa. El procesamiento del producto se efectúa entonces de la manera descrita arriba.

En el caso de una alta inestabilidad en la temperatura de la enzima secada por aspersión, la regulación de la temperatura del producto es de particular importancia durante el método de la invención. Esta debe seleccionarse lo más baja posible puesto que con una temperatura creciente y/o una duración creciente del método de secamiento por aspersión y de aglomeración se incrementan las pérdidas de actividad. De manera típica, la temperatura del producto durante el secamiento por atomización, es decir la temperatura del polvo sólido, secado por atomización, se encuentra en aproximadamente 40 hasta 75 °C, en particular a menos de aproximadamente 70 °C, con frecuencia menos de 60 °C. Cuanto más largo sea el tiempo de residencia en el lecho fluidificado, tanto menos debe seleccionarse la temperatura.

La temperatura de producto durante la aglomeración y el secamiento en la capa de fluidificación, es decir la temperatura del aglomerado que se encuentra en el lecho fluidificado, debe seleccionarse a nivel bajo debido al tiempo más largo de residencia en el dispositivo, y se encuentra en valores de aproximadamente 30 a 70 °C, en particular menos de 60 °C y preferiblemente a menos de 50 °C.

Para seguir disminuyendo el contenido residual de humedad puede requerirse la realización de un paso de post-secamiento. Durante el post-secamiento la temperatura de producto debe encontrarse en el intervalo arriba nombrado y en particular a 50°C o menos. Mediante el post-tratamiento el contenido residual de humedad en los preparados de la invención se reducen a valores de menos de aproximadamente 20 % en peso, preferiblemente de aproximadamente 5 hasta 17 % en peso.

El secamiento durante la aglomeración o el post-secamiento se logra usando alimentación de aire precalentado. La temperatura de aire alimentado, que puede ser diferente según la temperatura de producto seleccionada de referencia, se encuentra en general en un intervalo entre 30 y 180 °C. El post-secamiento se efectúa a temperatura más baja, más precisamente en el intervalo de aproximadamente 35 hasta 55 °C.

- 5 La duración de la aglomeración también depende del tamaño del lote seleccionado, pero se encuentra aproximadamente en el intervalo de 30 minutos hasta varias horas.

f2) Preparación de la formulación enzimática

- 10 Usando técnicas de mezclado conocidas de por sí se mezcla el pre-producto secado por atomización, opcionalmente aglomerado (composición enzimática secada) con el material de vehículo arriba descrito. Para este propósito, por ejemplo, se adiciona en porciones el preparado de enzima al vehículo y se mezcla, si se requiere por un tiempo de, por ejemplo, 1 hasta 5 minutos, hasta lograr una distribución homogénea. Entonces se adiciona el líquido hidrofóbico. Este puede atomizarse, añadirse a gotas o verterse a la mezcla o sobre la mezcla durante el proceso de mezclado. Después de finalizar la adición, el proceso de mezclado continúa durante, por ejemplo, 5 a 45 minutos, hasta que el aceite se distribuya de manera homogénea. El producto resultante en este caso posee una porción de polvo muy pequeña. Habitualmente no se requieren otros pasos de tratamiento.

Para el proceso de mezcla son adecuados diferentes tipos de mezclador, como por ejemplo mezcladores de cono-tornillo (por ejemplo de la empresa Nauter), mezcladores de reja de arado (por ejemplo de la empresa Lödige), mezcladores de dos ejes. Los tiempos de mezcla dependen del tipo seleccionado de mezclador y pueden ser diferentes.

- 20 g) Composiciones de productos alimenticios y alimentos para animales

Las formulaciones enzimáticas preparadas de acuerdo con la invención son adecuadas, en particular, para adicionar a los productos alimenticios y alimentos para animales.

- 25 Particularmente son adecuadas las formulaciones como aditivos para alimentos para animales en mezcla con alimentos aislados para animales de procedencia vegetal o animal según la FMV (Reglamento Alemán para alimentación animal), como, por ejemplo, productos secundarios de cereal, harina de forraje de trigo, salvado de trigo; moltura de extracción, orujos, migas de melaza, harina de pescado, harinas de carne y huesos; y/o productos minerales aislados para alimentar animales según FMV, como por ejemplo carbonatos, fosfatos, sulfatos, propionatos. También son adecuados los cereales como trigo, centeno, cebada, avena, maíz, mijo o triticale; productos secundarios de cereal (subproductos de la molienda), como salvados, sémolas, sémola de trigo, harinas de forraje o harinillas; subproductos de la obtención de aceite (harinas de extracción, expeller, tortas); subproductos de la obtención de azúcar (melaza, migas secas, azúcar de forraje, pulpas, almidones de azúcar, gluten de maíz, gluten de trigo); subproductos de la industria de fermentación, residuos de cervecería, levaduras, gérmenes de malta, heces de destilería; forrajes animales y otros alimentos para animales, como harina de sangre, harina de pescado, jugo de prensado, proteína de patata.

- 35 Parte experimental

Ejemplo de preparación V1: Formulación de xilanasa

- a) En un concentrado acuoso de xilanasa con un contenido de masa seca de aproximadamente 20 hasta 35 % en peso, un valor de pH en el intervalo de 3,5-5,0 y una actividad de 60 000 hasta 100 000 TXU/g se disolvió a 4-10 °C 10 - 20 % en peso de sulfato de magnesio heptahidrato, respecto del concentrado.
- 40 b) Para el secamiento por atomización y la aglomeración se aspergió la composición enzimática preparada en el punto a) en un lecho fluidificado de laboratorio Aeromat Tipo MP-1 de la empresa Niro-Aeromatic a través de una boquilla de sustancia 2, según el método Top-Spray. El cono de plástico del lecho fluidificado tiene un diámetro de placa distribuidora de 110 mm y una placa perforada con 12 % de área libre. El lecho fluidificado se carga con una cantidad de aire de 50 m³/h y temperaturas de aire alimentado de 40 hasta 100°C. La temperatura de aire alimentado se reguló de tal manera que el producto en el lecho fluidificado mantuvo una temperatura de cerca de 45 °C. La duración fue de 240 minutos. A continuación el producto se enfrió arremolinándose a 50 m³/h de aire alimentado a 30 °C.

c) La composición enzimática obtenida en el punto b) se tamizó. El material fino y el material grueso se tamizaron de tal modo que una fracción útil fue obtenida con una distribución de tamaño de partícula de 100 µm hasta 400 µm. Se obtuvo un producto con los siguientes datos característicos:

Composición:

Xilanasa (masa seca)	65 % en peso
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	20 % en peso
Humedad residual	15 % en peso
Actividad	de 200 000 hasta 300 000 TXU/g
Apariencia (Microscopio)	Aglomerados compuestos de varias partículas primarias
Diámetro promedio de partícula	171 µm

5

d) Para producir la formulación enzimática se cargó salvado sémola de trigo (675,5 g) en un mezclador de laboratorio (empresa Lödige) y se homogenizó a temperatura ambiente y 170 revoluciones por minuto. En estas condiciones se pusieron 21 g de la composición enzimática preparada en el punto c) en la mezcladora y se mezcló por 5 minutos.

10 Después se agregaron lentamente a gotas 3,5 g de aceite de soya mediante una pipeta y después se siguió mezclando por 30 minutos. Se obtuvo un producto con los siguientes datos característicos:

Composición:

Salvado de sémola de trigo (masa seca)	90 % en peso
Composición enzimática (de c))	3 % en peso
Aceite de soya	0,5 % en peso
Humedad residual	6,5 % en peso
Actividad	de 5 000 hasta 7 000 TXU/g
Diámetro promedio de partícula:	337 µm

Ejemplo de preparación V2: Formulación de Glucanasa

15 a) En un concentrado acuoso de β-glucanasa con un contenido de masa seca de aproximadamente 20 hasta 35 % en peso, un valor de pH en el intervalo de 3,5-5,0 y una actividad de 150 000 hasta 400 000 TGU/g se disolvieron a 4-10 °C 10 hasta 20 % en peso de sulfato de magnesio-heptahidrato, respecto del concentrado.

20 b) Para el secamiento por atomización y aglomeración se aspergió la composición enzimática preparada en el punto a) en un lecho fluidificado de laboratorio Aeromat Tipo MP-1 de la empresa Niro-Aeromatic a través de una boquilla de fluido 2 de acuerdo con el método Top-Spray. El cono plástico del lecho fluidificado tiene un diámetro de placa distribuidora de 110 mm y una placa perforada con 12 % de área libre. El lecho fluidificado se cargó con una cantidad de aire de 50 m³/h y temperaturas de aire alimentado de 40 hasta 100 °C. La temperatura de aire alimentado se reguló de tal modo que el producto en la capa de remolino mantuvo una temperatura de cerca de

45°C. La duración de atomización fue de 240 min. A continuación se enfrió el producto bajo el remolino a 50 m³/h de aire alimentado a 30 °C.

- 5 c) La composición enzimática obtenida en el punto b) se tamizó. El material fino y el grueso se tamizaron de tal modo que se obtuvo una fracción útil con una distribución de tamaños de partícula de 100 µm hasta 400 µm. Se obtuvo un producto con los siguientes datos característicos:

Composición:

Glucanasa (Masa seca)	65 % en peso
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	20 % en peso
Humedad residual	15 % en peso
Actividad	de 500 000 hasta 120 000 TGU/g
Apariencia (Microscopio)	Aglomerado compuesto de varias partículas primarias
Diámetro promedio de partícula	167 µm

- 10 d) Para la preparación de la formulación enzimática se puso salvado de sémola de trigo (693 g) en un mezclador de laboratorio (empresa Lödige) y se homogenizó a temperatura ambiente y 170 revoluciones por minuto. En estas condiciones se pusieron 3,5 g de la composición enzimática preparada en el punto c) en el mezclador y se mezcló por 5 min. Después mediante una pipeta se adicionaron lentamente a gotas 3,5 de g aceite de soya y después se siguió mezclando por 30 minutos. Se obtuvo un producto con los siguientes datos característicos:

Composición:

Salvado de sémola de trigo (masa seca)	92,5 % en peso
Composición enzimática (de c))	0,5 % en peso
Aceite de soya	0,5 % en peso
Humedad residual	6,5 % en peso
Actividad	de 1 000 hasta 7 000 TGU/g
Diámetro promedio de partícula	321 µm

15 **Ejemplo de preparación V3: Formulación de xilanasa/glucanasa**

- Para la preparación de una formulación enzimática se puso salvado de sémola de trigo (672 g) en una mezcladora de laboratorio (de la empresa Lödige) y se homogenizó a temperatura ambiente y 170 revoluciones por minuto. En estas condiciones se pusieron 21 g de la composición enzimática preparada en el ejemplo de preparación V1 c) y 3,5 g de la composición enzimática preparada en el ejemplo de preparación V2 c) en la mezcladora y se mezcló por 5 minutos. Después se adicionaron lentamente a gotas 3,5 g de aceite de soya mediante una pipeta y a continuación se siguió mezclando por 30 minutos. Se obtuvo un producto con los siguientes datos característicos:

Composición:

Salvado de sémola de trigo (masa seca)	89,5 % en peso
--	----------------

Composición enzimática (de V1 c))	3 % en peso
Composición enzimática (de V2 c))	0,5 % en peso
Aceite de soya	0,5 % en peso
Humedad residual	6,5 % en peso
Actividad de xilanasa	de 5 000 hasta 7 000 TXU/g
Actividad de glucanasa	de 1 000 hasta 7 000 TGU/g
Diámetro promedio de partícula	328 µm

Ejemplo de preparación V4: Formulación de xilanasa/glucanasa

5 a) Un concentrado acuoso de β -glucanasa con un contenido de masa seca de aproximadamente 20 hasta 35 % en peso, un valor de pH en el intervalo de 3,5-5,0 y una actividad de 150 000 hasta 400 000 TGU/g fue mezclada con un concentrado acuoso de xilanasa con un contenido de masa seca de aproximadamente 20 hasta 35 % en peso, un valor de pH en el intervalo de 3,5 hasta 5,0 y una actividad de 60 000 hasta 100 000 TXU/g en proporción 1:8. En la mezcla se disolvió a 4-10 °C 10 hasta 30 % en peso de sulfato de magnesio-heptahidrato, respecto del concentrado.

10 Después se siguió procesando el concentrado de enzima obtenido en el punto a) como en el ejemplo de preparación V1 en los pasos b) hasta d).

Se obtuvo un producto con los siguientes datos característicos:

Composición:

Salvado de sémola de trigo (Masa seca)	90 % en peso
Composición enzimática (de c))	3 % en peso
Aceite de soya	0,5 % en peso
Humedad residual	6,5 % en peso
Actividad de xilanasa	de 5 000 hasta 7 000 TXU/g
Actividad de glucanasa	de 1 000 hasta 7 000 TGU/g
Diámetro promedio de partícula	343 µm

Ejemplo de ensayo 1: Determinación del valor de polvo

15 El valor de polvo (% respecto de la cantidad total del producto) de mezclas de la invención se determina con y sin adición de aceite.

20 La determinación se efectúa según el siguiente método: cada tres muestras de a $10 \pm 0,03$ g del sólido a estudiar se vierten lentamente (de 2 a 3 segundos) por un tubo de caída (longitud = 60 cm; diámetro = 3 cm) en un recipiente (20,2 cm de altura, 19,5 cm de ancho, 19,5 cm de longitud; una manguera de succión se encuentra en una pared lateral a una altura de cerca de 13 cm y está montada en un ángulo recto (90°) hacia el tubo de caída. Con la ayuda de una bomba de aceite conectada por el tubo de succión al contenedor, el polvo resultante se succiona afuera del contenedor y se recoge en un filtro a velocidad constante ($15 \pm 0,5$ l/min) durante 1 minuto. Para esto se usa un filtro

de vidrio para vacío (filtro nutsche) (diámetro 35 mm, D2, 50ml) provisto con un filtro adecuado (por ejemplo prefiltro de fibra de vidrio Sartorius, 13 400-37-S; diámetro 35 mm). La cantidad de polvo retirada por succión se determina con ayuda de una balanza analítica relacionada con la cantidad de muestra utilizada y expresada como un promedio porcentual. Según los valores porcentuales de polvo determinados la conducta de polvo de las muestras se describe tal como sigue a continuación:

5

Valor de polvo [%]	Descripción
0 - 0,05	casi desprovista de polvo
0,05 - 0,25	formando polvo débilmente
0,25 - 1,00	formando polvo
> 1,00	formando polvo de manera fuerte

Materiales usados:

Polvo de xilanasa (XEA): actividad: 229300 TXU/g; diámetro promedio de partícula = 171; (20 % en peso de sulfato de magnesio-heptahidrato); secado de manera análoga al ejemplo de preparación V1

10 Salvado de sémola de trigo (WGK) (Hildebrandmühlen); diámetro promedio de partícula = 370 aceite de soya

Mezclado de las muestras:

El WGK se carga en la mezcladora Lödige, a éste se adiciona el polvo SD y se hace una premezcla a temperatura ambiente por 5 minutos a 170 rpm. El aceite de soya se calienta a cerca de 80°C, se adiciona a gotas lentamente con una pipeta y se sigue mezclando por 30 minutos. Se preparan 1000 g de mezcla en cada caso. Los valores determinados para diferentes mezclas así como para XEA puro y WGK puro se recopilan en la siguiente tabla:

15

Muestra E5/051	Salvado de sémola de trigo (g)	Polvo SD (g)	Aceite de soya (g)	Actividad teórica (TXU/g)	Valor de polvo (%)	Notas	Aceite de soya (%)
Lote 1	967,3	32,7	0,0	7500	0,081	Formación débil de polvo	0,0
Lote 2	962,3	32,7	5,0	7500	0,025	Casi desprovisto de polvo	0,5
Lote 3	957,3	32,7	10,0	7500	0,015	Casi desprovisto de polvo	1,0
WGK	pur	-	0,0	0	0,120	Formación débil de polvo	0,0
XEA	-	pur	0,0	229300	0,049	Casi desprovisto de polvo	0,0

Se observa una disminución sorprendentemente significativa de la propensión a formar polvo de las mezclas que contienen aceite según la invención.

Adicionalmente, después de la verificación visual y también de la investigación por microscopio de luz de los lotes estudiados no pudieron establecerse diferencias en la conducta de segregación (no se muestran los resultados).

Ejemplo de ensayo 2: determinación de la capacidad de flujo

5 La determinación de la capacidad de flujo de las formulaciones enzimáticas según la invención se efectúa según métodos conocidos. En el estado de la técnica se describen distintos métodos que son adecuados teóricamente (compárese Schmitt et al., Part. Part. Syst. Charact. 21 (2004) 403-410).

De acuerdo con la invención, la determinación se efectúa con ayuda del probador de corte de anillo de Schulze RST.01-pc. El ensayo se efectuó según el método ASTM D6773 (Schulze Ring Shear Tester 2002).

Se usaron los siguientes parámetros de prueba:

10 Tiempo de almacenamiento de la muestra en la celda de medición: 0 h

Temperatura: 22 °C

Humedad relativa de aire: 70 %

Tensión de endurecimiento (sobrecarga): $\sigma_1 = 11,18$ kPa

15 Según el método ASTM D6773 pudo lograrse una capacidad de flujo de $ff_c = 8,8$. De esta forma el producto tiene buena capacidad de fluir.

REIVINDICACIONES

1. Formulación enzimática sólida para ser incorporada en alimento para animales, productos alimenticios o complementos alimenticios, la cual comprende una mezcla de
- 5 a) al menos una composición enzimática en forma de partículas de al menos una enzima y al menos una sal orgánica o inorgánica de un catión mono- o bivalente con
- b) al menos un vehículo orgánico o inorgánico en forma de partículas
- y
- c) al menos un líquido hidrofóbico;
- 10 donde la proporción entre el diámetro promedio de partícula del vehículo y la composición enzimática se encuentra en el intervalo de 0,125 hasta 8 y donde la proporción de mezcla entre la composición enzimática y el vehículo se encuentra en el intervalo de 1:1000 hasta 1:5 partes en peso.
2. Formulación enzimática según la reivindicación 1, que comprende una composición enzimática en forma de partículas, que contiene una enzima en mezcla con al menos una sal orgánica o inorgánica de un catión mono- o bivalente.
- 15 3. Formulación enzimática según la reivindicación 1, que comprende una composición enzimática en forma de partículas, que contiene al menos dos enzimas distintas una de otra en mezcla con al menos una sal orgánica o inorgánica de un catión mono- o bivalente.
4. Formulación enzimática según la reivindicación 1, que comprende al menos dos composiciones enzimáticas distintas entre sí, en forma de partículas, y ambas composiciones **se caracterizan porque**, contienen al menos una enzima distinta, en cuyo caso las enzimas están presentes en cada composición en mezcla con al menos una sal orgánica o inorgánica de un catión mono- o bivalente.
- 20 5. Formulación enzimática según una de las reivindicaciones 2 a 4, donde los tamaños promedio de partícula de la composición enzimática y del vehículo se encuentran independientemente uno de otro respectivamente en el intervalo de 50 hasta 500 μm .
- 25 6. Formulación enzimática según una de las reivindicaciones precedentes, donde la porción del líquido hidrofóbico es de 0,1 hasta 5 % en peso, respecto del peso total de la formulación enzimática.
7. Formulación enzimática según una de las reivindicaciones precedentes, donde la porción de sal en la composición enzimática se encuentra en el intervalo de 1 hasta 30 % en peso, respecto del peso total de la composición enzimática.
- 30 8. Formulación enzimática según una de las reivindicaciones precedentes, donde la(s) enzima(s) se selecciona(n) entre xilanasas, glucanasas, celulasas, proteasas, queratinasas, amilasas y mezclas de las mismas.
9. Formulación enzimática según una de las reivindicaciones precedentes, donde la formulación comprende una mezcla de
- 35 a) al menos una composición enzimática cuyo componente de enzima se selecciona entre xilanasas, glucanasas y mezclas de las mismas, en mezcla con sulfato de magnesio, donde la porción de sulfato de magnesio es de aproximadamente 5 hasta 25 % en peso, respecto del peso total de la composición enzimática seca;
- b) al menos un vehículo de salvado de sémola de trigo, en cuyo caso la proporción de mezcla entre la composición enzimática y el vehículo se encuentra en el intervalo de 1 : 5 hasta 1 : 500; y
- c) aceite vegetal en una porción de 0,1 hasta 1 % en peso, respecto del peso final de la formulación enzimática,
- 40 en cuyo caso el tamaño promedio de partícula de la composición enzimática y el vehículo se encuentra en el intervalo de aproximadamente 150 hasta 500 μm , y la porción de xilanasas se encuentra en 3.000 - 30.000 TXU/g de formulación y la porción de glucanasa se encuentra en 2.000 hasta 20.000 TGU/g de formulación.

10. Formulaci3n enzimática segun la reivindicaci3n 9, que comprende una composici3n enzimática cuyo componente de enzima es una xilanasas, una glucanasas, o una mezcla de xilanasas y glucanasas; o que comprende dos composiciones enzimáticas de dos enzimas diferentes, en cuyo caso uno de los componentes de enzima es una glucanasas y el otro es una xilanasas.
- 5 11. Método para la preparaci3n de una formulaci3n enzimática s3lida segun una de las reivindicaciones precedentes, donde al menos una composici3n enzimática en forma de partículas, que comprende al menos una enzima y al menos una sal orgánica o inorgánica de un cati3n mono- o bivalente se mezcla con al menos un vehiculo inorgánico u orgánico en forma de partículas y se humedece la mezcla con un líquido hidrofóbico.
- 10 12. Método segun la reivindicaci3n 11, donde se suministra una composici3n enzimática en forma de partículas, que contiene una enzima en mezcla con al menos una sal orgánica o inorgánica de un cati3n mono- o bivalente.
13. Método segun la reivindicaci3n 11, donde se suministra una composici3n enzimática en forma de partículas, que contiene al menos dos enzimas diferentes entre sí en mezcla con al menos una sal orgánica o inorgánica de un cati3n mono- o bivalente.
- 15 14. Método segun la reivindicaci3n 11, donde se suministra al menos dos composiciones enzimáticas diferentes entre sí, en forma de partículas, y ambas composiciones **se caracterizan porque**, contienen al menos una enzima diferente, en cuyo caso la enzima se encuentra presente en cada composici3n en mezcla con al menos una sal orgánica o inorgánica de un cati3n mono- o bivalente.
- 20 15. Método segun una de las reivindicaciones 11, 12 o 13, donde la composici3n enzimática se obtiene mediante secamiento por atomizaci3n o mediante secamiento por atomizaci3n y aglomeraci3n de un líquido que contiene enzima, en el cual se alberga al menos una sal orgánica o inorgánica de un cati3n mono- o bivalente.
- 25 16. Método segun la reivindicaci3n 11 o 14, donde se obtienen al menos dos composiciones enzimáticas de enzimas diferentes entre sí mediante secamiento por atomizaci3n o mediante secamiento por atomizaci3n y aglomeraci3n de al menos dos líquidos diferentes que contiene enzima, en los cuales se alberga al menos una sal orgánica o inorgánica de un cati3n mono- o bivalente, y en cuyo caso
- a) se mezcla cada una de las al menos dos composiciones enzimáticas con un vehiculo inorgánico u orgánico en forma de partículas;
- o
- b) se mezcla un vehiculo inorgánico u orgánico en forma de partículas con las al menos dos composiciones enzimáticas; y
- 30 la mezcla resultante segun la variante a) o la variante b) se humedece con un líquido hidrofóbico.
17. Método para la preparaci3n de una formulaci3n enzimática s3lida, que comprende al menos una enzima seleccionada entre xilanasas, glucanasas y mezclas de las mismas, en cuyo caso
- a) se seca mediante atomizaci3n, o se seca mediante atomizaci3n y se aglomera, al menos un líquido que contiene enzima para producir al menos una composici3n enzimática, en cuyo caso su componente de enzima se selecciona entre xilanasas, glucanasas y mezclas de las mismas, y este componente de enzima está contenido en el líquido en mezcla con sulfato de magnesio y donde la porci3n de sulfato de magnesio es de 5 hasta 25 % en peso respecto del peso total de la composici3n enzimática seca;
- 35 b) la composici3n enzimática obtenida de esta forma se mezcla con un vehiculo inorgánico u orgánico en forma de partículas; y
- 40 c) la mezcla de enzima/vehiculo se humedece con un líquido hidrofóbico.
18. Método segun la reivindicaci3n 17, donde se suministra
- a) una composici3n enzimática en forma de partículas, que contiene al menos una xilanasas en mezcla con sulfato de magnesio; o

b) una composición enzimática en forma de partículas, que contiene al menos una glucanasa en mezcla con sulfato de magnesio; o

c) una composición enzimática en forma de partículas, que contiene al menos una xilanasa y al menos una glucanasa en mezcla con sulfato de magnesio; o

5 d) al menos dos composiciones enzimáticas diferentes entre sí, en forma de partículas, donde una de las composiciones contiene al menos una xilanasa y otra de las composiciones contiene al menos una glucanasa, en cuyo caso las enzimas se encuentran presentes en cada composición en mezcla con sulfato de magnesio.

10 **19.** Método según la reivindicación 17 o 18, donde se mezclan una o dos composiciones enzimáticas distintas con al menos un vehículo de salvado de sémola de trigo, en cuyo caso la proporción de mezcla entre la composición enzimática y el vehículo se encuentra en el intervalo de 1 : 5 hasta 1 : 1000.

20. Uso de una formulación enzimática seca según una de las reivindicaciones 1 a 10, para la preparación de un producto alimenticio, un complemento alimenticio o un alimento para animales.

15 **21.** Método para la preparación de alimento para animales, producto alimenticio o complemento alimenticio que contiene una formulación enzimática seca según una de las reivindicaciones 1 hasta 10, que comprende la preparación de una tal formulación enzimática seca con ayuda de un método según una de las reivindicaciones 11 a 19, y su incorporación a continuación en alimentos para animales, productos alimenticios o complementos alimenticios.