

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 598 482**

51 Int. Cl.:

A23K 40/30 (2006.01)

A23K 20/189 (2006.01)

A23K 20/158 (2006.01)

C12N 11/02 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.01.2007 PCT/EP2007/000263**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.07.2007 WO07082693**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2007 E 07711341 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 1974030**

54 Título: **Formulaciones de enzimas mejoradas para pienso**

30 Prioridad:

17.01.2006 GB 0600913

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

27.01.2017

73 Titular/es:

AB ENZYMES GMBH (100.0%)

Feldbergstrasse 78

64293 Darmstadt, DE

72 Inventor/es:

WINN, PETER, DAVID;

SILVERTHORNE, JOHN, MARTIN;

STREET, PETER, FRANCIS, SCOTT y

MULQUEEN, PATRICK, JOSEPH

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 598 482 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulaciones de enzimas mejoradas para pienso.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a mejoras en la fabricación de piensos. Más en particular, la invención se refiere a métodos para producir un producto que contenga enzima, mejorado, para uso en la fabricación de pienso y a los productos producidos por tales métodos.

Antecedentes de la invención

10 Los alimentos para animales están constituidos predominantemente por cereales y proteínas vegetales, una gran porción de los cuales no puede ser digerida completamente por los animales monogástricos, incluyendo cerdo y aves de corral. Mucha de la energía disponible está contenida en la forma de polisacáridos no de almidón (PNA) que los animales monogástricos no pueden digerir. De manera similar, la mayoría de los materiales vegetales usados en los piensos contiene el fósforo mineral que está unido en la forma de ácido fítico y no puede ser degradado por los animales monogástricos. Las enzimas externas, por ejemplo, fitasa, añadidas directamente a los piensos actúan como suplementos para las enzimas digestivas normales ya presentes en el sistema digestivo de los animales. La adición de enzimas ayuda a mejorar la digestibilidad, facilitando la mejor utilización de los piensos. Cuanto más pueda utilizar un animal el pienso, mejor será la realización del animal (por ej., ganancia de peso aumentada) y menor será la carga medioambiental en términos de estiércol u otro desecho.

20 Para la utilización de fósforo de fitato y minerales y elementos traza unidos en complejos de ácido fítico, es necesaria la hidrólisis de los grupos fosfato unidos de tipo éster de ácido fítico por la fitasa. Las fitasas pertenecen a un grupo especial de fosfatasa que pueden hidrolizar fitato a una serie de ésteres de fosfato inferiores de mioinositol y fosfato. Se conocen dos tipos de fitasas: 3-fitasa y 6-fitasa, que indica el ataque inicial del enlace éster del fosfato susceptible. Aunque los animales monogástricos carecen de suficiente fitasa para utilizar con eficacia fósforo de fitato, muchos hongos, bacterias y levaduras producen fitasa que puede utilizarse para suplementar raciones para los animales.

25 Los efectos beneficiosos de las fitasas suplementarias en la digestibilidad del fósforo y la realización del animal están bien documentados. La eficacia de cualquier preparación enzimática depende no sólo del tipo, la tasa de inclusión y el nivel de actividad presente, sino también de la capacidad de la enzima para mantener su actividad en las diferentes condiciones encontradas por el tubo digestivo y las condiciones usadas para el tratamiento previo de una formulación de pienso.

30 Desafortunadamente, durante el procedimiento de fabricación del pienso (en general, extrusión, granulación, etc.), las condiciones de alta temperatura y presión con frecuencia dan como resultado una pérdida significativa de ingredientes sensibles al calor y/o solubles en agua, valiosos, tales como las enzimas. Los ingredientes también se pueden perder en procedimientos posteriores a la fabricación cuando los piensos se exponen al aire y al agua durante, por ejemplo, el almacenamiento y la manipulación, o de condiciones que tienen lugar en el sistema propio del animal. La pérdida de valor o funcionalidad del ingrediente puede ser costosa y aumentar el riesgo de pérdida de una composición de pienso fijada como objetivo que sea necesaria para la realización óptima del animal. Debido a que la mayoría de las enzimas comerciales disponibles en la actualidad no son termotolerantes, con frecuencia se aplican posteriormente a la granulación, en general vía pulverización de una disolución enzimática sobre el pienso granulado para evitar la inactivación por calor de la enzima o las enzimas que tendría lugar durante el procedimiento de granulación. Sin embargo, las cantidades de enzima en las preparaciones de pienso finales normalmente son muy pequeñas, lo que hace difícil conseguir una distribución homogénea de la enzima en el pienso y los líquidos son notoriamente más difíciles de mezclar uniformemente que los ingredientes secos. Además, se requiere equipo especializado (caro) para añadir líquidos al pienso después de la granulación que no está disponible en la actualidad en la mayoría de las fábricas de piensos (debido al coste extra).

45 Las formulaciones secas de enzima o enzimas, por otra parte, presentan la desventaja potencial de la inactivación térmica de las enzimas durante la granulación. Los protocolos de fabricación preferidos en la industria de los piensos implican la granulación con vapor en el caso de que el pienso se someta a inyección o inyecciones de vapor previamente a la granulación. En la etapa de granulación posterior, el pienso es forzado a través de una matriz o boquilla y se cortan las tiras de mezcla extruida resultantes en gránulos adecuados de longitud variable. El contenido en humedad inmediatamente antes de la granulación es generalmente entre 15-25% y típicamente entre 18% y 19%. Durante este procedimiento, las temperaturas del pienso pueden elevarse a 60-95°C o más. El efecto combinado de alto contenido en humedad y alta temperatura es perjudicial para muchas enzimas. Estas desventajas también se encuentran en otros tipos de tratamientos termomecánicos tales como extrusión y expansión.

55 Una propuesta para resolver el problema de pérdida de actividad enzimática durante el procedimiento de calentamiento ha sido descubrir o lograr por bioingeniería enzimas termotolerantes. Por ejemplo, la Patente de EE.UU. 7.135.323 describe una fitasa termotolerante lograda por bioingeniería que retiene al menos el 40% de actividad después de 30 minutos a aproximadamente 60°C y que presenta una alta actividad específica, es decir, al

5 menos aproximadamente 200 unidades de fitasa/mg a 37°C y un pH ácido, por ej., pH 4,5. Dicha fitasa termotolerante comercialmente disponible como Fitasa Quantum™ presenta una actividad específica 8 veces mayor que otras enzimas comercialmente disponibles y puede añadirse previamente a la granulación, facilitando de ese modo la producción de un pienso con una distribución mejorada de la enzima. Por otra parte, el pienso que comprende la Fitasa Quantum™ puede presentar una semivida mayor que el pienso pulverizado con fitasa, ya que el procedimiento de pulverización introduce humedad que puede soportar crecimiento fúngico y bacteriano durante el almacenamiento.

10 Ha habido intentos previos de proteger algunos de los ingredientes más susceptibles o costosos recubriéndolos con diversos materiales. Las propuestas practicadas hasta la fecha incluyen combinaciones de recubrimiento de ingredientes modificados de manera química con varios materiales para conseguir protección. Una técnica usada fue recubrir el ingrediente con alguna forma de lípido tal como grasas o ácidos grasos procedentes de una variedad de fuentes animales y vegetales usando un procedimiento tal como la microencapsulación. Sin embargo, dichos recubrimientos presentan todos una característica común por que sus puntos de fusión no exceden comúnmente de aproximadamente 70°C. Por lo tanto, su uso eficaz como un recubrimiento protector está normalmente limitado a entornos de tratamiento por debajo de 70°C. Las temperaturas asociadas a los procedimientos de extrusión y granulación son típicamente mayores que 70°C y los piensos producidos por extrusión con frecuencia requieren secado a temperaturas que exceden de 100°C, haciendo así los recubrimientos de lípidos en gran parte ineficaces para máxima protección del ingrediente cuando se usan dichos procedimientos de fabricación a temperatura alta. Además, estas técnicas emplean grandes cantidades de lípido, que se fija típicamente en capa sucesivas alrededor del ingrediente. Esto puede reducir enormemente la biodisponibilidad del producto tratado.

15 La patente de EE.UU. 2005/163765 describe un procedimiento para la preparación de un granulado que contiene enzimas, en el que un líquido que contiene enzimas, acuoso, es, opcionalmente enriquecido con un portador sólido y/o ingredientes aditivos, tratado en gránulos, secado y con posterioridad recubierto con una poliolefina, preferiblemente polipropileno y/o polietileno.

20 La patente internacional WO 92/12645 describe una enzima que contiene granulado en T que está recubierto con un agente de recubrimiento que comprende una grasa o cera de fusión alta.

25 La patente de EE.UU. 6.610.519 describe una composición de fitasa sólida con una actividad de fitasa de por encima de 20 FYT/g que contiene una fuente de ácido láctico tal como licor de maceración del maíz para estabilizar la fitasa. La patente de EE.UU. 6.500.426 describe gránulos que contienen enzimas para fabricar composiciones de pienso usando un portador que contiene al menos aproximadamente 15% (p/p) de carbohidrato tal como almidón y menos de 5% (p/p) de proteína.

30 La patente de EE.UU. 6.136.772 describe gránulos que contienen enzimas que comprenden (a) una enzima y (b) un núcleo que puede de manera intrínseca absorber al menos 5% p/p (basado en el peso del núcleo) de agua y procedimientos para la producción de tales gránulos.

35 La patente internacional WO 94/17106 describe un método y preparación para el almacenamiento y suministro de reactivos proteínicos purificados que comprende una cantidad de un primer portador de cera, teniendo el primer portador de cera un primer punto de fusión y una cantidad de un primer reactivo, en el que el primer reactivo es una preparación sustancialmente purificada de un reactivo proteínico.

40 La patente internacional WO 98/27199 describe un procedimiento para la inmovilización de una enzima, que comprende las etapas: a. seleccionar una enzima anfífilica para inmovilización, b. preparar una emulsión que comprenda una fase hidrófoba continua y una fase acuosa dispersada, fase acuosa que contenga la enzima y material adecuado para actuar como portador para la enzima cuando se lleve a cabo la siguiente etapa, material que se disuelva parcialmente y no se disuelva parcialmente en la fase acuosa, c. retirar agua de la fase dispersada hasta que esta fase se transforme en partículas recubiertas de enzima sólidas.

45 Aunque las enzimas termotolerantes tales como la fitasa mejoran enormemente la fabricación de pienso, se requieren más mejoras para proteger la enzima de temperaturas incluso mayores manteniendo aún su biodisponibilidad. Por lo tanto, existe una necesidad de proporcionar un producto que contenga enzima, que sea adecuado para uso en la producción de pienso que presente estabilidad de la enzima mejorada durante el tratamiento térmico.

50 De acuerdo con esto, la presente invención proporciona un método para preparar un producto enzimático termoestable, mejorado, para uso en la fabricación de pienso.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un método para preparar un producto enzimático termoestable para uso en la fabricación de pienso que comprende:

55 a. combinar (i) una enzima, (ii) un portador sólido y (iii) una sustancia hidrófoba fundible seleccionada de: aceite de ricino hidrogenado, una mezcla de aceite vegetal hidrogenado y no hidrogenado, una cera microcristalina, ácido 12-

hidroxiesteárico, aceite de almendra de palma hidrogenado, aceite de palma hidrogenado, aceite de colza hidrogenado y cera parafínica de fusión alta para proporcionar un producto combinado;

b. opcionalmente aplicar suficiente calor al producto combinado de la etapa (a) para permitir que funda la sustancia hidrófoba fundible;

5 c. enfriar el producto combinado para proporcionar el producto enzimático termoestable y

d. opcionalmente secar el producto a un contenido de humedad deseado.

La cantidad de sustancia hidrófoba fundible usada en la presente invención puede ser insuficiente para proporcionar un recubrimiento contiguo alrededor de la enzima que se tiene que proteger. La biodisponibilidad de la enzima se mantiene, por lo tanto. Añadir dicha sustancia hidrófoba fundible a una formulación enzimática sorprendentemente e inesperadamente mejora la estabilidad térmica del producto enzimático sobre productos similares sin la sustancia hidrófoba fundible. Sin desear estar ligados por la teoría, se formula la hipótesis de que la realización mejorada de los productos producidos según la presente invención es debida a una combinación de la capacidad térmica aumentada de la sustancia hidrófoba fundible (reduciéndose de ese modo el impacto directo del calor sobre las enzimas durante el procedimiento de granulación del pienso) y la naturaleza hidrófoba del tratamiento, que reduce la tasa de entrada de humedad (vapor) a la posición de la enzima en el producto durante el procedimiento de granulación del pienso. La sustancia hidrófoba fundible según la presente invención se selecciona como se definió anteriormente e incluye (por sus siglas en inglés): aceite de ricino hidrogenado (HCO), aceite de almendra de palma hidrogenado (HPKO), aceite de palma hidrogenado (FHPO o Akoflake Palm 58 (AP)) o aceite de colza hidrogenado (FHRO o Akoflake FSR (AFx, donde x= F (escama) o M (masa fundida))), una mezcla de aceite vegetal hidrogenado y no hidrogenado (PB3), ácido 12-hidroxiesteárico (12-HAS), cera microcristalina tal como Cerit HOT y ceras parafínicas de fusión alta tales como Mekon White. Esta sustancia hidrófoba fundible como se definió anteriormente puede ser un único componente o proceder de mezclas de productos diseñados para producir un punto de fusión deseado.

El producto enzimático termotolerante obtenido según la invención puede ser añadido como un suplemento a pienso o a componentes de pienso previamente a, o durante, el tratamiento del pienso. El producto enzimático termotolerante obtenido según la invención puede ser añadido a una mezcla de componentes del pienso previamente a, y/o durante, el acondicionamiento térmico (por ej., vapor) en una fábrica de gránulos. Así, la invención incluye métodos para preparar y usar un producto enzimático termotolerante. La presente invención se refiere también, en general, a un método para preparar un suplemento alimenticio para animales monogástricos. El método incluye tratar una enzima con una cantidad protectora de una sustancia hidrófoba fundible biocompatible.

Según un aspecto, la presente invención proporciona un producto enzimático termoestable para uso en la fabricación de pienso que comprende:

a. combinar (i) una enzima, (ii) un portador sólido y (iii) una sustancia hidrófoba fundible seleccionada de: aceite de ricino hidrogenado, una mezcla de aceite vegetal hidrogenado y no hidrogenado, una cera microcristalina, ácido 12-hidroxiesteárico, aceite de almendra de palma hidrogenado, aceite de palma hidrogenado, aceite de colza hidrogenado y cera parafínica de fusión alta para proporcionar un producto combinado;

b. opcionalmente aplicar suficiente calor al producto combinado de la etapa (a) para permitir que funda la sustancia hidrófoba fundible;

c. enfriar el producto combinado para proporcionar el producto enzimático termoestable y

40 d. opcionalmente secar el producto a un contenido de humedad deseado.

En un aspecto de esta realización, es posible modificar el orden de adición y/o tratamiento, tal como preparando un producto enzimático seco como una primera fase añadiendo enzima a un portador sólido y añadiendo después la sustancia hidrófoba fundible. En una realización, la enzima es fitasa y la sustancia hidrófoba fundible se selecciona del grupo que consiste en: aceite de ricino hidrogenado, aceite de almendra de palma hidrogenado, aceite de colza hidrogenado, aceite de palma hidrogenado, una mezcla de aceite vegetal hidrogenado y no hidrogenado, ácido 12-hidroxiesteárico, Cerit HOT y Mekon White. Lo anterior y otros aspectos de la invención llegarán a ser más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

Descripción de la secuencia en el listado de secuencias.

SEC ID N°: 1 es la secuencia de aminoácidos de una fitasa útil como un suplemento en pienso.

50 Descripción detallada de la invención

Las enzimas tales como la fitasa son importantes como suplementos alimenticios para los animales, en particular los animales monogástricos como aves de corral y cerdos y es deseable proporcionar la máxima cantidad de enzima. Puesto que la mayoría de los productos enzimáticos comerciales no es termoestable, la cantidad de enzima

disponible para los animales está limitada por el procedimiento a alta temperatura/vapor con el que se fabrica el pienso. Las sustancias hidrófobas fundibles y el método para su uso, descritos en la presente memoria, pueden proporcionar mayor protección frente al calor y al agua de la funcionalidad de la enzima durante los procedimientos de fabricación de pienso y mantener la biodisponibilidad.

5 En una realización, la presente invención incluye un método para preparar un producto enzimático termoestable para uso en la fabricación de pienso que comprende:

10 a. combinar (i) una enzima, (ii) un portador sólido y (iii) una sustancia hidrófoba fundible seleccionada de: aceite de ricino hidrogenado, una mezcla de aceite vegetal hidrogenado y no hidrogenado, una cera microcristalina, ácido 12-hidroxiesteárico, aceite de almendra de palma hidrogenado, aceite de palma hidrogenado, aceite de colza hidrogenado y cera parafínica de fusión alta para proporcionar un producto combinado;

b. opcionalmente aplicar suficiente calor al producto combinado de la etapa (a) para permitir que funda la sustancia hidrófoba fundible;

c. enfriar el producto combinado para proporcionar el producto enzimático termoestable y

d. opcionalmente secar el producto a un contenido de humedad deseado.

15 En un aspecto de esta realización, la sustancia hidrófoba fundible se añade en la etapa (a) como escamas sólidas o como un líquido fundido profundido. El experto reconocerá que si se añade la sustancia hidrófoba fundible como un líquido fundido profundido, la etapa (b) puede no ser necesaria.

20 Los componentes referidos en la etapa (a) pueden combinarse en una sola etapa o alternativamente, en etapas separadas. Por ejemplo, la enzima se puede combinar primero con el portador sólido y opcionalmente agua, opcionalmente seco, y después la combinación enzima/portador resultante combinada con la sustancia hidrófoba fundible. En una realización, la enzima se produce en una planta, incluyendo pero no limitándose a, maíz o trigo y ese grano que contiene enzima se muele para producir un granulado o harina que comprende enzima activa en cantidad suficiente para producir un producto de efecto biológico cuando se estabiliza por el método de la invención. En otra realización, se realiza una o más de las etapas en un aparato de lecho fluidizado.

25 En otra realización, el portador sólido es un material absorbente y/o adsorbente. Los ejemplos de portadores sólidos que son adecuados para uso en el método de la presente invención incluyen, sin limitación, absorbentes de fuentes vegetales tales como granos de semillas molidos, por ejemplo, maíz molido, trigo molido, harinillas de trigo, harina de soja, cáscaras de arroz, pienso de gluten de maíz, sémola de maíz, granos secos de destilación y otros portadores adecuados u homologados para uso en pienso. El portador sólido también puede ser, pero no limitarse a, un absorbente de fuente mineral, por ejemplo, sílice, tierra de diatomeas o arcilla. En un aspecto de esta realización, el portador sólido es trigo o maíz molido. En otro aspecto, el portador sólido es harina de trigo o de maíz.

30 Por sustancia hidrófoba "fundible" se quiere decir una sustancia hidrófoba que es sólida a la temperatura de almacenamiento ambiente típica de un pienso producto pero funde a una temperatura por encima de ésta. En una realización, las temperaturas de fusión oscilarán de 25°C a 120°C. La temperatura superior está limitada por la capacidad para fundir la sustancia hidrófoba en el procedimiento y la estabilidad de la enzima a estas temperaturas elevadas durante el periodo de tratamiento. En un aspecto de esta realización, la sustancia hidrófoba presenta un punto de fusión en el intervalo 25-95°C. En otro aspecto de esta realización, la sustancia hidrófoba presenta un punto de fusión en el intervalo 30-90°C. En otro aspecto más de esta realización, la sustancia hidrófoba presenta un punto de fusión en el intervalo 50-90°C. En otro aspecto más de esta realización, la sustancia hidrófoba presenta un punto de fusión en el intervalo 60-80°C. En otro aspecto más de esta realización, la sustancia hidrófoba presenta un punto de fusión en el intervalo de 82-86°C. En otro aspecto de esta realización, la sustancia hidrófoba fundible presenta un punto de fusión en el intervalo de 66-69°C. En otro aspecto más de esta realización, la sustancia hidrófoba fundible presenta un punto de fusión en el intervalo de 58-60°C. En otro aspecto más de esta realización, la sustancia hidrófoba presenta un punto de fusión en el intervalo de 38-46°C.

45 En una realización, el producto que contiene enzima de la presente invención puede comprender cualquier cantidad adecuada de una sustancia hidrófoba fundible que proteja la enzima y mantenga la biodisponibilidad. En un aspecto de esta realización, el producto que contiene enzima comprende 1-30% en peso de una sustancia hidrófoba fundible. En otro aspecto de esta realización, el producto que contiene enzima comprende 5-20% en peso de una sustancia hidrófoba fundible. En otro aspecto de esta realización, el producto que contiene enzima comprende al menos 5% o más en peso, por ejemplo 7,5%, 10%, 20% o 30% de una sustancia hidrófoba fundible. Sin desear estar limitados por la teoría, se piensa que el tratamiento de la enzima con una sustancia hidrófoba fundible protege la matriz del producto enzimático del efecto de la temperatura y la humedad durante el procedimiento de granulación. Se añade una concentración suficiente de una sustancia hidrófoba fundible a la matriz para efectuar el tratamiento y asegurar la retención mejorada de actividad de la enzima, sin tener en cuenta la concentración de enzima presente en la matriz.

Típicamente, la enzima fitasa, en la que la fitasa comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1 se formula que contenga 2.500 unidades de fitasa/g de producto como un producto granular concentrado. Este producto

se mezcla después (se diluye) con agentes alimenticios adecuados y se mezcla por un procedimiento de calentamiento/granulación para producir un pienso que contiene una cantidad prescrita de enzima fitasa. Esta cantidad de enzima se determina por las necesidades de pienso de la especie animal fijada como objetivo, la edad y el uso deseado (por ejemplo, láminas o parrillas para pollos) y la naturaleza de la enzima. Es posible producir un producto concentrado según la invención en el que la carga enzimática sea mucho mayor. Por ejemplo, es posible producir un producto granular que contenga hasta al menos 20.000 unidades de fitasa/g. Los límites superiores de concentración están limitados predominantemente por la capacidad para dosificar dicho producto concentrado con precisión en una gran masa de pienso y asegurar que la enzima se distribuya de manera uniforme por toda la masa de pienso antes y después del procedimiento de granulación del pienso. Con un producto de fitasa típico que se formula para que contenga 2.500 unidades de fitasa/g, aumentar la concentración del producto a 20.000 unidades de fitasa/g requeriría que se aplicara sólo 12,5% del peso de un producto concentrado comparado con las clásicas 2.500 unidades de fitasa/g. Para un producto de 40.000 unidades de fitasa/g, sólo se requeriría que se aplicara 6,25% del producto concentrado para suministrar el mismo efecto que un producto clásico de 2.500 unidades de fitasa/g. Ese producto concentrado se estabilizaría aún por los niveles relativamente bajos (1-30%) de sustancia hidrófoba fundida como se describe en la presente memoria. Por otra parte, los ahorros de coste de emplear productos que contengan fitasa más concentrada son evidentes por sí mismos. Si la dosificación y distribución de dichos productos concentrados fuera problemática, también es posible considerar una alternativa económica para tratar toda la enzima a una concentración inferior considerando una dilución previa de la enzima concentrada (por ejemplo, a 20.000 unidades de fitasa/g) con un diluyente adecuado para producir una materia prima aceptable para el procedimiento de granulación final del pienso completo. Esto introduciría ahorros de coste por la capacidad para granular una cantidad muy reducida de enzima con el sólido hidrófobo fundible. Claramente, hay opciones aquí para un experto en la materia para variar la concentración de enzima en el producto granulado para ofrecer beneficios de coste mejorados sin comprometer la tolerancia térmica aumentada del producto conseguida por el tratamiento con un sólido hidrófobo fundible. Aunque las concentraciones de enzima mencionadas son específicas para enzima fitasa, los principios se pueden aplicar igualmente a otros sistemas enzimáticos dependiendo de sus tasas de uso y actividades específicas. También es posible considerar niveles mucho menores de enzima contenidos en el producto concentrado. Dichos productos también requerirán cargas de un sólido fundible hidrófobo en el intervalo 1-30%.

En otra realización, la invención incluye una disolución que contiene enzima que comprende una o más enzimas adecuadas para uso en un pienso. En un aspecto de esta realización, se selecciona una enzima del grupo que consiste en: fitasa, fosfatasa, xilanasas, celulasas, glucanasas, mananasas, amilasas, alfa-amilasa, glucoamilasa, peptidasas, lipasas, esterases, manasas, quitinasas, p-1,3- y p-1,4-glucanasas, glucosa oxidasa, catalasa, galactosidasa, glucosidasa, hemicelulasas, invertasas, pectinasas, pululasas y proteasas. El experto reconocerá que se pueden usar enzimas y otros ingredientes alimenticios termolábiles distintos de los enumerados específicamente en la presente invención. En otro aspecto de esta realización, la enzima es una fitasa. En otro aspecto más de esta invención, la fitasa comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1. En otra realización, la enzima que se tiene que proporcionar en la presente invención es un producto sólido en vez de una disolución.

El experto reconocerá que la presente invención se puede aplicar para proteger otros componentes lábiles del procedimiento térmico de concentrados de pienso. Tales especies se pueden seleccionar de, pero no limitarse a ninguno de los siguientes grupos, individualmente o en combinación: vitaminas, tales como vitamina A, B₁₂, D, D₃, E, riboflavina, niacina, colina, ácido fólico, etc.; ácidos nucleicos y nucleótidos, etc., tales como guanina, timidina, citosina, adenina, etc.; aminoácidos, tales como glicina, lisina, treonina, triptófano, arginina, tirosina, metionina, etc.; micro-organismos, tales como *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, etc.; medicamentos y vacunas, tales como clortetraciclina, eritromicina, oxitetraciclina, etc., y potenciadores del sabor, tales como, azúcares, especias, aceites esenciales, saborizantes sintéticos, etc.

El producto enzimático tratado con sustancia hidrófoba fundible de la invención se mezcla con agentes alimenticios adecuados y se mezcla por un procedimiento de calentamiento/granulación para producir un pienso que contenga una cantidad prescrita de enzima fitasa. Este procedimiento implica mezclar todos los componentes entre sí comprimiéndolos por un extrusor con inyección de vapor para actuar como un aglutinante/método de pasteurización para producir gránulos de pienso adecuados para administración a animales fijados como objetivo (tales como, pero no limitándose a, aves de corral o cerdos). Durante este procedimiento, las temperaturas del pienso (referido como la "papilla") se pueden elevar a aproximadamente 90°C o superior. A estas temperaturas, la enzima puede ser desactivada rápidamente. El producto de este procedimiento se ensaya entonces para recuperación de enzima (expresado como % recuperado relativo a la papilla no tratada, equivalente, usada para preparar los gránulos). El producto de un procedimiento de granulación original El producto de un procedimiento de grano a la granulación original (mediante el cual se añade directamente una disolución de enzima a trigo granular molido) se muestra en la Tabla 2 (referencia QP2500D) como comparación. Los productos de esta invención se refieren por el tipo de sustancia hidrófoba fundible, por ejemplo sin limitación, HCO es un aceite de ricino hidrogenado con un intervalo de punto de fusión típico de 82-86°C, PB3 es una mezcla de aceites vegetales hidrogenados y no hidrogenados con un intervalo de puntos de fusión típico de 38-46°C, Akoflake Palm 58 o FHPO es un aceite de palma hidrogenado (completamente endurecido) con un intervalo de puntos de fusión típico de 58-60°C, HPKO es un aceite de almendra de palma endurecido con un intervalo de puntos de fusión típico de 41-44°C, Akoflake FSR o FHRO es un aceite de colza hidrogenado (completamente endurecido) con un intervalo de puntos de fusión de 66-69°C. Se reconocerá por el experto en la materia que el punto de fusión real puede variar dependiendo de las condiciones

medioambientales o físicas bajo las cuales se calienta la sustancia hidrófoba fundible o la fuente de la sustancia hidrófoba fundible.

La presente invención proporciona además un producto obtenible por un método de la presente invención, un método para preparar un pienso que comprende combinar un producto obtenible por un método de la presente invención con ingredientes de pienso adecuados y un pienso así producido.

El experto en la materia reconocerá que el método de la presente invención puede usarse en otros procedimientos de formulaciones de pienso incluyendo, pero no limitándose a, productos secados por pulverización, en los que se atomiza una disolución que contiene enzima líquida en una torre de secado por pulverización para formar pequeñas gotitas que durante su descenso por la torre de secado se seca hasta formar un material en forma de partículas que contiene enzima. Se pueden producir partículas muy pequeñas de esta manera (Michael S. Showell (editor); Powdered detergents; Surfactant Science Series; 1.998; vol. 71; páginas 140-142; Marcel Dekker); productos estratificados, en los que se recubre la enzima como una capa alrededor de una partícula de núcleo preformada, en la que se atomiza una disolución que contiene una enzima, típicamente un aparato de lecho fluidizado en el que se fluidizan partículas de núcleo preformadas y la disolución que contiene enzima se adhiere a las partículas de núcleo y se seca hasta dejar una capa de enzima seca sobre la superficie de la partícula de núcleo. Se pueden obtener partículas de un tamaño deseado de esta manera si se puede encontrar una partícula de núcleo útil del tamaño deseado. Este tipo de producto se describe, por ejemplo, en la patente internacional WO 97/23606. Se conoce otro tipo de producto en el que se aplica una partícula de núcleo absorbente y en vez de recubrir la enzima como una capa alrededor del núcleo, se absorbe la enzima sobre y/o en la superficie del núcleo. Dicho procedimiento se describe en la patente internacional WO 97/39116. Los productos de extrusión o granulados, en los que se presiona una pasta que contiene enzima a los gránulos o se extruye a presión por una pequeña abertura y se corta en partículas que se secan con posterioridad. Los productos comprimidos, en los que se suspende un polvo enzimático en cera fundida y se pulveriza la suspensión, por ej., por un atomizador de disco rotatorio, en una cámara de enfriamiento donde las gotitas solidifican rápidamente (Michael S. Showell (editor); Powdered detergents; Surfactant Science Series; 1.998; vol. 71; página 140-142; Marcel Dekker). Productos de granulación del mezclador, en los que se añade un líquido que contiene enzima a una composición de polvo seco de componentes de granulación convencionales. El líquido y el polvo se mezclan en una proporción adecuada y a medida que se absorbe la humedad del líquido en el polvo seco, los componentes del polvo seco empezarán a adherirse y aglomerarse y las partículas se acumularán formando gránulos comprendiendo la enzima.

La invención se describirá ahora por los siguientes ejemplos, que no se destinan a limitar el alcance de la invención de ningún modo. El experto en la materia reconocerá que se pueden realizar varias modificaciones y variaciones en la presente invención sin apartarse del alcance o el espíritu de la invención. Por ejemplo, se pueden usar las características ilustradas o descritas como parte de una realización en otra realización para proporcionar incluso más realizaciones. Se desea que la presente invención cubra dichas modificaciones y variaciones como que se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

Ejemplo 1. Preparación de concentrado de enzima.

Se usó un concentrado enzimático comercial Fitasa 2500D Quantum™ (QP2500D) (Syngenta Animal Nutrition, Inc.), una formulación seca de la fitasa con una concentración mínima garantizada de 2.500 unidades de fitasa/g, en los siguientes ejemplos. Se prepara típicamente QP2500D por pulverización de una Fitasa Quantum™ líquida formulada concentrada, por ejemplo, QP2500CL, que tiene una concentración mínima de 25.000 unidades de fitasa/g en trigo molido. Se seca el portador de trigo a un contenido de humedad en el intervalo de 10-13% en un secador de lecho fluidizado de proceso continuo.

Cuando se fabrican gránulos de pienso a partir de una papilla que comprende componentes de pienso y el concentrado de fitasa formulado seco, la papilla se trata haciéndola pasar por un acondicionador reconocido en la técnica. El acondicionador comprende un tubo de mezcla que también sirve para inyectar vapor a aproximadamente 120°C y una presión de 200 Pa (2 bar). El tiempo de permanencia en el acondicionador es aproximadamente 30 segundos.

Para mejorar la estabilidad térmica, por ejemplo, una reducción en pérdida de actividad enzimática, se desarrollaron métodos para tratar la enzima con una sustancia hidrófoba fundible para minimizar el efecto de vapor y temperatura manteniendo aún la biodisponibilidad.

Ejemplo 2. Adición de sustancia hidrófoba fundible, sólida, a material en forma de partículas seco.

Los experimentos iniciales indicaron que pulverizar una sustancia hidrófoba fundida, por ejemplo, aceite de ricino hidrogenado (HCO; punto de fusión típico 82-86°C), sobre QP2500D en un lecho fluidizado no fue adecuado para proporcionar un producto termoestable mejorado. Esto es debido al hecho de que se requiere una temperatura de aproximadamente 100°C para mantener la sustancia hidrófoba en un estado líquido durante la pulverización y dispersión sobre las partículas dando como resultado una pérdida inaceptable de actividad enzimática. Añadir un emulsionante no mejoró el procedimiento.

Se desarrolló después un procedimiento según el cual se mezclan escamas de HCO sólido (una sustancia hidrófoba fundible) con un material en forma de partículas en un secador de lecho fluidizado (SLF) mantenido a temperatura normal. Después de la mezcla adecuada, se aumenta la temperatura del aire de entrada hasta que se funden las escamas de HCO. Después se detiene el calentamiento del dispositivo y se enfría el producto tratado resultante a temperatura normal.

En un procedimiento típico, se añaden escamas de HCO sólido a QP2500D en un secador de lecho fluidizado Strea-1™ con un recipiente de paredes de vidrio gruesas (Aeromatic-Fielder; Bubendorf, Suiza) a temperatura normal. Después de mezclado adecuado, se aumentó la temperatura del aire de entrada a aproximadamente 105°C, que está por encima del punto de fusión de HCO (82-86°C), hasta que se fundieron las escamas de HCO y se trataron las partículas de QP2500D. Después se detuvo el calentamiento del dispositivo y se enfrió el producto a temperatura normal. Debido a que la temperatura de la pared de vidrio era menor que la del producto, se adhirió algo del producto tratado a la pared de vidrio. Por lo tanto, el producto tratado se tamizó por un tamiz de malla de 2 mm para devolver el tamaño de partícula al del material en forma de partículas de QP2500D original. Para estos experimentos desarrollados iniciales, se añadió HCO a QP2500D a una tasa para proporcionar un 20% en peso de carga de tratamiento de cera a las partículas de QP2500D. Este procedimiento dio como resultado un producto acabado suelto que presentó propiedades de estabilidad térmica mejoradas durante la fabricación de pienso comparado con un producto en el que no había sido añadida la sustancia hidrófoba fundible. Se evaluó una serie de aceites, aceites hidrogenados y ceras parafínicas durante las pruebas. Algunos de los aceites de alimento/pienso comercialmente disponibles y aceites hidrogenados presentaron puntos de fusión bajos en el intervalo de 30-50°C y éstos se desecharon por ser demasiado blandos a temperatura normal o ligeramente elevada para uso en este procedimiento particular aunque se usaron con posterioridad en el procedimiento descrito en el Ejemplo 8. Otros diversos aceites y aceites hidrogenados enumerados en la Tabla 1 presentaron puntos de fusión en el intervalo de 70-90°C y se seleccionaron inicialmente para más experimentos en este procedimiento.

Tabla 1. Sustancias hidrófobas fundibles evaluadas.

Nombre	Abreviatura	Composición	Intervalo de puntos de fusión típico (°C)
Aceite de ricino hidrogenado	HCO	forma hidrogenada de aceite de planta de ricino <i>Ricinus communis</i>	82-86
Cerit HOT	CH	cera microcristalina	79-85
ácido 12-hidroxiesteárico	12-HSA	derivado por hidrólisis de HCO	76-78
Aceite de almendra de palma hidrogenado	HPKO	forma hidrogenada de aceite de almendras de la palma de aceite <i>Elaeis spp</i>	41-44
Aceite de colza completamente endurecido	FHRO	forma hidrogenada de aceite de las semillas de la planta de colza <i>Brassica napus</i>	66-69
Aceite de palma completamente endurecido	FHPO	forma hidrogenada de aceite del fruto de la palma de aceite <i>Elaeis spp</i>	58-60
PB3	PB3	mezcla patentada de aceite vegetal hidrogenado y aceite vegetal	38-46
Akoflake Palm 58	AP	aceite de palma completamente endurecido	58-60
Akoflake FSR	AFF	aceite de colza completamente endurecido	66-69
Mekon white	MW	cera parafínica de fusión alta	88-92

Ejemplo 3. Desarrollo del procedimiento de secador de lecho fluidizado adicional.

Durante el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, tuvieron lugar varios cambios en temperatura (es decir, calentamiento y enfriamiento) en cada etapa. Para optimizar el procedimiento de fabricación de un material en forma de partículas seco, se desarrolló un procedimiento en una sola etapa mediante el cual durante la preparación del producto tratado con sustancia hidrófoba fundible, se pudieron tratar juntos el portador sólido, enzima y sustancia hidrófoba fundible con cambio mínimo de temperatura.

Se desarrollaron dos métodos: Método 1. Se pulveriza un portador sólido con una cantidad deseada de disolución enzimática líquida en un secador de lecho fluidizado. Se retira la humedad en exceso aumentando la temperatura de entrada. Se añade una sustancia hidrófoba fundible, sólida, y se mezcla con los otros componentes. La temperatura del aire de entrada se aumenta después para fundir la sustancia hidrófoba en el material en forma de partículas de portador/enzima, sólido.

En un procedimiento típico, se pulverizaron 50 g de un concentrado de fitasa de 25.000 unidades de fitasa/g nominal sobre 500 g de trigo molido en un secador de lecho fluidizado Strea-1™ y se aumentó la temperatura a aproximadamente 50°C para proporcionar un material en forma de partículas recubierto de enzima, seco, de 2.500 unidades de fitasa/g nominales. Después se añadieron 100 g de escamas de HCO sólidas y se mezclaron con el material en forma de partículas. Después se aumentó la temperatura del aire de entrada a aproximadamente 105-110°C hasta que se fundieron las escamas de HCO y se trataron las partículas.

Método 2. Se mezclaron un portador sólido y una sustancia hidrófoba fundible, sólida, en un secador de lecho fluidizado a temperatura normal. Después se pulverizó un concentrado enzimático líquido sobre la mezcla. Se calienta progresivamente la temperatura del aire de entrada a un nivel para retirar la humedad en exceso y después para fundir la sustancia hidrófoba como en el Método 1.

En un procedimiento típico, se mezclaron entre sí 500 g de trigo molido y 100 g de escamas de HCO sólidas en un secador de lecho fluidizado Strea-1™ a temperatura normal. Después se pulverizaron 50 g de un concentrado de fitasa de 25.000 unidades de fitasa/g nominales sobre la mezcla resultante. Después se aumentó progresivamente la temperatura del aire de entrada a aproximadamente 105-110°C que retira la humedad en exceso, se fundió el HCO y se trataron las partículas.

Este método presenta una ventaja sobre el Método 1 por que minimiza el número de etapas separadas requeridas para conseguir el producto deseado.

Tanto el Método 1 como el Método 2 pueden incorporar opcionalmente una etapa intermedia en la que se eleva la temperatura del aire de entrada, típicamente a 80°C, para retirar el agua en exceso de los componentes previamente a la fusión del HCO.

Tanto el método 1 como el método 2 dan como resultado un producto suelto que se asemeja físicamente al producto obtenido en el Ejemplo 1.

Ejemplo 4. Extrapolación del procedimiento.

Se llevaron a cabo más pruebas para evaluar los métodos desarrollados descritos en el Ejemplo 2 en un secador de lecho fluidizado Glatt® a escala piloto con un recipiente de paredes de acero inoxidable (Glatt Ingenieurtechnik GmbH, Weimar, Alemania). El uso de un recipiente de acero inoxidable en vez de un recipiente de vidrio dio como resultado paredes del recipiente de temperatura mucho mayor y una reducción resultante en adhesión del producto acabado a las paredes. Estas pruebas mostraron que se posible usar un método de una sola etapa para fabricar un producto que comprende de aproximadamente 10% a aproximadamente 20% de HCO virtualmente sin formación de grumos en una escala de 2,5-3,0 kg.

Durante el procedimiento, se aumentó la temperatura de entrada de temperatura normal a aproximadamente 105-110°C para fundir el HCO. De nuevo, se puede incorporar opcionalmente una etapa intermedia que implica una temperatura de entrada de típicamente 80°C para retirar humedad en exceso. Se consiguió típicamente la temperatura de entrada en un par de minutos aumentado la temperatura del aire de entrada, pero se observó que se elevaba la temperatura del aire de salida lentamente por un periodo de típicamente 10 a 40 minutos, dependiendo de la escala. Cuanta más agua se elimina, este efecto llega a reducirse gradualmente y la temperatura del producto se eleva hasta que es eventualmente suficientemente alta para que funda el HCO y fluya por las partículas de trigo. El procedimiento se completó reduciendo la temperatura del aire de entrada tan rápidamente como fue posible para "congelar" o solidificar la sustancia hidrófoba fundible y se mantuvieron las partículas tratadas discretas.

Ejemplo 5. Mezcladores discontinuos.

Se desarrolló un medio alternativo para producir producto tratado con HCO usando un mezclador de alta energía, por ejemplo, un mezclador Ploughshare® (Gebr. Lödige, Maschinenbau, Alemania). El experto en la materia reconocerá que se pueden usar otros mezcladores de este tipo. Se pone concentrado de fitasa seco (Fitasa 2500D Quantum™) en la cámara mezcladora de un mezclador Ploughshare. Mientras la cámara está en movimiento, se

suministra HCO fundido de un sistema de bombeo calentado a la cámara vía una boquilla de chorro o boquillas de chorro. Opcionalmente, la camisa de calentamiento de la cámara de mezclamiento puede ser de temperatura controlada bombeando agua a hasta 75°C para prolongar el estado fundido del HCO durante el procedimiento de tratamiento de las partículas.

- 5 Después de que se completa el tratamiento, se deja enfriar el lote a temperatura normal mientras se mantiene la mezcla para conseguir un producto suelto similar a los descritos anteriormente. En un procedimiento típico, se tratan 8 kg de Fitasa 2500D Quantum™ con 1.600 g de HCO fundido a aproximadamente 100°C, después se mezcla durante 5 minutos. Después de mezclamiento, las partículas resultantes tienen un tratamiento homogéneo con cera.

Ejemplo 6. Mezcladores del procedimiento continuo.

- 10 Se desarrolló otro método usando un mezclador de procedimiento continuo, por ejemplo, el mezclador de paletas de alto cizallamiento continuo Turbulizer® (Bepex International LLC, Minneapolis, MN). El experto en la materia reconocerá que se pueden usar otros mezcladores de este tipo. Usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 4, pero en un procedimiento continuo, se alimenta Fitasa 2500D Quantum™ y HCO fundido por dispositivos de suministro medidos a una cámara de mezcla. Por ajuste adecuado de los ángulos de las paletas en el mezclador, se ajusta el tiempo de permanencia en el mezclador para asegurar el mezclamiento adecuado de los componentes y el tratamiento de las partículas con HCO. El producto suelto resultante obtenido es similar a los descritos previamente.

En un procedimiento típico, se alimentó Fitasa 2500D Quantum™ por un dispositivo de suministro de tornillo sinfín a la cámara de mezcla a 205 kg/h. Se bombeó HCO fundido por una bomba calentada medida a 41 kg/h para conseguir un producto suelto similar a los descritos anteriormente.

Ejemplo 7. Pruebas de granulación.

Se prepararon muestras de papilla que comprendían 200 g de concentrado de fitasa/1.000 kg de papilla usando material en forma de partículas de fitasa tratada con HCO y no tratada (QP2500D). Se granuló la papilla a varias temperaturas controladas en general en el intervalo de 80°C a 95°C. Se analizaron las muestras de la papilla de partida y los gránulos acabados y se comparó la recuperación en porcentaje de la enzima en el producto granulado con la de la masa. Se realizaron cinco pruebas de granulación y pruebas de biodisponibilidad. Se llevó a cabo una prueba de almacenamiento. Se prepararon muestras con cargas de HCO en QP2500D de 5%, 7,5%, 10% y 20% en peso.

Los resultados de las pruebas de temperatura de granulación se muestran en la Tabla 2 para QP2500D tratado con 20% de HCO y no tratado. En todas las pruebas de granulación realizadas, el material tratado con HCO mostró una mejora significativa de la recuperación numérica de fitasa en los gránulos del pienso cuando se compara con el producto clásico de QP2500D (producto no tratado con HCO).

Tabla 2. Recuperación en porcentaje de la actividad de la fitasa a diferentes temperaturas de granulación.

Tratamiento	% Recuperación de fitasa a la Temperatura/ % mejora por QP2500D		
	85°C	88°C	90°C
Tratado con 20% de HCO	92/30	79/36	66/47
QP2500D	71/0	58/0	45/0

35 La Tabla 3 indica la recuperación en porcentaje de actividad enzimática siguiendo a la granulación de masa a diferentes temperaturas y cargas de HCO. En general, todas las concentraciones de HCO fueron mejores que el control de QP2500D no tratado con HCO. Los datos muestran que hubo alguna protección de la enzima mejorada a concentraciones de HCO tan bajas como 5% en peso. La mejora aumentó con concentraciones de al menos 7,5-20% en peso.

40

Tabla 3. Recuperación de actividad enzimática después de granulación.

Temperatura de granulación promedio (°C)	% Recuperación (relativo a masa no tratada)/% mejora por QP2500D				
	QP2500D	5% de HCO	7,5% de HCO	10% de HCO	20% de HCO
87,9	58/0				
91,3	42/0				
93,4	28/0				
88,5		63/>09			
91,2		52/24			
93,6		40/>43			
88,5			74/>28		
91,2			61/45		
93,4			45/61		
88,6				83/>43	
91,5				58/>38	
93,1				50/» 19*	
88,3					76/>31
91,8					66/>57
93,0					48/» 14*

Las cifras de mejora se calcularon de la relación de la recuperación relativa a las temperaturas de granulación equivalentes (si dentro de 0,1°C o menor, de otro modo, se usó la temperatura inferior siguiente) para QP2500D.

- 5 *Aquí, la temperatura de QP2500D usada como referencia estuvo significativamente por debajo de la temperatura de granulación de la muestra.

Los resultados de las pruebas de biodisponibilidad se muestran en la Tabla 4. En todas las pruebas de biodisponibilidad hubo una biodisponibilidad de la fitasa tan buena en el producto tratado con HCO como en QP2500D y en varias de las pruebas hubo mejor biodisponibilidad numérica en la formulación tratada con HCO.

- 10 Tabla 4. Comparación de biodisponibilidad entre fitasa tratada con HCO y no tratada.

Número de prueba	Peso corporal del animal (g)	
	Q2500D	Fitasa tratada con 20% de HCO
1	832	830
2	649	660
3	645	670
4	677	729
5	627	706

Los resultados de la prueba de almacenamiento mostraron que después de al menos 3 meses de almacenamiento la muestra tratada con HCO era tan buena como o mejor que QP2500D en retención de actividad de la fitasa a 21°C.

Ejemplo 8. Extrusión con HCO.

Un procedimiento típicamente usado para la preparación de productos que contienen enzimas, sólidos, es un procedimiento de extrusión de gránulos en el que todos los componentes se combinan en un procedimiento de mezcla con una cantidad adecuada de agua para actuar como tanto un agente de fluidización como de mezclado para los componentes. La mezcla húmeda resultante es extruida entonces por un aparato de extrusión adecuado para producir granulados húmedos. Estos granulados húmedos son tratados además entonces para conformar los gránulos, por ej., cortando a longitudes apropiadas o esferonizando, y después se secan a un contenido de humedad adecuado.

Para ensayar si los métodos de la presente invención eran aplicables al procedimiento de extrusión se realizaron varios experimentos con varias sustancias hidrófobas fundibles.

Para algunas muestras, se mezclaron 50,6 g de Fitasa 25000CL Quantum™ (QP25000CL) con aproximadamente 450 g de harina de trigo. Mientras se mezclaban estos dos componentes, se vertieron 46,9 g de HCO fundido en la mezcla. Después se añadieron aproximadamente 80 g de agua y se mezcló la premezcla completa durante unos aproximadamente 30 segundos adicionales. Después de este tiempo, se extruyó la premezcla por un tamiz de 0,8 mm y se rompieron las hebras húmedas y después se redondea en un esferonizador. Se reconocerá que aunque el producto normalmente se describe como esférico, muchas veces el producto es "redondeado" pero no esférico. Se incluyen todas esas conformaciones del producto. La masa extruida de 0,8 mm produce esferas de aproximadamente 0,8 mm. El experto en la materia reconocerá que el método descrito se puede usar para producir otras esferas y conformaciones de tamaño especificado, por ejemplo, aquéllas con diámetros que oscilan en tamaño de 0,5 a 10 mm. Después del procedimiento de esferonización, los gránulos húmedos se transfirieron a un secador de lecho fluidizado y se secaron durante 20 minutos a aproximadamente 55°C. El producto seco se tamizó por tamices de 1,18 mm y 0,425 mm. La fracción retenida en el tamiz de 0,425 mm se designó como producto acabado.

Se prepararon otras muestras que contenían varias relaciones de cera a harina de trigo. En la primera muestra se mezclaron (7% de HCO), 50,4 g de Fitasa 25000CL (QP25000CL) con aproximadamente 462,9 de harina de trigo. Mientras se mezclaban estos dos componentes, se vertieron 34,2 de HCO fundido en la mezcla. Después se añadieron aproximadamente 100 g de agua y se mezcló la premezcla completa durante aproximadamente 30 segundos adicionales. Esta pasta se extruyó, se esferonizó, se secó y se tamizó de un modo similar a los ejemplos anteriores. En otra muestra, se mezclaron (13% de HCO) 52,7 g de Fitasa 25000CL (QP25000CL) con aproximadamente 437,8 g de harina de trigo. Mientras se mezclaban estos dos componentes, se vertieron 56,3 g de HCO fundido a la mezcla. Después se añadieron aproximadamente 70 g de agua y se mezcló la premezcla completa durante aproximadamente 30 segundos adicionales. Esta pasta se extruyó, se esferonizó, se secó y se tamizó de un modo similar a los ejemplos anteriores.

Ejemplo 9. Extrusión con PB3.

Para estos experimentos, se mezclaron 50,6 g de QP25000CL con aproximadamente 450 g de harina de trigo. Mientras se mezclaban estos dos componentes, se añadieron 44,8 g de PB3 como un sólido blando y se mezclaron en la harina de trigo. Después se añadieron aproximadamente 70 g de agua y se mezcló la premezcla completa durante aproximadamente unos 30 segundos adicionales. Después de este tiempo, se extruyó la premezcla por un tamiz de 0,8 mm y se rompieron las hebras húmedas y después se redondearon en un esferonizador. La masa extruida de 0,8 mm produce esferas de aproximadamente 0,8 mm. El experto en la materia reconocerá que el método descrito se puede usar para producir otras esferas de tamaño especificado, por ejemplo, aquéllas con diámetros que oscilan en tamaño de 0,5 a 10 mm. Después del procedimiento de esferonización, se transfirieron los gránulos húmedos a un secador de lecho fluidizado y se secaron durante 20 minutos a aproximadamente 55°C. El producto secado se tamizó por tamices de 1,18 mm y 0,6 mm. La fracción retenida en el tamiz de 0,6 mm se designó como producto acabado.

Ejemplo 10. Extrusión con otras sustancias hidrófobas fundidas.

En experimentos adicionales se preparó una serie de gránulos extruidos que contenían ejemplos adicionales de sustancias hidrófobas fundibles. Estos gránulos se prepararon de una manera similar a como se describió anteriormente por que se fundió la cera previamente a la adición a la mezcla de harina de trigo/fitasa. Las ceras empleadas se incluyen en la Tabla 1.

Ejemplo 11. Incorporación de un HCO sólido por un procedimiento de extrusión.

En vez de añadir HCO fundido o PB3 ablandado, se diseñó un método para incorporar la forma sólida de una sustancia hidrófoba fundible al procedimiento de extrusión. Se mezclaron aproximadamente 45 g de escamas de HCO con aproximadamente 450 g de harina de trigo. Después se añadieron aproximadamente 51 g de QP25000CL con mezclado. Se añadieron aproximadamente 80 g de agua y se mezcló la premezcla completa durante unos aproximadamente 30 segundos adicionales. Después de este tiempo, se extruyó la premezcla por un tamiz de 0,8 mm y se rompieron las hebras húmedas, después se redondearon en un esferonizador. Después se transfirieron los gránulos húmedos a un secador de lecho fluidizado y se secaron durante 20 minutos a 55 °C. Se tamizó el producto

seco por tamices de 1,18 mm y 0,500 mm. Se designaron los gránulos retenidos por el tamiz de 0,500 mm como producto acabado.

Ejemplo 12. Incorporación de Akoflake FSR sólido por un procedimiento de extrusión.

5 En otro experimento, se añadió Akoflake FSR, un aceite de colza completamente endurecido, a una escama y se mezcló con aproximadamente 450 g de harina de trigo. Después se añadieron aproximadamente 51 g de QP25000CL con mezclamiento. Se añadieron aproximadamente 90 g de agua y se mezcló la premezcla completa durante aproximadamente unos 30 segundos adicionales. Después de este tiempo, se extruyó la premezcla por un tamiz de 0,8 mm y se rompieron las hebras húmedas, después se redondearon en un esferonizador. Después se transfirieron los gránulos húmedos a un secador de lecho fluidizado y se secaron durante 20 minutos a 55°C. Se tamizó el producto seco por tamices de 1,18 mm y 0,425 mm. Se designaron los gránulos retenidos por el tamiz de 10 0,425 mm como producto acabado.

Ejemplo 13. Pruebas de granulación.

Los gránulos producidos en los Ejemplos 8-12 se usaron para fabricar pienso por un procedimiento de granulación como se describe en el Ejemplo 7.

15 Los resultados de algunas de las pruebas de granulación usando una forma líquida fundida (masa fundida) de la sustancia hidrófoba fundible se muestran en la Tabla 5. Los resultados demuestran que los gránulos que comprenden un gránulo de infusión de cera presentaban una recuperación de la fitasa de mayor porcentaje cuando se compara con el producto comercial QP2500D, siendo el % de recuperación dependiente de la cera usada. El procedimiento de extrusión descrito en los Ejemplos 8 a 12 dio como resultado un producto suelto que presentaba 20 un grado aumentado de protección enzimática sobre los gránulos tratados con HCO descritos en los Ejemplos 2 a 7 anteriormente.

Tabla 5. Recuperación de actividad enzimática después de granulación.

Temp., de granulación promedio (°C)	% Recuperación (relativa a masa no tratada/% de mejora sobre QP2500D				
	QP2500D	HCO	PB3	AP	AFM
89,0	50/0				
90,0	44/0				
91,5	35/0				
93,0	24/0				
89,7		96/>92			
91,8		91/>160			
93,6		76>216			
89,5			89/>78		
92,0			83/>137		
93,9			70>191		
89,7				84/>68	
91,8				73/>108	
93,4				63/>162	
89,8					79/>58
91,8					69/>97
93,4					63>162
89,5					
91,7					

93,5					
------	--	--	--	--	--

Las cifras de mejora se calcularon por el método descrito para la Tabla 3.

5 La Tabla 6 muestra el efecto relativo sobre las recuperaciones en porcentaje conseguidas para los gránulos producidos usando aceite de ricino hidrogenado (HCO) y aceite de colza hidrogenado (AFx) cuando se añadieron como un líquido fundido (masa fundida) o como un sólido (escamas). Estos datos demuestran que se puede añadir la sustancia hidrófoba fundible como un líquido fundido o como un sólido sin que afecte a la recuperación de actividad enzimática.

Tabla 6. Comparación de recuperación de actividad enzimática usando una sustancia hidrófoba fundible en dos formas diferentes, el líquido fundido y sólido.

	Relación % recuperación (líquido fundido)/% recuperación (sólido)					
	Aceite de ricino hidrogenado ^a			Aceite de colza hidrogenado ^d		
Temp (°C)	89,5	91,6	93,3	89,8	91,9	94,1
Relación	1,13	0,99	1,08	0,98	0,95	1,04

^a % recuperación HCO (masa fundida) Ejemplo 8/% recuperación HCO (escama) Ejemplo 11

^b % recuperación AFM (masa fundida) Ejemplo 10/% recuperación /AFF (escama) Ejemplo 12

10

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Enzimas AB GmbH

<120> Formulaciones enzimáticas mejoradas para pienso.

<130> 18551EP

15 <140> Patente europea EP 07 711 341.3

<141> 2007-01-12

<150> Patente británica GB 20060000913

<151> 17-01-2.006

<160> 1

20 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 410

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Fitasa lograda por ingeniería.

<400> 1

ES 2 598 482 T3

Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser Val Val Ile Val Ser Arg
 1 5 10 15
 His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Thr Gln Leu Met Gln Asp Val
 20 25 30
 Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val Lys Leu Gly Glu Leu Thr
 35 40 45
 Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu Gly His Tyr Trp Arg Gln
 50 55 60
 Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Pro Lys Cys Gly Cys Pro Gln Ser
 65 70 75 80
 Gly Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp Glu Arg Thr Arg Lys Thr
 85 90 95
 Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro Asp Cys Ala Ile Thr Val
 100 105 110
 His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp Pro Leu Phe Asn Pro Leu
 115 120 125
 Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala Asn Val Thr Asp Ala Ile
 130 135 140
 Leu Glu Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp Phe Thr Gly His Tyr Gln
 145 150 155 160
 Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu Asn Phe Pro Gln Ser Asn
 165 170 175
 Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu Ser Cys Ser Leu Thr Gln
 180 185 190
 Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala Asp Cys Val Ser Leu Thr
 195 200 205

Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr Glu Ile Phe Leu Leu Gln
 210 215 220
 Gln Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp Gly Arg Ile Thr Asp Ser
 225 230 235 240
 His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His Asn Ala Gln Phe Asp Leu
 245 250 255
 Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg Ala Thr Pro Leu Leu
 260 265 270
 Asp Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His Pro Pro Gln Lys Gln Ala
 275 280 285
 Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu Phe Ile Ala Gly His Asp
 290 295 300
 Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu Glu Leu Asn Trp Thr Leu
 305 310 315 320
 Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Glu Leu Val Phe Glu
 325 330 335
 Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln Trp Ile Gln Val Ser Leu
 340 345 350
 Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp Lys Thr Pro Leu Ser Leu
 355 360 365
 Asn Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr Leu Ala Gly Cys Glu Glu
 370 375 380
 Arg Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala Gly Phe Thr Gln Ile Val
 385 390 395 400
 Asn Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu
 405 410

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un producto enzimático termoestable para uso en la fabricación de pienso que comprende:
- 5 a. combinar (i) una enzima, (ii) un portador sólido y (iii) una sustancia hidrófoba fundible seleccionada de: aceite de ricino hidrogenado, una mezcla de aceite vegetal hidrogenado y no hidrogenado, una cera microcristalina, ácido 12-hidroxiesteárico, aceite de almendra de palma hidrogenado, aceite de palma hidrogenado, aceite de colza hidrogenado y cera parafínica de fusión alta para proporcionar un producto combinado;
- b. opcionalmente aplicar suficiente calor al producto combinado de la etapa (a) para permitir que funda la sustancia hidrófoba fundible;
- 10 c. enfriar el producto combinado para proporcionar el producto enzimático termoestable y
- d. opcionalmente secar el producto a un contenido de humedad deseado.
2. El método según la reivindicación 1, en el que en la etapa (a) se añade agua adicional para formar una mezcla de pasta adecuada y que comprende además la etapa de extruir el producto de la etapa (b) y secar y enfriar el producto extruido.
- 15 3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que una forma fundida de la sustancia hidrófoba fundible se añade en la etapa (a).
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la disolución que contiene enzima se combina primero con el portador sólido y después se combina la combinación enzima/portador resultante con la sustancia hidrófoba fundible.
- 20 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la sustancia hidrófoba fundible presenta una temperatura de fusión de aproximadamente 25-120°C, preferiblemente aproximadamente 30-90°C, más preferiblemente aproximadamente 38-46°C, más preferiblemente aproximadamente 58-60°C, más preferiblemente aproximadamente 66-69°C y más preferiblemente aproximadamente 82-86°C.
- 25 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el producto enzimático termoestable comprende al menos 1-30% en peso, preferiblemente al menos 5% en peso, preferiblemente al menos 7,5% en peso, más preferiblemente al menos 10% en peso y lo más preferiblemente al menos 20% en peso de la sustancia hidrófoba fundible.
- 30 7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el portador sólido es un grano de semilla molido o mineral, y se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en: maíz molido, trigo molido, harinillas de trigo, harina de soja, cáscaras de arroz, pienso de gluten de maíz, sémola de maíz, harina de maíz, harina de trigo, granos secos de destilación, tierra de diatomeas, sílice y arcilla.
- 35 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la enzima se selecciona del grupo que consiste en: fitasa, fosfatasa, xilanasas, celulasas, glucanasas, mananasas, amilasas, alfa-amilasas, glucoamilasas, peptidasas, lipasas, esterases, manasas, quitinasas, β -1,3-glucanasas, β -1,4-glucanasas, glucosa oxidasa, catalasa, galactosidasas, glucosidasas, hemicelulasas, invertasas, lactasas, pectinasas, pululasas y una proteasa.
9. El método según la reivindicación 8, en el que la enzima es una fitasa, preferiblemente una fitasa termotolerante y más preferiblemente una fitasa termotolerante que comprende la SEC ID N° 1.
10. Uso de un producto enzimático termoestable obtenible por un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, junto con ingredientes de pienso adecuados para preparar un pienso.

40