

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 580**

51 Int. Cl.:

A23K 20/189 (2006.01)

A23K 10/00 (2006.01)

A23K 20/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2007 E 07802509 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2051590**

54 Título: **Gránulos de enzima para pienso para animales**

30 Prioridad:

07.08.2006 DK 200601037

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

08.07.2016

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

**MARCUSSEN, ERIK y
JENSEN, POUL ERIK**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 576 580 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

Gránulos de enzima para pienso para animales

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a gránulos de enzima especialmente para pienso para animales. La presente invención además se refiere a la fabricación de dichos gránulos.

10 Antecedentes de la invención

[0002] En la técnica en lo que se refiere a pienso para animales es un hecho bien conocido que la granulación del pienso es un desiderátum, ya que la granulación del pienso aumenta la digestibilidad de especialmente la fracción de almidón del pienso.

15 Además, es conocido que la granulación de pienso para animales reduce problemas de polvo. En el proceso de producción de gránulos de pienso es considerado necesario tratar con vapor el pienso triturado para matar microorganismos patógenos si están presentes y gelatinizar parcialmente el almidón para mejorar las propiedades físicas de los gránulos, con lo cual un tratamiento de vapor de alrededor de 70-120°C es apropiado. Compuestos activos presentes en los gránulos de pienso tales como enzimas no son muy estables a alta temperatura o humedad, y por lo tanto, se tiene que usar un exceso grande de enzimas, o componentes de pienso sin enzimas se granulan y se tratan con vapor, donde después un lodo o solución que contiene enzimas es recubierto sobre los gránulos tratados con vapor. Sin embargo, este proceso de recubrimiento es voluminoso y frecuentemente no es compatible con el equipo triturador de pienso.

25 Un intento para obtener gránulos de enzimas mejorados para pienso es descubierto en WO 92/12645. WO 92/12645 describe gránulos-T, que son recubiertos con una grasa o una cera. Dichos gránulos-T se mezclan con componentes de pienso tratados con vapor y posteriormente se granulan. Con esta invención era posible tratar térmicamente los gránulos que comprendían enzimas y evitar el recubrimiento voluminoso con enzimas después del tratamiento térmico.

30 El uso de gránulos-T recubiertos de cera fue una mejora significativa en este campo ya que era posible mantener una actividad enzimática aceptable durante la granulación con vapor. Otro intento para mejorar la estabilidad de la granulación de gránulos de enzimas es descrito en WO 2006034710 donde se ha descubierto que el recubrimiento de los gránulos de enzimas con un recubrimiento de sal mejora la estabilidad de la granulación.

35 Sin embargo algunos molinos de pienso son ejecutados bajo condiciones muy agresivas que son todavía muy agresivas para los gránulos de enzimas mejorados, por lo tanto sigue habiendo una demanda para una estabilidad de la granulación mejorada. Además el inconveniente con el recubrimiento de los gránulos enzimáticos es un paso adicional del proceso. La presente invención proporciona estabilidad de granulación óptima y hace opcional la etapa de recubrimiento.

40 [0003] Es descrito en WO 99/32595 el uso de sulfato de cobre como recubrimiento de barrera en gránulos enzimáticos para estabilizar gránulos enzimáticos para detergentes. Es también conocido en la técnica usar sales inorgánicas de zinc y magnesio para estabilizar gránulos enzimáticos, ver WO 97/05245.

45 **RESUMEN DE LA INVENCION**

[0004] Un objeto de la presente invención es proporcionar un gránulo enzimático con buena estabilidad de granulación.

50 Un segundo objeto de la presente invención es proporcionar un simple proceso para obtener gránulos enzimáticos con buena estabilidad de granulación.

Se ha descubierto sorprendentemente que los iones de cobre tienen un efecto positivo en la estabilidad enzimática durante la granulación si se formulan junto con la enzima.

55 La presente invención proporciona así en un primer aspecto un gránulo adecuado para pienso que comprende una mezcla de una enzima y un donador de iones de Cu en una cantidad entre 1 y 600 Cu²⁺/molécula de proteína enzimática.

1. La presente invención además proporciona un método para fabricación de una composición de pienso que incluye las etapas de:

- 60 i. mezclar componentes de pienso con los gránulos de cualquier reivindicación precedente,
- ii. tratar con vapor dicha composición (i), y
- iii. granular dicha composición (ii).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

65 **Introducción**

[0005] Hemos descubierto sorprendentemente que es posible aumentar la estabilidad de enzimas comprendidas en gránulos durante la granulación con vapor añadiendo un donador de iones de cobre.

Además hemos identificado que la cantidad de iones de cobre adicionada tiene que ser ajustada de manera que se optimice la estabilidad de granulación pero sin destruir por se la estabilidad de la enzima, que parece aparentemente reducirse si cantidades demasiado altas de Cu están presentes en el gránulo enzimático.

Definiciones

[0006] Mediante el término "donador de iones de Cu" o "donador de iones de cobre" se entiende un compuesto que comprende cobre, y que es capaz de proveer iones de cobre a la composición de la invención.

Mediante el término "solución" se entiende una mezcla homogénea de dos o más sustancias.

Mediante el término "suspensión" se entiende partículas finas suspendidas en un líquido.

[0007] Mediante el término "tamaño de partícula" se entiende el diámetro medio de masa de los gránulos.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado según lo entiende comúnmente un experto en la materia a la que esta invención pertenece.

Como se usa en la especificación y reivindicaciones, el singular "un", "uno" y "el" incluyen las referencias plurales a menos que el contexto especifique claramente lo contrario.

Por ejemplo, el término gránulo puede incluir una pluralidad de gránulos.

El gránulo

[0008] Cuando se hace referencia al gránulo de la presente invención éste puede bien ser un único gránulo o diferentes gránulos.

El gránulo de la presente invención que es particularmente bien adecuado para la granulación con vapor y como parte de una composición de pienso granulada tratada con vapor, comprende una región que comprende enzimas donde un donador de iones de cobre está presente para estabilizar la enzima.

Según la presente invención la enzima y donador de iones de cobre están presentes en una matriz homogénea.

La matriz que comprende la enzima y donador de iones de cobre puede comprender otros componentes auxiliares.

Se ha encontrado que tamaños de partícula adecuados del gránulo de la presente invención son 50-2000 μm , tal como 50-800 μm , o 75-700 μm , más particular 100-1000 μm .

El gránulo de la presente invención puede en una forma de realización particular tener un tamaño de partícula por debajo de 700 μm .

En otra forma de realización particular de la presente invención el tamaño de partícula del gránulo final es 100-800 μm .

En una forma de realización más particular de la presente invención el tamaño de partícula del gránulo final es 300-600 μm .

En una forma de realización más particular de la presente invención el tamaño de partícula es 450-550 μm .

En otra forma de realización particular de la presente invención el tamaño de partícula del gránulo final es inferior a 400 μm .

En otra forma de realización más particular el tamaño de partícula de los gránulos de la presente invención es superior a 250 μm e inferior a 350 μm .

En una forma de realización particular de la presente invención el tamaño de partícula del gránulo de la presente invención es entre 210 y 390 μm .

La matriz que comprende enzimas

[0009] La matriz o región que comprende enzimas del gránulo puede ser el núcleo del gránulo, una capa que rodea el núcleo, o el gránulo como tal si la estructura del gránulo es homogénea en todo el gránulo.

Puede haber capas presentes entre la capa enzimática y el núcleo, o la capa enzimática puede estar al lado del núcleo.

El núcleo puede ser una partícula inerte.

[0010] La región que comprende enzimas puede ser una mezcla homogénea que comprende una enzima y un donador de iones de cobre, o una partícula inerte con una capa matricial que incluye una enzima y un donador de iones de cobre aplicado sobre esta.

La partícula de núcleo que bien consiste en una mezcla homogénea comprendiendo la enzima y el donador de iones de cobre o bien consiste en una partícula inerte sobre la cual una capa comprendiendo la enzima y donador de iones de cobre es aplicada tiene en una forma de realización particular un tamaño de partícula de 20-800 μm .

En una forma de realización más particular de la presente invención el tamaño de partícula del núcleo es 50-500 μm .

En una forma de realización aún más particular de la presente invención el tamaño de partícula del núcleo es 100-300 μm .

En una forma de realización más particular de la presente invención el tamaño de partícula del núcleo es 150-250 μm .

En otra forma de realización particular de la presente invención el tamaño de partícula del núcleo es 400-500 μm .

La partícula del núcleo comprendiendo la enzima tiene en una forma de realización particular un tamaño de partícula

de 20-800 µm.

En una forma de realización más particular de la presente invención el tamaño de partícula del núcleo es 50-500 µm.

En una forma de realización aún más particular de la presente invención el tamaño de partícula del núcleo es 100-300 µm.

5 En una forma de realización más particular de la presente invención el tamaño de partícula del núcleo es 150-250 µm.

En otra forma de realización particular de la presente invención el tamaño de partícula del núcleo es 400-500 µm.

[0011] Partícula inerte:

10 Partículas inertes tales como partículas de placebo, partículas portadoras, núcleos inactivos, partículas inactivas, partículas sin igual, partículas o semillas no activas, son partículas que no comprenden enzimas o solo una cantidad menor de enzimas sobre la cual una mezcla de recubrimiento que comprende la enzima pueden ser estratificadas.

Se pueden formular con materiales orgánicos o inorgánicos tales como sales inorgánicas, azúcares, polialcoholes, moléculas orgánicas pequeñas tales como ácidos orgánicos o sales, almidón, harina, harina tratada, celulosa,

15 polisacáridos, minerales tales como arcillas o silicatos o una combinación de dos o más de estos.

En una forma de realización particular de la presente invención las partículas para ser recubiertas son partículas inactivas.

En una forma de realización más particular de la presente invención el material de las partículas del núcleo es seleccionado del grupo consistente en sales inorgánicas, harina, polialcoholes, moléculas orgánicas pequeñas,

20 almidón, celulosa y minerales.

Partículas inertes se pueden producir por una variedad de técnicas de granulación incluyendo: cristalización, precipitación, recubrimiento en bombo, recubrimiento de lecho fluido, aglomeración de lecho fluido, atomización giratoria, extrusión, formación de perlas, esfertonización, métodos de reducción de tamaño, granulación en tambor, y/o granulación de alta cizalladura.

25

Enzimas

[0012] La enzima en el contexto de la presente invención puede ser cualquier enzima o una combinación de diferentes enzimas que son adecuadas para ser dadas a un animal, lo que significa que de una manera u otra será

30 nutricionalmente bueno para el animal que se coma la enzima.

Por consiguiente, cuando se hace referencia a "una enzima" esto en general se entenderá para incluir una enzima o una combinación de enzimas.

En una forma de realización particular no se interpreta como incluyendo enzimas que tienen una función terapéutica en el sentido médico/farmacéutico.

35 Las enzimas de pienso deberían ser de calidad de pienso/alimento, lo que significa por tanto que estas no pueden ser nocivas para el animal y ser de una calidad de pienso/alimento que deberían cumplir especificaciones de pureza recomendada para enzimas de calidad alimenticia.

En una forma de realización particular esto significa que la enzima cumple con especificaciones de pureza recomendada para enzimas de calidad alimentaria dada por la Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos

40 Alimentarios (JECFA) y el código sobre los productos químicos alimentarios (FCC).

La enzima debe en una forma de realización particular comprender menos de 30 bacterias coliformes por gramo y comprender una cuenta viable inferior a 50000/g.

45 Los gránulos de la invención incluyen entre aproximadamente 0.0005 a aproximadamente 20 % en una base de peso en seco del componente enzimático del gránulo.

Por ejemplo, el porcentaje en peso de enzima en las formas de realización de la invención comprende al menos 0.0005 a aproximadamente 15%, al menos 0.001 a aproximadamente 15%, al menos 0.01 hasta aproximadamente 10%, al menos 0.1 hasta aproximadamente 10%, al menos 1.0 hasta aproximadamente 10%, al menos 1.0 hasta

50 aproximadamente 8%, al menos 1.0 hasta aproximadamente 5%, y al menos 2.0 hasta al menos 5% en el gránulo.

Dosis típicas de 25 a 400 gramos de los gránulos estables enzimáticos por tonelada de pienso entregarán aproximadamente 0.0001 a aproximadamente 80 gramos de proteína enzimática activa por tonelada de pienso, y los gránulos enzimáticos se pueden dosificar hasta tanto como 5000 gramos por tonelada de pienso.

55 Debe entenderse que variantes enzimáticas (producidas, por ejemplo, por técnicas recombinantes) se incluyen en el significado del término "enzima".

Ejemplos de tales variantes enzimáticas se describe, por ejemplo en EP 251,446 (Genencor), WO 91/00345 (Novo Nordisk), EP 525,610 (Solvay) y WO 94/02618 (Gist-Brocades NV).

60 Las enzimas se pueden clasificar basándose en el manual Enzyme Nomenclature de NC-IUBBM, 1992), ver también la página ENZYME en internet: <http://www.expasy.ch/enzyme/>. ENZYME es un repositorio de información relativa a la nomenclatura de enzimas.

Está principalmente basada en las recomendaciones de Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUB-MB), Academic Press, Inc., 1992, y describe cada tipo de enzima

65 caracterizada para el cual un número de EC (Comisión Enzimática) ha sido proporcionado (Bairoch A. The ENZYME database, 2000, Nucleic Acids Res 28:304-305).

Esta nomenclatura enzimática de IUB-MB se basa en su especificidad de sustrato y ocasionalmente en su mecanismo molecular; tal clasificación no refleja las características estructurales de estas enzimas.

70

[0013] Otra clasificación de ciertas enzimas glicósido hidrolasa, tal como endoglucanasa, xilanasas, galactanasas,

75

mananasa, dextranasa y alfa-galactosidasa, en familias basadas en similitudes de secuencias de aminoácidos ha sido propuesta hace años.

Actualmente se incluyen en 90 familias diferentes: ver el sitio de internet CAZy(ModO) (Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) servidor de enzimas activas de carbohidrato en URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZy/index.html> (papeles correspondientes: Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. En "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering", H.J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat and B. Svensson eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 3-12; Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) The modular structure of cellulases and other carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. En "Genetics, Biochemistry and Ecology of Cellulose Degradation", K. Ohmiya, K. Hayashi, K. Sakka, Y. Kobayashi, S. Karita y T. Kimura eds., Uni Publishers Co., Tokio, págs. 15-23).

Los tipos de enzimas que se pueden incorporar en gránulos de la invención incluyen oxidorreductasas (EC 1.-.-), transferasas (EC 2.-.-), hidrolasas (EC 3.-.-), liasas (EC 4.-.-), isomerasas (EC 5.-.-) y ligasas (EC 6.-.-). Oxidorreductasas preferidas en el contexto de la invención son peroxidasas (EC 1.11.1), lacasas (EC 1.10.3.2) y glucosa oxidasas (EC 1.1.3.4). Un ejemplo de una oxido-reductasa disponible comercialmente (EC 1.-.-) es Gluzyne™ (enzima disponible por Novozymes A/S).

Otras oxidorreductasas están disponibles de otros proveedores.

Transferasas preferidas son transferasas en cualquiera de las siguientes sub-clases:

a transferasas que transfieren grupos mono-carbono (EC 2.1)

b transferasas que transfieren residuos de aldehído o de cetona (EC 2.2); aciltransferasas (EC 2.3)

c glicosiltransferasas (EC 2.4)

d transferasas que transfieren grupos alquilo o arilo, aparte de grupos metilo (EC 2.5); y

e transferasas que transfieren grupos nitrogenados (EC 2.6).

Un tipo más preferido de transferasa en el contexto de la invención es una transglutaminasa (proteína-glutamina γ -glutamilttransferasa; EC 2.3.2.13).

Otros ejemplos de transglutaminasas adecuadas están descritos en WO 96/06931 (Novo Nordisk A/S).

[0014] Hidrolasas preferidas en el contexto de la invención son: hidrolasas de éster carboxílico (EC 3.1.1.-) tales como lipasas (EC 3.1.1.3) fitasas (EC 3.1.3.-), por ejemplo 3-fitasas (EC 3.1.3.8) y 6-fitasas (EC 3.1.3.26) glicosidasas (EC 3.2, que caen dentro de un grupo denominado aquí como "carbohidrasas"), tales como α -amilasas (EC 3.2.1.1); peptidasas (EC 3.4, también conocidas como proteasas); y otras carbonil hidrolasas.

Ejemplos de fitasas disponibles comercialmente incluyen fitasa de Bio-Feed™ (Novozymes), Ronozyme™ P (DSM Nutritional Products), Natuphos™ (BASF), Finase™ (enzimas AB), y la serie de productos de Phyzyme™ (Danisco). Otras fitasas preferidas incluyen aquellas descritas en WO 98/28408, WO 00/43503, y WO 03/066847.

En el presente contexto, el término "carbohidrasa" se utiliza para indicar no solo enzimas capaces de descomponer cadenas de carbohidrato (por ejemplo almidones o celulosa) de especialmente estructuras anulares de cinco y de seis elementos (es decir glicosidasas, EC 3.2), pero también enzimas capaces de isomerizar carbohidratos, por ejemplo estructuras anulares de seis elementos tal como D-glucosa hasta estructuras anulares de cinco elementos tal como D-fructosa.

Carbohidrasas relevantes incluyen las siguientes (números EC en paréntesis): α -amilasas (EC 3.2.1.1), β -amilasas (EC 3.2.1.2), glucano 1,4- α -glucosidasas (EC 3.2.1.3), endo-1,4-beta-glucanasa (celulasas, EC 3.2.1.4), endo-1,3(4)- β -glucanasas (EC 3.2.1.6), endo-1,4- β -xilanasas (EC 3.2.1.8), dextranasas (EC 3.2.1.11), quitinasas (EC 3.2.1.14), poligalacturonasas (EC 3.2.1.15), lisozimas (EC 3.2.1.17), β -glucosidasas (EC 3.2.1.21), α -galactosidasas (EC 3.2.1.22), β -galactosidasas (EC 3.2.1.23), amilo-1,6-glucosidasas (EC 3.2.1.33), xilano 1,4- β -xilosidasas (EC 3.2.1.37), glucano endo-1,3- β -D-glucosidasas (EC 3.2.1.39), α -dextrina endo-1,6- α -glucosidasas (EC3.2.1.41), sacarosa α -glucosidasas (EC 3.2.1.48), glucano endo-1,3- α -glucosidasas (EC 3.2.1.59), glucano 1,4- β -glucosidasas (EC 3.2.1.74), glucano endo-1,6- β -glucosidasas (EC 3.2.1.75), galactanasas (EC 3.2.1.89), arabinano endo-1,5- α -L-arabinosidasas (EC 3.2.1.99), lactasas (EC 3.2.1.108), quitosanasas (EC 3.2.1.132) y xilosa isomerasas (EC 5.3.1.5).

[0015] En el presente contexto una fitasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de fitato (mioinositol hexakisfosfato) a (1) mioinositol y/o (2) mono-, di-, tri-, tetra- y/o penta-fosfatos de los mismos y (3) fosfato inorgánico. Tres diferentes tipos de fitasas son conocidos: una denominada 3-fitasa (nombre alternativo 1-fitasa; una mioinositol hexafosfato 3-fosfohidrolasa, EC 3.1.3.8), llamada 4-fitasa (nombre alternativo 6-fitasa, nombre basado en el sistema de numeración 1L y no de numeración 1D, EC 3.1.3.26), y una llamada 5-fitasa (EC 3.1.3.72). Para los fines de la presente invención, los tres tipos se incluyen en la definición de fitasa.

Para los fines de la actividad de fitasa de la presente invención puede ser, preferiblemente es, determinado en la unidad de FYT, una FYT que es la cantidad de enzima que libera 1 micro-mol ortofosfato inorgánico por min. bajo las siguientes condiciones: pH 5.5; temperatura 37°C; sustrato: fitato de sodio (C₆H₆O₂₄P₆Na₁₂) en una concentración de 0.0050 mol/l.

Ensayos de fitasa adecuados están descritos en ejemplo 1 de WO 00/20569.

FTU es para determinar la actividad de fitasa en el pienso y premezcla.

Ejemplos preferidos de fitasas son fitasas microbianas, tales como fitasas fúngicas o bacterianas, por ejemplo derivadas de los siguientes:

i. Ascomicetos, tales como los descritos en EP 684313 o US 6139902; *Aspergillus awamori* PHYA (SWISSPROT P34753, gen 133:55-62 (1993)); *Aspergillus niger* (ficuum) PHYA (SWISSPROT P34752, Gene 127:87-94 (1993), EP 420358); *Aspergillus awamori* PHYB (SWISSPROT P34755, Gene 133:55-62 (1993)); *Aspergillus niger* PHYB

- (SWISSPROT P34754, Biochem. Biophys. Res. Commun. 195:53-57(1993)); *Emericella nidulans* PHYB (SWISSPROT 000093, Biochim. Biophys. Acta 1353:217-223 (1997));
- ii. *Thermomyces* o *Humicola*, tal como la fitasa de *Thermomyces lanuginosus* descrita en WO 97/35017;
- iii. Basidiomicetos, tal como *Peniophora* (WO 98/28408 y WO 98/28409);
- 5 iv. Otras fitasas fúngicas tales como las descritas en JP 11000164 (fitasa de *Penicillium*), o WO98/13480 (*Monascus anka* fitasa);
- v. *Bacillus*, tal como *Bacillus subtilis* PHYC (SWISSPROT 031097, Appl. Environ. Microbiol. 64:2079-2085 (1998)); *Bacillus* sp. PHYT (SWISSPROT 066037, FEMS Microbiol. Lett. 162:185-191 (1998)); *Bacillus subtilis* PHYT (SWISSPROT P42094, J. Bacteriol. 177:6263-6275 (1995)); la fitasa descrita en AU 724094, o WO 97/33976;
- 10 vi. *Escherichia coli* (por ejemplo US 6110719);
- vii. *Citrobacter*, tal como *Citrobacter freundii* (descrita en WO 2006/038062, WO 2006/038128, o con la secuencia de UniProt Q676V7), *Citrobacter braakii* (descrita en WO 2004/085638 (Geneseq ADU50737), y WO 2006/037328), y *Citrobacter amalonaticus* o *Citrobacter gillienii* (descrita en WO 2006/037327);
- viii. Otras fitasas bacterianas como la fitasa de *Buttiauxella* (descritas en WO 2006/043178);
- 15 ix. Fitasas de levadura, por ejemplo de *Schwanniomyces occidentalis* (por ejemplo descrita en US 5830732); al igual que
- x. Una fitasa con una secuencia de aminoácidos de al menos 75% de identidad a una secuencia de aminoácidos madura de cualquiera de las fitasas de (i)-(ix);
- 20 xi. Una variante de la fitasa de (i)-(ix) que comprende una sustitución, eliminación, y/o inserción de uno o varios aminoácidos;
- xii. Una variante alélica de la fitasa de (i)-(ix);
- xiii. Un fragmento de la fitasa de (i) - (ix) que retiene actividad de fitasa; o
- xiv. Un polipéptido sintético diseñado basándose en (i)-(ix) y teniendo actividad de fitasa.
- Ejemplos preferidos de variantes de fitasa se describen en, por ejemplo, WO 99/49022, WO 99/48380, WO 00/43503, EP 0897010, EP 0897985, WO 2003/66847, al igual que en los mencionados arriba WO 2006/038063, WO 2006/038128, y WO 2006/43178).
- Ejemplos de proteasas (peptidasas) disponibles comercialmente incluyen Kannase™, Everlase™, Esperase™, Alcalase™, Neutrase™, Durazym™, Savinase™, Ovozyme™, Pyrase™, tripsina pancreática NOVO (PTN), Bio-Feed™ Pro y Clear-Lens™ Pro (todos disponibles por Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca).
- 30 Otras proteasas preferidas incluyen aquellas descritas en WO 01/58275 y WO 01/58276.
- Otras proteasas disponibles comercialmente incluyen Ronozyme™ Pro, Maxatase™, Maxacal™, Maxapem™, Opticlean™, Propease™, Purafect™ y Ox™ Purafect (disponible por Genencor International Inc., Gist-Brocades, BASF, o DSM Nutritional Products).
- Ejemplos de lipasas disponibles comercialmente incluyen Lipex™, Lipoprime™, Lipopan™, Lipolase™, Lipolase™, 35 ultra Lipozyme™, Palatase™, Resinase™, Novozym™ 435 y Lecitase™ (todas disponibles por Novozymes A/S).
- Otras lipasas disponibles comercialmente incluyen Lumafast™ (lipasa de *Pseudomonas mendocina* de Genencor international Inc.); Lipomax™ (lipasa de *Ps. pseudoalcaligenes* de Gist-Brocades/Genencor Int. Inc.; y lipasa de *Bacillus* sp. de enzimas de Solvay.
- Otras lipasas están disponibles de otros proveedores.
- 40 Ejemplos de carbohidrasas disponibles comercialmente incluyen Alpha-Gal™, Bio-Feed™ Alpha, Bio-Feed™ Beta, Bio-Feed™ Plus, Bio-Feed™ Wheat, Bio-Feed™ Z, Novozyme™ 188, Carezyme™, Celluclast™, Cellusoft™, Celluzyme™, Ceremyl™, Citrozym™, Denimax™, Dezyme™, Dextrozyme™, Duramyl™, Energex™, Finizym™, Fungamyl™, Gamanase™, Glucanex™, Lactozym™, Liquezyme™, Maltogenase™, Natalase™, Pentopan™, Pectinex™, Promozyme™, Pulpzyme™, Novamyl™, Termamyl™, AMG™ (Amiloglucosidasa Novo), Maltogenase™, 45 Sweetzyme™ y Aquazym™ (todas disponibles por Novozymes A/S).
- Otras carbohidrasas están disponibles de otros proveedores, tales como las series de productos Roxazyme™ y Ronozyme™ (DSM Nutritional Products), Avizyme™, Porzyme™ y series de productos de Grindazyme™ (Danisco; Finnfeeds), y Natugrain™ (BASF), Purastar™ y Purastar™ OxAm (Genencor).
- Otras enzimas disponibles comercialmente incluyen Mannaway™, Pectaway™, Stainzyme™ y Renozyme™.
- 50 [0016] En una forma de realización particular de la presente invención la enzima de pienso es seleccionada del grupo consistente en endoglucanasas, endo-1,3(4)-beta-glucanasas, proteasas, fitasas, galactanasas, mananasas, dextranasas y alfa-galactosidasa, y se hace referencia a WO 2003/062409 que está incorporada por la presente por referencia.
- 55 Enzimas de pienso adecuadas particulares incluyen: amilasas, fosfatasas, tales como fitasas, y/o fosfatasas ácidas; carbohidrasas, tales como enzimas amilíticas y/o enzimas degradantes de la pared celular vegetal incluyendo celulasas tales como β-glucanasas y/o hemicelulasas tales como xilanasas o galactanasas; proteasas o peptidasas tales como lisozima; galatosidasas, pectinasas, estererasas, lipasas, en particular fosfolipasas tal como las fosfolipasas pancreáticas mamíferas A2 y glucosa-oxidasa.
- 60 En particular las enzimas de pienso tienen un pH neutro y/o ácido óptimo.
- En una forma de realización particular de la presente invención la enzima de pienso es seleccionada del grupo consistente en amilasas, fosfatasas, fitasas, celulasas, β-glucanasas, hemicelulasas, proteasas, peptidasas, galatosidasas, pectinasas, estererasas, lipasas y glucosa-oxidasa.
- 65 En una forma de realización particular de la presente invención la enzima es seleccionada del grupo consistente en amilasas, proteasas, beta-glucanasas, fitasas, xilanasas, fosfolipasas y glucosa oxidadas.
- Las listas de enzimas anteriores son ejemplos solo y no significa que sean exclusivas.

Cualquier enzima se puede utilizar en los gránulos duraderos de la presente invención, incluyendo enzimas de tipo salvaje, recombinantes y variantes de fuentes bacterianas, fúngicas, levadura, planta, insecto y animales, y enzimas ácidas, neutras o alcalinas.

5 Donador de iones de cobre

[0017] El donador de iones de cobre puede ser cualquier compuesto que sea capaz de donar iones de cobre.

El donador de iones de cobre es preferiblemente soluble en agua.

10 El donador de iones de cobre puede ser orgánico o inorgánico y se puede seleccionar pero no está limitado al grupo consistente en sales de cobre de cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, sulfito, bisulfato, tiosulfato, fosfato, fosfato monobásico, fosfato dibásico, hipofosfito, dihidrogeno pirofosfato, tetraborato, borato, carbonato, bicarbonato, metasilicato, citrato, malato, maleato, malonato, metionato, succinato, lactato, formiato, acetato, butirato, propionato, benzoato, tartrato, ascorbato, gluconato y quelatos de cobre tales como quelatos de aminoácidos.

15 En una forma de realización particular de la presente invención el donador de iones de cobre es seleccionado del grupo consistente en Cu-acetato x 1 H₂O, CuCO₃, Cu(OH)₂ x 1 H₂O, CuCl₂ x 2 H₂O, Cu(C₅H₁₀NO₂S)₂ (metionato cúprico), CuO, CuSO₄ x 5 H₂O, CuSO₄ x 1 H₂O, quelato cúprico de aminoácidos, Cu(C₆H₁₃N₂O₂)₂SO₄, Cu-sulfato-lisina y quelato de metionina de cobre.

20 En una forma de realización particular de la presente invención el donador de iones de cobre es seleccionado del grupo consistente en cloruro de cobre, bromuro de cobre, yoduro de cobre, sulfato cúprico, sulfato de cobre, bisulfato de cobre, tiosulfato de cobre, fosfato de cobre, fosfato monobásico de cobre, fosfato dibásico de cobre, hipofosfito de cobre, dihidrogeno pirofosfato de cobre, tetraborato de cobre, borato de cobre, carbonato de cobre, bicarbonato de cobre, metasilicato de cobre, citrato de cobre, malato de cobre, maleato de cobre, malonato de cobre, metionato de cobre, succinato de cobre, lactato de cobre, formiato de cobre, acetato de cobre, butirato de cobre, propionato de cobre, benzoato de cobre, tartrato de cobre, ascorbato de cobre, gluconato de cobre, quelatos de cobre tales como

25 quelatos de aminoácidos, Cu-acetato x 1 H₂O, CuCO₃, Cu(OH)₂ x 1 H₂O, CuCl₂ x 2 H₂O, Cu(C₅H₁₀NO₂S)₂ (metionato de cobre), CuO, CuSO₄ x 5 H₂O, CuSO₄ x 1 H₂O, quelato de cobre de aminoácidos, Cu(C₆H₁₃N₂O₂)₂SO₄, Cu-sulfato-lisina, quelato de metionina de cobre y combinaciones de los mismos.

Dichos compuestos se seleccionan con la condición de que si cualquiera de los compuestos mencionados no son saludables o de otra manera no buenos para el animal deberían ser deseleccionados.

30 [0018] En una forma de realización más particular de la presente invención la sal cúprica es sulfato de cobre pentahidratado.

El donador de iones de cobre se puede adicionar en forma de una solución, dispersión, emulsión o en el estado seco.

35 En una forma de realización el donador de iones de cobre se añade como un polvo.

En una forma de realización particular de la presente invención el donador de iones de cobre se añade en la forma de una solución.

La solución es en una forma de realización particular una solución acuosa.

En una forma de realización el donador de iones de cobre se añade como un líquido.

40 Hemos descubierto sorprendentemente que el donador de iones de cobre se puede adicionar en una proporción determinada a la enzima.

Si la cantidad de iones de cobre es demasiado baja la estabilidad de granulación de la enzima no es significativamente mejorada.

45 Si la cantidad de iones de cobre es demasiado alta hemos encontrado que la estabilidad de la enzima per se disminuye siendo lo más desafortunado.

Así la cantidad de iones de cobre puede no ser demasiado alta en comparación con la cantidad de enzima presente.

Las cantidades descritas abajo se dan en los iones de cobre por molécula de proteína enzimática.

La cantidad de iones de cobre es calculada basándose en la cantidad total de compuesto que comprende cobre adicionado.

50 Así la cantidad de cobre es una cantidad teórica calculada como si todo el cobre presente en el gránulo está en forma iónica.

Esto significa que prácticamente el cobre no está necesariamente en forma iónica en el gránulo.

Según la presente invención la cantidad de iones de cobre está entre 1 y 600 Cu²⁺/molécula de proteína enzimática.

55 En una forma de realización más particular la cantidad de Cu²⁺ está entre 1 y 400 Cu²⁺/molécula de proteína enzimática.

En una forma de realización aún más particular de la presente invención la cantidad de Cu²⁺ está entre 1 y 200 Cu²⁺/molécula de proteína enzimática.

En una forma de realización más particular de la presente invención el sulfato de cobre se añade en una cantidad de Cu²⁺ entre 1 y 100 Cu²⁺/molécula de proteína enzimática.

60 En una forma de realización particular de la presente invención la cantidad de iones de cobre es entre 1 y 600 Cu²⁺/molécula de proteína fitasa.

En una forma de realización más particular la cantidad de Cu²⁺ es entre 1 y 400 Cu²⁺/molécula de proteína fitasa.

En una forma de realización aún más particular de la presente invención la cantidad de Cu²⁺ es entre 1 y 200 Cu²⁺/molécula de proteína fitasa.

65 En una forma de realización más particular de la presente invención el sulfato de cobre se adiciona en una cantidad de Cu²⁺ entre 1 y 100 Cu²⁺/molécula de proteína fitasa.

En una forma de realización particular de la presente invención el donador de iones de cobre es seleccionado del grupo consistente en cloruro de cobre, bromuro de cobre, yoduro de cobre, sulfato de cobre, sulfito de cobre, bisulfito de cobre, tiosulfato de cobre, fosfato de cobre, fosfato monobásico de cobre, fosfato dibásico de cobre, hipofosfito de cobre, dihidrogeno pirofosfato de cobre, tetraborato de cobre, borato de cobre, carbonato de cobre, bicarbonato de cobre, metasilicato de cobre, citrato de cobre, malato de cobre, maleato de cobre, malonato de cobre, metionato de cobre, succinato de cobre, lactato de cobre, formiato de cobre, acetato de cobre, butirato de cobre, propionato de cobre, benzoato de cobre, tartrato de cobre, ascorbato de cobre, gluconato de cobre, quelatos de cobre tales como quelatos de aminoácidos, Cu-acetato x 1 H₂O, CuCO₃, Cu(OH)₂ x 1 H₂O, CuCl₂ x 2 H₂O, Cu(C₅H₁₀NO₂S)₂ (metionato cúprico), CuO, CuSO₄ x 5 H₂O, CuSO₄ x 1 H₂O, quelato cúprico de aminoácidos, Cu(C₆H₁₃N₂O₂)₂SO₄, Cu-sulfato-lisina, quelato de metionina de cobre y combinaciones de los mismos y donde la cantidad de iones de cobre adicionada está entre 1 y 400 Cu²⁺/molécula de proteína enzimática, tal como entre 1 y 200 Cu²⁺/molécula de proteína enzimática, incluso entre 1 y 100 Cu²⁺/molécula de proteína enzimática.

Agentes de granulación adicionales

[0019] El gránulo puede comprender materiales adicionales tales como ligantes, productos de relleno, materiales fibrosos, agentes estabilizadores, agentes de solubilización, agentes de suspensión, agentes de regulación de viscosidad, esferas ligeras, plastificantes, sales, lubricantes y fragancias.

[0020] Ligantes de la presente invención pueden ser polímeros sintéticos, ceras incluyendo grasas, caldo de fermentación, carbohidratos, sales o polipéptidos.

Polímeros sintéticos

[0021] Por polímeros sintéticos se entiende polímeros cuya estructura ha sido polimerizada sintéticamente. Polímeros sintéticos adecuados de la invención incluyen en particular polivinilpirrolidona (PVP), alcohol polivinílico (PVA), acetato de polivinilo, poliacrilato, polimetacrilato, poliacrilamida, polisulfonato, policarboxilato, y copolímeros de los mismos, en particular polímeros o copolímeros solubles en agua.

En una forma de realización particular de la presente invención el polímero sintético es un polímero de vinilo.

Ceras

[0022] Una "cera" en el contexto de la presente invención debe entenderse como un material polimérico teniendo un punto de fusión entre 25 -150 °C, particularmente 30 to100°C más particularmente 35 a 85°C más particularmente 40 a 75°C.

La cera está preferiblemente en un estado sólido a temperatura ambiente, 25°C.

El límite inferior se prefiere que establezca una distancia razonable entre la temperatura a la que la cera comienza a fundirse a la temperatura en la que los gránulos o composiciones comprendiendo los gránulos están normalmente almacenados, 20 a 30°C.

Para algunos gránulos una característica preferible de la cera es que la cera debería ser soluble en agua o dispersable en agua, la cera debería desintegrarse y/o disolverse para proporcionar una rápida liberación y disolución del activo incorporado en las partículas a la solución acuosa.

Ejemplos de ceras solubles en agua son polietilenglicoles (PEG's).

Entre ceras insolubles en agua, que son dispersables en una solución acuosa están los triglicéridos y aceites.

Para algunos gránulos es preferible que la cera sea insoluble.

En una forma de realización particular de la presente invención la composición de cera es una composición hidrofílica.

En una forma de realización particular al menos 25 % p/p de los constituyentes comprendidos en la composición de cera es soluble en agua, preferiblemente al menos 50% p/p, preferiblemente al menos 75% p/p, preferiblemente al menos 85% p/p, preferiblemente al menos 95% p/p, preferiblemente al menos 99% p/p.

En otra forma de realización la composición de cera es hidrofílica y dispersable en una solución acuosa.

En una forma de realización particular la composición de cera comprende menos del 75% p/p constituyentes hidrofóbicos, preferiblemente menos del 50% p/p, preferiblemente menos del 25% p/p, preferiblemente menos del 15% p/p, preferiblemente menos del 5% p/p, preferiblemente menos del 1% p/p.

[0023] En una forma de realización particular la composición de cera comprende menos del 75% p/p constituyentes insolubles de agua, preferiblemente menos del 50% p/p, preferiblemente menos del 25% p/p, preferiblemente menos del 15% p/p, preferiblemente menos del 5% p/p, preferiblemente menos del 1% p/p.

Ceras adecuadas son compuestos orgánicos o sales de compuestos orgánicos teniendo una o varias de las propiedades anteriormente mencionadas.

La composición de cera de la invención puede comprender cualquier cera, que es sintetizada químicamente.

También puede igualmente comprender ceras aisladas de una fuente natural o un derivado.

Por consiguiente, la composición de cera de la invención puede comprender ceras seleccionadas de la siguiente lista no limitativa de ceras.

- Polietilenglicoles, PEG. Distintas ceras de PEG están disponibles comercialmente teniendo tamaños moleculares diferentes, donde PEG con tamaños moleculares bajos también tienen bajos puntos de fusión.

Ejemplos de PEG adecuados son PEG 1500, PEG 2000, PEG 3000, PEG 4000, PEG 6000, PEG 8000, PEG 9000 etc. por ejemplo de BASF (series de Pluriol E) o de Clariant o de Ineos. Derivados de polietilenglicoles también pueden ser usados.

- 5 - Polipropilenos (por ejemplo polipropilenglicol de Pluriol P series de BASF) o polietilenos o mezclas derivadas. Derivados de polipropilenos y polietilenos también pueden ser usados.
- Polímeros de óxido de etileno, óxido de propileno o copolímeros de los mismos son útiles, tal como en polímeros en bloque, por ejemplo Pluronic PE 6800 de BASF. Derivados de alcoholes grasos etoxilados.
- 10 - Ceras aisladas de una fuente natural, tal como cera carnauba (punto de fusión entre 80-88°C), cera de Candelilla (punto de fusión entre 68-70°C) y cera de abejas. Otras ceras naturales o derivadas de las mismas son ceras derivadas de animales o plantas, por ejemplo de origen marino. Aceite de planta hidrogenada o sebo animal. Ejemplos de tales ceras son sebo de buey hidrogenado, aceite de palma hidrogenado, semillas de algodón hidrogenado y/o aceite de soja hidrogenada, donde el término "hidrogenado" como se utiliza en este caso debe ser interpretado como saturación de cadenas de
- 15 - Carbohidrato insaturado, por ejemplo en triglicéridos, donde enlaces dobles de carbono=carbono se convierten en enlaces sencillos carbono-carbono. Aceite de palma hidrogenado está comercialmente disponible por ejemplo de Hobum Oele und Fette GmbH - Alemania o Deutche Cargill GmbH - Alemania.
- Alcoholes de ácidos grasos, tal como el alcohol de ácido graso de cadena larga lineal NAFOL 1822 (C18, 20, 22) de Condea Chemie GMBH - Alemania, teniendo un punto de fusión entre 55-60°C. Derivados de
- 20 - alcoholes de ácidos grasos.
- Monoglicéridos y/o diglicéridos, tal como glicerilo estearato, donde estearato es una mezcla de ácido palmítico y esteárico, son ceras útiles. Un ejemplo de esto es Dimodan PM - de Danisco Ingredients, Dinamarca.
- Ácidos grasos, tales como ácidos grasos de cadena larga lineal hidrogenada y derivados de ácidos grasos.
- 25 - Parafinas, es decir hidrocarburos sólidos.
- Cera microcristalina.

[0024] En otras formas de realización ceras que son útiles en la invención se pueden encontrar en C.M. McTaggart et. al., Int. J. Pharm. 19, 139 (1984) o Flanders et. al., Drug Dev. Ind. Pharm. 13,1001 (1987) ambos incorporados aquí por referencia.

30 En una forma de realización particular de la presente invención la cera de la presente invención es una mezcla de dos o más ceras diferentes.

En una forma de realización particular de la presente invención la cera o ceras es seleccionada del grupo consistente en PEG, ácidos grasos, alcoholes de ácido graso y glicéridos.

En otra forma de realización particular de la presente invención las ceras son elegidas de ceras sintéticas.

35 En una forma de realización más particular las ceras de la presente invención son PEG.

En una forma de realización más particular de la presente invención la cera es seleccionada del grupo de sebo bovino, PEG y aceite de palma.

Caldo de fermentación

40 [0025] Un caldo de fermentación conforme a la invención comprende células microbianas y/o detrito celular de las mismas (biomasa).

En una forma de realización preferida el caldo de fermentación comprende al menos 10% de la biomasa, más preferiblemente al menos 50%, aún más preferiblemente al menos 75% y de la forma más preferible al menos 90% o

45 al menos 95% de la biomasa que se origina de la fermentación.

En otra forma de realización preferida el caldo contiene 0-31% p/p sustancia seca, preferiblemente 0-20% p/p, más preferiblemente 0-15% p/p tal como 10-15% p/p sustancia seca, 0% sustancia seca siendo excluida de dichos rangos.

50 La biomasa puede constituir hasta 90% p/p de la sustancia seca, preferiblemente hasta 75% p/p, más preferiblemente hasta 50% p/p de la sustancia seca, mientras la enzima puede constituir hasta 50% p/p de la sustancia seca, preferiblemente hasta 25% p/p, más preferiblemente hasta 10% p/p de la sustancia seca.

Polisacáridos

55 [0026] Los polisacáridos de la presente invención pueden ser polisacáridos no modificados de origen natural o polisacáridos de origen natural modificados.

[0027] Polisacáridos adecuados incluyen celulosa, pectina, dextrina y almidón.

Los almidones pueden ser solubles o insolubles en agua.

60 En una forma de realización particular de la presente invención el polisacárido es un almidón.

En una forma de realización particular de la presente invención el polisacárido es un almidón insoluble.

Almidones de origen natural de una amplia variedad de fuentes vegetales se adecuan en el contexto de la invención (bien como almidones per se, o como el punto de partida para almidones modificados), y almidones pertinentes incluyen almidón de: arroz, maíz, trigo, patata, avena, mandioca, palma de sagú, yuca, cebada, batata, sorgo,

65 boniatos, centeno, mijo, alforfón, arrurruz, taro, tannia, y pueden por ejemplo estar en la forma de harina.

Almidón de mandioca está entre los almidones preferidos en el contexto de la invención; a este respecto se puede

mencionar que mandioca y almidón de mandioca son conocidos bajo varios sinónimos, incluyendo tapioca, yuca, mandioca y manihot.

Como se emplea en el contexto de la presente invención, el término "almidón modificado" denota un almidón de origen natural, que ha sufrido alguna especie de al menos modificación química parcial, modificación enzimática, y/o modificación física o fisicoquímica, y que - en general - muestra propiedades alteradas relativas al almidón "progenitor".

En una forma de realización particular de la presente invención el gránulo comprende un polisacárido.

Sales

[0028] El núcleo puede comprender sal adicional.

La sal puede ser una sal inorgánica, por ejemplo sales de sulfato, sulfito, fosfato, fosfonato, nitrato, cloruro o carbonato o sales de ácidos orgánicos simples (menos de 10 átomos de carbono por ejemplo 6 o menos átomos de carbono) tal como citrato, malonato o acetato.

Ejemplos de cationes en esta sal son iones álcali o metálicos alcalinotérreos, aunque el ión de amonio o iones metálicos de la primera serie de transición, tal como sodio, potasio, magnesio, calcio, zinc o aluminio.

Ejemplos de aniones incluyen cloruro, yoduro, sulfato, sulfito, bisulfito tiosulfato, fosfato, fosfato monobásico, fosfato dibásico, hipofosfito, pirofosfato de dihidrogeno, carbonato, bicarbonato, metasilicato, citrato, malato, maleato, malonato, succinato, lactato, formiato, acetato, butirato, propionato, benzoato, tartrato, ascorbato o gluconato.

En particular sales metálicas álcali o alcalinotérreas de sulfato, sulfito, fosfato, fosfonato, nitrato, cloruro o carbonato o sales de ácidos orgánicos simples tales como citrato, malonato o acetato pueden ser utilizadas.

Ejemplos específicos incluyen NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , Na_3PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , K_2SO_4 , KHSO_4 , ZnSO_4 , MgSO_4 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, borato sódico, acetato magnésico y citrato sódico.

[0029] La sal también puede ser una sal hidratada, es decir un hidrato de sal cristalina con agua ligado de cristalización, tal como se describe en WO 99/32595.

Ejemplos de sales hidratadas incluyen sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$), sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$), fosfato sódico dibásico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4(7\text{H}_2\text{O})$), nitrato de magnesio hexahidratado ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2(6\text{H}_2\text{O})$), borato sódico decahidratado, citrato sódico dihidratado y acetato magnésico tetrahidratado.

[0030] En una forma de realización particular de la presente invención el ligante es un polipéptido.

El polipéptido se puede seleccionar de gelatina, colágeno, caseína, quitosano, ácido poliaspártico y ácido poliglútamico.

En otra forma de realización particular el ligante es un derivado de celulosa tal como hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa o CMC.

Un ligante adecuado es un ligante carbohidratado tal como dextrina p. ej. Glucidex 21D o Avedex W80.

Productos de relleno

[0031] Productos de relleno adecuados son sales inorgánicas solubles y/o insolubles en agua tales como sulfato de álcali finamente molido, carbonato de álcali y/o cloruro de álcali, arcillas tales como caolín (por ejemplo SPESWHITE™, English China Clay), bentonitas, talcos, zeolitas, yeso, carbonato cálcico y/o silicatos.

Productos de relleno típicos son sulfato de di-sodio y lignosulfonato de calcio.

Otros productos de relleno son sílice, yeso, caolín, talco, silicato de aluminio de magnesio y fibras de celulosa.

Materiales fibrosos

[0032] Celulosa pura o impura en la forma fibrosa tal como serrín, celulosa fibrosa pura, algodón, u otras formas de celulosa fibrosa pura o impura.

También, ayudantes de filtración basados en celulosa fibrosa pueden ser usados.

Diferentes marcas de celulosa en la forma fibrosa están en el mercado, por ejemplo CEPO™ y ARBOCELL™.

Ejemplos pertinentes de ayudantes de filtración de celulosa fibrosa son ARBOCELL BFC 200™ y ARBOCELL BC 200™.

Fibras también sintéticas se pueden usar como se describen en EP 304331 B1.

Agentes estabilizadores

[0033] Agentes estabilizadores o protectores tales como se usan de forma convencional en el campo de la granulación.

Agentes estabilizadores o protectores pueden caer en diferentes categorías: materiales alcalinos o neutros, agentes reductores, antioxidantes y/o sales de iones metálicos de serie de primera transición.

Cada uno de estos se puede utilizar conjuntamente con otros agentes protectores de la misma categoría o diferente.

Ejemplos de agentes protectores alcalinos son silicatos de metal alcalino, carbonatos o bicarbonatos.

Ejemplos de agentes protectores reductores son las sales de sulfito, tiosulfito, tiosulfato o MnSO_4 mientras ejemplos de antioxidantes son metionina, hidroxitolueno butilado (BHT) o hidroxianisol butilado (BHA).

En particular agentes estabilizadores pueden ser sales de tiosulfatos, por ejemplo tiosulfato de sodio o metionina. Todavía otros ejemplos de estabilizadores útiles son gelatina, urea, sorbitol, glicerol, caseína, polivinil pirrolidona (PVP), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), carboximetilcelulosa (CMC), hidroxietilcelulosa (HEC), polvo de leche desnatada y/o aceites comestibles, tal como aceite de soja o aceite de canola.

- 5 Agentes estabilizadores particulares en los gránulos de pienso son una fuente de ácido láctico o almidón. En una forma de realización particular de la presente invención el gránulo comprende una fuente de ácido láctico según solicitud de patente no. EP 1.117.771 que es por la presente incorporada como referencia. Una fuente de ácido láctico preferida es licor de maceración del maíz.
- 10 Es también bien conocido en la técnica que sustratos enzimáticos como el almidón, lípidos, proteínas etc pueden actuar como estabilizadores para enzimas.

Agentes de solubilización

- 15 [0034] Como se conoce por el experto en la técnica, muchos agentes, a través de una variedad de métodos, sirven para aumentar la solubilidad de formulaciones, y agentes típicos conocidos por la técnica se pueden encontrar en la Farmacopea nacional.

Esferas ligeras:

- 20 [0035] Esferas ligeras son partículas pequeñas con baja densidad real. Típicamente, son partículas esféricas huecas con aire o gas en su interior. Tales materiales son normalmente preparados por expansión de un material sólido. Estas esferas ligeras pueden ser de naturaleza inorgánica u orgánica.
- 25 Polisacáridos son preferidos, como el almidón o derivados de los mismos. Biodac® es un ejemplo de material ligero no hueco hecho de celulosa (residuos de fabricación de papel), disponible de GranTek Inc. Estos materiales se pueden incluir en los gránulos de la invención bien solos o como una mezcla de diferentes materiales ligeros.

- 30 Agentes de suspensión:

[0036] Agentes de suspensión, mediadores y/o solventes pueden ser incorporados.

Agentes de regulación de viscosidad:

- 35 [0037] Agentes de regulación de viscosidad pueden estar presentes.

Plastificantes:

- 40 [0038] Plastificantes de la presente invención incluyen, por ejemplo: polioles tales como azúcares, polialcoholes, glicerina, glicerol trimetilol propano, neopentilglicol, trietanolamina, mono-, di- y trietilenglicol o politilenglicoles (PEGs) teniendo un peso molecular inferior a 1000; urea y agua.

Lubricantes:

- 45 [0039] Como se usa en el presente contexto, el término "lubricante" se refiere a cualquier agente, que reduce la fricción de superficie, lubrica la superficie del gránulo, reduce la tendencia al incremento de electricidad estática, y/o reduce la friabilidad de los gránulos. Los lubricantes pueden servir como agentes de antiaglomeración y agentes humectantes.
- 50 Ejemplos de lubricantes adecuados son politilenglicoles (PEGs) inferiores y aceites minerales. El lubricante es particularmente un aceite mineral o un surfactante no iónico, y más particularmente el lubricante no es miscible con los otros materiales.

Recubrimientos

- 55 [0040] Los gránulos de la presente invención pueden comprender una, dos o más capas de recubrimiento adicionales. Los recubrimientos se pueden aplicar al gránulo para proporcionar características o propiedades adicionales. Así, por ejemplo, un recubrimiento adicional puede conseguir uno o varios de los siguientes efectos:
- 60 Reducción (i) de la tendencia a la formación de polvo de un gránulo;
 (ii) protección del compuesto activo en el gránulo contra los compuestos hostiles en el entorno.
 (iii) disolución a un índice deseado en la introducción del gránulo en un medio líquido (tal como un medio ácido);
 (iv) proporción de una mejor fuerza física del gránulo.
- 65 Los recubrimientos de la presente invención generalmente se aplican como una o varias capas que rodean el núcleo. Formas de realización incluyen una, dos, tres o cuatro capas de recubrimiento protectoras.

- Materiales de recubrimiento adecuados son polímeros, carbohidratos, proteínas, lípidos, grasas y aceites, ácidos grasos, sales inorgánicas, y gomas y sus mezclas derivadas.
- Los recubrimientos incluyen recubrimientos de barrera contra la humedad y recubrimientos hidratantes de humedad.
- Los recubrimientos de barrera contra la humedad funcionan excluyendo la humedad, por ejemplo formando una capa de cubierta que típicamente no absorbe la humedad y previene o retarda el índice de migración de humedad en el gránulo.
- Recubrimientos hidratantes de humedad en el gránulo absorben o enlazan la humedad bien como agua libre o agua de hidratación, actuando así para impedir o retardar la extensión o índice de transporte de humedad externa en el gránulo.
- Los recubrimientos hidratantes de humedad típicamente constituyen al menos aproximadamente 35% p/p del gránulo.
- Los materiales hidratantes de humedad en los recubrimientos aíslan térmicamente las enzimas y absorberán una cantidad determinada de humedad y la retendrán en el material hidratante sin permitir que pase a la porción del gránulo que tiene la enzima.
- Para recubrimientos hidratantes de humedad en gránulos estables que no contienen cantidades apreciables de agua antes del tratamiento con vapor, tales recubrimientos pueden constituir aproximadamente 25% p/p del gránulo.
- Recubrimientos de barrera contra la humedad típicamente comprenden materiales hidrofóbicos, tales como polímeros hidrofóbicos, por ejemplo PVA, HPMC, almidones de hidroxipropilo diluido en ácido y almidón oxidado; proteínas, por ejemplo concentrados de suero de leche y proteína de suero de leche; lípidos, por ejemplo, lecitina; grasas y aceites, ácidos grasos, látex y gomas, por ejemplo, goma arábica.
- Determinados recubrimientos de barrera de humedad, tal como PVA y goma arábica, no son fácilmente oxidados y encuentran particularmente aplicabilidad en la provisión de estabilidad química cuando los gránulos de la invención se almacenan en mezclas no granuladas o no comprimidas, por ejemplo, en premezclas que contienen cloruro de colina.
- Materiales de recubrimiento hidratantes de humedad típicamente son materiales hidrofílicos, tales como carbohidratos y sales inorgánicas, incluyendo sales hidratadas.
- Ejemplos de materiales hidratantes de humedad son sulfato de magnesio, sulfato de sodio, maltodextrina, sulfato amónico, azúcares, por ejemplo, sacarosa, y almidón de maíz nativo.
- Polímeros usados para los recubrimientos de protección son alcohol polivinílico (PVA), polietilenglicol, polivinilpirrolidona, poliácridatos, óxidos de polietileno (PEO), ácido poliláctico, polivinilcloruro, acetato de polivinilo, polivinil pirrolidonas (PVP), éteres de celulosa, alginatos, gelatina, almidones modificados y derivados sustituidos, hidrolizados y copolímeros de los mismos, tales como almidón de hidroxipropilo diluido en ácido, tal como, hidroxipropilmetilcelulosa Pure cote™ (HPMC), metilcelulosa (MC), carboximetilcelulosa (CMC), y etilcelulosa.
- Muchos polímeros preferidos para los recubrimientos de protección son PVA, PVA modificado, como se describe en la Pat. de EEUU N° 6,872,696, y celulosa modificada, tal como metilcelulosa y celulosa de hidroxilpropilmetilo, como se describe en la publicación PCT No. WO 99/51210, los cuales que se incorporan por referencia aquí.
- Carbohidratos usados para los recubrimientos de protección son maltodextrina hidroxilmetil celulosa, almidones modificados o nativos hechos de maíz, sorgo, arrurruz, arroz, trigo, centeno, cebada, avena, patata, batata, tapioca, mandioca, sagú, y azúcares incluyendo sacarosa, sólidos de jarabe de maíz, melaza, glucosa, fructosa, y lactosa.
- Proteínas usadas para los recubrimientos protectores son polvo de suero de leche, concentrado de proteína de suero de leche, aislado de proteína de suero, caseinatos, concentrado y aislado de proteína de soja, ceína, albúmina y gelatina.
- Lípidos simples, compuestos y derivados que se pueden utilizar en los recubrimientos de protección son ceras (por ejemplo, vegetal, mineral y sintética, tal como candelilla, cera de abejas, cerumen, carnuba (Carnauba), goma laca, parafina, y ceras microcristalinas); lecitina (por ejemplo mono- y diglicéridos); ácidos grasos (por ejemplo, ácidos esteárico, palmítico, linoleico, oleico, butírico, y ácidos grasos araquidónicos y sus sales de sodio, potasio, calcio y zinc); y grasas y aceites (por ejemplo, grasas y aceites hidrogenados o parcialmente hidrogenados, tales como soja, maíz, semilla de algodón, sebo, canola, y aceite de linaza).
- Un lípido preferido para los recubrimientos protectores es la lecitina.
- Sales inorgánicas usadas para los recubrimientos de protección incluyen sales de sulfato, citrato, cloruro, carbonato, sulfito, fosfato, fosfonato, y sales de bicarbonato de sodio, amonio, potasio, calcio, magnesio y zinc.
- Sales preferidas son magnesio, sodio y sulfatos de amonio.
- Gomas que se pueden utilizar en los recubrimientos protectores incluyen goma arábica, goma guar, agar, goma tragacanto, goma de karya, goma garrofín, carragenina, goma xantana, y alginatos.
- Los recubrimientos protectores de la presente invención pueden incluir además plastificantes, lubricantes, pigmentos y polvos, tales como talco, bentonita, caolín, almidón de maíz, silicato de magnesio, carbonato cálcico, y quitosano.
- Formas de realización determinadas de la presente invención típicamente tienen una única capa de un material hidratante de humedad que es aproximadamente al menos 55% p/p del gránulo.
- Debido a que la capacidad de recubrimientos hidratantes de humedad para llenar y secuestrar agua tiene un límite, niveles relativamente altos de recubrimientos de capa única son aplicados.
- Alternativamente, material(es) hidratantes de humedad se pueden aplicar en dos capas.
- Otras formas de realización de la presente invención tienen recubrimientos protectores que utilizan ambos materiales hidratantes de humedad y materiales de barrera contra la humedad.
- En estas formas de realización, la cantidad de material hidratante de humedad puede ser inferior, al menos aproximadamente 25% p/p del gránulo y el material de barrera contra la humedad es aproximadamente 2% a 25% p/p del gránulo.

La utilización de ambos materiales hidratantes de humedad y materiales de barrera contra la humedad combina mecanismos protectores y reduce típicamente coste, particularmente de los materiales de barrera contra la humedad.

5 Materiales de barrera contra la humedad, particularmente materiales que forman películas pueden ser sometidos a daño mecánico que, si estos materiales se usan solo como un recubrimiento fino, puede llevar a pérdida de protección para la enzima.

La combinación permite el uso de menos de ambos materiales que serían requeridos si los materiales fueran usados solos.

10 La combinación permite algún daño en la capa de barrera contra la humedad vista la presencia del material hidratante de humedad.

Cualquier recubrimiento(s) convencional de propiedades deseadas se puede aplicar y ejemplos de materiales de recubrimiento convencionales y métodos de revestimiento son, entre otras cosas, descritos en US 4,106,991, EP 170360, EP 304332, EP 304331, EP 458849, EP 458845, WO 97/39116, WO 92/12645, WO 89/08695, WO 89/08694, WO 87/07292, WO 91/06638, WO 92/13030, WO 93/07260, WO 93/07263, WO 96/38527, WO 96/16151, 15 WO 97/23606, US 5,324,649, US 4,689,297, EP 206417, EP 193829, DE 4344215, DE 4322229 A, DD 263790, JP 61162185 A, JP 58179492 o PCT/DK/01/00628.

En una forma de realización particular de la presente invención el recubrimiento adicional es un recubrimiento de cera, de acuerdo con US 4,106,991 o EP 0,569,468 que están incorporadas por la presente por referencia.

Para ceras adecuadas ver la sección "Ceras" más arriba.

20 En una forma de realización particular de la presente invención un recubrimiento adicional puede comprender PVA, PEG y/o aceite de palma.

Materiales de recubrimiento adicionales

25 [0041] El recubrimiento puede comprender materiales de recubrimiento adicionales tales como ligantes, productos de relleno, materiales fibrosos, agentes estabilizadores de enzimas, sales, agentes solubilizantes, agentes suspensores, agentes reguladores de viscosidad, esferas ligeras, plastificantes, sales, lubricantes y fragancias tal y como se menciona en la sección "agentes de granulación adicionales" más arriba.

30 Otros ingredientes de recubrimiento pueden ser pigmentos.

Pigmentos

35 [0042] Pigmentos adecuados incluyen, pero de forma no limitativa, blanqueadores finamente divididos, tales como dióxido de titanio o caolín, pigmentos coloreados, colorantes solubles en agua, al igual que combinaciones de uno o varios pigmentos y colorantes solubles en agua.

[0043] Opcionalmente, los gránulos pueden ser recubiertos con una mezcla de recubrimiento.

40 Tales mezclas pueden comprender pero de forma no limitativa agentes de recubrimiento, agentes de recubrimiento preferiblemente hidrofóbicos, tales como aceite de palma hidrogenado y sebo bovino, y si se desea otros aditivos, tales como carbonato cálcico o caolín.

En una forma de realización particular de la presente invención el gránulo de la presente invención comprende además un recubrimiento de cera.

45 En una forma de realización particular de la presente invención el gránulo de la presente invención además comprende una fuente de ácido láctico.

En una forma de realización particular de la presente invención el gránulo de la presente invención además comprende sustancia seca de licor de maceración del maíz.

En una forma de realización particular de la presente invención el gránulo es recubierto con un recubrimiento de sal.

Preparación del gránulo

50 [0044] El gránulo crudo comprende una enzima y un donador de iones de cobre.

Métodos para preparar un gránulo crudo pueden ser encontrados en el Handbook of Powder Technology; Particle size enlargement by C. E. Capes; volumen 1, 1980; Elsevier.

Métodos de preparación incluyen tecnologías de formulación de gránulos y piensos conocidas, es decir:

55 a) productos secados atomizados, donde una solución conteniendo enzima líquida se atomiza en una torre de secado por atomización para formar gotitas pequeñas que durante su bajada por la torre de secado se secan para formar un material en partículas que contiene enzimas.

Partículas muy pequeñas se pueden producir de esta manera (Michael S. Showell (editor); Powdered detergents; Surfactant Science Series; 1998; vol. 71; page 140-142; Marcel Dekker).

60 b) productos estratificados, donde el compuesto activo es recubierto como una capa alrededor de una partícula de núcleo inerte preformada, donde una solución conteniendo enzimas es atomizada, típicamente en un equipo de lecho fluido donde las partículas de núcleo preformadas son fluidificadas, y la solución con enzimas se adhiere a las partículas de núcleo y se secan hasta dejar una capa de enzima seca en la superficie de la partícula del núcleo.

65 Partículas de un tamaño deseado se pueden obtener de esta manera si una partícula del núcleo útil del tamaño deseado puede ser encontrada.

Este tipo de producto es descrito en por ejemplo WO 97/23606

c) partículas absorbidas, donde antes que recubrir la enzima como una capa alrededor del núcleo, el compuesto activo se absorbe sobre y/o en la superficie del núcleo.

Tal proceso es descrito en WO 97/39116.

d) productos de extrusión o granulados, donde una pasta conteniendo enzimas se prensa hasta hacer gránulos o se extrude bajo presión a través de una abertura pequeña y se corta en partículas que son posteriormente secadas.

Tales partículas normalmente tienen un tamaño considerable debido al material en donde se hace la abertura de extrusión (normalmente una placa con agujeros perforados) establece un límite en la caída de presión admisible sobre la abertura de extrusión.

También, presiones de extrusión muy altas cuando se usa una pequeña abertura aumentan la generación de calor en la pasta de compuesto activo, que es nociva para la enzima. (Michael S. Showell (editor); Powdered detergents; Surfactant Science Series; 1998; vol. 71; página 140-142; Marcel Dekker)

e) productos comprimidos, donde un polvo enzimático se suspende en cera fundida y la suspensión es pulverizada, por ejemplo a través de un atomizador de disco rotativo, en una cámara de enfriamiento donde las gotitas rápidamente se solidifican (Michael S. Showell (editor); Powdered detergents; Surfactant Science Series; 1998; vol. 71; página 140-142; Marcel Dekker).

El producto obtenido es uno donde la enzima es uniformemente distribuida en todo un material inerte en vez de ser concentrado en su superficie.

También US 4,016,040 y US 4,713,245 son documentos relativos a esta técnica

f) productos de granulación mezcladores, donde se añade un líquido conteniendo enzimas a una composición en polvo seca de componentes de granulación convencionales.

El líquido y el polvo se mezclan en una proporción adecuada y cuando la humedad del líquido se absorbe en el polvo seco, los componentes del polvo seco empezarán a adherirse y a aglomerarse y se desarrollarán partículas, formando granulados que comprenden la enzima.

Tal proceso es descrito en US 4,106,991 (NOVO NORDISK) y documentos relacionados EP 170360 B1 (NOVO NORDISK), EP 304332 B1 (NOVO NORDISK), EP 304331 (NOVO NORDISK), WO 90/09440 (NOVO NORDISK) y WO 90/09428 (NOVO NORDISK).

En un producto particular de este proceso donde varios mezcladores de alta cizalladura se pueden usar como granuladores, granulados consistentes en enzima como compuesto activo, productos de relleno y ligantes etc. se mezclan con fibras de celulosa para reforzar las partículas para dar el denominado granulado T.

Las partículas reforzadas, siendo más robustas, liberan menos polvo enzimático.

g) reducción de tamaño, donde los gránulos se producen por fresado o trituración de partículas mayores, gránulos, comprimidos, briquetas etc. que contienen la enzima.

La fracción de partícula del núcleo deseada se obtiene por tamizado del producto molido o triturado.

Partículas sobre y subdimensionadas pueden ser recicladas.

La reducción de tamaño es descrita en (Martin Rhodes (editor); Principles of Powder Technology; 1990; Capítulo 10; John Wiley & Sons).

h) granulación en lecho fluido.

La granulación en lecho fluido implica suspender partículas en un flujo de aire y pulverizar un líquido sobre las partículas fluidificadas por medio de boquillas.

Las partículas tocadas por gotitas de spray se vuelven mojadas y se vuelven pegajosas.

Las partículas pegajosas chocan con otras partículas y se adhieren y forman un gránulo.

i) los gránulos crudos se pueden someter a secado, tal como en un secador de lecho fluido.

Otros métodos conocidos para secar gránulos en la industria de piensos o enzimas se pueden usar por el experto.

El secado preferiblemente tiene lugar a una temperatura de producto de 25 a 90°C.

Para algunas enzimas es importante que los núcleos que comprenden la enzima contengan una cantidad baja de agua antes de recubrirse con la sal.

Si enzimas hidrosensibles son recubiertas con una sal antes de que el agua excesivo sea quitado, será retenido en el núcleo y esto puede afectar a la actividad de la enzima negativamente.

Tras el secado, los núcleos preferiblemente contienen 0.1-10 % p/p agua.

Recubrimiento del gránulo

[0045] Recubrimientos y métodos convencionales como se conocen en la técnica pueden ser usados adecuadamente, tales como los recubrimientos descritos en la patente danesa PA 2002 00473, WO 89/08694, WO 89/08695, 270 608 B1 y/o WO 00/01793.

Otros ejemplos de materiales de recubrimiento convencionales pueden ser descubiertos en US 4,106,991, EP 170360, EP 304332, EP 304331, EP 458849, EP 458845, WO 97/39116, WO 92/12645A, WO 89/08695, WO 89/08694, WO 87/07292, WO 91/06638, WO 92/13030, WO 93/07260, WO 93/07263, WO 96/38527, WO 96/16151, WO 97/23606, WO 01/25412, WO 02/20746, WO 02/28369, US 5879920, US 5,324,649, US 4,689,297, US 6,348,442, EP 206417, EP 193829, DE 4344215, DE 4322229 A, DE 263790, JP 61162185 A y/o JP 58179492.

[0046] El recubrimiento se puede preparar por los mismos métodos como se ha mencionado anteriormente en la sección "Preparación del gránulo".

Los gránulos obtenidos se pueden someter a redondeo (por ejemplo esferonización), tal como en un Marumeriser[™], o compactación.

Los gránulos pueden ser secados, tal como en un secador de lecho fluido.

Otros métodos conocidos para secar gránulos en la industria de piensos o de enzimas se pueden usar por la persona experta.

El secado preferiblemente tiene lugar a una temperatura de producto de 25 a 90°C.

5 Fabricación de gránulos de pienso

[0047] "Gránulos" y "granulado" se refieren a comprimidos o gránulos sólidos redondeados, esféricos y cilíndricos y los procesos para formar tales formas sólidas, particularmente gránulos de pienso y, pienso para animales extrudido y sólido.

10 Procesos de fabricación de granulación de pienso conocidos generalmente incluyen mezclar juntos los ingredientes de pienso durante aproximadamente 1 a aproximadamente 5 minutos, transferir la mezcla a una tolva impulsora, transportar la mezcla a un acondicionador de vapor, opcionalmente transferir la mezcla acondicionada de vapor a un expansor, transferir la mezcla al triturador de granulado o extrusor, y finalmente transferir los gránulos en un refrigerador de granulado.

15 Fairfield, D. 1994. Capítulo 10, Pelleting Cost Center. En Feed Manufacturing Technology IV. (McElhiney, editor), American Feed Industry Association, Arlington, VA, pp. 110-139.

En la fabricación de gránulos de pienso de la presente invención se prefiere implicar tratamiento de vapor antes de la granulación, un proceso llamado acondicionamiento.

20 En el paso de granulación posterior el pienso se fuerza a través de un molde y las cadenas resultantes son cortadas en gránulos adecuados de longitud variable.

Durante este paso de acondicionamiento la temperatura del proceso puede elevarse a 60-100°C o incluso más hasta 120°C.

El gránulo de las formas de realización anteriormente mencionadas pueden retener al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, y al menos 95% de actividad enzimática bajo tratamiento de vapor.

25 En una forma de realización particular de la presente invención el gránulo de la invención retiene al menos 70% de actividad enzimática después de ser expuesta a 100°C.

En la presente invención la mezcla de pienso (pienso triturado) se puede preparar mediante la mezcla de los gránulos comprendiendo la enzima y donador de iones de cobre con los componentes de pienso deseados.

La mezcla se conduce a un acondicionador por ejemplo un mezclador de cascada con inyección de vapor.

30 En una forma de realización particular la mezcla de pienso que comprende gránulos que comprenden la enzima y el donador de iones de cobre y otros ingredientes de pienso son tratados con vapor.

Opcionalmente la mezcla de pienso tratada con vapor es granulada.

El acondicionador de vapor trata la mezcla durante aproximadamente 20 a aproximadamente 90 segundos, y hasta varios minutos, a alrededor de 85°C hasta aproximadamente 95°C.

35 El pienso es calentado en el acondicionador hasta una temperatura específica, 60- 100°C, por ejemplo 60°C, 70°C, 80°C, 90°C o 100°C inyectando vapor, medido en la salida del acondicionador.

El periodo de permanencia puede variar de segundos a minutos e incluso horas.

Tal como 5 segundos, 10 segundos, 15 segundos, 30 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos y 1 hora.

40 En una forma de realización particular de la presente invención la temperatura es 100°C y el periodo de permanencia es 60 segundos.

En una forma de realización particular de la presente invención la temperatura del proceso durante el tratamiento con vapor es al menos 60°C.

45 En una forma de realización más particular de la presente invención la temperatura de proceso durante el tratamiento de vapor es al menos 70°C.

En una forma de realización aún más particular de la presente invención la temperatura del proceso durante el tratamiento con vapor es al menos 80°C.

En una forma de realización más particular de la presente invención la temperatura del proceso durante el tratamiento con vapor es al menos 90°C.

50 La cantidad de vapor puede variar conforme a la cantidad de humedad y la temperatura inicial de la mezcla de pienso.

Aproximadamente 4% hasta aproximadamente 6% del vapor adicionado ha sido proporcionado en los procesos de granulación, y la cantidad se selecciona para producir menos de aproximadamente el 18% de humedad en el triturado antes de la granulación, o hasta aproximadamente el 28% de humedad en el triturado destinado para la extrusión.

55 Un proceso expansor opcional ocurre durante aproximadamente 4 hasta aproximadamente 10 segundos a una gama de temperatura de aproximadamente 100°C hasta aproximadamente 140°C.

La porción de granulado triturado del proceso de fabricación funciona típicamente durante aproximadamente 3 hasta aproximadamente 5 segundos a una temperatura de aproximadamente 85°C a aproximadamente 95°C.

60 Después del acondicionamiento el pienso se puede conducir a una prensa por ejemplo una prensa de Simon Heesen, y prensar hasta obtener gránulos con longitud variable por ejemplo 15 mm.

Después de la prensa los gránulos se colocan en un refrigerador de aire y se enfrían durante un tiempo específico por ejemplo 15 minutos.

65 [0048] Una forma de realización particular de la presente invención es un método para fabricar una composición de pienso que incluye las etapas de:

- i. mezclar componentes de pienso con gránulos de la presente invención,
- ii. tratar con vapor dicha composición (i), y
- iii. granular dicha composición (ii).

5 [0049] En una forma de realización particular de la presente invención el gránulo comprende una enzima y un donador de iones de cobre, donde la enzima es seleccionada de amilasas, fosfatasas, fitasas, celulasas, β -glucanasas, hemicelulasas, proteasas, peptidasas, galatosidasas, pectinasas, esterases, lipasas y glucosa-oxidasa, y donde la cantidad de cobre añadida al gránulo durante la producción del gránulo es entre 1 y 600 Cu^{2+} /molécula de proteína enzimática y donde el tamaño de partícula del gránulo es entre 50-2000 μm , y donde el gránulo ha sido tratado con vapor a una temperatura de al menos 60°C.

Pienso para animales

15 [0050] El gránulo de la presente invención es adecuado para el uso en las composiciones de pienso para animales. El gránulo se mezcla con sustancias de pienso, tal composición de pienso se llama el pienso triturado. Las características del gránulo permiten su uso como un componente de una composición que es bien adecuada como un pienso para animales, que es tratado con vapor y opcionalmente posteriormente granulado. El término animal incluye todos los animales.

Ejemplos de animales son no rumiantes, y rumiantes, tales como vacas, oveja y caballos.

20 En una forma de realización particular, el animal es un animal no rumiante.

Animales no rumiantes incluyen animales monogástricos, por ejemplo cerdos o puercos (incluyendo, pero no limitado a, lechones, cerdos en crecimiento, y cerdas); aves tales como pavos y pollo (incluyendo pero no limitado a pollos de engorde, gallinas ponedoras); terneros jóvenes; y pescan (incluyendo pero no limitado a salmón).

El pienso de la presente invención puede comprender proteínas vegetales.

25 El término proteínas vegetales como se utiliza en este caso se refiere a cualquier compuesto, composición, preparación o mezcla que incluye al menos una proteína derivada de u originada de un vegetal, incluyendo proteínas modificadas y derivados de proteína.

En formas de realización particulares, el contenido de proteína de las proteínas vegetales es al menos 10, 20, 30, 40, 50, o 60% (p/p).

30 Proteínas vegetales se pueden derivar de fuentes de proteína vegetal, tales como leguminosas y cereales, por ejemplo materiales de plantas de las familias *Fabaceae* (*leguminosae*), *Cruciferaeae*, *Chenopodiaceae*, y *Poaceae*, tal como harina de soja, harina de lupino y comida de semilla de colza.

En una forma de realización particular, la fuente de proteína vegetal es material de una o varias plantas de la familia *Fabaceae*, por ejemplo semilla de soja, altramuza, guisante, o judía.

35 En otra forma de realización particular, la fuente de proteína vegetal es material de una o varias plantas de la familia *Chenopodiaceae*, por ejemplo remolacha, remolacha azucarera, espinaca o quinoa.

Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son semilla de colza, y repollo.

Semilla de soja es una fuente de proteína vegetal preferida.

40 Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son cereales tales como cebada, trigo, centeno, avena, maíz (grano), arroz, y sorgo.

Aditivos de pienso adecuados son inhibidores enzimáticos, vitaminas liposolubles, vitaminas solubles en agua, oligoelementos y macrominerales.

45 Además, ingredientes opcionales de aditivo de pienso son agentes colorantes, compuestos de aroma, estabilizadores, péptidos antimicrobianos, y/o al menos otra enzima seleccionada de entre fitasas EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26; xilanasas EC 3.2.1.8; galactanasas EC 3.2.1.89; y/o beta-glucanasas EC 3.2.1.4.

Ejemplos de péptidos antimicrobianos (AMP) son CAP18, Leucocina A, Tritrpticina, Protegrina-1, Tanatina, Defensina, ovispirina tal como novispirina (Robert Lehrer, 2000), y variantes, o fragmentos de los mismos que retienen actividad antimicrobiana.

50 Ejemplos de polipéptidos antifúngicos (AFP) son el *Aspergillus giganteus*, y péptidos de *Aspergillus niger*, al igual que variantes y fragmentos de los mismos que retienen actividad antifúngica, como se describe en WO 94/01459 y PCT/DK02/00289.

Vitaminas normalmente lipo e hidrosolubles, al igual que oligoelementos forman parte de la llamada premezcla destinada para la adición al pienso, mientras que macrominerales son normalmente añadidos por separado al pienso.

55 Las siguientes son listas no exclusivas de ejemplos de estos componentes:

Ejemplos de vitaminas liposolubles son vitamina A, vitamina D3, vitamina E, y vitamina K, por ejemplo vitamina K3.

Ejemplos de vitaminas hidrosolubles son vitamina B12, biotina y colina, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, niacina, ácido fólico y pantotenato, por ejemplo ca-D-pantotenato.

Ejemplos de oligoelementos son manganeso, zinc, hierro, cobre, yodo, selenio, y cobalto.

60 Ejemplos de macrominerales son calcio, fósforo y sodio.

En todavía otras formas de realización particulares, la composición de pienso para animales de la invención contiene 0-80% maíz; y/o 0-80% sorgo; y/o 0-70% trigo; y/o 0-70% cebada; y/o 0-30% avena; y/o 0-40% harina de soja; y/o 0-10% harina de pescado; y/o 0-20% suero de leche.

65 [0051] La presente invención es posteriormente descrita por los siguientes ejemplos que no deberían ser interpretados como limitación del ámbito de la invención.

Métodos y materiales

Prueba de vapor

5 [0052] Una prueba de tratamiento con vapor a escala de laboratorio ha sido desarrollada para simular las actividades residuales que son encontradas después de la granulación con vapor a gran escala.

[0053] La prueba de tratamiento con vapor a escala de laboratorio comprende un mezclador Lödige de 5 litros equipado con una envoltura.

10 El mezclador también tiene una abertura en el fondo, que se puede usar para un termopar o introducción de vapor a través de un tubo.

Flujo de vapor para el tratamiento de los granulados son controlados dejando el vapor a 1.5 bar pasando un agujero de 2.0 mm.

15 El mezclador se precalienta por vapor a través de la envoltura mezcladora para alcanzar una temperatura de 100°C. Para evitar el condensado en conexiones de vapor y tubo para ser insertado en el mezclador, un flujo de vapor es permitido antes de la introducción del granulado.

Las condiciones de pruebas comprenden una serie de acciones controladas con precisión en el tiempo para buena reproducibilidad.

20 A tiempo cero, 1 kg de granulados de enzima se añade al mezclador mientras giran las herramientas mezcladoras a toda velocidad.

Inmediatamente después el tubo de vapor se inserta en el mezclador para que los granulados alcancen 100°C, y después de precisamente 30 segundos el vapor es desactivado.

La mezcla se mantiene a 100°C durante otros 30 segundos tras lo cual aprox 200 gramos se vierten en una red de tamizado de 75 micras.

25 Para enfriar inmediatamente el granulado caliente una red es situada encima de la red de muestra y la muestra se enfría durante 60 segundos usando una tapa conectada a la ventilación de aire.

Una muestra de referencia es tomada antes y después del tratamiento con vapor y enviada a la medición de actividad FYT para calcular la actividad residual.

30 Mediciones de estabilidad de granulación

Configuración experimental en el ejemplo 5, 8 y 11:

35 [0054] Aproximadamente 50 g de granulado enzimático fue premezclado con 10 kg de pienso durante 10 minutos en un mezclador horizontal pequeño.

Esta premezcla fue mezclada con 90 kg de pienso durante 10 minutos en un mezclador horizontal más grande.

Del mezclador el pienso fue conducido al acondicionador (un mezclador de cascada con inyección de vapor) a razón de aproximadamente 300 kg/hora.

40 El acondicionador calentó el pienso a 100°C (medido en la salida) por inyección de vapor.

El periodo de permanencia en el acondicionador fue 60 segundos.

Del acondicionador el pienso fue conducido a una prensa de Simon Heesen equipada con un cuño horizontal de 3.0x35 mm y prensado hasta gránulos con una longitud de alrededor de 15 mm.

Después de la prensa los gránulos fueron colocados en un refrigerador de aire y enfriados durante 15 minutos.

45 [0055] Formulación de pienso:

74.0% maíz molido

20.7% sémola de soja tostada

5.0% Aceite de soja

0.3% premezcla Solivit Mikro 106 de minerales y vitaminas

50 12% Contenido de agua

Análisis de actividad de fitasa

55 [0056] Método: fitasa divide ácido fítico en fosfato, el fosfato liberado se reacciona con vanadio y óxidos de molibdeno en un complejo coloreado (amarillo).

La absorbancia se mide a 415 nm.

Unidad: 1 FTU = cantidad de enzima que a condiciones estándar (como se da debajo) libera fosfato equivalente a 1 µM de fosfato por minuto.

60 Tampones:

[0057] Tampón de extracción: 0.01% Tween 20 (polioxietileno sorbitán monolaurato)

Sustrato: 5 mM ácido fítico, 0.22M acetato (acetato de sodio/ácido acético), pH 5.5.

65 Reactivo: 5 mM de vanadato de amonio, 20 mM de heptamolibdato de amonio tetrahidrato, 40 mM amoníaco, 2.4M ácido nítrico

Procedimiento:

[0058] Extracción de pienso: 50 g de pienso son extraídos en un tampón de extracción de 500 ml durante 1 hora. Otra dilución eventual en el tampón de extracción si la actividad es superior a 2.5 FTU/g de pienso. (nivel de detección es 0.1 FTU/g de pienso).

La muestra es centrifugada (15 minutos a 4000 r.p.m.). 300 µl de sobrenadante se mezclan con 3 ml sustrato y se reacciona durante 60 minutos a 37 grados C. 2 ml de reactivo se añade.

Las muestras son centrifugadas (10 minutos a 4000 rpm.). La absorbancia a 415 nm es medida.

La actividad se determina con respecto a una curva estándar preparada con KH_2PO_4 .

Se hace referencia a WO 2003/66847.

EJEMPLOS**Ejemplo 1**

[0059] Un polvo consistente en:

1,5 Kg de celulosa fibrosa, Arbocel BC200

0,75 Kg de ligante de carbohidrato, Avedex W80

11.362 kg de sulfato de sodio finamente molido

fue granulado en un mezclador Lödige FM 50 con un líquido de granulación consistente en:

0,75 Kg de ligante de carbohidrato, Avedex W80

0,3 Kg de almidón de trigo

1,7 Kg de concentrado de fitasa

1,275 Kg de agua

[0060] La granulación fue realizada en cierto modo como se describe en la patente US nº 4.106.991, Ejemplo 1.

[0061] El granulado obtenido fue secado en un lecho fluido hasta un contenido de agua por debajo de 1% y tamizado para obtener un producto con la gama de partícula 250 µm a 850 µm.

Finalmente, el producto fue recubierto con 11,5% de aceite de palma y 22% de carbonato cálcico en un modo según se describe en la patente US nº 4.106.991, Ejemplo 22.

Ejemplo 2

[0062] Un polvo consistente en:

1,5 Kg de celulosa fibrosa, Arbocel BC200

0,75 Kg de ligante de carbohidrato, Avedex W80

11,272 kg sulfato de sodio finamente molido

fue granulado en un mezclador Lödige FM 50 con un líquido de granulación consistente en:

0,75 Kg de ligante de carbohidrato, Avedex W80

0,3 Kg de almidón de trigo

0,09 Kg de $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$

1,7 Kg de concentrado de fitasa

0,016 Kg 26% NaOH

1,2 Kg de agua

[0063] La granulación fue realizada en un modo según se describe en la patente US nº 4,106,991, Ejemplo 1.

El granulado fue secado en un lecho fluido hasta un contenido de agua por debajo de 1 % y tamizado para obtener un producto con la gama de partícula 250 µm a 850 µm.

Finalmente, el producto fue recubierto con 11,5% aceite de palma y 22% de carbonato cálcico en un modo según se describe en la patente US nº 4,106,991, Ejemplo 22.

Ejemplo 3

[0064] Un polvo consistente en:

1,5 Kg de celulosa fibrosa, Arbocel BC200

0,75 Kg de ligante de carbohidrato, Avedex W80

11,107 kg de sulfato de sodio finamente molido

fue granulado en un mezclador Lödige FM 50 con un líquido de granulación consistente en:

0,75 Kg de ligante de carbohidrato, Avedex W80

0,3 Kg de almidón de trigo

0,255 Kg de $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$

1,7 Kg de concentrado de fitasa

0,035 Kg NaOH 26%

1,25 Kg de agua

[0065] La granulación fue realizada en un modo según se describe en la patente US nº 4.106.991, Ejemplo 1.

[0066] El granulado fue secado en un lecho fluido hasta un contenido de agua por debajo de 1% y tamizado para obtener un producto con la gama de partícula 250 µm a 850 µm.

5 Finalmente, el producto fue recubierto con 12,0% aceite de palma y 22% de carbonato cálcico en cierto modo como se describe en la patente US nº 4.106.991, Ejemplo 22.

Ejemplo 4

10 [0067] Un polvo consistente en:

1,5 Kg celulosa fibrosa, Arbocel BC200

0,75 Kg ligante de carbohidrato, Avedex W80

10,912 kg sulfato de sodio finamente molido

fue granulado en un mezclador Lödige FM 50 con un líquido de granulación consistente en:

15 0,75 Kg ligante de carbohidrato, Avedex W80

0,3 Kg almidón de trigo

0,450 Kg CuSO₄ x 5 H₂O

1,7 Kg concentrado de fitasa

0,035 Kg 26% NaOH

20 1,25 Kg agua

[0068] La granulación fue realizada en un modo según se describe en la patente US nº 4.106.991, Ejemplo 1.

[0069] El granulado fue secado en un lecho fluido hasta un contenido de agua por debajo de 1% y tamizado para obtener un producto con la gama de partícula 250 µm a 850 µm.

25 Finalmente, el producto fue recubierto con 11,5% aceite de palma y 22% de carbonato cálcico en un modo como se describe en la patente US nº 4.106.991, Ejemplo 22.

Ejemplo 5

30 [0070] Las muestras producidas en el ejemplo 1 a ejemplo 4 fueron evaluadas en una prueba de granulación a 100°C en la salida del acondicionador.

El contenido de fitasa fue medido utilizando el método analítico EB-SM 0559.02 versión 01 (disponible de Novozymes contra pedido) en un pienso triturado antes de la granulación y en los gránulos de pienso después de la granulación.

35 Las siguientes actividades residuales de la fitasa fueron descubiertas:

Lote	Actividad Residual de la fitasa en [%]
Ejemplo 1	68.5
Ejemplo 2	86.9
Ejemplo 3	86.3
Ejemplo 4	87.6

40 [0071] La conclusión es que CuSO₄ mejora significativamente la estabilidad de la granulación.

Ejemplo 6

[0072] La estabilidad per se fue evaluada.

Actividad Residual de la fitasa en [%]:

Lote	Cantidad de Cu ²⁺ /molécula de proteína enzimática	después de 4 semanas a 40°C	después de 4 semanas a 50°C	después de 4 semanas a 40°C/60% RH
Ejemplo 2	135	91.3	68.2	26.3
Ejemplo 3	380	87.7	61.9	17.7
Ejemplo 4	675	91.6	68.8	15.0

45 [0073] Se puede concluir que iones de cobre tienen una influencia negativa en la estabilidad per se. La estabilidad se reduce per se con una cantidad en aumento de iones Cu²⁺.

Ejemplo 7

50 [0074] Un polvo consistente en:

1,5 Kg de celulosa fibrosa, Arbocel BC200

0,75 Kg de ligante de carbohidrato, Avedex W80

11,312 kg de sulfato de sodio finamente molido

55 fue granulado en un mezclador Lödige FM 50 con un líquido de granulación consistente en:

0,75 Kg de ligante de carbohidrato, Avedex W80
 0,3 Kg de almidón de trigo
 1,595 Kg de concentrado de fitasa
 1,450 Kg de agua

5 [0075] La granulación fue realizada en un modo según se describe en la patente US nº 4.106.991, Ejemplo 1.

[0076] El granulado obtenido fue secado en un lecho fluido hasta un contenido de agua por debajo de 1% y tamizado para obtener un producto con la gama de partícula 250 µm a 850 µm.

10 Finalmente, el producto fue recubierto con 10% de aceite de palma y 22% de carbonato cálcico en un modo según se describe en la patente US nº 4.106.991, Ejemplo 22.

Ejemplo 8

15 [0077] Un polvo consistente en:
 1,5 Kg de celulosa fibrosa, Arbocel BC200
 0,75 Kg de ligante de carbohidrato, Avedex W80
 11,267 kg de sulfato de sodio finamente molido
 fue granulado en un mezclador Lödige FM 50 con un líquido de granulación consistente en:
 20 0,75 Kg de ligante de carbohidrato, Avedex W80
 0,3 Kg de almidón de trigo
 0,045 Kg de CuSO₄ x 5 H₂O
 1,595 Kg de concentrado de fitasa
 1,45 Kg de agua

25 [0078] La granulación fue realizada en un modo según se describe en la patente US nº 4.106.991, Ejemplo 1.
 El granulado fue secado en un lecho fluido hasta un contenido de agua por debajo de 1% y tamizado para obtener un producto con la gama de partícula 250 µm a 850 µm.
 Finalmente, el producto fue recubierto con 10,1% de aceite de palma y 22% de carbonato cálcico en un modo como
 30 se describe en la patente US nº 4.106.991, Ejemplo 22.

Ejemplo 9

35 [0079] Un polvo consistente en:
 1,5 Kg de celulosa fibrosa, Arbocel BC200
 0,75 Kg de ligante de carbohidrato, Avedex W80
 11,222 kg de sulfato de sodio finamente molido
 fue granulado en un mezclador Lödige FM 50 con un líquido de granulación consistente en:
 40 0,75 Kg de ligante de carbohidrato, Avedex W80
 0,3 Kg de almidón de trigo
 0,090 Kg de CuSO₄ x 5 H₂O
 1,595 Kg de concentrado de fitasa
 1,4 Kg de agua

45 [0080] La granulación fue realizada en un modo según se describe en la patente US nº 4,106,991, Ejemplo 1.
 El granulado fue secado en un lecho fluido hasta un contenido de agua por debajo de 1% y tamizado para obtener un producto con la gama de partícula 250 µm a 850 µm.
 Finalmente, el producto fue recubierto con 10,2% de aceite de palma y 22% de carbonato cálcico en un modo según
 50 se describe en la patente US nº 4,106,991, Ejemplo 22.

Ejemplo 10

[0081] Las muestras producidas en el Ejemplo 7 a Ejemplo 9 fueron evaluadas en una prueba de granulación a 100°C en la salida del acondicionador.
 55 El contenido de fitasa fue medido utilizando el método analítico EB-SM 0559.02 versión 01 (disponible de Novozymes contra pedido) antes de la granulación y en los gránulos de pienso después de la granulación.
 Las siguientes actividades residuales de la fitasa fueron encontradas:

Lote	Actividad residual de la fitasa en [%]
Ejemplo 7	62.2
Ejemplo 8	76.2
Ejemplo 9	81.4

60 [0082] La conclusión es que CuSO₄ mejora significativamente la estabilidad de la granulación.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Gránulo adecuado para pienso que incluye una enzima, donde el gránulo tiene un tamaño de partícula de 50-2000 μm , **caracterizado por el hecho de que** el gránulo comprende una mezcla de la enzima y un donador de iones de cobre en una cantidad entre 1 y 600 Cu^{2+} /molécula de proteína enzimática.
2. Gránulo según la reivindicación 1, donde el gránulo comprende un núcleo y una capa que rodea el núcleo, y donde la enzima y el donador de iones de cobre están presentes en el núcleo.
- 10 3. Gránulo según la reivindicación 1, donde la enzima y el donador de iones de cobre están presentes en una capa que rodea una partícula inactiva.
4. Gránulo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la cantidad de cobre adicionada es entre 1 y 400 Cu^{2+} /molécula de proteína enzimática.
- 15 5. Gránulo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el donador de iones de cobre es seleccionado del grupo consistente en sales de cloruro de cobre, bromuro, yoduro, sulfato, sulfito, bisulfito, tiosulfato, fosfato, fosfato monobásico, fosfato dibásico, hipofosfito, pirofosfato de dihidrógeno, tetraborato borato, carbonato, bicarbonato, metasilicato, citrato, malato, maleato, malonato, metionato, succinato, lactato, formiato, acetato, butirato, propionato, benzoato, tartrato, ascorbato, gluconato y combinaciones de los mismos.
- 20 6. Gránulo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el donador de iones de cobre es seleccionado del grupo consistente en sulfato de cobre, acetato de cobre, citrato de cobre y metionato de cobre.
- 25 7. Gránulo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enzima es seleccionada del grupo consistente en amilasas, fosfatasas, fitasas, celulasas, β -glucanasas, hemicelulasas, proteasas, peptidasas, galatosidasas, pectinasas, estererasas, lipasas, glucosa-oxidasa y sus mezclas derivadas.
- 30 8. Gránulo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la enzima es seleccionada del grupo consistente en amilasas, proteasas, beta-glucanasas, fitasas, xilanasas, fosfolipasas, glucosa oxidasas y sus mezclas derivadas.
9. Gránulo según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde la enzima es una fitasa.
- 35 10. Gránulo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el gránulo comprende un recubrimiento de sal.
11. Gránulo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el gránulo comprende un recubrimiento de polímero.
- 40 12. Gránulo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el gránulo comprende un recubrimiento de cera.
- 45 13. Método para fabricación de una composición de pienso que incluye las etapas de:
i. mezclar componentes de pienso con los gránulos de cualquier reivindicación precedente,
ii. tratar con vapor dicha composición (i), y
iii. granular dicha composición (ii).
- 50 14. Método según la reivindicación 13, donde el tratamiento con vapor es hecho a una temperatura de al menos 60°C, al menos 70°C, al menos 80°C, o al menos 90°C.