

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 028**

51 Int. Cl.:

**A23K 1/165** (2006.01)

**A23K 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2006 E 06793402 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 1928260**

54 Título: **Granulado enzimático II que contiene fitasa**

30 Prioridad:

**12.09.2005 DE 102005043324**

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

**04.05.2015**

73 Titular/es:

**BASF SE (100.0%)  
67056 Ludwigshafen , DE**

72 Inventor/es:

**LOHSCHIEDT, MARKUS;  
BETZ, ROLAND y  
BRAUN, JÖRG**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 535 028 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Granulado enzimático II que contiene fitasa

5 La presente invención se refiere a nuevos granulados enzimáticos que contienen fitasa, que son adecuados como aditivos para piensos. La invención se refiere también al uso de los granulados enzimáticos que contienen fitasa en composiciones de pienso y en particular composiciones de pienso peletizado, que pueden obtenerse con el uso de los granulados enzimáticos que contienen fitasa.

10 Es habitual en general añadir fitasa a los piensos animales, para garantizar una mejor conversión alimenticia, una mejor calidad de producto o un bajo impacto en el medio ambiente. Además es práctica habitual, suministrar el pienso animal en forma peletizada, dado que una peletización no sólo facilita la toma del pienso, sino que también mejora la manipulación del pienso. Además se ha mostrado que, en el caso del pienso peletizado, se digieren mejor determinados constituyentes del pienso y sustancias contenidas añadidas al pienso, tal como por ejemplo, vitaminas, enzimas, elementos traza, pueden incluirse mejor en la mezcla de pienso.

15 Para la disminución de la carga microbiana (Higienización) de tales piensos animales se lleva a cabo con frecuencia un tratamiento térmico. Un tratamiento térmico tiene lugar también en el contexto del acondicionador necesario para la peletización, en el que el pienso se mezcla con vapor y de esta manera se calienta y se humedece. En la verdadera etapa de peletización se presiona el pienso mediante una matriz. Otros procesos que se usan en la industria de los piensos son la extrusión y la expansión. La acción del calor en todos estos procesos representa un problema, dado que las enzimas contenidas en tales mezclas de piensos tales como fitasa son por regla general térmicamente inestables. Se realizaron por lo tanto distintos esfuerzos para mejorar la estabilidad térmica y en particular la estabilidad de peletización de composiciones de pienso que contienen enzimas.

20 Con respecto a una alta estabilidad de peletización es fundamentalmente ventajoso producir granulados enzimáticos con partículas de granulado comparativamente grandes, dado que en éstos, la superficie específica es menor en comparación con partículas más pequeñas. En el caso de una alta actividad enzimática específica, por ejemplo en el caso de actividades fitasa por encima de 10000 FTU/g disminuye la precisión de dosificación en el caso de partículas grandes, dado que es difícil de alcanzar una distribución uniforme del granulado en el pienso con una actividad deseable preferentemente en el pienso de aproximadamente 500 FTU/kg. La consecuencia son fuertes oscilaciones de la actividad enzimática en la ración diaria de los animales.

25 Por otro lado son deseables altas reactividades fitasa específicas de al menos 7000 FTU/g o incluso al menos 13000 FTU/g para la reducción de los costes de producción (con respecto a actividad) y para la reducción de del volumen de producto específico de actividad.

30 El documento WO 98/54980 describe granulados que contienen enzima con una estabilidad de peletización mejorada, que se producen mediante extrusión de una solución enzimática acuosa con un soporte a base de un hidrato de carbono comestible y posterior secado. La actividad fitasa de los granulados se encuentra en el intervalo de 5000 a 10000 FTU/g.

35 El documento WO 2000/47060 describe granulados enzimáticos que contienen fitasa, que son adecuados como aditivos para piensos y presentan un recubrimiento de polietilenglicol. La reactividad fitasa específica en estas partículas se encuentra en el intervalo de 4000 a 20000 FTU/g. No se enseña una relación entre tamaño de partícula y actividad fitasa. Productos similares se conocen por el documento WO 03/059086, que se diferencia de los del documento WO 2000/47060 por un recubrimiento con una sustancia hidrófoba en lugar del recubrimiento de polietilenglicol.

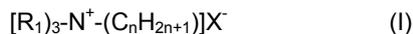
40 En el documento WO 2001/25412 se enseña que las capas de recubrimiento gruesas en los granulados enzimáticos (diámetro de partícula total con respecto a diámetro de núcleo de enzima > 1,1) contribuyen a la reducción de la tendencia a la formación de polvo del producto así como al aumento de la estabilidad en almacenamiento. Estas capas gruesas llevan naturalmente a un aumento de tamaño del granulado enzimático. No se enseñan granulados que contienen fitasa.

45 El documento WO 2004/108911 describe granulados enzimáticos con alta actividad enzimática específica, en particular con una alta relación de enzima activa con respecto a inactiva, y un pequeño porcentaje de polvo. La reactividad fitasa específica se encuentra en al menos 15000 FTU/g. Los granulados allí descritos no son satisfactorios debido a su precisión de dosificación.

50 El documento WO 2005/074707 describe formulaciones enzimáticas líquidas o sólidas, estabilizadas, por ejemplo granulados, que contienen al menos una fosfatasa, por ejemplo fitasa, al menos una sustancia de acción estabilizante del grupo agar agar, algina, carragenanos, furcellarano, goma ghatti, goma tragacanto, goma karaya, goma guar, goma de algarrobo, goma de semilla de tamarindo, arabinogalactano y goma xantana, así como al menos una proteína animal.

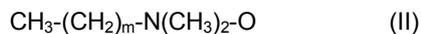
55 El documento EP 1645195 describe formulaciones enzimáticas líquidas o sólidas, estabilizadas, por ejemplo granulados, que contienen al menos una enzima, por ejemplo una fitasa y al menos una sustancia de acción

estabilizante, que se seleccionan del grupo que consiste en sales de N-alkil-trialquil/arilamonio de fórmula I,



en la que X representa Cl, Br o I, R<sub>1</sub> se seleccionan independientemente entre sí entre metilo, etilo, propilo, i-propilo, butilo, fenilo o bencilo y n representa un número de 1 a 22;

5 emulsionantes de óxido de amina de fórmula II



en la que M representa de 5 a 21, y 1-propanosulfonato de N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio.

10 El documento EP 1508281 describe composiciones de pienso granuladas, recubiertas con polímero, así como procedimientos para su producción, las composiciones de pienso que pueden obtenerse de esta manera así como composiciones de pienso peletizado, que se producen con el uso de las composiciones recubiertas con polímero.

El documento EP 1457560 describe un procedimiento para la producción de líquidos acuosos, que contienen, fitasa con una reactividad fitasa específica de al menos 14000 FTU/g.

El documento US 2003/0054511 describe un procedimiento para la producción de granulados que contienen enzima, que son adecuados para la producción de piensos animales, que comprende las siguientes etapas:

- 15 a) mezclar una alimentación enzimática, un material de soporte sólido, agua y al menos un aditivo en cantidad efectiva;
- b) procesar mecánicamente la mezcla de la etapa a) al mismo tiempo o a continuación del proceso de mezclado, obteniéndose granulados que contienen enzima;
- 20 c) secar los granulados y
- d) recubrir los granulados secados con polietilenglicol.

El documento WO 01/83727 describe un procedimiento para la producción continua de granulados enzimáticos, que comprende las siguientes etapas:

- 25 a) producir una composición enzimática líquida, que contiene una o varias enzimas;
- b) opcionalmente añadir aditivos a la composición enzimática de la etapa a);
- c) pulverizar una o varias composiciones enzimáticas de las etapas a) y b) por medio de toberas pulverizadoras en un lecho fluidizado;
- d) separar el material fino, que se descarga en el gas de escape y recircular el material finamente dividido al lecho fluidizado como germen para la formación de gránulos;
- 30 e) formar partículas de granulado con tamaño predeterminado mediante ajuste de la corriente de visible;
- f) descargar las partículas de granulado por medio de uno o varios separadores por gravedad de contracorriente, que están dispuestos en el plato de entrada del dispositivo de lecho fluidizado; y
- g) opcionalmente recubrir las partículas de granulado obtenidas en la etapa f).

35 Por lo tanto es un objetivo proporcionar granulados enzimáticos que contienen fitasa con precisión de dosificación mejorada con, al mismo tiempo, una actividad fitasa específica de 7000 a 13000 FTU/g. Los granulados presentarán además una alta estabilidad de peletización y podrán producirse de manera sencilla y económicamente. Además, ya durante la producción no se producirán pérdidas de actividad enzimática.

40 Se encontró que los granulados enzimáticos que contienen fitasa con una reactividad fitasa específica de al menos 7000 FTU/g, preferentemente al menos 7500 FTU/g, en particular al menos 8000 FTU/g, por ejemplo de 7000 a 13000 FTU/g, o de 7500 a 13000 FTU/g o de 8000 a 13000 FTU/g presentan una capacidad de dosificación especialmente adecuada cuando el tamaño de partícula medio (promedio en peso) de las partículas de granulado se encuentra en el intervalo de 350 a 550 μm y en especial en el intervalo de 400 a 550 μm y la reactividad fitasa específica del granulado, expresada en unidades FTU por gramo, no supera un valor de 2000 [FTU g<sup>-1</sup>]·D<sup>-3</sup>·mm<sup>3</sup>, de manera especialmente preferente de 1500 [FTU g<sup>-1</sup>]·D<sup>-3</sup>·mm<sup>3</sup>.

45 La invención se refiere a un granulado enzimático que contiene fitasa para piensos, cuyas partículas presentan un tamaño de partícula promedio en peso en el intervalo de 350 a 550 μm y cuya reactividad fitasa específica, expresada en FTU/g, asciende al menos a 7000 y no supera un valor de

$$FTU_{max} = 2000 [FTU g^{-1}] \cdot D^{-3} \cdot mm^3$$

en la que D representa el diámetro de partícula promedio en peso de las partículas de granulado en mm.

50 La reactividad fitasa específica de tales granulados enzimáticos de acuerdo con la invención asciende preferentemente al menos a 7500 FTU/g, en particular al menos a 8000 FTU/g.

Preferentemente la reactividad fitasa específica no superará un valor de

$$FTU_{\max} = 1500 [FTU g^{-1}] \cdot D^{-3} \cdot mm^3,$$

en particular de  $1000 [FTU g^{-1}] \cdot D^{-3} \cdot mm^3$ .

5 1 FTU de actividad fitasa se define a este respecto como la cantidad de enzima que libera 1 micromol de fosfato inorgánico por minuto a partir de fitato de sodio acuoso 0,0051 mol/l a pH 5,5 y 37 °C. La determinación de la actividad fitasa puede llevarse a cabo por ejemplo de acuerdo con "Determination of Phytase Activity in Feed by a Colorimetric Enzymatic Method": Collaborative Interlaboratory Study Engelen et al.: Journal of AOAC International Vol. 84, Nº 3, 2001, o también Simple and Rapid Determination of Phytase Activity, Engelen et al., Journal of AOAC International, Vol. 77, Nº 3, 1994.

10 El diámetro de partícula promedio en peso de las partículas de granulado se encuentra en especial en el intervalo de 400 a 550 µm. La distribución media del tamaño de partícula puede determinarse de manera en sí conocida mediante dispersión de luz, por ejemplo con un Mastersizer S, de la empresa Malvern Instruments GmbH o mediante análisis de tamizado, por ejemplo con una máquina de tamizado de tipo Vibro VS 10000 de la empresa Retsch. Por el tamaño de partícula medio entiende el experto el denominado valor  $D_{50}$  de la curva de distribución del tamaño de partícula, es decir el valor al que el 50 % en peso de todas las partículas quedan por encima o por debajo.

20 Preferentemente, las partículas presentan sólo un pequeño porcentaje de partículas finamente divididas. Por consiguiente, al menos el 90 % en peso de las partículas presentan un diámetro de partícula de más de 100 µm, en particular más de 150 µm y en especial más de 200 µm y no más del 10 % en peso presentan un diámetro por debajo de estos límites (valor  $D_{10}$ ). Preferentemente, el porcentaje en peso de las partículas con un diámetro de partícula por debajo de 100 µm asciende a menos del 8 % en peso, en particular menos del 5 % en peso y en especial menos del 1 % en peso.

25 Preferentemente, las partículas del granulado presentan sólo un pequeño porcentaje de partículas gruesas. Por consiguiente, al menos el 90 % en peso de las partículas presentan un diámetro de partícula de no más de 1200 µm, en particular no más de 1000 µm y en especial no más de 800 µm y no más del 10 % en peso un diámetro por encima de estos límites (valor  $D_{10}$ ). Preferentemente, el porcentaje en peso de las partículas con un diámetro de partícula 1200 µm, en particular por encima de 1000 µm asciende a menos del 8 % en peso, en particular menos del 5 % en peso y en especial menos del 1 % en peso.

30 Preferentemente, la distribución del tamaño de partícula es estrecha, es decir la desviación del diámetro medio en peso es pequeña. En granulados preferidos, por lo tanto la distribución del tamaño de partícula está caracterizada por un valor  $D_{90}/D_{10} < 3,5$ , en particular  $< 3$ , de manera especialmente preferente  $< 2$  y en especial  $< 1,8$ .

35 Las partículas del granulado pueden presentar en principio una geometría irregular, prefiriéndose partículas con una geometría regular, es decir cilíndrica o esférica. En particular, ha resultado ser favorable cuando las partículas de granulado presentan un factor de redondez  $< 2$ , en particular  $< 1,8$  y en especial  $< 1,6$ . El factor de redondez corresponde a la relación de la superficie media de las partículas de granulado con respecto a la superficie de una esfera, que presenta el diámetro promedio en peso de las partículas de granulado.

40 En una primera forma de realización preferida, las partículas de granulado presentan una geometría esférica o elipsoidal, en la que la relación de diámetro mayor con respecto a diámetro menor no superará preferentemente un valor de 3:1, en particular de 1,5:1 y en especial 1,3:1. En una forma de realización igualmente preferida, la geometría de las partículas de granulado es cilíndrica, encontrándose la relación de diámetro con respecto a longitud preferentemente en el intervalo de 1:1,3 a 1:3. Las partículas de granulado de forma cilíndrica presentan preferentemente extremos redondeados.

45 Los granulados de acuerdo con la invención pueden estar no recubiertos, o las partículas de granulado presentan un recubrimiento, es decir las partículas de granulado comprenden un núcleo A que contiene enzima y un recubrimiento B dispuesto sobre el núcleo.

50 Las partículas de granulado de acuerdo con la invención contienen además de la fitasa preferentemente al menos un material de soporte sólido, adecuado para piensos. En granulados recubiertos, el material de soporte es habitualmente constituyente del núcleo. El material de soporte constituye habitualmente al menos el 50 % en peso, en particular al menos el 55 % en peso y con frecuencia al menos el 60 % en peso de los constituyentes no acuosos del granulado no recubierto o del núcleo, por ejemplo del 50 al 96,9 % en peso, preferentemente del 55 al 94,8 % en peso y en particular del 60 al 89,7 % en peso.

55 Como materiales de soporte apropiados para piensos pueden usarse soportes inorgánicos u orgánicos inertes habituales. Un soporte "inerte" no puede mostrar ninguna interacción negativa con la enzima o las enzimas del aditivo para piensos de acuerdo con la invención, tal como provocan por ejemplo una inhibición irreversible de la actividad enzimática, y debe ser inofensivo para el uso como agente auxiliar en aditivos para piensos. Como

ejemplos de materiales de soporte adecuados pueden mencionarse: compuestos orgánicos de bajo peso molecular así como compuestos orgánicos de alto peso molecular de origen natural o sintético así como sales inorgánicas inertes. Se prefieren materiales de soporte orgánicos. Entre ellos se prefieren especialmente hidratos de carbono.

5 Ejemplos de soportes orgánicos de bajo peso molecular adecuados son en particular azúcares, tal como por ejemplo glucosa, fructosa, sacarosa. Como ejemplos de soportes orgánicos de alto peso molecular se mencionan polímeros de hidrato de carbono, en particular aquellos que contienen unidades  $\alpha$ -D-glucopiranosas, amilosa o amilopectina, en particular almidones nativos y modificados, celulosa microcristalina pero también  $\alpha$ -glucanos y  $\beta$ -glucanos, pectina (inclusive protopectina) y glicógeno. Preferentemente, el material de soporte comprende al menos un hidrato de carbono polimérico insoluble en agua, en particular un material de almidón nativo, tal como en particular almidón de maíz, almidón de arroz, almidón de trigo, almidón de patata, almidones de otras fuentes vegetales tal como almidón de tapioca, mandioca, sagú, centeno, avena, cebada, batata, arruruz y similares, además harinas de cereales, tal como por ejemplo harina de maíz, de trigo, de centeno, de cebada y de avena así como harina de arroz. Son adecuadas en particular también mezclas de los materiales de soporte mencionados anteriormente, en particular mezclas, que, principalmente, es decir en al menos el 50 % en peso, con respecto al material de soporte, comprenden uno o varios materiales de almidón. Preferentemente el hidrato de carbono insoluble en agua constituye al menos el 50 % en peso, en particular al menos el 65 % en peso y en especial al menos el 80 % en peso del material de soporte. Materiales de soporte especialmente preferidos son almidones, que contienen no más del 5 % en peso y en particular no más del 2 % en peso de proteína u otros constituyentes. Un material de soporte preferido adicional es celulosa microcristalina. Esta puede usarse sola o en mezcla con los materiales de soporte mencionados anteriormente. Siempre que la celulosa microcristalina se utilice en mezcla con otros materiales de soporte, constituye preferentemente no más del 50 % en peso, en particular no más del 30 % en peso, por ejemplo del 1 al 50 % en peso, en particular del 1 al 30 % en peso y en especial del 1 al 10 % en peso del material de soporte.

25 Como materiales de soporte inorgánico se tienen en cuenta en principio todos los materiales de soporte inorgánicos conocidos para piensos y aditivos para piensos, por ejemplo sales inorgánicas inertes por ejemplo sulfatos o carbonatos de los metales alcalinos y alcalinotérreos tal como sulfato o carbonato de sodio, de magnesio, de calcio y de potasio, además silicatos compatibles con piensos tal como talco y ácidos silícicos. La cantidad de material de soporte inorgánico, con respecto a la cantidad total de material de soporte, no superará por regla general el 50 % en peso, especialmente el 35 % en peso y muy especialmente el 20 % en peso. En una forma de realización preferida los materiales de soporte orgánicos constituyen la cantidad total o casi la cantidad total, es decir al menos el 95 % en peso del material de soporte.

Además, el granulado contiene al menos una fitasa, pudiendo estar presentes también mezclas de distintas fitasas o mezclas de fitasa con uno o varias enzimas distintas. Enzimas para piensos típicas son, además de fitasa por ejemplo oxidorreductasas, transferasas, liasas, isomerasas, ligasas, lipasas e hidrolasas distintas de fitasa. En 35 granulados recubiertos, la fitasa es habitualmente constituyente del núcleo. Enzimas típicas para piensos se mencionan además de fitasa por ejemplo oxidorreductasas, transferasas, liasas, isomerasas, ligasas, lipasas y en particular hidrolasas distintas de fitasa. Ejemplos de hidrolasas, es decir enzimas, que provocan una escisión hidrolítica de enlaces químicos, son esterasas, glicosidasas, queratinasas, eterhidrolasas, proteasas, amidasas, aminidasas, nitrilasas y fosfatidasas. Las glicosidasas (EC 3.2.1, también denominadas como carbohidrasas) comprenden tanto endo- como exo-glicosidasas, que escinden enlaces tanto  $\alpha$ -glicosídicos como  $\beta$ -glicosídicos. 40 Ejemplos típicos de ello son amilasas, maltasas, celulasas, endo-xilanasas, por ejemplo endo-1,4- $\beta$ -xilanasas o xilan-endo-1,3- $\beta$ -xilosidasas,  $\beta$ -glucanasas, en particular endo-1,4- $\beta$ - y endo-1,3- $\beta$ -glucanasas, manasas, lisozimas, galactosidasas, pectinasas,  $\beta$ -glucuronidasas y similares.

La expresión "fitasa" comprende tanto fitasa natural como cualquier otra enzima, que muestra actividad fitasa, que puede por ejemplo catalizar una reacción mediante la que se libera fósforo o fosfato a partir de fosfatos de mio- 45 inositol. En el caso de la fitasa puede tratarse tanto de una 3-fitasa (EC 3.1.3.8) como de una 4- o 6-fitasa (EC 3.1.3.26) o de una 5-fitasa (EC 3.1.3.72) o de una mezcla de las mismas. Preferentemente la fitasa pertenece a la clase de enzimas EC 3.1.3.8.

La fitasa usada de acuerdo con la invención no está sujeta a ninguna limitación y puede ser tanto de origen 50 microbiológico como ser una fitasa obtenida mediante modificación genética de una fitasa que se produce de manera natural o una fitasa obtenida mediante construcción *de novo*. En el caso de la fitasa puede tratarse de una fitasa de plantas, de hongos, de bacterias o de una fitasa producida por levaduras. Se prefieren fitasas de fuentes microbiológicas tal como bacterias, levaduras u hongos. Sin embargo pueden ser también de origen vegetal. En una forma de realización preferida se trata de una fitasa de una cepa fúngica, en particular de una cepa *Aspergillus*, por ejemplo *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus terreus*. Se prefieren especialmente fitasas, que se derivan de una cepa de *Aspergillus niger* o una cepa de *Aspergillus oryzae*. En otra forma de realización preferida, la fitasa se deriva de una cepa bacteriana, en particular una cepa de *Bacillus*, una cepa de *E. coli* o una cepa de *Pseudomonas*, prefiriéndose entre estas fitasas que se derivan de una cepa de *Bacillus Subtilis*. En otra forma de realización preferida, la fitasa se deriva de una levadura, en particular una cepa de *Kluyveromyces* o una cepa de *Saccharomyces*, prefiriéndose 60 entre ellas fitasas que se derivan de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*. En esta invención, la expresión "una

enzima derivada de fitasa” comprende la fitasa producida de manera natural por la cepa respectiva, que o bien se obtiene de la cepa o bien se codifica por una secuencia de ADN aislada a partir de la cepa y se produce por un organismo huésped, que se transformó con esta secuencia de ADN. La fitasa puede obtenerse a partir del microorganismo respectivo de acuerdo con técnicas conocidas, que habitualmente comprenden la fermentación del microorganismo productor de fitasa un medio nutriente adecuado (véase por ejemplo el catálogo de ATCC) y la obtención posterior de la fitasa a partir del medio de fermentación de acuerdo con técnicas convencionales. Ejemplos de fitasas así como de procedimientos para la producción y el aislamiento de fitasas se encuentran en los documentos EP-A 420358, EP-A 684313, EP-A 897010, EP-A 897985, EP-A 10420358, WO 94/03072, WO 98/54980, WO 98/55599, WO 99/49022, WO 00/43503, WO 03/102174, a cuya divulgación se hace referencia expresamente con el presente documento.

La cantidad de fitasa en el granulado depende naturalmente de acuerdo con la actividad deseada del granulado enzimático y la actividad de la enzima usada y se encuentra habitualmente en el intervalo del 3 al 49,9 % en peso, en particular en el intervalo del 5 al 44,8 % en peso y en especial en el intervalo del 10 al 39,7 % en peso, calculado como masa seca y con respecto al peso total de todos los constituyentes no acuosos del granulado no recubierto, o del núcleo.

En una forma de realización preferida comprenden los constituyentes del granulado no recubierto o del núcleo además del material de soporte apropiado para el pienso al menos un polímero soluble en agua. Este polímero actúa como aglutinante y aumenta al mismo la estabilidad de pelletización. Polímeros solubles en agua preferidos presentan un peso molecular promedio en número en el intervalo de  $5 \times 10^3$  a  $5 \times 10^6$  Dalton, en particular en el intervalo de  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^6$  Dalton. Los polímeros se consideran solubles en agua, cuando pueden disolverse por completo al menos 3 g de polímero en 1 litro de agua.

Entre los polímeros solubles en agua usados de acuerdo con la invención

- polisacáridos, por ejemplo almidones modificados solubles en agua con por regla general propiedades adhesivas, por ejemplo productos de degradación de almidón (dextrinas) tal como dextrinas de ácido, pirodextrinas, hidrolizados parciales enzimáticos (dextrinas límite), almidones degradados de manera oxidativa y sus productos de reacción de dextrinas con polímeros catiónicos o aniónicos, productos de reacción de dextrinas con anhídrido de succinato de octenilo (OSA), cola de almidón, además quitina, quitosano, carragenano, alginatos, sales de ácido arábigo, gomas, por ejemplo goma arábigo, tragacanto, goma karaya; goma xantana y goma gellan; galactomananos; derivados de celulosa solubles en agua, por ejemplo metilcelulosa, etilcelulosa y hidroxialquilcelulosas tal como por ejemplo hidroxietilcelulosa (HEC), hidroxietilmetilcelulosa (HEMC), etilhidroxietilcelulosa (EHEC), hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) e hidroxibutilcelulosa, así como carboximetilcelulosa (CMC);
- proteínas solubles en agua, por ejemplo proteínas de origen animal tal como gelatinas, caseína, en particular caseinato de sodio y proteínas vegetales, tal como proteína de soja, proteína de guisante, proteína de judía, proteína de colza, proteína de girasol, proteína de semilla de algodón, proteína de patata, altramuza, zeína, proteína de trigo, proteína de maíz y proteína de arroz,
- polímeros sintéticos, por ejemplo polietilenglicol, poli(alcohol vinílico) y en particular las marcas Kollidon de la empresa BASF, copolímeros de alcohol vinílico-éster vinílico, homo- y copolímeros de la vinilpirrolidona con acetato de vinilo y/o acrilatos de alquilo  $C_1$ - $C_4$ ,
- y opcionalmente biopolímeros modificados, por ejemplo lignina, polilactida.

Polímeros solubles en agua preferidos son neutros, es decir no presentan ningún grupo ácido o básico. Entre ellos se prefieren especialmente poli(alcoholes vinílicos), inclusive poli(acetatos de vinilo) parcialmente saponificados con un grado de saponificación de al menos el 80 %, así como en particular éteres de celulosa neutros, solubles en agua tal como metilcelulosa, etilcelulosa e hidroxialquilcelulosas tal como por ejemplo hidroxietilcelulosa (HEC), hidroxietilmetilcelulosa (HEMC), etilhidroxietilcelulosa (EHEC), hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) e hidroxibutilcelulosa.

En una forma de realización preferida de la invención, el polímero soluble en agua se selecciona entre éteres de celulosa neutros. Ejemplos de éteres de celulosa neutros, solubles en agua, preferidos, de acuerdo con la invención son metilcelulosa, etilcelulosa e hidroxialquilcelulosas, por ejemplo hidroxietilcelulosa (HEC), hidroxietilmetilcelulosa (HEMC), etilhidroxietilcelulosa (EHEC), hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) e hidroxibutilcelulosa. Entre ellos se prefieren especialmente metilcelulosa, etilcelulosa y éteres de celulosa mixtos con grupos metilo o grupos etilo y grupos hidroxialquilo tal como HEMC, EHEC y HPMC. Éteres de celulosa sustituidos con metilo o etilo presentan un grado de sustitución DS (con respecto a los grupos alquilo) en el intervalo de 0,8 a 2,2 y en el caso de éteres de celulosa mixtos un grado de sustitución DS con respecto a los grupos alquilo en el intervalo de 0,5 a 2,0 y un grado de sustitución HS con respecto a los grupos hidroxialquilo en el intervalo de 0,02 a 1,0.

El porcentaje en polímeros solubles en agua puede variarse en función de la forma de realización a lo largo de amplios intervalos. En el caso de granulados enzimáticos con un constituyente de soporte, su porcentaje en constituyentes no acuosos del granulado enzimático no recubierto o del núcleo constituye preferentemente del 0,1 al 20 % en peso, en particular del 0,2 al 10 % en peso y en especial del 0,3 al 5 % en peso.

- Además, el material que forma el núcleo o el granulado no recubierto puede contener adicionalmente una sal que estabiliza la enzima. En el caso de las sales de acción estabilizante se trata habitualmente de sales de cationes divalentes, en particular de sales del calcio, magnesio o de zinc, así como de sales de cationes monovalentes, en particular de sodio o de potasio, por ejemplo los sulfatos, carbonatos, hidrogenocarbonatos y los fosfatos inclusive hidrogenofosfatos y hidrogenofosfatos de amonio de estos metales. Sales preferidas son los sulfatos. Se prefieren especialmente sulfato de magnesio y sulfato de zinc, inclusive sus hidratos. La cantidad de sal se encuentra preferentemente en el intervalo del 0,1 al 10 % en peso, en particular en el intervalo del 0,2 al 5 % en peso, y en especial en el intervalo del 0,3 al 3 % en peso, con respecto al peso total de todos los constituyentes no acuosos del material de núcleo o del granulado no recubierto.
- Los granulados de acuerdo con la invención presentan por regla general un contenido en agua por debajo del 15 % en peso, con frecuencia en el intervalo del 1 al 12 % en peso, en particular en el intervalo del 3 al 10 % en peso y en especial en el intervalo del 5 al 9 % en peso, con respecto al peso del granulado que contiene enzima. De acuerdo con una forma de realización preferida de la invención las partículas de granulado del granulado enzimático comprenden
- a) un núcleo, que comprende al menos una fitasa y al menos un material de soporte sólido adecuado para piensos, y
  - b) un recubrimiento dispuesto sobre el núcleo.

Con respecto a la estabilidad de peletización ha resultado ser ventajoso cuando el granulado no recubierto, o los núcleos del granulado recubierto o de todas las partículas, después de la trituración necesaria durante la suspensión o disolución en agua desionizada a 25 °C dan como resultado un valor de pH en el intervalo de 4,5 a 6,5, preferentemente de 4,6 a 6 y de manera especialmente preferente de 4,7 a 5,5. Por regla general, para la determinación del valor de pH se disuelven 5 g de los núcleos no recubiertos o núcleos recubiertos a 25 °C en 200 ml de agua desionizada y se determina después de 30 min el valor de pH que va a ajustarse con un electrodo de vidrio o con un aparato de medición de valor de pH.

Por consiguiente de acuerdo con una forma de realización preferida de la invención los constituyentes que forman el núcleo o el granulado no recubierto comprenden además de la fitasa así como los constituyentes adicionales opcionalmente presentes tal como material de soporte sólido y aglutinante al menos un agente para el ajuste de un valor de pH de 4,5 a 6,5, preferentemente de 4,6 a 6 y de manera especialmente preferente de 4,7 a 5,5 por ejemplo un tampón o una base, esto último en particular cuando los materiales que forman el núcleo presentan por su parte grupos ácido.

Sustancias adecuadas para el ajuste del valor de pH son suficientemente conocidas por el experto, por ejemplo por Küster-Thiel, Rechen tafeln für die chemische Analytik, 102ª edición, 1982, Walter deGruyter-Verlag y Handbook of Chemistry and Physics, 76ª ed. 1995-1996, CRS Press 8-38 y siguientes; Norma DIN cuaderno 22, Directrices para la medición de pH en instalaciones industriales, Berlín: Beuth 1974; DIN 19266 (agosto de 1979); DIN 19267 (agosto de 1978); Naturwissenschaften 65, 438 y sig. (1978). Kontakte (Merck) 1981, N° 1, 37-43.

Ejemplos de tampones adecuados son acetato, propionato, tartrato, hidrogenocarbonato, ftalato, hidrogenoftalato, en particular las sales de sodio, de potasio o de calcio, de las sustancias mencionadas anteriormente, inclusive sus hidratos o dihidratos, tampón fosfato, fosfato de potasio o de sodio, sus hidratos o dihidratos, carbonato de sodio o de potasio. Ejemplos de bases adecuados son carbonato de sodio o de potasio, hidróxido de sodio, de potasio, de calcio, de magnesio, de amonio o agua amoniacal o sus óxidos.

La cantidad de tampón o base se encuentra habitualmente en el intervalo del 0,1 al 5 % en peso, con respecto al peso total de los constituyentes no acuosos, que forman el núcleo o el granulado no recubierto. En principio no debe tener lugar ninguna adición del tampón, cuando los constituyentes del material de núcleo en la composición presente en el núcleo dan como resultado ya un valor de pH de este tipo. En particular ha dado buen resultado un granulado que puede obtenerse mediante un procedimiento en el que para la producción del granulado se usa un concentrado enzimático acuoso, que a 25 °C presenta un valor de pH en el intervalo de 4,5 a 6,5, preferentemente de 4,6 a 6 y de manera especialmente preferente de 4,7 a 5,5. A este respecto, el valor de pH del concentrado enzimático se determina directamente con un electrodo de vidrio o con un aparato de medición del valor de pH.

Siempre que las partículas de los granulados enzimáticos de acuerdo con la invención presenten al menos un recubrimiento dispuesto en el núcleo de las partículas, éste cubre la superficie de los núcleos preferentemente en al menos el 80 % (valor medio) y en particular por completo.

La relación en peso de núcleo con respecto a recubrimiento se encuentra en preferentemente en el intervalo de 70:30 a 99:1, preferentemente en el intervalo de 75:25 a 98:2, en particular en el intervalo de 80:20 a 96:4 y en especial en el intervalo de 85:15 a 95:5, pudiendo ser también ventajoso en algunos casos mayores porcentajes de recubrimiento, por ejemplo en el caso de recubrimientos de sal.

Habitualmente, los tamaños de partícula de los granulados enzimáticos recubiertos, de acuerdo con la invención corresponden a los de los granulados no recubiertos o los núcleos, que se designan a continuación también como granulados brutos. En otras palabras, en granulados recubiertos, la relación de diámetro de partícula medio del

granulado recubierto con respecto al diámetro de partícula medio del granulado bruto no superará por regla general un valor de 1,1:1 y en particular un valor de 1,09:1.

En principio son adecuados todos los tipos de recubrimientos, que se conocen por el estado de la técnica para granulados enzimáticos. Se prefieren recubrimientos hidrófobos, es decir recubrimientos, cuyos constituyentes no son solubles o sólo solubles de manera limitada en agua. Por consiguiente una forma de realización especialmente preferida de acuerdo con la invención se refiere a granulados enzimáticos que contienen fitasa, cuyas partículas presentan un recubrimiento, que se compone en al menos el 90 % en peso de sustancias hidrófobas insolubles en agua.

Como materiales hidrófobos se tienen en cuenta para el recubrimiento hidrófobo tanto sustancias poliméricas como sustancias oligoméricas o de bajo peso molecular. De acuerdo con la invención, los materiales hidrófobos presentan un alto porcentaje de hidrocarburo, constituyendo el porcentaje de carbono e hidrógeno por regla general al menos el 80 % en peso, en particular al menos el 85 % en peso del material hidrófobo. Se prefieren aquellas sustancias, que presentan un punto de fusión por encima de 30 °C, preferentemente por encima de 40 °C, en particular por encima de 45 °C y en especial por encima de 50 °C, o en el caso de sustancias que no funden, son sólidas a estas temperaturas o presentan una temperatura de transición vítrea por encima de estas temperaturas. Se prefieren materiales hidrófobos con puntos de fusión en el intervalo de 40 a 95 °C, en particular en el intervalo de 45 a 80 °C, y de manera especialmente preferente en el intervalo de 50 a 70 °C.

Preferentemente el material hidrófobo es pobre en ácido y presenta un índice de acidez por debajo de 80, en particular por debajo de 30 y en especial por debajo de 10 (determinado de acuerdo con la norma ISO 660).

Ejemplos de materiales hidrófobos adecuados de acuerdo con la invención son

- poliolefinas tales como polietileno, polipropileno y polibutenos;
- ácidos grasos saturados con preferentemente 10 a 32 átomos de C, con frecuencia de 12 a 24 átomos de C y en particular de 16 a 22 átomos de C;
- ésteres de ácidos grasos saturados, preferentemente mono-, di- y triglicéridos así como ésteres de ácidos grasos saturados con alcoholes grasos. Los alcoholes grasos presentan por ejemplo de 10 a 32 átomos de C, en particular de 16 a 24 átomos de C, tal como alcohol cetílico o alcohol estearílico. Los ácidos grasos o los restos de ácido graso en los ésteres de ácido graso presentan preferentemente de 10 a 32, con frecuencia de 12 a 24 átomos de C y en particular de 16 a 22 átomos de C;
- ceras, en particular ceras vegetales y ceras de origen animal, pero también cera de Montana y ceras de éster de Montana;
- poli(acetatos de vinilo);
- polímeros y copolímeros de (met)acrilato de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, preferentemente aquellos con un peso molecular promedio en número de aproximadamente 100.000 a 1.000.000; en particular copolímeros de acrilato de etilo /metacrilato de metilo y copolímeros de acrilato de metilo/acrilato de etilo.

En una forma de realización preferida, el material que forma el recubrimiento se compone en al menos el 70 % en peso, especialmente en al menos el 80 % en peso, en particular en al menos el 90 % en peso de al menos una sustancia seleccionada entre ácidos grasos saturados, ésteres de ácido graso y sus mezclas (a continuación denominado abreviado como "grasas"), prefiriéndose ésteres de ácido graso y en particular triglicéridos. Saturado significa que el material hidrófobo está esencialmente libre de constituyentes insaturados y por consiguiente presenta un índice de yodo por debajo de 5 y en particular por debajo de 2 (método de acuerdo con Wijs, norma DIN 53 241).

En particular preferentemente el recubrimiento se compone en al menos el 70 % en peso, en particular al menos el 80 % en peso y en especial al menos el 90 % en peso de los triglicéridos mencionados anteriormente.

En una forma de realización preferida de la invención, el agente de recubrimiento contiene principalmente, es decir en al menos el 70 % en peso, en particular al menos el 80 % en peso y en especial por encima del 90 % en peso de aceites vegetales hidrogenados, en particular triglicéridos de origen vegetal, por ejemplo aceite de semilla de algodón, de maíz, de cacahuete, de soja, de palma, de palmiste, de babasú, de colza, de girasol y de cártamo hidrogenados. Entre ellos son aceites vegetales hidrogenados especialmente preferidos aceite de palma, aceite de semilla de algodón y aceite de soja hidrogenados. El aceite vegetal hidrogenado más preferido es aceite de soja hidrogenado. De igual manera son adecuados también otras grasas y ceras que proceden de plantas y animales, por ejemplo grasa de sebo bovino. Son adecuadas también grasas y ceras idénticas a las naturales, es decir ceras y grasas sintéticas con una composición que corresponde principalmente a la de los productos naturales.

La siguiente tabla menciona algunos ejemplos de materiales de recubrimiento adecuados de acuerdo con la invención:

| Nombre              | Composición                   | Intervalo de fusión | Nº de CAS / INCI           |
|---------------------|-------------------------------|---------------------|----------------------------|
| Cutina CP de Cognis | palmitato de cetilo sintético | 46 - 51 °C          | 95912-87-1 Cetyl Palmitate |

(continuación)

| Nombre  | Composición   | Intervalo de fusión | Nº de CAS / INCI                |
|---|---|---------------------|---------------------------------|
| Edenor NHTI-G de Cognis                             | triglicérido  | 56 - 60 °C          | 67701-27-3*                     |
| Edenor NHTI-V de Cognis                             | triglicérido  | 57 - 60 °C          | 67701-27-3* EINECS<br>266-945-8 |
| Edenor C1892 de Cognis                              | ácido esteárico, C16 -18                            | 66 - 99 °C          |                                 |
| Edenor HPA de Cognis                                | ácidos grasos, aceite de palma, hidrogenado, C16-18 | 55 - 57 °C          |                                 |
| Edenor HRAGW de Cognis                              | ácidos grasos, C 16 -22                             | 64 - 66 °C          |                                 |
| Edenor C2285R de Cognis                             | ácidos grasos, C18 -22                              | 75 - 78 °C          | 68002-88-0*                     |
| Rilanit de Cognis                                   | triglicérido  | 83 - 90 °C          |                                 |
| Sustituto de cera de Japón de Kahl -Wachsraffinerie | principalmente éster de glicerol de ácido palmítico | 49 - 55 °C          | rhus succedanea                 |
| Tefacid de Karlshamns                               | Aceite de palmiste Tefacid Palmic 90                | 65 °C               | 57-10-3                         |
| Polvo de grasa de soja de Sankyu/Japón              |   | 65 - 70 °C          |                                 |

5 Son grasas adecuadas además los productos comercializados con el nombre comercial Vegeol PR de la empresa Aarhus Olie, DK, por ejemplo Vegeol® PR 267, PR 272, PR 273, PR 274, PR 275, PR 276, PR 277, PR 278 y PR 279.

10 Como ceras son adecuadas como material de recubrimiento en particular ceras de origen animal tal como cera de abejas y cera de lana, ceras de origen vegetal tal como cera de candelilla, cera de carnauba, cera de azúcar de caña, cera de carandaí, cera de rafia, cera de Columbia, cera de esparto, cera de alfalfa, cera de bambú, cera de cáñamo, cera de abeto douglasia, cera de corcho, cera de sisal, cera de lino, cera de algodón, cera de dammar, cera de cereales, cera de arroz, cera de ocatilla, cera de adelfa, cera de montana, ceras de éster de montana, ceras de polietileno, además los productos comercializados con el nombre comercial Wükonil, Südranol, Lubranil o Mikronil de la empresa Süddeutsche Emulsions-Chemie, o los productos con el nombre comercial Poligen WE1, WE3, WE4, WE6, WE7, WE8 BW, WE9 de BASF.

15 Materiales de recubrimiento hidrófobos adecuados son además las siguientes poliolefinas: poliisopreno, polibutadieno y poliisobuteno de alto peso molecular y de peso molecular medio.

20 En polímeros y copolímeros de (met)acrilato de alquilo preferidos, el grupo alquilo presentan de 1 a 4 átomos de carbono. Como ejemplos concretos de copolímeros adecuados se mencionan: copolímeros de acrilato de etilo/metacrilato de metilo, que se comercializan por ejemplo con los nombres comerciales Kollicoat EMM 30D de BASF AG o con el nombre comercial Eudragit NE 30 D de la empresa Degussa; así como copolímeros de metacrilato/acrilato de etilo, tal como se comercializan por ejemplo con el nombre comercial Kollicoat MAE 30DP de BASF AG o con el nombre comercial Eudragit 30/55 de la empresa Degussa en forma de una dispersión acuosa.

Como ejemplos de dispersiones de poli(acetato de vinilo) pueden mencionarse aquellas que están estabilizadas con polivinilpirrolidona y se comercializan por ejemplo con el nombre comercial Kollicoat SR 30D de BASF AG (contenido en sólidos de la dispersión aproximadamente del 20 al 30 % en peso).

25 En otra forma de realización de la invención el recubrimiento comprende sustancias poliméricas, que presentan en agua una solubilidad por lo menos limitada. Ejemplos de ellas son

a) polialquilenglicoles, en particular polietilenglicoles, preferentemente aquellos con un peso molecular promedio en número de aproximadamente 400 a 15.000, tal como por ejemplo de aproximadamente 400 a 10.000;

30 b) polímeros o copolímeros de poli(óxido de alquileo), preferentemente aquellos con un peso molecular promedio en número de aproximadamente 4.000 a 20.000, tal como por ejemplo de aproximadamente 7.700 a 14.600; en particular copolímeros de bloque de polioxitileno y polioxipropileno;

c) polivinilpirrolidona, preferentemente con un peso molecular promedio en número de aproximadamente 7.000 a 1.000.000, tal como por ejemplo de aproximadamente 44.000 a 54.000;

35 d) copolímeros de vinilpirrolidona/acetato de vinilo, preferentemente aquellos con un peso molecular promedio en número de aproximadamente 30.000 a 100.000, tal como por ejemplo de aproximadamente 45.000 a 70.000;

e) poli(alcoholes vinílicos), preferentemente aquellos con un peso molecular promedio en número de aproximadamente 10.000 a 200.000, tal como por ejemplo de aproximadamente 20.000 a 100.000;

5 f) celulosas modificadas o derivados de celulosa, tal como por ejemplo hidroxipropilmetilcelulosa, preferentemente con un peso molecular promedio en número de aproximadamente 6.000 a 80.000, tal como por ejemplo de aproximadamente 12.000 a 65.000; pero también metilcelulosa, etilcelulosa e hidroxialquilcelulosas tal como por ejemplo hidroxietilcelulosa (HEC), hidroxietilmetilcelulosa (HEMC), etilhidroxietilcelulosa (EHEC), hidroxipropilcelulosa (HPC) y

g) copolímeros de injerto de poli(alcohol vinílico)-polietilenglicol;

10 (h) almidones modificados (por ejemplo productos de reacción de anhídrido de succinato de octenilo (OSA) y almidón).

Como ejemplos polialquilenglicoles adecuados a) se mencionan: polipropilenglicoles y en particular polietilenglicoles de diferente peso molecular, tal como por ejemplo PEG 4000 o PEG 6000, que pueden obtenerse de BASF AG con los nombres comerciales Lutrol® E 4000 y Lutrol® E 6000 así como las marcas Kollidon de la empresa BASF.

15 Como ejemplos de los polímeros b) anteriores se mencionan: poli(óxidos de etileno) y poli(óxidos de propileno), polímeros mixtos de óxido de etileno/óxido de propileno así como copolímeros de bloque, formados a partir de bloques de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno), tal como por ejemplo polímeros que pueden obtenerse de BASF AG con el nombre comercial Lutrol® F68 y Lutrol® F127.

20 Como ejemplos de los polímeros c) anteriores se mencionan: polivinilpirrolidonas, tal como se comercializan por ejemplo por BASF AG con el nombre comercial Kollidon® o Luviskol®.

Como ejemplo de los polímeros d) mencionados anteriormente se menciona: un copolímero de vinilpirrolidona/acetato de vinilo, que se comercializa por BASF AG con el nombre comercial Kollidon® VA64.

Como ejemplos de los polímeros e) anteriores se mencionan: productos, tal como se comercializan por ejemplo por la empresa Clariant con el nombre comercial Mowiol®.

25 Como ejemplos de polímeros f) adecuados se mencionan: hidroxipropilmetilcelulosas, tal como se comercializan por ejemplo por Shin Etsu con el nombre comercial Pharmacoat®.

Ejemplos de los polímeros g) son los productos comercializados con el nombre comercial Kollicoat® IR de BASF Aktiengesellschaft.

30 Se entiende que los granulados enzimáticos de acuerdo con la invención, además del recubrimiento hidrófobo pueden presentar también uno o varios, por ejemplo 1, 2 o 3 recubrimientos adicionales, que se componen de otros materiales, por ejemplo los recubrimientos que se enseñan en el estado de la técnica. De acuerdo con la invención es esencial que al menos un recubrimiento se compone de materiales hidrófobos, pudiendo estar dispuesta esta capa de manera aleatoria y en particular está dispuesta directamente sobre el núcleo que contiene enzima. Existe también la posibilidad de que en el caso de al menos una capa se trate de una capa de sal o de una capa que se compone en al menos el 30 % de sal. A este respecto estará dispuesta una capa de sal de este tipo preferentemente entre el núcleo y la capa exterior. Las sales mencionadas más arriba pueden mencionarse en este caso como ejemplo.

40 Los granulados enzimáticos de acuerdo con la invención pueden producirse de manera análoga a procedimientos de producción conocidos para granulados enzimáticos, por ejemplo de manera análoga a los modos de proceder descritos en los documentos WO 98/54980, WO 98/55599, WO 01/00042, WO 03/059086, WO 03/059087, WO 2004/108911 o PCT/EP 2005/000826.

De acuerdo con una forma de realización preferida el procedimiento comprende las siguientes etapas:

45 a) proporcionar un granulado bruto que contiene fitasa, no recubierto, que comprende al menos una fitasa y al menos un material de soporte sólido adecuado para piensos, y que presenta por regla general un contenido en agua por debajo del 15 % en peso, con frecuencia en el intervalo del 1 al 12 % en peso, en particular en el intervalo del 3 al 10 % en peso y en especial en el intervalo del 5 al 9 % en peso, con respecto al peso del granulado bruto que contiene enzima, y  
b) recubrir el granulado bruto.

50 La producción del granulado bruto puede tener lugar en principio de cualquier manera. Por ejemplo puede procesarse una mezcla, que comprende el soporte apropiado para piensos, al menos un derivado de celulosa neutro, soluble en agua y al menos una enzima y opcionalmente otros constituyentes tal como agua, tampón, sales de metal estabilizantes, mediante extrusión, granulación en mezcladora, granulación en lecho fluidizado, aglomeración en plato o compactación, de manera en sí conocida para dar un granulado bruto. La producción de granulados no recubiertos tiene lugar de igual manera que la producción del granulado bruto, con la diferencia de

que el granulado no se recubre.

En una forma de realización preferida la producción del granulado bruto comprende en una primera etapa la extrusión de una masa que contiene agua, que comprende al menos una enzima y al menos un material de soporte inerte, preferentemente sólido, y opcionalmente otros constituyentes tal como agua, tampón, sales de metal estabilizantes y aglutinante en las cantidades indicadas anteriormente.

Preferentemente, la producción de la masa comprende un ajuste del valor de pH, de tal manera que la masa, al suspenderse en agua, presenta un valor de pH en el intervalo de 4,5 a 6,5, preferentemente de 4,6 a 6 y de manera especialmente preferente de 4,7 a 5,5. El ajuste del valor de pH puede tener lugar mediante la adición de un tampón o de una base a la masa. Preferentemente, se efectúa un ajuste del valor de pH de la masa, de tal manera que se produce la masa con el uso de un concentrado enzimático acuoso, cuyo valor de pH durante la dilución se encuentra en el intervalo de 4,5 a 6,5, preferentemente de 4,6 a 6 y de manera especialmente preferente de 4,7 a 5,5. Dado que el concentrado enzimático presenta con frecuencia un valor de pH débilmente ácido por debajo de 4, se añade preferentemente un tampón o una base. Bases adecuadas son además de amoníaco, agua amoniacal e hidróxido de amonio hidróxidos, citratos, acetatos, formiatos, carbonatos e hidrogenocarbonatos de metal alcalino e hidróxidos de metal alcalinotérreo, así como aminas y óxidos de metal alcalinotérreo tal como CaO y MgO. Ejemplos de agentes de tamponamiento inorgánicos son hidrogenofosfatos de metal alcalino, en particular hidrogenofosfatos de sodio y de potasio, por ejemplo  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$  y  $Na_2HPO_4$ . Un agente preferido para el ajuste del valor de pH es amoníaco o agua amoniacal, NaOH, KOH. Tampones adecuados son por ejemplo mezclas de las bases mencionadas anteriormente con ácidos orgánicos tal como ácido acético, ácido fórmico, ácido cítrico.

El material de soporte constituye por regla general del 50 al 96,9 % en peso, preferentemente del 55 al 94,8 % en peso y en particular del 60 al 89,7 % en peso de los constituyentes no acuosos de la masa. El al menos uno, aglutinante polimérico, soluble en agua, constituye por regla general del 0,1 al 10 % en peso, preferentemente del 0,15 al 5 % en peso, en particular del 0,2 al 2 % en peso y en especial del 0,3 al 1 % en peso, de los constituyentes no acuosos de la masa. La al menos una enzima constituye por regla general del 3 al 49,9 % en peso, en particular en el intervalo del 5 al 44,8 % en peso y en especial en el intervalo del 10 al 39,7 de los constituyentes no acuosos de la masa. El porcentaje de otros constituyentes corresponde a los porcentajes de cantidades indicados anteriormente para la composición del núcleo o del granulado no recubierto.

Además de los constituyentes mencionados anteriormente, la masa contiene agua en una cantidad que garantiza la homogeneización suficiente de los constituyentes que forman la masa y una consistencia suficiente (plastificación) de la masa para la extrusión. La cantidad de agua necesaria para ello puede determinarse por un experto del campo de la formulación de enzimas de manera en sí conocida. El porcentaje de agua en la masa se encuentra habitualmente en el intervalo de > 15 al 50 % en peso, en particular en el intervalo del 20 al 45 % en peso y en especial en el intervalo del 25 al 40 % en peso, con respecto al peso total de la masa.

La producción de la masa tiene lugar de manera en sí conocida mediante mezclado de los constituyentes que forman la masa en un dispositivo de mezclado adecuado, por ejemplo en una mezcladora o amasadora habitual. Para ello se mezclan de manera intensiva el o los sólidos, por ejemplo el material de soporte, con la fase líquida, por ejemplo agua, una solución acuosa de aglutinante o un concentrado enzimático acuoso. Por regla general se introduce el soporte como sólido en la mezcladora y se mezcla con un concentrado enzimático acuoso así como con el polímero soluble en agua, preferentemente en forma de una solución acuosa separada o se disuelve en el concentrado enzimático acuoso, así como opcionalmente con la sal estabilizante, preferentemente en forma de una solución o suspensión acuosa separada, en particular disuelta o suspendida en el concentrado enzimático acuoso. Opcionalmente se agregará agua adicional para el ajuste de la consistencia deseada de la masa. Preferentemente, durante el mezclado no se superará una temperatura de 60 °C, en particular de 40 °C. De manera especialmente preferente, la temperatura de la masa durante el mezclado asciende a de 10 a 30 °C. Opcionalmente se enfriará por lo tanto el dispositivo de mezclado durante la producción de la masa.

La masa así obtenida se somete a continuación a una extrusión, preferentemente a una extrusión a baja presión. La extrusión, en particular la extrusión a baja presión, tiene lugar por regla general en un aparato, en el que se presiona la pasta que va a extruirse (masa) a través de una matriz. El diámetro de orificio de la matriz determina el diámetro de partícula y se encuentra por regla general en el intervalo de 0,3 a 2 mm y en particular en el intervalo de 0,4 a 1,0 mm. Son extrusoras adecuadas por ejemplo extrusoras de cúpula o extrusoras de jaula, que se comercializan, entre otras, por empresas tal como Fitzpatrick o Bepex. En el caso de la consistencia correcta de la masa que va a granularse resulta en este sentido un aumento de temperatura sólo bajo al atravesar la matriz (hasta aproximadamente 20 °C). Preferentemente la extrusión tiene lugar bajo control de la temperatura, es decir la temperatura de la masa no superará durante la extrusión una temperatura de 70 °C, en particular de 60 °C. En particular, la temperatura de la masa durante la extrusión se encuentra en el intervalo de 20 a 50 °C.

Las hebras de masa que salen de la extrusora se rompen en partículas granulosas cortas o pueden romperse opcionalmente con ayuda de dispositivos de corte adecuados. Las partículas de granulado así obtenidas presentan habitualmente un tamaño de grano homogéneo, es decir una distribución de tamaño de grano estrecha.

De esta manera se obtiene un granulado bruto con un contenido en agua comparativamente alto, que por regla general asciende a más del 15 % en peso, por ejemplo en el intervalo del 15 al 50 % en peso, en particular en el intervalo del 20 al 45 % en peso, con respecto al peso total del granulado bruto húmedo. De acuerdo con la invención, se seca por lo tanto antes del recubrimiento de manera que su contenido en agua no ascienda a más del 15 % en peso y preferentemente se encuentre en el intervalo del 1 al 12 % en peso, en particular en el intervalo del 3 al 10 % en peso y en especial en el intervalo del 5 al 9 % en peso.

Por regla general se llevará a cabo a continuación un confeccionamiento del granulado bruto. El confeccionamiento comprende por consiguiente por regla general una etapa de secado. Ésta tiene lugar preferentemente en un secador de lecho fluidizado. En este sentido se conduce un gas calentado, por regla general aire o una corriente de nitrógeno desde abajo a través de la capa de producto. La cantidad de gas se ajusta habitualmente de modo que se fluidifican las partículas y se arremolinan. Mediante la transferencia de calor de gas/partículas se evapora el agua. Dado que los granulados brutos que contienen enzima son por regla general lábiles a la temperatura, se prestará atención a que la temperatura del granulado bruto no aumente demasiado, es decir por regla general no por encima de 80 °C y preferentemente no por encima de 70 °C. En particular, la temperatura del granulado durante el secado se encuentra en el intervalo de 30 a 70 °C. La temperatura de secado puede controlarse de manera sencilla a través de la temperatura de la corriente de gas. La temperatura de la corriente de gas se encuentra habitualmente en el intervalo de 140 a 40 °C y en particular en el intervalo de 120 a 60 °C. El secado puede tener lugar de manera continua y de manera discontinua.

Después del secado puede fraccionarse (opcionalmente) el granulado también por medio de un tamiz. El material grueso y el material fino pueden molerse y devolverse a la mezcladora para el macerado de la masa de granulación.

Así mismo, ha resultado ser ventajoso redondear, es decir esferonizar, el granulado bruto aún húmedo antes de la realización del secado. En este sentido se reduce en particular la formación de porcentajes de polvo indeseados en el producto final.

Dispositivos adecuados para el redondeo de los granulados brutos húmedos son los denominados esferonizadores, que presentan esencialmente un disco que gira en horizontal, sobre el que se presionan los extruidos mediante la fuerza centrífuga contra la pared. Los extruidos se rompen contra las microrranuras fijadas mediante el proceso de extrusión, de modo que se generan partículas cilíndricas con una relación de diámetro con respecto a longitud de aproximadamente 1:1,3 a 1:3. Mediante la sollicitación mecánica en el esferonizador se redondean aproximadamente las partículas en primer lugar cilíndricas.

De acuerdo con una forma de realización adicional la producción del granulado bruto tiene lugar mediante Secado por pulverización, granulación por pulverización, aglomeración por pulverización, compactación, granulación en mezcladora de alta cizalladura o aparatos similares, y procedimientos, en los que se introduce energía mecánica en forma de elementos constructivos móviles y/o la incorporación de una corriente de gas y así tiene lugar la formación de partículas o la producción de granulado bruto.

Representa una alternativa adicional también la producción de granulado bruto mediante absorción. En este caso se pone en contacto el concentrado enzimático o una solución enzimática con un material de soporte (mediante adición o rociado de la solución). Como materiales de soporte se tienen en cuenta los materiales de soporte mencionados anteriormente. La enzima se difunde con el disolvente presente en la solución, preferentemente agua, durante este procedimiento parcialmente o por completo en el material de soporte. El disolvente, preferentemente agua, puede eliminarse a continuación o en paralelo mediante procedimientos térmicos. Esto puede tener lugar por ejemplo en un lecho fluidizado, un secador de lecho fluidizado u otro secador.

A continuación, el granulado bruto así obtenido puede recubrirse. Para ello se aplicará de manera en sí conocida uno de los materiales de recubrimiento mencionados anteriormente sobre el granulado bruto. La aplicación del material que forma el recubrimiento puede tener lugar de manera en sí conocida mediante aplicación de una solución, dispersión o suspensión del material que forma el recubrimiento en un disolvente adecuado, por ejemplo agua, o mediante aplicación de una masa fundida del material. La aplicación de una masa fundida se prefiere de acuerdo con la invención, porque con ello puede prescindirse de la eliminación posterior del disolvente o agente de dispersión. Es decir, que para la aplicación de una masa fundida no es necesario el uso de un secador/aparato de recubrimiento caro (por ejemplo de un secador de lecho fluidizado), sino que se hace posible el uso de una mezcladora. El recubrimiento con una masa fundida del material se denomina en lo sucesivo también como recubrimiento en fundido.

Procedimientos adecuados para la aplicación del recubrimiento comprenden el recubrimiento en un lecho fluidizado o en capa turbulenta, así como el recubrimiento en una mezcladora (de manera continua o discontinua), por ejemplo en un tambor de granulación, una mezcladora de reja, por ejemplo de la empresa Lödige, una mezcladora de paletas por ejemplo de la empresa Forberg, una mezcladora nauta, una mezcladora de granulación, una secadora de granulación, un aparato de recubrimiento de vacío por ejemplo de la empresa Forberg o un granulador de alta cizalladura.

En particular, el recubrimiento del granulado bruto tiene lugar

- i) en un lecho fluidizado o en la capa turbulenta, por ejemplo mediante rociado del granulado bruto con una masa fundida, una solución o una dispersión del material que forma el recubrimiento; así como  
 ii) en uno de los dispositivos de mezclado mencionados anteriormente mediante introducción del granulado bruto en una masa fundida del material que forma el recubrimiento o mediante rociado o riego del granulado bruto con una masa fundida, una solución o dispersión del material que forma el recubrimiento.

El recubrimiento mediante rociado del granulado bruto con una masa fundida, una solución o una dispersión en un lecho fluidizado o en la capa turbulenta se prefiere especialmente de acuerdo con la invención. El rociado del granulado bruto con una masa fundida, una solución o dispersión del material puede llevarse a cabo en el aparato de lecho fluidizado en principio en el procedimiento de *Bottom-Spray* (la tobera se apoya en el fondo de entrada y se pulveriza hacia arriba) o en el procedimiento de *Top-Spray* (el recubrimiento se inyecta desde arriba en el lecho fluidizado).

El recubrimiento del granulado bruto puede llevarse a cabo en el contexto del procedimiento de acuerdo con la invención de manera continua o discontinua.

De acuerdo con una primera forma de realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, el granulado bruto se dispone previamente en una capa turbulenta, se arremolina y se recubre mediante rociado de una dispersión acuosa o no acuosa, preferentemente acuosa, del material que forma el recubrimiento con este material. Para ello se usa preferentemente un líquido lo más concentrado posible, aún pulverizable, tal como por ejemplo una dispersión acuosa del 10 al 50 % en peso o solución o dispersión no acuosa del material.

El rociado de la solución o dispersión del material se lleva a cabo preferentemente de modo que se dispone previamente el granulado bruto en un aparato de lecho fluidizado o una mezcladora y con calentamiento simultáneo del recipiente se rocía el material de pulverización. El aporte de energía tiene lugar en el aparato de lecho fluidizado mediante contacto con gas de secado calentado, con frecuencia aire. Un precalentamiento de la solución o dispersión puede ser útil cuando de esta manera puede pulverizarse material de pulverización con mayor porcentaje de sustancia seca. En el caso del uso de fases líquidas orgánicas es conveniente una recuperación del disolvente y se prefiere el uso de nitrógeno como gas de secado para evitar mezclas explosivas. La temperatura de producto durante el recubrimiento se encontrará en el intervalo de aproximadamente 30 a 80 °C y en particular en el intervalo de 35 a 70 °C y en especial en el intervalo de 40 a 60 °C. El recubrimiento puede llevarse a cabo en el aparato de lecho fluidizado en principio en el procedimiento de *Bottom-Spray* (la tobera se apoya en el fondo de entrada y se pulveriza hacia arriba) o en el procedimiento de *Top-Spray* (el recubrimiento se inyecta desde arriba en el lecho fluidizado). En el caso del uso de una mezcladora para el recubrimiento, después del rociado de la solución o dispersión debe eliminarse el disolvente o el líquido de la dispersión. Esto puede llevarse a cabo en una secadora.

De acuerdo con una segunda forma de realización especialmente preferida del procedimiento de acuerdo con la invención el recubrimiento del granulado bruto dispuesto previamente en una capa turbulenta o mezcladora tiene lugar por medio de una fusión del material que forma el recubrimiento. El recubrimiento en fundido en un lecho fluidizado se lleva a cabo preferentemente de modo que se dispone previamente el granulado bruto que va a recubrirse en el aparato de lecho fluidizado. El material previsto para el recubrimiento se funde en un depósito exterior y se bombea por ejemplo a través de una conducción calentable hacia la tobera pulverizadora. Un calentamiento del gas de tobera es conveniente. La tasa de pulverización y la temperatura de entrada de la masa fundida se ajustan preferentemente de modo que el material discorra aún adecuadamente sobre la superficie del granulado y recubre el mismo de manera uniforme. Un precalentamiento del granulado antes de la inyección de la masa fundida es posible. En el caso de materiales con alto punto de fusión se seleccionará por regla general la temperatura de modo que se evite una pérdida de actividad enzimática en su mayor parte. La temperatura de producto se encontrará por lo tanto preferentemente en el intervalo de aproximadamente 30 a 80 °C y en particular en el intervalo de 35 a 70 °C y en especial en el intervalo de 40 a 60 °C. También el recubrimiento en fundido puede llevarse a cabo en principio de acuerdo con el procedimiento de *Bottom-Spray* o de acuerdo con el procedimiento de *Top-Spray*.

El recubrimiento en fundido en una mezcladora puede llevarse a cabo de dos maneras distintas. O bien se dispone previamente el granulado que va a recubrirse en una mezcladora adecuada y se pulveriza o riega una masa fundida del material en la mezcladora. Otra posibilidad consiste en mezclar el material hidrófobo que se encuentra en forma sólida con el producto. Mediante alimentación de energía a través de la pared del recipiente o a través de la herramienta de mezclado se funde el material hidrófobo y se recubre así el granulado bruto. Según sea necesario puede añadirse de vez en cuando algo de agente de separación. Agentes de separación adecuados son por ejemplo ácido silícico, talco, estearatos y fosfato de tricalcio, o sales tal como sulfato de magnesio, sulfato de sodio o carbonato de calcio.

A las soluciones, dispersiones o masas fundidas usadas para el recubrimiento pueden añadirse opcionalmente otros aditivos, tal como por ejemplo celulosa microcristalina, talco y caolín, o sales.

En una forma de realización de acuerdo con la invención especial del procedimiento puede prescindirse de la adición de agentes de separación durante la aplicación del material o la adición de agente de separación a la solución, dispersión o masa fundida que va a aplicarse. Esto es en particular posible cuando los núcleos de enzima usados

5 presentan tamaños de partícula medios de al menos 300  $\mu\text{m}$ , preferentemente al menos 350  $\mu\text{m}$ , en particular al menos 400  $\mu\text{m}$ , por ejemplo se encuentran en el intervalo de 300 a 800  $\mu\text{m}$ , preferentemente en el intervalo de 350  $\mu\text{m}$  a 750  $\mu\text{m}$  y en particular en el intervalo de 400  $\mu\text{m}$  a 700  $\mu\text{m}$ , y al mismo tiempo la cantidad de material de recubrimiento usado con respecto al peso total no asciende a más del 30 % en peso, preferentemente no más del 25 % en peso, en particular no más del 20 % en peso y en especial no más del 17 % en peso. En estos casos pueden recubrirse los núcleos de enzima de manera especialmente adecuada sin aglomeración de las partículas.

10 La adición de un agente auxiliar de flujo después de la etapa de recubrimiento puede mejorar las propiedades de flujo del producto. Agentes auxiliares de flujo típicos son ácidos silícicos, por ejemplo los productos Sipemat de la empresa Degussa o los productos Tixosil de la empresa Rhodia, talco y estearatos y fosfato de tricalcio o sales tal como sulfato de magnesio, sulfato de sodio o carbonato de calcio. Los agentes auxiliares de flujo se añaden, con respecto al peso total del producto, en una cantidad del 0,005 % en peso al 5 % en peso al producto recubierto. Contenidos preferidos son del 0,1 % en peso al 3 % en peso y de manera especialmente preferente son del 0,2 % en peso al 1,5 % en peso.

15 En un aspecto adicional de la invención, los granulados enzimáticos recubiertos o no recubiertos se mezclan con un material de soporte inerte, para producir así un aditivo para piensos, que presente una actividad enzimática menor que el granulado enzimático. Materiales de soporte preferidos son los materiales de soporte mencionados anteriormente o sustancias orgánicas, tal como por ejemplo salvado, sémola, grano partido o harinas de centeno, patata, trigo, maíz u otras materias primas renovables, preferentemente materias primas que se usan habitualmente en piensos animales.

20 Otro objeto de la invención se refiere a composiciones de pienso, en particular composiciones de pienso peletizado, que además de los constituyentes habituales contienen al menos un aditivo para piensos de acuerdo con la definición anterior como añadidura.

25 Por último, la invención se refiere también al uso de un aditivo para piensos de acuerdo con la definición anterior para la producción de composiciones de pienso, en particular de composiciones de pienso tratadas de manera hidrotérmica y en especial de composiciones de pienso peletizado.

30 Para la producción de las composiciones de pienso se mezclan los granulados enzimáticos recubiertos o no recubiertos producidos de acuerdo con la invención con piensos animales habituales (tal como por ejemplo pienso para engorde de los cerdos, pienso para lechones, pienso para cerdas, pienso para pollos y pienso para pavos). El porcentaje de granulado enzimático se selecciona de modo que el contenido en enzima se encuentre por ejemplo en el intervalo de 10 a 1000 ppm. A continuación se peletiza el pienso con ayuda de una prensa de peletización adecuada. Para ello se acondiciona la mezcla de pienso habitualmente mediante introducción de vapor y a continuación se presiona a través de una matriz. En función de la matriz pueden producirse así pelets de aproximadamente 2 a 8 mm de diámetro. La temperatura de proceso más alta aparece a este respecto durante el acondicionamiento o al presionar la mezcla a través de la matriz. En este caso pueden alcanzarse temperaturas en el intervalo de aproximadamente 60 a 100 °C.

35 Los siguientes ejemplos sirven para explicar la invención

Ejemplo 1 (no de acuerdo con la invención):

40 a) En un concentrado acuoso de fitasa con un contenido en masa seca de aproximadamente el 25 al 35 % en peso, un valor de pH en el intervalo de 3,7-3,9 y una actividad de 26000 a 36000 FTU/g se disolvieron a 4-10 °C sulfato de zinc hexahidratado al 1 % en peso, con respecto al concentrado.

45 b) En una mezcladora con cuchilla de cortador periódico se dispusieron previamente 700 g de almidón de maíz y 52 g de celulosa microcristalina, se homogeneizó y se añadió a ello lentamente a temperaturas de 10 a 30 °C bajo homogeneización al mismo tiempo 630 g del concentrado de fitasa que contiene sulfato de zinc y 20 g de agua. Se homogeneizó con enfriamiento de la mezcladora durante 5 min más a temperaturas en el intervalo de 10 a 50 °C, se paso entonces la masa así obtenida a una extrusora de cúpula y se extruyó la masa a temperaturas en el intervalo de 30 a 50 °C a través de una matriz con un diámetro de orificio de 0,7 mm dando hebras de 5 cm de longitud.

50 c) El extruido así obtenido se redondeó en una máquina de redondeo (tipo P50, empresa Glatt) durante 5 min a 350  $\text{min}^{-1}$  (velocidad de giro del plato giratorio) y a continuación se secó en una secadora de lecho fluidizado (capa turbulenta de laboratorio Aeromat tipo MP-1 de la empresa Niro-Aeromatic) a una temperatura de hasta 40 °C (temperatura de producto) hasta una humedad residual de aproximadamente el 6 % en peso.

El granulado así obtenido presentaba una actividad de aproximadamente 18700 FTU/g. Los granulados tenían un tamaño de grano de como máximo 1300  $\mu\text{m}$  y un tamaño de partícula medio de 580  $\mu\text{m}$  (análisis de tamizado).

55 Se obtuvo un producto con la siguiente composición:

Composición:

|   |                                       |                |
|---|---------------------------------------|----------------|
| 5 | almidón de maíz                       | 62,4 % en peso |
|   | fitasa (masa seca)                    | 26 % en peso   |
|   | celulosa microcristalina:             | 5 % en peso    |
|   | sulfato de zinc (ZnSO <sub>4</sub> ): | 0,6 % en peso  |
|   | humedad residual:                     | 6 % en peso    |

**Ejemplo 2:**

10 A partir del granulado enzimático del Ejemplo 1 se obtuvo por medio de tamiz vibrador (empresa Retsch) se obtuvo una fracción de porcentaje de finos. Para ello se añadieron 200 g del granulado enzimático en un tamiz con el ancho de malla 425 µm y se tamizaron durante 15 min. Pudo obtenerse un porcentaje de finos (<425 µm) de 38 g. Los granulados de este porcentaje de finos tenían un tamaño de partícula medio de aproximadamente 410 µm (determinado por Mastersizer S). La actividad del porcentaje de finos ascendió a 18800 FTU/g.

**Ejemplo 3 (no de acuerdo con la invención):**

15 A partir del granulado enzimático del Ejemplo 1 se obtuvo por medio de tamiz vibrador (empresa Retsch) una fracción de partículas gruesas. Para ello se añadieron 200 g del granulado enzimático en tamices con el ancho de malla 850 y 600 µm y se tamizaron durante 10 min. Pudo obtenerse una fracción intermedia (>600 µm y <850 µm) de 28 g. Los granulados de esta fracción intermedia gruesa tenían un tamaño de partícula medio de 750 µm (determinado por medio de análisis de tamizado). La actividad del porcentaje de gruesos ascendió a 18800 FTU/g.

Ensayo 1: Determinación de la exactitud de dosificación

20 Para evaluar la exactitud de dosificación de los granulados enzimáticos descritos en los Ejemplos 2 y 3 se llevó a cabo, tal como se describe a continuación, un ensayo de mezclado con posterior determinación de la actividad enzimática. Para ello se dispuso previamente 1 kg de un pienso con una mezcladora Lödige y se homogeneizó. Como pienso se usó un pienso para pollos habitual en la práctica con la siguiente composición:

|                                      |         |
|--------------------------------------|---------|
| Maíz                                 | 53,79 % |
| Granos partidos de soja HP           | 36,00 % |
| Aceite de soja                       | 6,00 %  |
| DL-Metionina                         | 0,31 %  |
| L-Lisina                             | 0,10 %  |
| Treonina                             | 0,05 %  |
| Sal para ganado                      | 0,38 %  |
| Cal para pienso                      | 1,32 %  |
| Cloruro de colina al 50 %            | 0,10 %  |
| Bolifor MCP-F                        | 1,45 %  |
| Vitamina/premezcla de oligoelementos | 0,50 %  |

25 Se ajustó entonces en cada caso mediante la adición del granulado enzimático del Ejemplo 2 y 3 una actividad objetivo calculatoria en el pienso de 500 FTU/kg. Para ello debió añadirse, basándose en la actividad analizada del granulado enzimático en cada caso 0,0267 g del granulado del Ejemplo 2 o Ejemplo 3. Se mezcló en cada caso durante 10 min. Después del mezclado se tomaron de cada preparación en cada caso 10 muestras de en cada caso 50 g y se determinó su actividad enzimática. En la siguiente tabla están resumidos los resultados:

| Granulado   | Granulado del Ej. 2 | Granulado del Ej. 3 |
|---|---------------------|---------------------|
| Diámetro de partícula medio [µm]                      | 410                 | 750                 |
| Actividad del granulado [FTU/g]                       | 18800               | 18800               |
| Cantidad de granulado pesada sobre 1 kg de pienso [g] | 0,0267              | 0,0267              |
| Actividad objetivo en el pienso [FTU/kg]              | 500                 | 500                 |
| Actividad en el pienso, muestra 1 [FTU/kg]            | 755                 | 604                 |
| Actividad en el pienso, muestra 2 [FTU/kg]            | 475                 | 886                 |
| Actividad en el pienso, muestra 3 [FTU/kg]            | 585                 | 589                 |
| Actividad en el pienso, muestra 4 [FTU/kg]            | 822                 | 279                 |
| Actividad en el pienso, muestra 5 [FTU/kg]            | 493                 | 1126                |
| Actividad en el pienso, muestra 6 [FTU/kg]            | 544                 | 729                 |
| Actividad en el pienso, muestra 7 [FTU/kg]            | 289                 | 507                 |
| Actividad en el pienso, muestra 8 [FTU/kg]            | 582                 | 509                 |

30

(continuación)

| Granulado   | Granulado del Ej. 2 | Granulado del Ej. 3 |
|---|---------------------|---------------------|
| Actividad en el pienso, muestra 9 [FTU/kg]                | 587                 | 1107                |
| Actividad en el pienso, muestra 10 [FTU/kg]               | 530                 | 683                 |
| Actividad media en el pienso [FTU/kg]                     | 566                 | 702                 |
| Desviación estándar de la actividad en el pienso [FTU/kg] | <b>147</b>          | <b>270</b>          |

La desviación estándar de la actividad en el pienso en el caso del granulado más grueso (Ej. 3) es mayor que en el caso del granulado del Ejemplo 2.

## REIVINDICACIONES

1. Granulado enzimático que contiene fitasa para piensos, cuyas partículas presentan un tamaño de partícula promedio en peso en el intervalo de 350 a 550  $\mu\text{m}$  y cuya actividad fitasa específica, expresada en FTU/g, asciende al menos a 7000 y no supera un valor de

$$5 \quad \text{FTU}_{\text{max}} = 2000 [\text{FTU g}^{-1}] \cdot D^{-3} \cdot \text{mm}^3$$

en la que D representa el diámetro de partícula promedio en peso de las partículas de granulado en mm.

2. Granulado enzimático de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el 90 % en peso de las partículas presentan un diámetro de partícula de más de 100  $\mu\text{m}$  (valor  $D_{10}$ ).

10 3. Granulado enzimático de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que el 90 % en peso de las partículas presentan un diámetro de partícula de no más de 1200  $\mu\text{m}$  (valor  $D_{90}$ ).

4. Granulado enzimático de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que la distribución del tamaño de partícula de las partículas de granulado está caracterizada por un valor  $D_{90}/D_{10} < 3,5$ .

5. Granulado enzimático de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que las partículas del granulado presentan un factor de redondez inferior a 2.

15 6. Granulado enzimático de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores que comprende además de la fitasa al menos un material de soporte sólido adecuado para piensos.

7. Granulado enzimático de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que las partículas del granulado presentan

20 A) un núcleo, que comprende al menos una fitasa y al menos un material de soporte sólido adecuado para piensos, y  
b) un recubrimiento dispuesto sobre el núcleo.

25 8. Granulado enzimático de acuerdo con la reivindicación 7, en el que al menos un recubrimiento dispuesto sobre la superficie del núcleo se compone en al menos el 70 % en peso de sustancias, seleccionadas entre ceras, ácidos grasos saturados, los ésteres de ácidos grasos saturados, poliolefinas, derivados de celulosa, poli(acetato de vinilo), polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico), copolímeros de acetato de vinilo/vinilpirrolidona, polialquilenglicoles y sus mezclas.

9. Granulado enzimático de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 u 8, en el que el al menos un recubrimiento dispuesto sobre la superficie del núcleo se compone en al menos el 90 % en peso de sustancias hidrófobas insolubles en agua.

30 10. Granulado enzimático de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 a 9, en el que la relación en peso de núcleo con respecto a recubrimiento se encuentra en el intervalo de 70:30 a 99:1.

11. Granulado enzimático de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 a 10, en el que el material de soporte comprende al menos un hidrato de carbono polimérico insoluble en agua.

35 12. Granulado enzimático de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente un aglutinante soluble en agua.

13. Granulado enzimático de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el aglutinante soluble en agua se selecciona entre poli(alcohol vinílico) y polisacáridos solubles en agua.

14. Granulado enzimático de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el aglutinante polimérico, soluble en agua comprende un éter de celulosa neutro, en particular metilcelulosa.

40 15. Granulado enzimático de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores que comprende adicionalmente una sal que estabiliza la enzima.

16. Granulado enzimático de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la sal se selecciona entre sulfato de zinc y sulfato de magnesio.

45 17. Uso de un granulado enzimático que contiene fitasa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 16 en piensos.

18. Pienso, que contiene al menos un granulado enzimático que contiene fitasa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 16 y constituyentes de pienso habituales.

19. Pienso de acuerdo con la reivindicación 18 en forma de un pienso peletizado.