

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 865**

51 Int. Cl.:

A23K 1/165 (2006.01)

C12N 9/96 (2006.01)

C12N 9/98 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06826039 .7**

96 Fecha de presentación: **12.10.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1940241**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.07.2008**

54 Título: **Gránulos duraderos y estables con agentes activos**

30 Prioridad:

12.10.2005 US 726494 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

14.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

14.12.2012

73 Titular/es:

**DANISCO US INC. (100.0%)
925 Page Mill Road
Palo Alto, CA 94304-1013, US**

72 Inventor/es:

**BECKER, NATHANIEL, T.;
CLARKSON, KATHLEEN, A.;
DALE, DOUGLAS;
FRYKSDALE, BETH;
GERBERT, MARK, S.;
PARTSUF, MICHAEL y
GRAVESEN, TROELS**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 392 865 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).

DESCRIPCION

Gránulos duraderos y estables con agentes activos

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a gránulos duraderos y estables con agentes activos. Específicamente, la invención se refiere a gránulos duraderos y termoestables con agentes activos, siendo los gránulos particularmente adecuados para su inclusión en procedimientos de tratamiento con vapor, incluyendo procedimientos de preparación de pastillas y preparación de comprimidos y el procesamiento con vapor de piensos, sin una pérdida apreciable de actividad del agente activo. Los gránulos duraderos y estables tienen perfiles de disolución adecuados para liberar el agente activo para proporcionar eficacia para su fin pretendido. La actividad de los agentes activos se conserva tras el almacenamiento en mezclas no preparadas como pastilla y el tratamiento con vapor.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Es común el uso de agentes activos, tales como enzimas, en piensos. Se conoce que las enzimas mejoran la digeribilidad de los piensos, reducen los factores antinutricionales en los piensos y mejoran la productividad animal. Se conoce en la industria que los ingredientes de piensos ácidos y básicos así como ingredientes particulares de piensos, incluyendo, pero sin limitarse a oligoelementos, ácidos o bases orgánicos o inorgánicos, azúcares reductores y sustancias higroscópicas, particularmente cloruro de colina y cloruro de sodio, tienen un efecto adverso sobre agentes activos tales como otras vitaminas, proteínas, agentes antimicrobianos, prebióticos, probióticos y enzimas; y, también se conoce que algunos procedimientos de producción de piensos son perjudiciales para los agentes activos.

Existe un problema en la industria para proporcionar formulaciones protectoras para hacer que los agentes activos sean adecuados para su almacenamiento en mezclas de pienso no preparados como pastilla, tales como mezclas y premezclas base, que pueden ser ácidas o básicas y contener los ingredientes que tienen un efecto adverso sobre la estabilidad de los agentes activos. Se dice que un mecanismo para el efecto adverso son las reacciones de oxidación-reducción (redox) que se producen entre compuestos oxidantes y reductores en las premezclas en presencia de agua. Un estudio notificado en BASF Technical Bulletin NU0013 notifica que dos enzimas comercialmente disponibles que contienen gránulos conservaron, respectivamente, el 86% y el 81% de actividad tras el almacenamiento durante 3 semanas en una premezcla de pienso, y el 55% y el 33% de actividad, respectivamente, tras el almacenamiento en la premezcla de pienso durante 6 semanas. Actualmente algunos fabricantes de enzimas para la industria de los piensos recomiendan que las enzimas se protejan con envasado de barrera si van a almacenarse en premezclas, o que se almacenen por separado de las premezclas, o que se almacenen en premezclas durante sólo un corto periodo de tiempo.

Adicionalmente, muchos agentes activos usados en alimentos y piensos son termolábiles. La estabilidad térmica de las enzimas y su capacidad para sobrevivir etapas de procesamiento con calor en la fabricación de piensos es un problema en la industria, particularmente en la producción de pastillas de pienso. En comparación con mezclas de piensos secos, las pastillas de pienso tienen propiedades que se ven favorecidas por la industria, tales como calidad de pienso mejorada, patógenos reducidos, niveles inferiores de polvo durante la fabricación, buena manipulación y dosificación de ingredientes más uniforme. Los procedimientos de preparación de pastillas industriales preferidos utilizan inyección de vapor, en un procedimiento conocido como acondicionamiento, que añade humedad y eleva la temperatura antes de la etapa de preparación de pastillas, que luego fuerza los ingredientes de pienso calentados por vapor, o masa acondicionada, a través de un troquel. Las temperaturas de procedimiento de preparación de pastillas pueden ser de desde aproximadamente 70°C hasta 95°C, o superiores.

En los documentos WO 92/12645, DE 19929257, US 2003/0054511 y WO 2006/034710 se dan a conocer pastillas de pienso que contienen enzimas.

Las enzimas son ingredientes de pienso importantes y deben poder resistir las temperaturas de procesamiento cada vez mayores usadas en procedimientos de preparación de pastillas, particularmente aquellos procedimientos que emplean ensanchadores, mientras se continúa ofreciendo una eficacia *in vivo*.

Debido al vapor, a las temperaturas y a las fuerzas de compresión usadas en procedimientos de preparación de pastillas, la estabilidad de las enzimas y otros agentes activos es un problema que se ilustra por el hecho de que las enzimas de piensos se proporcionan a menudo a la industria como productos líquidos estabilizados que se añaden a pastillas de pienso tras el procedimiento de preparación de pastillas para evitar la inactivación de las enzimas. La dosificación homogénea es un problema cuando la enzima se aplica tras la preparación de pastillas, por ejemplo, pulverizando la enzima sobre las pastillas, y el coste del equipo para añadir enzima tras la preparación de pastillas es elevado. Alternativamente, se añaden formulaciones de enzima líquidas, o formulaciones de enzima en mezcla seca a la mezcladora antes de la preparación de pastillas. En determinados casos, pueden añadirse niveles superiores de enzimas que los necesarios con el fin de compensar las pérdidas durante la preparación de pastillas.

Los procedimientos de formación de comprimidos también utilizan fuerzas de compresión y pueden emplear o no calor. Los comprimidos se usan en las industrias del cuidado del hogar, por ejemplo, en aplicaciones de lavandería, lavado de vajillas y limpieza de superficies.

5 Existe la necesidad en las industrias de los alimentos, de los piensos y del cuidado del hogar de gránulos duraderos y estables con componentes activos que sirvan como componentes en formulaciones que se someten a tratamiento con vapor, por ejemplo, procedimientos de preparación de pastillas y preparación de comprimidos, sin una pérdida apreciable de actividad del agente activo y con perfiles de disolución adecuados para liberar los componentes activos para proporcionar una eficacia para su fin pretendido. También existe la necesidad de gránulos duraderos y estables con agentes activos que conserven su actividad cuando se usen como ingredientes en formulaciones de pienso, tales como mezclas no preparadas como pastilla, que contienen ingredientes que afectan de manera adversa a los agentes activos.

SUMARIO DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere a un gránulo para composiciones de pienso que está constituido por:
 un núcleo que está constituido por sulfato de sodio (40,0%);
 un recubrimiento que contiene agente activo aplicado sobre el núcleo, estando constituido dicho recubrimiento por enzima (5,0%), PVA (1,0%) y almidón de maíz (5,0%);
 15 un recubrimiento de hidratación y humedad aplicado sobre el recubrimiento de agente activo, estando constituido dicho recubrimiento por sulfato de sodio (40,0%); y
 un recubrimiento de barrera frente a la humedad aplicado sobre el recubrimiento, estando constituido dicho recubrimiento por PVA (3,0%) y talco (6,0%);
 refiriéndose los porcentajes anteriores a los porcentajes en peso de los componentes respectivos con respecto al peso de todo el gránulo,
 20 teniendo el gránulo una actividad de agua inferior a 0,5.

En otra realización de la presente invención, se proporciona un procedimiento para elaborar el gránulo mencionado anteriormente, comprendiendo el procedimiento: proporcionar un material de núcleo y enzima, estando la enzima dispuesta en capas sobre el material de núcleo; aplicar al material de núcleo y enzima un material de hidratación y humedad para formar una capa; recubrir la capa con un material de barrera frente a la humedad para formar un recubrimiento, siendo la aplicación y el recubrimiento en condiciones seleccionadas de modo que la actividad de agua del gránulo estable sea inferior a 0,5.

Los gránulos duraderos y estables de la presente invención son particularmente adecuados como ingredientes en pastillas de pienso.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30 La presente invención proporciona gránulos duraderos y estables con agentes activos que resisten tanto temperaturas altas como fuerzas de compresión altas cuando se añaden a formulaciones sometidas a, por ejemplo, pretratamientos con vapor calentado, procedimientos de preparación de pastillas de pienso y procedimientos de preparación de comprimidos, mientras mantienen perfiles de disolución adecuados para liberar agentes activos que pueden proporcionar una eficacia para su fin pretendido.

35 La presente invención proporciona sorprendentemente gránulos duraderos y estables con agentes activos de pienso que resisten pretratamientos con vapor y temperaturas y fuerzas de compresión de procedimientos de calentamiento con vapor de preparación de pastillas de pienso mientras mantienen perfiles de disolución que liberan los agentes activos de pienso para proporcionar la eficacia pretendida. Los componentes del gránulo están aprobados preferiblemente para su uso en piensos.

40 Los gránulos resisten el pretratamiento de piensos calentados con vapor y las temperaturas y fuerzas de compresión de procedimientos de preparación de pastillas mientras mantienen perfiles de disolución que liberan la enzima para proporcionar una eficacia de biodisponibilidad *in vivo*. Los componentes del gránulo son comestibles para animales, y preferiblemente también son digeribles.

45 Los gránulos pueden usarse para mezclas de pienso no preparadas como pastilla, por ejemplo, premezclas. Los gránulos duraderos y estables conservan la eficacia cuando la mezcla no preparada como pastilla se pretrata con calor y vapor antes de alimentarse a los animales, o después de que la mezcla no preparada como pastilla se prepare como pastilla. Sorprendentemente, los agentes activos mantienen la actividad cuando se almacenan en mezclas no preparadas como pastilla que contienen ingredientes que son perjudiciales para la estabilidad de las enzimas. Sin querer restringirse a ninguna teoría particular, se cree que un material de hidratación y humedad en los gránulos actúa
 50 en combinación con un material de barrera frente a la humedad en los gránulos para proteger el componente activo de los ingredientes perjudiciales en mezclas no preparadas como pastilla. El material de hidratación y humedad retarda o reduce la tasa o el grado de migración de agua al área del agente activo, y el material de barrera frente a la humedad no deja pasar el agua. La combinación del material de hidratación y humedad y el material de barrera frente a la humedad proporciona estabilidad mecánica para proteger adicionalmente el agente activo en el caso de que una capa de un

material de barrera frente a la humedad se dañe. Adicionalmente, se usan materiales de barrera frente a la humedad que se oxidan sólo en condiciones extremas, de modo que en combinación con materiales de hidratación y humedad, los gránulos son químicamente estables debido a que se cree que las reacciones redox se reducen durante el almacenamiento de los gránulos en materiales no preparadas como pastilla.

5 Los gránulos duraderos y estables de la presente invención son preferiblemente gránulos esféricos o casi esféricos, aunque pueden usarse si se desea otras formas tales como discos, óvalos, formas cilíndricas y oblongas. Los gránulos tienen capas protectoras que rodean el agente activo.

10 Los gránulos pueden mezclarse junto con ingredientes secos, tales como formulaciones de piensos o para el cuidado del hogar o mezclas de pienso no preparadas como pastilla, por ejemplo, formulaciones de premezcla, antes de su uso en un procedimiento de preparación de pastillas o preparación de comprimidos, o usarse en mezclas de piensos secos y masa no preparadas como pastilla. Los gránulos son particularmente adecuados para su uso en procedimientos de fabricación de preparación de pastillas de pienso, y también son adecuados para alimentos, incluyendo alimentos para animales domésticos.

15 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Tal como se usó en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, el singular “un”, “una” y “el/la” incluye las referencias plurales a menos que el contexto establezca claramente lo contrario. Por ejemplo, el término gránulo puede incluir una pluralidad de gránulos.

20 Para los fines de esta descripción el “agente activo” es una enzima. Los agentes activos inherentemente termoestables están abarcados por la presente invención y presentan termoestabilidad potenciada en los gránulos de la presente invención.

25 Puede usarse cualquier enzima, y una lista no limitativa de enzimas incluye fitasas, xilanasas, β -glucanasas, fosfatasas, proteasas, amilasas (alfa o beta o glucoamilasas), celulasas, lipasas, cutinasas, oxidasas, transferasas, reductasas, hemicelulasas, mananasas, esterases, isomerasas, pectinasas, lactasas, peroxidases, lacasas, otras enzimas redox y mezclas de las mismas.

30 Las enzimas particularmente preferidas incluyen una xilanasas de *Trichoderma reesei* y una xilanasas variante de *Trichoderma reesei*, ambas disponibles de Danisco A/S, Dinamarca y/o Genencor International, Inc., Palo Alto, California, o la xilanasas inherentemente termoestable descrita en el documento EP1222256B1, así como otras xilanasas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus tubigensis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Neocallimastix patriciarum*, especies de *Penicillium*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces thermoviolaceus*, *Thermomonospora fusca*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*; ejemplos de fitasas son Finasa L[®], una fitasa de *Aspergillus sp.*, disponible de AB Enzymes, Darmstadt, Alemania; Phyzyme[™] XP, una fitasa de *E. coli*, disponible de Danisco, Copenhague, Dinamarca, y otras fitasas de, por ejemplo, las siguientes especies: *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Buttiauxella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Penicillium*, *Humicola*, *Bacillus* y *Peniophora*.

35 Un ejemplo de una celulasa es Multifect[®] BGL, una celulasa (beta-glucanasa), disponible de Danisco A/S, Dinamarca, y otras celulasas de especies tales como *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Humicola*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Penicillium*, *Thermomonospora*, *Clostridium* e *Hypocrea*. También pueden usarse las celulasas y endoglucanasas descritas en el documento US20060193897A1. Las amilasas pueden ser, por ejemplo, de especies tales como *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Bacillus*, por ejemplo, *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. coagulans* y *B. amyloliquefaciens*. Las amilasas fúngicas adecuadas se derivan de *Aspergillus*, tales como *A. oryzae* y *A. niger*. Las proteasas pueden ser de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus lentus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y especies de *Aspergillus* y *Trichoderma*.

40 Las fitasas, xilanasas, fosfatasas, proteasas, amilasas, esterases, enzimas redox, lipasas, transferasas, celulasas y β -glucanasas son enzimas usadas frecuentemente para su inclusión en piensos.

45 En aspectos particularmente preferidos de la invención, las enzimas se seleccionan de fitasas, xilanasas, beta-glucanasas, amilasas, proteasas, lipasas, esterases y mezclas de las mismas. En una realización de la presente invención, se proporcionan dos enzimas en el gránulo, una xilanasas y una beta-glucanasa. Las enzimas pueden mezclarse entre sí o aplicarse al gránulo por separado. En otra realización, se proporcionan tres enzimas en el gránulo, concretamente beta-glucanasa, xilanasas y fitasa.

50 Las listas de enzimas anteriores son sólo ejemplos y no pretenden ser excluyentes. Puede usarse cualquier enzima en los gránulos duraderos de la presente invención, incluyendo enzimas de tipo natural, recombinantes y variantes de fuentes bacterianas, fúngicas, de levadura, vegetales, de insectos y animales, y enzimas ácidas, neutras o alcalinas.

55 Pueden usarse dosis típicas de 25 a 400 gramos de los gránulos de enzima duraderos y estables por tonelada de pienso, y la dosificación de los gránulos de enzima puede ser de hasta aproximadamente 5000 gramos por tonelada de pienso. Las dosificaciones pueden ser incluso superiores cuando los gránulos termoestables de la presente

invención se usan como componente de mezclas de pienso no preparadas como pastilla, por ejemplo, premezclas, que pueden contener varios agentes activos y se añaden a composiciones de pienso. Por ejemplo, la dosificación de los gránulos de enzima añadidos a la premezcla puede ser aproximadamente del 0,2% al 10% de la premezcla, o de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 3% de una mezcla base. En una realización a modo de ejemplo, el nivel de actividad de gránulos duraderos y estables que contienen fitasa almacenados en una premezcla es de aproximadamente 500 U/g, o superior. Normalmente se añaden premezclas a la dieta a de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 2%, y se añaden mezclas base a de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 6%.

Los gránulos duraderos de la presente invención pueden dimensionarse como se desee y tienen un diámetro de entre aproximadamente 300 um y aproximadamente 1000 um, de aproximadamente 300 um a aproximadamente 900 um, de aproximadamente 400 um a aproximadamente 800 um, y de aproximadamente 400 um a aproximadamente 600 um.

“Fuerzas de compresión” para los fines de esta descripción se refiere generalmente a fuerzas aplicadas axialmente que provocan que los átomos de un material se compacten. Las fuerzas de compresión, tal como se usan en el presente documento, se producen en procedimientos de preparación de pastillas y preparación de comprimidos y pueden incluir un elemento de tensión de flexión cuando las fuerzas aplicadas no son completamente simétricas con respecto al eje longitudinal del material.

Una “enzima inherentemente termoestable” se refiere a enzimas que tienen un punto de fusión que está por encima de aproximadamente 60°C a aproximadamente 65°C, por ejemplo, la enzima inherentemente termoestable utilizada en la tabla 2 para los gránulos 28, 29 y 30 tiene un punto de fusión de 69°C a un pH de 5,5 y un punto de fusión de 72°C a un pH de 8,0. Varias de las enzimas termolábiles a las que se hace referencia a lo largo de la memoria descriptiva tenían, por ejemplo, un punto de fusión inferior a 60°C a valores de pH de 5,5 y 8,0.

“Materiales de barrera frente a la humedad” se refiere a materiales que excluyen, impiden o retardan sustancialmente la absorción de agua. Normalmente estos materiales son hidrófobos o anfífilicos, proporcionan aislamiento frente al agua y no absorben ni se unen inherentemente al agua e incluyen, pero no se limitan a, materiales formadores de película. El material de barrera frente a la humedad usado en la presente invención es PVA.

“Materiales de hidratación y humedad” se refiere a materiales que absorben líquidos acuosos, tales como agua, mediante unos de varios mecanismos. En un primer mecanismo, los materiales absorben agua libre. En un segundo mecanismo, los materiales absorben agua unida que generalmente está presente como aguas cristalinas de hidratación. Por consiguiente, los materiales pueden proporcionarse como materiales parcial o totalmente hidratados o como materiales no hidratados que absorberán o se unirán a líquidos acuosos y retardarán o reducirán la tasa o el grado de migración de tales líquidos al agente activo. En un tercer mecanismo, los materiales de hidratación y humedad aíslan térmicamente el agente activo retardando la transferencia de calor al agente activo dentro del gránulo y manteniendo el agente activo a una temperatura inferior que la temperatura en la superficie exterior del gránulo. El material de hidratación y humedad usado en la presente invención es sulfato de sodio.

El material de hidratación y humedad es anhidro de modo que la actividad de agua del gránulo completado es inferior a 0,5. Sin querer restringirse a ninguna teoría particular, cuando el gránulo se somete a procedimientos de calentamiento con vapor, el material de hidratación y humedad de sal inorgánica empezará a absorber agua del tratamiento de calentamiento con vapor, moviéndose el agua al interior del material de hidratación y humedad en un procedimiento cinético a lo largo del corto periodo de tiempo del tratamiento con vapor para impedir que el agua penetre al interior del área del gránulo que porta el agente activo. Para los fines de esta descripción, “hidratado”, “parcialmente hidratado” y “no hidratado” se refieren a un potencial de hidratación del material cuando el gránulo está en equilibrio antes de someterse a calentamiento con vapor. Un material “hidratado” se refiere a un material que contiene agua en forma libre o unida, o una combinación de las mismas. Puede añadirse agua o bien durante o bien después de los procedimientos de recubrimiento y el grado de hidratación del gránulo es una función de los materiales del gránulo y la temperatura, la humedad y las condiciones de secado en las que se aplica.

“Pastillas” y “preparación de pastillas” se refieren a pastillas o comprimidos sólidos redondeados, esféricos y cilíndricos y a los procedimientos para formar tales formas sólidas, particularmente pastillas de pienso y piensos sólidos extruidos. Los procedimientos de fabricación de preparación de pastillas de pienso conocidos incluyen generalmente mezclar entre sí ingredientes de pienso durante de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 minutos, transferir la mezcla a un depósito de carga, transportar la mezcla a un acondicionador de vapor, transferir opcionalmente la mezcla acondicionada con vapor a un ensanchador, transferir la mezcla al molino de pastillas o prensa extrusora, y finalmente transferir las pastillas al interior de un enfriador de pastillas. Fairfield, D. 1994, capítulo 10, Pelleting Cost Center. En Feed Manufacturing Technology IV. (McElhiney, editor), American Feed Industry Association, Arlington, VA, págs. 110-139.

El acondicionador de vapor trata la mezcla durante de aproximadamente 20 a aproximadamente 90 segundos, y hasta varios minutos, a de aproximadamente 85°C a aproximadamente 95°C. La cantidad de vapor puede variar según la cantidad de humedad y la temperatura inicial de la mezcla de pienso. Se ha notificado aproximadamente del 4% a aproximadamente el 6% de vapor añadido en procedimientos de preparación de pastillas, y la cantidad se selecciona

para producir menos de aproximadamente el 18% de humedad en la masa antes de la preparación de pastillas, o hasta aproximadamente el 28% de humedad en la masa que se pretende extruir.

Un procedimiento de expansión opcional se produce durante de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 segundos a un intervalo de temperatura de aproximadamente 100°C a aproximadamente 140°C. La parte del molino de pastillas del procedimiento de fabricación funciona normalmente durante de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 segundos a una temperatura de aproximadamente 85°C a aproximadamente 95°C.

Un gránulo "estable" se refiere a un gránulo en el que la actividad del/de los agente(s) activo(s) se mantiene sustancialmente tras su inclusión como ingrediente en una formulación que se somete a procedimientos de pretratamiento de calentamiento con vapor, procedimientos de preparación de pastillas de calentamiento con vapor, procedimientos de preparación de comprimidos de calentamiento con vapor, tras almacenamiento solo y almacenamiento como ingrediente en mezclas no preparadas como pastilla y no preparadas como comprimido. La estabilidad incluye termoestabilidad, vida útil de almacenamiento o estabilidad de almacenamiento, estabilidad mecánica y/o estabilidad química cuando los gránulos que contienen agente activo se almacenan en mezclas no preparadas como pastilla y no preparadas como comprimido y/o se someten a procedimientos de preparación de pastillas y procedimientos de preparación de comprimidos de calentamiento con vapor y a presión. La estabilidad mecánica se refiere a la consistencia física o integridad estructural de los gránulos, incluyendo la integridad estructural la resistencia a agentes microbianos, resistencia a la producción de polvo y resistencia a la liberación de ingredientes que puede dar como resultado la producción de olores. La estabilidad química se refiere al mantenimiento sustancial de actividad cuando los gránulos se almacenan en mezclas no preparadas como pastilla y no preparadas como comprimido con ingrediente(s) dañino(s) para el/los agente(s) activo(s). La termoestabilidad se define adicionalmente en el presente documento, y en general se refiere al mantenimiento de actividad tras la exposición a temperaturas hasta aproximadamente de 85°C a 95°C cuando los gránulos duraderos y estables son un ingrediente de pastillas, comprimidos y mezclas no preparadas como pastilla y no preparadas como comprimido.

"Preparación de comprimidos" se refiere a procedimientos para formar precomprimidos o comprimidos sólidos mediante la compresión de una mezcla de ingredientes en una prensa para comprimidos tal como se describe en el documento EP 1 257 631B1.

Los comprimidos pueden elaborarse mediante preparación de comprimidos por compresión directa de mezclas de agentes activos, cargas/aglutinantes, lubricantes y cualquier otro ingrediente opcional. El componente de agente activo se mezcla meticulosamente con los otros ingredientes del comprimido antes de entrar en la máquina de comprimidos. Se combinan los ingredientes en cualquier dispositivo de mezclado adecuado, tal como una mezcladora de tambores gemelos o aparato similar, o usando cualquier método de mezcla que dé como resultado la combinación de los ingredientes del comprimido.

Luego se comprimen las mezclas para dar comprimidos, usando cualquier dispositivo de preparación de comprimidos, tal como una prensa para comprimidos (modelo R-4 de Stokes, Warminster, PA). Las prensas para comprimidos tienen generalmente punzones correspondientes a la forma superior e inferior, que encajan en el interior de un troquel desde arriba y desde abajo del troquel. El material de comprimido mezclado se llena en el interior de la cavidad de troquel y al menos uno de los punzones, normalmente el punzón superior, entra en la cavidad de troquel. Se aplica presión a los punzones tanto superior como inferior. La acción de los punzones superior e inferior que se mueven uno hacia el otro, aplica presión al material entre los punzones, formando así un comprimido.

Pueden elaborarse una amplia variedad de formas de comprimido. La forma del comprimido está determinada por las herramientas de los punzones. Las fuerzas de compactación varían, dependiendo de la geometría del punzón, tipo de instrumento y formulación usada. Alternativamente, pueden elaborarse comprimidos usando procedimientos de granulación en seco o en húmedo tal como se describe en la patente estadounidense n.º 6.852.336. La patente 6.852.336 menciona que pueden utilizarse procedimientos de granulación en seco cuando uno de los componentes tiene propiedades cohesivas suficientes para que pueda prepararse como comprimido. El método mezcla los ingredientes con un lubricante, si se requiere. El procedimiento de granulación en húmedo describe mezcla el ingrediente seco usando una mezcladora de tambores gemelos o mezcladora de doble cono en condiciones de mezclado por cizallamiento y luego añade disoluciones de un agente de unión a los polvos mezclados para obtener una granulación.

Un gránulo "termoestable" se refiere a un gránulo que tiene un agente activo que conserva al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% y al menos el 95% de su actividad, medida mediante un ensayo convencional específico para el agente activo seleccionado, tras la inclusión en una formulación, y exposición a calor o a calor y vapor, de modo que la formulación alcanza temperaturas hasta aproximadamente de 85°C a aproximadamente 95°C durante hasta varios minutos. Los expertos en la técnica reconocerán que los gránulos termoestables en formulaciones expuestas a temperaturas inferiores a 85°C son estables, y los resultados de prueba realizados a 80°C establecen que de hecho, este es el caso. Por consiguiente, se entenderá que hasta de 85°C a 95°C significa abarcar temperaturas inferiores a 85°C, que están incluidas en el alcance de esta invención.

En una realización, "termoestable" se refiere a un agente activo que conserva al menos el 80% de su actividad medida mediante un ensayo convencional específico para el componente activo seleccionado tras la inclusión en una formulación, expuesta a vapor, de modo que la formulación alcanza temperaturas aproximadamente de 85°C-95°C

durante aproximadamente 30 segundos. Aún en otra realización, termoestable se refiere a un agente activo que conserva al menos el 50% de su actividad medida mediante un método convencional que es específico para el componente activo seleccionado tras la inclusión en una formulación, expuesta a vapor, de modo que la formulación alcanza temperaturas aproximadamente de 85°C-95°C durante aproximadamente 30 segundos.

5 “Mezclas no preparadas como pastilla” se refiere a premezclas o precursores, mezclas base, masa y diluyentes. Las premezclas contienen normalmente vitaminas y oligoelementos. Las mezclas base contienen normalmente ingredientes de piensos y alimentos tales como fosfato de dicalcio, piedra caliza, sal y una premezcla de vitaminas y minerales, pero no granos ni ingredientes proteicos. Los diluyentes incluyen, pero no se limitan a granos (por ejemplo harinillas de trigo y salvado de arroz) y arcillas, tales como filosilicatos (el silicato de magnesio sepiolita, bentonita, caolín, montmorillonita, hectorita, saponita, beidellita, atapulgita y estevensita). Las arcillas también funcionan como vehículos y agente fluidizante, o diluyentes, para premezclas de pienso. La masa comprende normalmente una dieta animal completa.

10 Los gránulos estables de la presente invención pueden añadirse a estas mezclas no preparadas como pastilla, y a mezclas de masa, que pueden tratarse posteriormente con vapor y/o prepararse como pastilla con vapor o secarse.

15 “Actividad de agua”, simbolizada como a_w se refiere a la humedad relativa fraccionada de una atmósfera en equilibrio con un material en fase sólida o líquida, es decir, la razón de la presión parcial de vapor de agua con respecto al agua pura presente anteriormente a la misma temperatura. En todas las fases entre las que la distribución de agua ha alcanzado el equilibrio, es por definición igual. El término “humedad relativa” se usa generalmente para describir el agua en la atmósfera o fase gaseosa en equilibrio con el sólido, y se expresa como porcentaje, siendo el 100% la humedad relativa de agua pura en un sistema cerrado. Por tanto, para cualquier valor de actividad de agua, existe una humedad relativa correspondiente dada por $\%HR = 100 \cdot a_w$. La actividad de agua puede medirse fácilmente mediante métodos conocidos en la técnica, normalmente colocando una muestra del material dentro de la cámara de temperatura controlada de un medidor de actividad de agua, tal como el modelo D2100 de sistema de actividad de agua disponible de Rotronic Instrument Corp. (Huntington, N.Y.), y que permite que la medición alcance el equilibrio tal como se indica en la presentación. La actividad de agua a la que se hace referencia en el presente documento es la del propio gránulo mismo la aplicación de todos los recubrimientos.

20 La actividad de agua para los gránulos de la presente invención es inferior a 0,5.

25 El gránulo duradero y estable de la presente invención es un gránulo que puede prepararse mediante cualquier procedimiento que dé como resultado la aplicación de uno o más recubrimientos protectores a un núcleo. El agente activo se recubre sobre un material de núcleo, y para los fines de esta descripción, un núcleo se refiere a todos los componentes del gránulo duradero excepto el/los recubrimiento(s) protector(es) aplicado(s) al núcleo del gránulo.

30 El núcleo puede elaborarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, tal como procedimientos de granulación, extrusión, recubrimiento en paila, esferoidización, granulación en tambor, aglomeración de alto cizallamiento, recubrimiento por pulverización en lecho fluido, cristalización, precipitación y perlado. Tales procedimientos se conocen en la técnica y se describen en la patente estadounidense n.º 4.689.297 y la patente estadounidense n.º 5.324.649 (procesamiento en lecho fluido); documento EP656058B1 y patente estadounidense n.º 454332 (procedimiento de extrusión); patente estadounidense n.º 6.248.706 (granulación, alto cizallamiento); y documento EP804532B1 y patente estadounidense n.º 6.534.466 (procedimientos de combinación utilizando recubrimiento en mezcladora y núcleo de lecho fluido).

35 Los recubrimientos protectores de la presente invención pueden aplicarse tal como se describe en los procedimientos de granulación, extrusión, lecho fluido y de perlado indicados anteriormente. Adicionalmente, los recubrimientos protectores pueden aplicarse mediante métodos de colada, incluyendo métodos de colada de disco giratorio, tal como se describe en el documento WO 03/000625.

40 Adicionalmente, en una realización, el procedimiento puede incluir una etapa de recocido con calor, que calienta el gránulo por encima de la temperatura de transición vítrea (Tg) de un componente de barrera frente a la humedad y luego reduce gradualmente la temperatura para provocar que el material de barrera se endurezca, o se vuelva vítreo.

NÚCLEOS

45 El núcleo es el núcleo interno del gránulo, y tal como se mencionó anteriormente, el componente activo se recubre alrededor de un núcleo que está constituido por sulfato de sodio. El núcleo para su uso en la presente invención es un material hidratable o poroso (es decir, un material que es dispersable o soluble en agua) que es un material de calidad alimentaria. El material de núcleo debe o bien dispersarse en agua (disgregarse cuando se hidrata) o bien solubilizarse en agua pasando a ser una verdadera disolución acuosa. El núcleo es preferiblemente un cristal de sulfato de sodio, a veces denominado simiente.

55

AGENTE ACTIVO

5 El agente activo, particularmente las enzimas comentadas anteriormente, se obtiene a partir de un caldo de fermentación y puede ser un caldo completo, caldo lisado o caldo de fermentación clarificado recuperado del procedimiento de fermentación. La enzima puede estar en forma líquida, de suspensión, secada, liofilizada o cristalina tal como se obtuvo usando procedimientos de recuperación a partir de caldos de fermentación. La/Las enzima(s) se mezcla(n) opcionalmente junto con PVA y almidón de maíz.

RECUBRIMIENTOS PROTECTORES

10 Los recubrimientos protectores de la presente invención se aplican generalmente como capas que rodean al núcleo cuando el agente activo no es inherentemente termoestable. Las realizaciones incluyen dos capas de recubrimiento protector.

15 Los recubrimientos protectores incluyen un recubrimiento de barrera frente a la humedad y un recubrimiento de hidratación y humedad. El recubrimiento de barrera frente a la humedad funciona no dejando pasar la humedad, formando una capa de cubierta que normalmente no absorbe humedad e impide o retarda la tasa de migración de humedad al interior del gránulo. El recubrimiento de hidratación y humedad sobre el gránulo absorbe o se une a la humedad como o bien agua libre o bien agua de hidratación, actuando de ese modo para impedir o retardar el grado o la tasa de transporte de humedad externa al interior del gránulo. El material de hidratación y humedad en el recubrimiento aísla térmicamente los agentes activos y absorberá una determinada cantidad de humedad y la conservará dentro del material de hidratación sin permitirle que pase a su través al interior de la parte del gránulo que tiene el agente activo.

20 El recubrimiento de barrera frente a la humedad comprende un material hidrófobo, es decir PVA.

El recubrimiento de barrera frente a la humedad de la presente invención incluye además talco.

25 Los procedimientos de la presente invención, además de los procedimientos descritos para la fabricación de los gránulos duraderos y estables, incluyen el mezclado de los gránulos con mezclas de pienso no preparadas como pastilla y el almacenamiento de las mezclas resultantes. Los procedimientos adicionales incluyen el tratamiento con vapor de las mezclas resultantes y/o la preparación de pastillas de las mezclas resultantes. Por supuesto, los gránulos duraderos y estables de la presente invención también pueden almacenarse solos y mezclarse con piensos, o prepararse como pastilla, cuando se desee.

Los siguientes ejemplos no pretenden ser limitativos.

EJEMPLOS

30 La tabla 1 a continuación es una lista de ingredientes y abreviaturas usados en los siguientes ejemplos.

Tabla 1

Ingrediente	Nombre y n.º de producto	Proveedor
Sacarosa	Azúcar granulada extra fina de caña pura Domino	Tate & Lyle North American Sugars, Baltimore, MD
Almidón de maíz	Almidón de maíz	Cargill Foods, Mineápolis, MN
MgSO ₄	Sulfato de magnesio heptahidratado, MgSO ₄ 7H ₂ O (sales de Epsom)	PQ Corporation, Berwyn, PA
HPMC	Hidroxipropil-metilcelulosa, nombre comercial: METHOCEL	Dow Chemical
Cera de carnauba	Michem Lube 160HS (emulsión de carnauba, 50% de sólidos)	Michelman Inc. Cincinnati, OH
Almidón modificado	PURE-COTE®	Grain Processing Corporation, Muscatine, IA
Lecitina	Lecitina de soja ULTRALEC® P	ADM Corp., Decatur, IL
PVA	Poli(alcohol vinílico), Elvanol® 51-05	DuPont, Wilmington, DE

Sulfato de sodio	Sulfato de sodio anhidro	Cooper Natural, Tulsa, Oklahoma
Sulfato de amonio	Sulfato de amonio n.º CAS 7783-20-2	General Alum & Chemical Corp. Searaport, Maine
Talco	Talco NYTAL 4000	RT Vanderbilt Co, Inc. Norwalk, CT
Suero de leche en polvo	PC42010	Leprino Foods, Denver CO
Proteína de suero de leche	Concentrado de proteína de suero de leche instantánea Proliant, n.º 8010, lote H4212	Hilmar Cheese Company, Hilmar, CA (WPC vendido formalmente a través de Proliant)
Aceite de linaza	Aceite de linaza sin refinar según las normas ASTM	Cargill Industrial Oils, Chicago, IL
Malto-dextrina	Maltodextrina M150	Grain Processing Corp (GPC) Muscatine, IA
Goma arábica	Goma arábica FT prehidratada TIC PRETESTED	TIC Gums, Belcamp, MD
Aceite de nabina	Aceite de nabina	Safeway
<u>Látex</u>		<u>FMC BioPolymer. Filadelfia, PA</u>
	<u>Aquacoat ECD (dispersión de etilcelulosa al 30%)</u>	
<u>Arena</u>	<u>Silicato de sodio</u>	<u>Sigma-Aldrich Chemical Co.</u>
		ICBP Independence, IA
Mazorcas de maíz	<u>Mazorcas de maíz o médula de maíz trituradas</u>	

La tabla 2 ilustra la composición de varios gránulos duraderos y estables a modo de ejemplo de la presente invención y varios gránulos que no demostraron al menos el 50% de actividad del agente activo recuperada en condiciones de preparación de pastillas particulares.

5

Tabla 2

Formulación n.º 1* (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sacarosa de 35-50 de malla	36,9
Agente activo	enzima	7,4
	sacarosa	12,6
	almidón de maíz	12,6
1 ^{er} recubrimiento	Sacarosa	10,5
	Almidón de maíz	10,5
2 ^o recubrimiento	Cera de carnauba	6,0

ES 2 392 865 T3

3 ^{er} recubrimiento	HPMC	3,5
-------------------------------	------	-----

*Etapa de recocido con calor

Formulación n.º 2 (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sacarosa de 35-50 de malla	17,5
Agente activo	enzima	3,5
	sacarosa	6,0
	almidón de maíz	6,0
1 ^{er} recubrimiento	MgSO ₄	67,0

Formulación n.º 3 (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sulfato de sodio	16,5
Agente activo	enzima	4,8
	sacarosa	4,0
	almidón de maíz	8,0
1 ^{er} recubrimiento	MgSO ₄	66,7

Formulación n.º 4 (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sacarosa de 35-50 de malla	17,5
Agente activo	enzima	3,5
	sacarosa	4,0
	almidón de maíz	8,0
1 ^{er} recubrimiento	maltodextrina	67

Formulación n.º 5 (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sulfato de sodio	14,8
Agente activo	enzima	2,9
	sacarosa	3,3

ES 2 392 865 T3

	almidón de maíz	6,6
1 ^{er} recubrimiento	MgSO ₄	55,6
2 ^o recubrimiento	goma arábica	17,0

Formulación n.º 6 (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sulfato de sodio	14,8
Agente activo	enzima	2,9
	sacarosa	3,3
	almidón de maíz	6,6
1 ^{er} recubrimiento	MgSO ₄	55,6
2 ^o recubrimiento	suero de leche	16,7

Formulación n.º 7 (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sulfato de sodio	14,8
Agente activo	enzima	2,9
	sacarosa	3,3
	almidón de maíz	6,6
1 ^{er} recubrimiento	MgSO ₄	55,6
2 ^o recubrimiento	concentrado de proteína de suero de leche	17,0

Formulación n.º 8 (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sulfato de sodio	13,4
Agente activo	enzima	2,6
	sacarosa	3,0
	almidón de maíz	6,0
1 ^{er} recubrimiento	almidón PureCote®	15,0
2 ^o recubrimiento	lecitina	10,0
3 ^{er} recubrimiento	MgSO ₄	50,0

ES 2 392 865 T3

Formulación n.º 9 (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sulfato de sodio	9,1
Agente activo	enzima	1,8
	sacarosa	2,1
	almidón de maíz	4,1
1 ^{er} recubrimiento	MgSO ₄	83,0

Formulación n.º 10 (Termolábil) (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sacarosa de 35-50 de malla	26,5
Agente activo	enzima	5,3
	sacarosa	9,1
	almidón de maíz	9,1
1 ^{er} recubrimiento	cera de carnauba	50

Formulación n.º 11 (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sulfato de sodio	10,7
Agente activo	enzima	2,1
	sacarosa	2,4
	almidón de maíz	4,8
1 ^{er} recubrimiento	PVA	4
	talco	36
2 ^o recubrimiento	MgSO ₄	40

Formulación n.º 12 (Gránulo de prueba sin recubrimiento protector) (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sacarosa de 35-50 de malla	53,1
Agente activo	enzima	10,6
	sacarosa	18,1
	almidón de maíz	18,1

ES 2 392 865 T3

Formulación n.º 13 (Termolábil) (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sacarosa de 35-50 de malla	44,2
Agente activo	enzima	8,9
	sacarosa	15,1
	almidón de maíz	15,1
1 ^{er} recubrimiento	sacarosa y almidón (razón 1:1)	16,7

Formulación n.º 14 (Termolábil) (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sacarosa de 35-50 de malla	48,3
Agente activo	enzima	9,7
	sacarosa	16,5
	almidón de maíz	16,5
1 ^{er} recubrimiento	Cera de carnauba	9,1

Formulación n.º 15 (Termolábil) (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sacarosa de 35-50 de malla	49,6
Agente activo	enzima	9,9
	sacarosa	16,9
	almidón de maíz	16,9
1 ^{er} recubrimiento	etilcelulosa	11,5

ES 2 392 865 T3

Formulación n.º 16 (Termolábil) (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sacarosa de 35-50 de malla	48,3
Agente activo	enzima	9,7
	sacarosa	16,5
	almidón de maíz	16,5
1 ^{er} recubrimiento	Hidroxipropil-metilcelulosa	9,1

Formulación n.º 17 (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sulfato de sodio	10,7
Agente activo	enzima	2,1
	sacarosa	2,4
	almidón de maíz	4,8
1 ^{er} recubrimiento	MgSO ₄	40
2 ^o recubrimiento	PVA	4
	talco	36

Formulación n.º 18 (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sulfato de sodio	13,4
Agente activo	enzima	2,6
	sacarosa	3,0
	almidón de maíz	6,0
1 ^{er} recubrimiento	MgSO ₄	50,0

ES 2 392 865 T3

2º recubrimiento	lecitina	10,0
3º recubrimiento	almidón PureCote®	15,0

Formulación n.º 19 (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sulfato de sodio	16,6
Agente activo	enzima	4,8
	sacarosa	4,0
	almidón de maíz	0,0
	talco	8,0
1º recubrimiento	MgSO ₄	66,7

Formulación n.º 20 (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sulfato de sodio	14,8
Agente activo	enzima	2,9
	sacarosa	3,3
	almidón de maíz	6,6
1º recubrimiento	goma arábica	17,0
2º recubrimiento	MgSO ₄	55,6

Formulación n.º 21 (Termolábil) (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sacarosa de 35-50 de malla	51,9
Agente activo	enzima	10,4
	sacarosa	17,7
	almidón de maíz	17,7

ES 2 392 865 T3

1 ^{er} recubrimiento	aceite de nabina	2,2
-------------------------------	------------------	-----

Formulación n.º 22 (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	mazorca de maíz triturada	17,5
Agente activo	enzima	3,5
	sacarosa	6,0
	almidón de maíz	6,0
1 ^{er} recubrimiento	MgSO ₄	67

Formulación n.º 23 (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sulfato de sodio	31,1
Agente activo	enzima	2,4
	almidón de maíz	9,4
1 ^{er} recubrimiento	MgSO ₄	43,7
2 ^o recubrimiento	goma arábica	3,4
	maltodextrina	10,1

Formulación n.º 24 (Termolábil) (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sulfato de sodio	29,9
Agente activo	enzima	3,3
	almidón de maíz	9,3
1 ^{er} recubrimiento	PureCote	12,0

ES 2 392 865 T3

2º recubrimiento	lecitina	8,0
3 ^{er} recubrimiento	MgSO ₄	37,5

Formulación n.º 25 (Termolábil) (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sulfato de sodio	47,8
Agente activo	enzima	5,3
	almidón de maíz	14,9
1 ^{er} recubrimiento	PureCote	19,2
2º recubrimiento	lecitina	12,8

Formulación n.º 26 (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sulfato de sodio	31,0
Agente activo	enzima	2,4
	almidón de maíz	9,4
1 ^{er} recubrimiento	sulfato de sodio	43,7
2º recubrimiento	goma arábica	13,5

Formulación n.º 27 (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sulfato de sodio	31,0
Agente activo	enzima	2,4
	almidón de maíz	9,4
1 ^{er} recubrimiento	MgSO ₄	43,7

ES 2 392 865 T3

2º recubrimiento	suero de leche	13,5
------------------	----------------	------

Formulación n.º 28** (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sulfato de sodio	32,7
Agente activo n.º 1	enzima n.º 1	9,1
	sacarosa	4,1
	almidón de maíz	8,5
Agente activo n.º 2	enzima n.º 2	1,9
	sacarosa	0,9
	almidón de maíz	1,8
Recubrimiento n.º 1	sulfato de sodio	33,6
Recubrimiento n.º 2	PVA 51-05	2,5
	talco	5,0

**Enzima inherentemente termoestable

Formulación n.º 29** (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sulfato de sodio	32,7
Agente activo n.º 1 y n.º 2 mezclados	enzima n.º 1 y n.º 2	
	sacarosa	10,9
	almidón de maíz	5,0
		10,3
Recubrimiento n.º 1	sulfato de sodio	33,6
Recubrimiento n.º 2	PVA 51-05	2,5
	talco	5,0

**Enzima inherentemente termoestable

ES 2 392 865 T3

Formulación n.º 30** (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	Arena	84,80
Agente activo n.º 1	enzima n.º 1	3,52
	sacarosa	1,62
	Trigo molido integral	3,31
Recubrimiento n.º 1	sulfato de sodio	5,50
Recubrimiento n.º 2	PVA 51-05	0,42
	talco	0,83

**Enzima inherentemente termoestable

Formulación n.º 31

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sulfato de sodio	40,0%
Pulverización 1	enzima	5,0%
	PVA	1,0%
	almidón de maíz	5,0%
Pulverización 2	sulfato de sodio	40,0%
Pulverización 3	PVA	3,0%
	talco	6,0%

Formulación n.º 32 (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sulfato de sodio	40,0%
Pulverización 1	enzima	5,0%
	almidón de maíz	9,0%

ES 2 392 865 T3

Pulverización 2	sulfato de sodio	39,0%
Pulverización 3	goma arábica	7,0%

Formulación n.º 33 (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	sulfato de sodio	54,8
Agentes activos (2)	Enzimas mezcladas	
	sacarosa	11,8
	almidón de maíz	5,4
Recubrimiento 1		11,1
	Sulfato de sodio	26,0
Recubrimiento 2	PVA	2,5
	talco	4,9

Formulación n.º 34 (Referencia)

	Componente	% (p/p) en base seca
Material de núcleo	Sulfato de sodio	54,8
Agentes activos (2)	Mezcla de enzimas	11,8
Recubrimiento 1	Sulfato de sodio	26,0
Recubrimiento 2	PVA	2,5
	talco	4,9

EJEMPLO 1. PREPARACIÓN DE GRÁNULOS EN LA TABLA 2.

5 Todos los gránulos en la tabla 2, excepto el gránulo número 1, son gránulos que se prepararon usando un procedimiento de lecho fluido tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.324.649. El procedimiento de lecho fluido fluidizó los materiales de núcleo en un procesador Vector FL-1 (fabricado por Vector Corp, Marion, IA, E.E.U.U.), un procesador Glatt 3 o uno Uniglatt (ambos fabricados por Glatt Air Techniques, Binzen, Alemania). Se recubrió mediante pulverización una mezcla de enzimas sobre el material de núcleo. Luego, se pulverizó cualquier recubrimiento protector de manera secuencial sobre la capa de enzimas y se dejó secar.

Por ejemplo, el gránulo de la formulación n.º 3 se preparó tal como sigue:

5 En una revestidora de lecho fluido de pulverización superior Glatt 3, se cargaron y se fluidizaron cristales de sulfato de sodio tamizados hasta 45/+140 de malla usando una temperatura de lecho calentado. Se mezcló un concentrado de ultrafiltración de xilanasa procedente de *Trichoderma reesei* con almidón de maíz y sacarosa y se pulverizó sobre los cristales. La disolución tenía aproximadamente el 33% de sólidos secos. El peso de lote final fue de 4000 gramos.

En una revestidora de pulverización superior Vector FL-1, se pulverizó material de hidratación y humedad, una disolución de sulfato de magnesio, sobre 833 gramos del material descrito anteriormente. La temperatura del lecho fue de 50°. El lote final pesó 2500 gramos.

10 La preparación del gránulo número 1 incluía además una etapa de recocido con calor en la que se calentó el gránulo hasta una temperatura suficiente para superar la temperatura de transición vítrea (Tg) del material de cera de carnauba seguido por enfriamiento lento que produjo una capa de cera endurecida, vítrea.

EJEMPLO 2: PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE MASA CON GRÁNULOS Y PREPARACIÓN DE PASTILLAS

15 Se usaron tres formulaciones de pienso y procedimientos de preparación de pastillas diferentes para preparar pastillas con los gránulos enumerados en la tabla 2. Se añadieron dosificaciones relativamente altas de gránulos a las formulaciones de pienso para optimizar los ensayos de actividad restante del agente activo.

Molino n.º 1:

Se mezclaron gránulos seleccionados de la tabla 2 junto con una formulación de pienso. La composición de las formulaciones de pienso fue tal como sigue:

20 el 75% (p/p) de harina de maíz (harina de maíz desgerminada amarilla enriquecida, n.º 50956, General Mills Operations, Mineápolis, MN); y

el 25% (p/p) de harina de soja (harina Pro Soybean, Cargill Oilseed Co., Cedar Rapids, IA).

25 Se combinaron 12 kg de la mezcla de pienso anterior con cada gránulo de muestra (dosificado a 5 g/kg de formulación de pienso), y se combinaron en una mezcladora Hobart grande (modelo D-300T, Troy OH), durante 8 minutos. Se conservaron aproximadamente 150 g de cada muestra como muestra de masa, o mezcla de pienso no preparada como pastilla. Luego se dividió cada lote en tres sublotes de 4 kg, y se prepararon pastillas en experimentos de molino de pastillas por triplicado.

30 El molino de pastillas usado fue modelo CL5 de CPM (California Pellet Mill Co., Crawfordsville, IN). Se controló la temperatura en el acondicionador de vapor mediante la cantidad de vapor inyectado, a 1,36 atm. La temperatura de acondicionamiento de la masa, medida inmediatamente antes de entrar en el troquel del molino de pastillas, se fijó a 89-90°C. Se realizó la medición de la temperatura usando un termómetro y un termopar de tipo "J" (OMEGA Engineering, Inc. Stamford, CT). El tiempo de residencia en el acondicionador fue aproximadamente de 5 segundos. Las dimensiones del troquel fueron de 12,7 cm de diámetro interno, 17,8 cm de diámetro externo, 4,7 mm de diámetro de orificio. El molino de pastillas se hizo funcionar de manera continua, y se procesaron las muestras a través del molino de manera secuencial, se separaron haciendo funcionar aproximadamente 2 kg de una mezcla de harina de maíz/soja entre muestras. Aproximadamente 1 minuto tras añadirse la masa de prueba al acondicionador, y tras haberse estabilizado la temperatura del acondicionador hasta una temperatura objetivo, se recogieron las pastillas a lo largo de un intervalo de 30 segundos, permitiendo que se recogiera aproximadamente 1 kg de pastillas para cada muestra. Se mantuvieron las pastillas recogidas en las condiciones ambientales, durante 30 segundos, y luego se enfriaron con un enfriador de aire durante 2-3 min. hasta temperatura ambiente.

40 Molino n.º 2:

45 Se prepararon como pastilla gránulos duraderos preparados de la tabla 2 con una formulación de pienso de maíz y soja. La composición exacta de las formulaciones de pienso fue tal como sigue: el 61,2% (p/p) de harina de maíz, el 31,6% (p/p) de harina de soja, el 3,0% de harina de carne y huesos, el 2,5% de aceite de soja, el 1,3% de piedra caliza, el 0,28% de sal y el 0,08% de metionina. Por cada gránulo sometido a prueba, se combinaron de 370 a 2000 gramos de los gránulos, dependiendo del tipo y la actividad de enzima, con 450 kg del pienso sin aceite, y se combinaron en una mezcladora de paletas durante 2 minutos. Luego se añadió aceite de soja y se mezcló la muestra durante 3 minutos adicionales. El molino de pastillas fue el modelo Master, fabricado por California Pellet Mill. El diámetro de orificio de pastilla del troquel fue de 4,5 mm. La velocidad de alimentación típica fue de 780 kg por hora. La temperatura en el acondicionador de vapor se controló manualmente, y se midió en la salida de alimentación desde el acondicionador. Se usaron dos temperaturas de acondicionamiento; 85°C y 95°C. El tiempo de residencia en el acondicionador fue aproximadamente de 30 segundos. Cuando se alcanzó la temperatura objetivo, se hizo funcionar el sistema durante aproximadamente 5 minutos antes de que tuviera lugar la toma de muestras. Se tomaron muestras de aproximadamente 5 kg de pienso preparado como pastilla, y se enfriaron extendiéndolos sobre bandejas tamizadas.

Molino n.º 3:

Se prepararon como pastilla los gránulos duraderos preparados con una formulación de pienso de trigo y soja o una formulación de trigo y cebada. La composición de la formulación de pienso fue o bien el 60% de trigo, el 31,5% de harina de soja, el 4% de aceite de soja, el 1,5% de fosfato de dicalcio, el 1,23% de premezcla de vitaminas y minerales, el 1,2% de piedra caliza, el 0,4% de sal y el 0,2% de DL-metionina; o bien el 60% de trigo, el 30% de cebada, usándose dos temperaturas de acondicionamiento, 90°C y 95°C. Por cada gránulo sometido a prueba, de 200 a 500 gramos de gránulos, dependiendo del tipo y la actividad de enzima, se combinaron con 160 kg del pienso, y se combinaron en una mezcladora horizontal con cinta helicoidal, durante aproximadamente 15 minutos. El molino de pastillas fue un molino Simon Heesen, de tipo monocilindro, equipado con un troquel de diámetro interno de 17,3 cm, con un diámetro de orificio de pastilla de 3 mm. La velocidad del troquel fue de 500 rpm y se impulsó mediante un motor de 7,5 kW. La velocidad de alimentación típica fue de 300 kg por hora. Se mantuvo la temperatura en el acondicionador de vapor a +/- 0,1 grados centígrados, medida en la salida de alimentación desde el acondicionador. El acondicionador tenía un sistema de mezcladora de tipo cascada. Se usaron tres temperaturas de acondicionamiento; 85°C, 90°C y 95°C. La presión de entrada de vapor fue de 2 atm, y la temperatura en el acondicionador se controló mediante ajuste manual de tres válvulas que regulaban el suministro de vapor. El tiempo de residencia en el acondicionador fue aproximadamente de 30 segundos. Cuando se alcanzó la temperatura objetivo, el sistema se hizo funcionar durante aproximadamente de 5 a 10 minutos antes de que tuviera lugar la toma de muestras. Se tomaron muestras durante periodos de 1-1,5 minutos, que correspondían a 5-7,5 kg del pienso preparado como pastilla, y se colocaron inmediatamente en una cámara de enfriamiento con un fondo perforado y flujo de aire de 1500 metros cúbicos por hora. Tras el enfriamiento durante 15 minutos, se redujeron de tamaño las muestras dos veces usando un divisor de muestras, y se tomó 1 kg para pruebas de laboratorio.

EJEMPLO 3: MEDICIONES DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Determinación de la actividad enzimática

Para determinar la actividad enzimática tras la preparación de pastillas, se molieron luego la masa y muestras preparadas como pastilla durante 30 segundos en un molinillo de café de cocina (modelo 203-42, Krups North America Inc., Medford MA), y se sometieron a ensayo para determinar la actividad enzimática tal como se describe a continuación. Alternativamente, se molieron las muestras en un molino centrífugo ZM-200, equipado con un tamiz de 1 mm (Retsch GmbH, Alemania).

Cálculo del porcentaje de actividad recuperada:

Para cada muestra de prueba, se sometieron a prueba tanto la masa como las muestras preparadas como pastilla correspondientes para determinar la actividad. Se calculó el porcentaje de actividad recuperada tal como sigue:

$$\% \text{ de actividad recuperada} = \frac{\text{actividad en pastilla} \times 100}{\text{actividad en la masa}}$$

Se realizó el ensayo de la enzima fitasa según el Método Oficial 2000.12 de la AOAC (Asociación de Químicos Analíticos), tal como se describe en "Determination of phytase activity in feed by a colorimetric enzymatic method: collaborative interlaboratory study". Engelen AJ, van der Heeft FC, Randsdorp PH, Somers WA, Schaefer J, van der Vat BJ. J AOAC Int. mayo-junio de 2001; 84(3):629-33. Brevemente, se extrajeron las muestras trituradas en acetato de sodio trihidratado 220 mM, cloruro de calcio dihidratado 68,4 mM, Tween 20 al 0,01%, pH 5,5. Luego se sometió a ensayo el sobrenadante. El ensayo mide la liberación de fosfato inorgánico a partir de fitasa de arroz, a pH 5,5, durante 60 min. a 37°C. El ensayo se detiene con reactivo de vanadato/molibdato ácido, y se cuantifica el fosfato mediante la intensidad del complejo de color amarillo del vanadomolibdofósforo.

Se realizó el ensayo de enzima xilanasas usando el kit de ensayo de xilanasas (Xylazyme AX Format), n.º de cat.: KXYLS Megazyme International Irlanda Ltd., Wicklow, Irlanda. Los materiales para el ensayo incluyen 16 x tubos de cultivo de vidrio desechables de 125 mm; tampón de extracción: tampón de sal de sodio de MES 100 mM, pH 6,0; tampón de ensayo: tampón fosfato de sodio 25 mM, pH 6,0; disolución de detención: 20 g de NaPO₄12H₂O en 1 litro de agua MilliQ, matraces de cultivo tisular de poliestireno, 225 ml (Corning Incorporated - Life Sciences Big Flats, Nueva York). Se extraen 6-12 g de pienso triturado en 120 ml de tampón de extracción, en un matraz de cultivo, durante 1 hora a 20-25°C, mientras que se agita en un agitador de gel orbital fijado a 100 rpm. Luego se centrifugan las muestras a 2000 g durante 1 min., y se somete a ensayo el sobrenadante. Para el ensayo, se diluyen de 20 a 100 ul del sobrenadante del pienso en 500 ul usando tampón de ensayo, en tubos de cultivo, y se equilibra en un baño de agua a 40°C durante 10 min. Luego, se coloca un comprimido de sustrato en cada tubo de cultivo, y se incuban las muestras durante 10 minutos adicionales a 40°C. Luego se añaden 10 ml de disolución de detención a cada tubo. Se agitan las muestras en vórtex brevemente, y luego se filtran a través de papel de filtro Whatman n.º 1. Se lee la absorbancia del filtrado con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 nm. En primer lugar, se pone a cero el espectrofotómetro con un blanco, elaborado mediante la combinación de 20 a 100 ul del sobrenadante del pienso, 500 ul de tampón de ensayo y 10 ml de disolución de detención. Luego se añade un comprimido de sustrato seguido por, agitación en vórtex, y filtración de la misma manera que las muestras. La interferencia de algunos componentes del

5 pienso puede afectar a la respuesta del ensayo. Con el fin de corregir cualquier interferencia, se prepararon curvas patrón con el fondo del pienso. Se añadieron gránulos de xilanasa no recubiertos a la masa de blanco, y a pastillas de blanco, a varios niveles. Luego se trituraron las muestras de pastillas y de masa con adiciones conocidas, y se extrajeron exactamente tal como se describió anteriormente. A partir de esta serie de extractos, se generaron curvas patrón para tanto la masa como para las pastillas.

10 Se realizó el ensayo de enzima beta-glucanasa usando un kit de ensayo de beta-glucanasa (formato de comprimido de Beta-Gluczyme), n.º de cat. : T-BGZ200, Megazyme International Irlanda Ltd., Wicklow, Irlanda. Los materiales para el ensayo incluyen 16 x tubos de cultivo de vidrio desechables de 125 mm; tampón de extracción y tampón de ensayo: tampón acetato de sodio 25 mM; disolución de detención: NaPO₄12H₂O al 2% en 1 litro de agua MilliQ; vasos de precipitados de 140 ml. Se extrajeron 10 g de pienso triturado en 100 ml de tampón de extracción, mezclando en un vaso de precipitados durante 1 hora a 20-25°C. Luego se centrifugan las muestras a 2000 g durante 1 min., y se somete a ensayo el sobrenadante. Para el ensayo, se diluyen de 20 a 100 ul del sobrenadante del pienso en 500 ul usando tampón de ensayo, en tubos de cultivo, y se equilibra en un baño de agua a 40°C durante 10 min. Luego, se coloca un comprimido de sustrato en el interior de cada tubo de cultivo y se incuban las muestras durante 10 minutos adicionales a 40°C. Luego se añaden 10 ml de disolución de detención a cada tubo. Se agitan las muestras en vórtex brevemente y luego se filtran a través de papel de filtro Whatman n.º 1. Se lee la absorbancia del filtrado con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 nm. En primer lugar, se pone a cero el espectrofotómetro con un blanco, elaborado mediante la combinación de 20 a 100 ul del sobrenadante del pienso, 500 ul de tampón de ensayo y 10 ml de disolución de detención. Luego se añade un comprimido de sustrato seguido por, agitación en vórtex y filtración de la misma manera que las muestras. Se prepara una curva patrón sometiendo a ensayo una serie de enzima diluida hasta niveles apropiados en tampón de ensayo.

RESULTADOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CONSERVADA

Tabla 3: Resultados de preparación de pastillas – Porcentaje de actividad recuperada tras la preparación de pastillas

Formulación	Molino n.º 1, 90°C	Molino n.º 2, 3 ó 4 a 85-95°C
10	<30% de xilanasa	
12	<30% de xilanasa	
13	<30% de xilanasa	
14	<30% de xilanasa	
15	<30% de xilanasa	
16	<30% de xilanasa	
21	<30% de xilanasa	
25	<30% de xilanasa	
1	>50% de xilanasa	
2	>50% de xilanasa	
3	>70% de xilanasa	>70% de xilanasa
5	>50% de xilanasa, >70% de fitasa de <i>E. coli</i>	>50% de xilanasa, >80% de fitasa de <i>E. coli</i>
6	>50% de xilanasa	
7	>50% de xilanasa	
9	>50% de xilanasa	
11		>50% de xilanasa, >70% de fitasa de <i>Aspergillus</i>
30		>60% de xilanasa termoestable
22	>50% de xilanasa	

23	>60% de fitasa de <i>E. coli</i>	>50% de xilanasa, >80% de fitasa de <i>E. coli</i>
27	>50% de xilanasa	>80% de fitasa de <i>E. coli</i>
33		>90% de BGL, >70% de xilanasa termoestable
4	>70% de xilanasa	
8	>70% de xilanasa	
17	>70% de xilanasa	
18	>70% de xilanasa	
19	>70% de xilanasa	
20	>70% de xilanasa	
26	>70% de xilanasa	>90% de fitasa de <i>E. coli</i>
28		>90% de BGL, >90% de xilanasa termoestable
29		>70% de BGL, >90% de xilanasa termoestable
31		>90% de fitasa de <i>E. coli</i>
32		>90% fitasa de <i>E. coli</i>

Los molinos de pastillas usados pueden dividirse en dos grupos. El molino n.º 1 es un molino a escala de laboratorio, que es mucho más duro de lo que se encuentra normalmente en la práctica comercial. La dureza se atribuye a la gran cantidad de vapor que se suministra a una parte relativamente pequeña de masa, unido al hecho de que la mezcla de pienso no contiene aceite, que lubrica normalmente el pienso mientras se traslada a través del troquel. Se considera que los molinos n.º 2 a n.º 4 son más representativos de las condiciones comerciales.

Las actividades conservadas de los gránulos sometidos a prueba se muestran en la tabla 3. Los gránulos que no se consideran gránulos duraderos y estables fueron los números 10, 12, 13, 14, 15, 16, 21 y 25, todos los cuales demostraron menos del 30% de actividad recuperada. Estos gránulos tienen un núcleo recubierto con una capa de matriz de enzima en la que el núcleo recubierto es superior a aproximadamente el 50% en p/p del gránulo completo. La mayoría de estos gránulos no estables solo tenían una capa de recubrimiento protector de un material de barrera frente a la humedad, tal como cera de carnauba, o etilcelulosa o HPMC, o aceite de nabina. Sin querer restringirse a ninguna teoría particular, y reconociendo que estos gránulos pueden mostrar más del 50% de actividad del agente activo conservada a 70-85°C, la escasa termoestabilidad de estos gránulos en estas condiciones de prueba, con respecto a los gránulos duraderos y estables, puede deberse a la provisión de materiales de recubrimiento como capas relativamente delgadas, que comprende, en cinco ejemplos, aproximadamente del 2,0 a aproximadamente el 17,0% p/p del gránulo, y/o el agente de recubrimiento particular empleado. Por ejemplo, el gránulo número 10 tiene un capa individual de material de recubrimiento que es el 50% p/p del material de barrera frente a la humedad (cera de carnauba); y el gránulo número 25 tiene dos capas de recubrimiento protector de barrera frente a la humedad que en conjunto constituyen el 32% p/p del gránulo.

Gránulos particularmente duraderos y estables fueron los números 4, 8, 17, 18, 19, 20, 26, 28, 29, 31 y 32, todos los cuales tienen más del 70% de actividad de xilanasa recuperada cuando se preparan como pastilla a aproximadamente 90°C durante aproximadamente 5 segundos. Adicionalmente, los gránulos 26, 31 y 32 demostraron más del 90% de actividad de fitasa recuperada cuando se prepararon como pastilla entre 85°C y 95°C durante aproximadamente 30 segundos. Los gránulos 28 y 29 demostraron más del 90% de actividad conservada de una xilanasa inherentemente termoestable en la mezcla de enzimas y el 70%-90% de actividad conservada de una beta-glucanasa termolábil cuando se preparó como pastilla entre 85°C y 95°C durante 30 segundos. Aquellos gránulos duraderos y estables que tienen un agente activo que no es inherentemente termoestable están o bien; 1) recubiertos con una capa protectora gruesa, individual de un material de hidratación y humedad, o 2) recubiertos con dos a tres capas protectoras, en las que al menos una de las capas es un material de hidratación y humedad y una capa es un material de barrera frente a la humedad.

En general, cuando se aplican materiales de hidratación y humedad como capas individuales, el recubrimiento debe comprender desde aproximadamente hasta al menos aproximadamente el 55% del gránulo, para proporcionar una termoprotección adecuada; y, cuando la cantidad de material de hidratación y humedad se disminuyó hasta menos del 55% usando una capa individual, el porcentaje de actividad conservada se redujo hasta menos del 50%. Sin embargo, cuando se usan los materiales de hidratación y humedad en combinación con materiales de barrera frente a la humedad, la capa protectora de hidratación y humedad puede disminuirse hasta al menos aproximadamente el 25% p/p del gránulo, mientras que el material de barrera frente a la humedad puede ser aproximadamente del 2% al 40% p/p del gránulo.

Otros gránulos duraderos y estables fueron los números 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 11, 22, 23, 27, 30 y 33 todos los cuales demostraron más del 50% de actividad xilanasa o fitasa recuperada cuando se prepararon como pastilla a 90°C durante 5 segundos o a de 85°C a 95°C durante 30 segundos. Tal como puede observarse a partir de estos resultados, los recubrimientos externos o internos de sal inorgánica solos proporcionan buena protección para la enzima y protección potenciada cuando se combinan con recubrimientos de barrera frente a la humedad. Tal como se indicó anteriormente, se elaboró el gránulo número 1 usando una etapa de procesamiento de recocido con calor y se cree que la adición de una etapa de recocido con calor potencia las propiedades de barrera de los materiales de barrera frente a la humedad, tales como polímeros, proteínas y lípidos, reduciendo de ese modo la cantidad de material de hidratación y humedad necesario para proporcionar termoestabilidad. Cuando se elaboró un gránulo idéntico por lo demás al gránulo n.º 1 sin recocido con calor, la actividad recuperada fue del 35%. Los gránulos 2, 3 y 22 muestran que pueden usarse diferentes materiales de núcleo sin comprometer la estabilidad del gránulo.

El gránulo 3 demostró más del 70% de actividad enzimática recuperada en periodos de tiempo de preparación de pastilla tanto de 5 segundos como de 30 segundos. El gránulo 11 demostró más del 50% de actividad de xilanasa recuperada cuando se preparó como pastilla a de 85°C a 95°C durante aproximadamente 30 segundos, y más del 70% de actividad fitasa recuperada cuando se preparó como pastilla a de 85°C a 95°C durante aproximadamente 30 segundos. El gránulo n.º 23 demostró más del 60% de actividad recuperada de fitasa cuando se preparó como pastilla durante 5 segundos a 90°C; más del 50% de actividad recuperada de xilanasa cuando se preparó como pastilla a de 85°C a 95°C durante 30 segundos; y, más del 80% de actividad recuperada de fitasa cuando se preparó como pastilla a de 85°C a 95°C durante 30 segundos.

EJEMPLO 4: PRUEBAS DE TRATAMIENTO CON VAPOR DIRECTO

Se dosificaron partes de 100 gramos de masa que comprendían el 75% de harina de maíz y el 25% de soja con gránulos, que contienen fitasa de *E. coli*, a una tasa de inclusión de 1,25 g de gránulos por 1 kilogramo de masa. Luego se envolvieron las muestras de masa en una bolsa de estopilla, y se trataron con vapor durante 20 segundos colocando las bolsas en un embudo con vapor a 30 psi aplicado en la parte inferior del embudo. Tras el tratamiento con vapor, se enfriaron las muestras hasta temperatura ambiente, se permitió que se secasen durante la noche, y luego se sometieron a ensayo para determinar la actividad fitasa. Se notificó el porcentaje de actividad recuperada de las muestras tratadas con vapor, con respecto a la masa no calentada.

Un gránulo que no se consideró resistente al vapor de manera adecuada en estas condiciones de prueba fue el número n.º 25, que tuvo menos del 35% de actividad recuperada tras el tratamiento con vapor. Los gránulos duraderos y estables de la presente invención fueron los números n.º 5 y n.º 23, que tuvieron más del 50% de actividad recuperada tras el tratamiento con vapor.

EJEMPLO 5: PRUEBA DE BIODISPONIBILIDAD DE GRÁNULOS

Los gránulos duraderos y estables de la presente invención pueden someterse a prueba para determinar la biodisponibilidad de la enzima de agente activo usando pruebas de biodisponibilidad conocidas, tales como el estudio de biodisponibilidad de fitasa dado a conocer en el documento WO 00/47060; pruebas de biodisponibilidad descritas en *Enzymes in Animal Nutrition, Proceedings of the 1st Symposium, Kartause Ittingen, Suiza, 13016 de octubre de 1993*; las pruebas de biodisponibilidad descritas en patentes de Chemgen.

Se evaluaron gránulos estables de la presente invención tras la preparación de pastillas para determinar la biodisponibilidad en pollos de engorde alimentados con una dieta comercial.

Materiales y métodos

Las enzimas y gránulos y tratamientos dietéticos sometidos a prueba incluyeron enzima Phyzyme[®] XP (6-fitasa; E.C. 3.1.3.26) sola, y gránulos estables recubiertos tanto con goma arábica (GA) como recubiertos con PVA de la presente invención que contenían enzima Phyzyme XP. (Véase la tabla 4). Se alimentaron pollos de engorde con las enzimas y los gránulos sometidos a prueba en una dieta o bien de masa o bien de pastillas (preparada a 90°C). Las dietas experimentales fueron: control positivo (dieta comercial), control negativo, control negativo + 500 U/kg de Phyzyme[®] XP, control negativo + 500 U/kg de fitasa recubierta con PVA, control negativo + 500 U/kg de fitasa recubierta con GA, control negativo + 500 U/kg de fitasa recubierta con PVA preparada como pastilla a 90°C y control negativo + 500 U/kg de fitasa recubierta con GA preparada como pastilla a 90°C. Excepto para el calcio y el fósforo, todas las dietas fueron isocalóricas e isonitrogenadas. (Véase la tabla 6). El calcio y el fósforo disponible en las dietas de control positivo y negativo fueron del 0,90% y el 0,78%, y del 0,37% y el 0,26%, respectivamente. Se añadió dióxido de titanio

(0,10%) a las dietas como marcador indigerible para ayudar a estimar la digeribilidad de nutrientes. Las dietas experimentales se fabricaron por ADAS Gleadthorpe a una especificación comercial y se conservaron en ADAS Gleadthorpe y se almacenaron con refrigeración. Se enviaron muestras de las mezclas de aditivos de enzima (25 g), cereal (250 g), harina de soja (250 g) y una muestra de todas las dietas (250 g) a Danisco Animal Nutrition Enzymes Feed Services, Edwin Rahrs Vej 38, DK-8220 Brabrand, Dinamarca. Se sometieron a prueba todas las muestras de pienso para determinar la fitasa antes de la alimentación.

Diseño y animales de experimentación:

Los pollos eran pollos de engorde Ross 308 macho de 0 a 21 días de edad usando ocho corrales duplicados por tratamiento con 30 aves por corral. Se colocaron los pollos aleatoriamente en cajas antes de pesarse y asignarse aleatoriamente a los corrales de tratamiento. Cada corral contenía un alimentador de tubo y las aves tenían libre acceso a agua mediante bebederos de boquilla (4 por corral) y pienso en todo momento. Se ajustó regularmente la altura de los bebederos para mantener el nivel con la parte superior de la parte posterior de las aves. Se proporcionó un lecho en forma de virutas de madera limpias hasta una profundidad de 5 cm. Se calentó el alojamiento mediante un sistema de incubación con aire caliente y el régimen de la temperatura objetivo de incubación fue de 31°C en un día, reduciendo en 1°C cada dos días hasta que se alcanzó 21°C en el día 21. Se calculó automáticamente la tasa de ventilación mínima para suministrar $1,9 \times 10^4 \text{ m}^3$ de aire por segundo por $\text{kg}^{0,75}$ de peso corporal y se suministró esta tasa mediante un ventilador de 610 mm controlado por un panel de control Farm-Ex Diacam. El programa de iluminación fue de 23 horas de luz y 1 hora de oscuridad. Se redujo la intensidad luminosa desde el máximo alcanzable en un día (40-60 lux) hasta una intensidad de aproximadamente 10 lux durante 10 días de edad. Se monitorizó la humedad relativa diariamente usando un registrador de datos Tinytalk©. Se vacunaron los pollos con IB H120 & 50% de Avinue (ND) en Hatchery.

Ingesta de pienso/Peso corporal

Se midió la utilización de pienso entre 0 y 21 días. Se midió el pienso en cada corral pesando de nuevo la cantidad de pienso restante al final del periodo y restándolo de la cantidad ofrecida. Se pesaron las aves en sus grupos de corral en un día. A los 21 días, se pesaron todas las aves en todos los corrales en lotes. se determinó el peso total de todas las aves en cada corral y se calculó la media. Se pesaron todas las aves que murieron y se registraron los detalles, y se sacrificó cualquier ave renqueante o ave que no podía alcanzar el pienso y el agua, del estudio y se enumeró la razón del sacrificio.

Cenizas de tibia

A los 21 días de edad, se sacrificaron 2 aves de cada corral usando dislocación cervical y se extirpó la pata izquierda. Se diseccionó la tibia y se envió el hueso a Eurofins laboratories, Woodthorne, Wolverhampton para análisis de cenizas en una representación gráfica. Se analizaron todos los datos usando un procedimiento de modelos lineales general de SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Cuando se hallaron diferencias significativas, se usó la prueba de Duncan para comparar las medias de los tratamientos individuales.

Resultados y discusión

La actividad fitasa analizada en las dietas experimentales fue <50, <50, 563, 467, 558 UTF/kg (fitasa recubierta con PVA) y 554 y 440 (fitasa recubierta con GA), para control positivo, control negativo, control negativo + 500 U/kg de Phyzyme® XP, control negativo + 500 U/kg de fitasa recubierta con PVA y fitasa recubierta con GA, y control negativo + 500 U/kg de fitasa recubierta con PVA y fitasa recubierta con GA preparadas como pastilla a 90°C, respectivamente (tabla 5), indicando que la actividad tanto de la fitasa recubierta con PVA como de la fitasa recubierta con GA no se destruyó tras la preparación como pastilla a 90°C.

Las dietas con que se alimentaron las aves complementadas con 500 U/kg de fitasa recubierta con PVA y fitasa recubierta con GA, preparadas como pastilla a 90°C, fueron más pesadas en el 21 que las aves alimentadas con las dietas de control positivo, control negativo y control negativo + 500 U/kg de Phyzyme® XP (tabla 7). Las aves alimentadas con dieta de control negativo consumieron menos pienso que las aves alimentadas con dietas complementadas con 500 U/kg de fitasa recubierta con PVA y fitasa recubierta con GA, preparadas como pastilla a 90°C (tabla 8). Las aves alimentadas con las dietas de masa complementadas con 500 U/kg de Phyzyme® y fitasa recubierta con PVA y fitasa recubierta con GA no mostraron diferencia estadística con el control positivo. Las dietas alimentadas complementadas con 500 U/kg de fitasa recubierta con PVA y fitasa recubierta con GA, preparadas como pastilla a 90°C, tuvieron una mejor razón de conversión de pienso en el día 21 que las aves alimentadas con las dietas de control negativo + 500 U/kg de Phyzyme® XP y control positivo (tabla 9). Las cenizas de tibia fueron inferiores para las aves alimentadas con dieta de control negativo en comparación con todos los demás tratamientos. Las aves alimentadas con dietas de control positivo y complementadas con fitasa tuvieron cenizas de tibia similares (tabla 10).

La fitasa sometida a prueba, o bien como Phyzyme® XP o bien recubierta con PVA o GA, rindió bien así como la dieta de control positivo cuando se alimentó como masa. Cuando se añadió fitasa recubierta con PVA o GA a dietas comerciales preparadas como pastilla a 90°C, la recuperación del producto se mantuvo en niveles sin preparación como pastilla y el rendimiento fue al menos tan bueno como o mejor que el de la dieta de control positivo. Los resultados indican que el recubrimiento de la enzima con PVA o GA mejoró su termoestabilidad a la temperatura de preparación como pastilla de 90°C sin perder bioeficacia en dietas comerciales con que se alimentan pollos de engorde.

Tabla 4 Tratamientos dietéticos

Tratamiento dietético	Enzima, U/kg	Inclusión (g/T)
Control positivo	0, dieta de masa	0
Control negativo	0, dieta de masa	0
Dieta de masa con Phyzyme XP	500 U/kg de dieta de masa con Phyzyme XP	100
Dieta de masa recubierta con PVA	500 U/kg de dieta de masa de fitasa recubierta con PVA	100
Dieta de pastilla recubierta con PVA	500 U/kg de fitasa recubierta con PVA (pastilla a 90°C)	100
Dieta de masa recubierta con GA	500 U/kg dieta de masa de fitasa recubierta con GA	100
Dieta de pastilla recubierta con GA	500 U/kg fitasa recubierta con GA (pastilla a 90°C)	100

Tabla 5 Actividad fitasa en dietas experimentales

Tratamiento dietético	Esperado	Observado	Observado, %
		UTF/Kg	
Control positivo, masa	<50	<50	-
Control negativo, masa	<50	<50	-
Dieta de masa con Phyzyme XP	500	563	<u>112,6</u>
Dieta de masa recubierta con PVA,	500	467	<u>93,4</u>
Preparada como pastilla recubierta con PVA a 90°C	500	558	111,6
Dieta de masa recubierta con GA			
Preparada como pastilla recubierta con GA a 90°C	500	440	88,0

5

Tabla 6 Dietas experimentales

Ingredientes: %	Control positivo	Control negativo
Maíz	58,56	59,49
Harina de soja -48	34,65	34,55
Aceite de soja	2,82	2,48
sal	0,30	0,30
Bicarbonato de sodio	0,20	0,20
Fosfato de dicalcio	1,59	0,83

ES 2 392 865 T3

Piedra caliza	0,95	1,12
Premezcla de vitaminas	0,50	0,50
Lisina-HCl	0,10	0,10
DL-Metionina	0,23	0,23
Dióxido de titanio	0,10	0,10
Portador de premezcla de enzimas	0	0,10
<i>Composición de nutrientes</i>		
Proteína cruda, %	21,68	21,68
Energía metabolizable de las aves de corral, MJ/kg	12,8	12,8
Calcio, %	0,90	0,78
Fósforo, %	0,67	0,54
Fósforo disponible, %	0,37	0,26
Metionina + cisteína, %	0,92	0,92
Metionina, %	0,56	0,56
Lisina, %	1,25	1,25
Treonina, %	0,82	0,82
Triptófano, %	0,25	0,25

Tabla 7 Peso corporal inicial y final de pollos de engorde alimentados con dietas experimentales

Tratamiento dietético	Peso corporal, g	
	Día 0	Día 21
Control positivo, masa	44,43	789 ^b
Control negativo, masa	43,55	680 ^d
500 U/kg de Phyzyme XP, masa	43,72	753 ^c
500 U/kg de fitasa recubierta con PVA, masa	43,75	740 ^e
500 U/kg de fitasa recubierta con GA, masa		
500 U/kg de fitasa recubierta con PVA, preparada como pastilla a 90°C	43,70	899 ^a
500 U/kg de fitasa recubierta con GA, preparada como pastilla a 90°C	43,67	934 ^a
Error estándar de la diferencia entre las medias	0,261 (PVA) 0,228 (GA)	6,015 (PVA) 7,741 (GA)
Valor de p	0,165 (PVA) 0,053 (GA)	<0,001 (PVA) <0,001 (GA)

Diferentes superíndices en la misma columna indican una diferencia significativa.

Tabla 8 Ingesta de pienso global de pollos de engorde alimentados con dietas experimentales

Tratamiento dietético	Ingesta de pienso (g/ave/día)
Control positivo, masa	56,69 ^d
Control negativo, masa	46,00 ^a
500 U/kg de Phyzyme XP, masa	59,03 ^b
500 U/kg de fitasa recubierta con PVA, masa	56,70 ^b
500 U/kg de fitasa recubierta con PVA, preparada como pastilla a 90°C	57,18 ^b
500 U/kg de fitasa recubierta con GA, preparada como pastilla a 90°C	64,33 ^b
Error estándar de la diferencia entre las medias	2,321 (PVA) 2,260 (GA)
Valor de p	0,004 (PVA) 0,001 (GA)

Diferentes superíndices en la misma columna indican una diferencia significativa.

Tabla 9 Razón de conversión de pienso de pollos de engorde alimentados con dietas experimentales

Tratamiento dietético	Razón de conversión de pienso
Control positivo, masa	1,617 ^{ab}
Control negativo, masa	1,548 ^{ab}
500 U/kg de Phyzyme XP, masa	1,752 ^a
500 U/kg de fitasa recubierta con PVA, masa	1,715 ^a
500 U/kg de fitasa recubierta con PVA, preparada como pastilla a 90°C	1,412 ^b
500 U/kg de fitasa recubierta con GA, preparada como pastilla a 90°C	1,537
Error estándar de la diferencia entre las medias	0,715 (PVA) 0,069 (GA)
Valor de p	0,016 (PVA) 0,061 (GA)

5 Diferentes superíndices en la misma columna indican una diferencia significativa.

Tabla 10 Contenido en ceniza de tibia de pollos de engorde alimentados con dietas experimentales

Tratamiento dietético	Contenido en ceniza de tibia (g/100 g)
Control positivo, masa	14,03 ^b
Control negativo, masa	10,86 ^a
500 U/kg de Phyzyme XP, masa	13,93 ^b

500 U/kg de fitasa recubierta con PVA, masa	13,24 ^b
500 U/kg de fitasa recubierta con PVA, preparada como pastilla a 90°C	13,50 ^b
500 U/kg de fitasa recubierta con GA, preparada como pastilla a 90°C	13,84 ^a
Error estándar de la diferencia entre las medias	0,403 (PVA) 0,302 (GA)
Valor de p	<0,001 (PVA) <0,001 (GA)

Diferentes superíndices en la misma columna indican una diferencia significativa.

EJEMPLO 6: PREMEZCLA DE ENZIMAS Y ESTABILIDAD DE PREPARACIÓN COMO PASTILLA

5 Se mezclaron gránulos que contenían fitasa, preparados según las formulaciones en la tabla 2, que tenían o bien un recubrimiento de PVA o bien un recubrimiento de goma arábica y un recubrimiento de hidratación y humedad, con la arcilla sepiolita, o una premezcla de vitaminas y minerales para pollos de engorde convencional con y sin cloruro de colina. Las razones de combinación fueron de 100 gramos de gránulos añadidos a 900 gramos de arcilla (sepiolita), o de 100 gramos de gránulos añadidos a 500 gramos de premezcla de vitaminas y minerales. Se almacenaron las muestras en recipientes sellados a 35°C durante 3 semanas, y entonces se sometieron a preparación como pastilla, tal como se describió anteriormente, en el molino n.º 3. El control experimental fueron gránulos que no se almacenaron en una premezcla, y se mantuvieron en las condiciones ambientales durante 3 semanas.

10 Las tablas 11 y 12 muestran el porcentaje de actividad fitasa recuperada de estas mezclas tras la preparación como pastilla a 90°C y 95°C. Se encontró que los gránulos mezclados con sepiolita o las premezclas de vitaminas y minerales tenían una actividad recuperada significativamente aumentada tras la preparación como pastilla.

Tabla 11				
Gránulos con formulación de PVA				
Premezcla	Porcentaje de actividad recuperada tras la preparación como pastilla, con respecto a la masa		Porcentaje de aumento en la actividad recuperada, con respecto a los gránulos de control	
	90°C	95°C	90°C	95°C
gránulos solos (control)	71%	57%		
Sepiolita + gránulos	95%	88%	34%	53%
Premezcla de vitaminas y minerales, sin cloruro de colina + gránulos	93%	80%	32%	40%
Premezcla de vitaminas y minerales, con cloruro de colina + gránulos	98%	85%	39%	48%

15

Tabla 12				
Gránulos con formulación de GA				
Premezcla	Porcentaje de actividad recuperada tras la preparación como pastilla, con respecto a la masa		Porcentaje de aumento en la actividad recuperada, con respecto a los gránulos de control	
	90°C	95°C	90°C	95°C
gránulos solos (control)	92%	81%		
Sepiolita + gránulos	99%	88%	8%	9%
Premezcla de vitaminas y minerales, sin cloruro de colina + gránulos	100%	81%	8%	0%
Premezcla de vitaminas y minerales, con cloruro de colina + gránulos	97%	80%	5%	-2%

5 Sin querer restringirse a ninguna teoría particular, se cree que la arcilla y la premezcla de vitaminas y minerales tienen capacidad para captar agua y, durante el almacenamiento con gránulos estables, absorben la humedad residual de los gránulos. Para ilustrar este efecto, la tabla 13 muestra los resultados de un experimento en el que se almacenan gránulos y sepiolita en recipientes abiertos, situados uno al lado del otro, dentro de una cámara cerrada. Se midió la actividad de agua de los gránulos, y de la sepiolita, antes y después de 7 días de almacenamiento a 25°C. Durante el almacenamiento, la sepiolita absorbió agua de los gránulos hasta que el sistema alcanzó un equilibrio. Tras el almacenamiento, los gránulos muestran una disminución en la actividad de agua, mientras que la sepiolita muestra un aumento en la actividad de agua.

Tabla 13				
	Actividad de agua inicial		Actividad de agua tras 7 días de almacenamiento conjunto	
	Sepiolita	Gránulos	Sepiolita	Gránulos
Gránulo con formulación de GA	0,312	0,558	0,359	0,373
Gránulo con formulación de PVA	0,312	0,516	0,354	0,365

EJEMPLO 7: ESTABILIDAD DE ALMACENAMIENTO CON CLORURO DE COLINA

15 El cloruro de colina, o cloruro de N-(2-hidroxietil)trimetilamonio, es un aditivo de piensos importante, un nutriente vitamínico, en piensos para aves de corral, cerdos y otros animales. El cloruro de colina es una molécula reactiva y tiene un efecto destructor ampliamente conocido sobre otras vitaminas y enzimas. El cloruro de colina se incluye a menudo en premezclas y mezclas base. Los niveles máximos usados en premezclas son de 74.800 mg/kg para cerdos y de 150.000 mg/kg para aves de corral. Y niveles típicos para mezclas base para cerdos son aproximadamente de 966 a 1282,9 mg/kg.

5 Se mostró que los gránulos duraderos y estables conservan la actividad enzimática cuando se almacenan en presencia de cloruro de colina. Se mezclaron gránulos que contenían fitasa, preparados con formulaciones o bien con PVA o bien con goma arábiga y un material de hidratación y humedad, con una premezcla de vitaminas y minerales para pollos de engorde convencional, con y sin cloruro de colina. La razón de combinación fue de 100 gramos de gránulos añadidos a 500 gramos de premezcla de vitaminas y minerales. Se almacenaron las muestras en recipientes sellados, a 35°C, durante 3 semanas, y entonces se sometieron a ensayo para determinar la actividad, usando el protocolo de ensayo de fitasa descrito anteriormente. El control del experimento fueron gránulos que no se almacenaron en una premezcla, y se mantuvieron a 35°C durante 3 semanas. Las tablas 14 y 15 muestran la actividad medida de las mezclas antes y después del almacenamiento, y el porcentaje de cambio en la actividad. Ninguna de las muestras presenta una pérdida apreciable de actividad tras el almacenamiento. El error de este ensayo, incluyendo el error de toma de muestras, extracción y ensayo de actividad es de aproximadamente el 15%.

Tabla 14			
Gránulo con formulación de PVA			
Muestra	Actividad inicial (UTF/g)	Actividad tras el almacenamiento durante 3 semanas a 35°C (UTF/g)	Porcentaje de cambio en la actividad
gránulos solos (control)	11.600	11.858	2%
gránulos + premezcla de vitaminas y minerales sin cloruro de colina	1.933	1.727	-12%
gránulos + premezcla de vitaminas y minerales con cloruro de colina	1.933	1.720	-12%

Tabla 15			
Gránulo con formulación de GA			
Muestra	Actividad inicial (UTF/g)	Actividad tras el almacenamiento durante 3 semanas a 35°C (UTF/g)	Porcentaje de cambio en la actividad
gránulos solos (control)	10.373	10.528	1%
gránulos + premezcla de vitaminas y minerales sin cloruro de colina	1.729	1.543	-12%
gránulos + premezcla de vitaminas y minerales con cloruro de colina	1.729	1.622	-7%

15 EJEMPLO 8: EFECTO DE LA ACTIVIDAD DE AGUA SOBRE LA ESTABILIDAD DE PREPARACIÓN COMO PASTILLA

Se prepararon gránulos de fitasa según una formulación que tiene un recubrimiento de PVA y/o un recubrimiento de capa de sal inorgánica, en un procedimiento de lecho fluido, tal como se describió anteriormente. Puede usarse una etapa de secado adicional si la actividad de agua del gránulo es superior a 0,5 tras el procesamiento, de modo que en una revestidora de lecho fluido, u otro procedimiento adecuado, pueden secarse los gránulos hasta que

se consigue una actividad de agua <0,5. Los resultados se muestran en la tabla 16 y demuestran que la actividad conservada tras la preparación como pastilla se potencia cuando la actividad de agua es inferior a 0,5.

Tabla 16					
Gránulo con formulación de PVA					
Gránulo	Actividad de agua	Porcentaje de actividad recuperada tras la preparación como pastilla, con respecto a la masa		Porcentaje de aumento en la actividad recuperada, con respecto a los gránulos de control	
		90°C	95°C	90°C	95°C
A (control)	0,57	81%	69%		
B	0,41	98%	87%	21%	26%
C	0,49	110%	97%	36%	41%

REIVINDICACIÓN

1. Gránulo para composiciones de alimentación que está constituido por:
- un núcleo constituido por sulfato de sodio (40,0%);
- 5 un recubrimiento que contiene agente activo aplicado sobre el núcleo, estando constituido dicho recubrimiento por enzima (5,0%), PVA (1,0%) y almidón de maíz (5,0%);
- un recubrimiento de hidratación y humedad aplicado sobre el recubrimiento de agente activo, estando constituido dicho recubrimiento por sulfato de sodio (40,0%); y
- un recubrimiento de barrera frente a la humedad aplicado sobre el recubrimiento, estando constituido dicho recubrimiento por PVA (3,0%) y talco (6,0%);
- 10 refiriéndose los porcentajes anteriores a los porcentajes en peso de los componentes respectivos con respecto al peso de todo el gránulo,
- teniendo el gránulo una actividad de agua inferior a 0,5.