(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 745 998**

(51) Int. CI.:

G06K 9/00 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)
B01J 2/16 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2014 PCT/US2014/022433**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14159185**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2014 E 14774900 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 2970924**

(54) Título: **Formulación de fitasa**

(30) Prioridad:

14.03.2013 US 201361784947 P
16.05.2013 GB 201308843

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.03.2020

(73) Titular/es:

BASF ENZYMES LLC (100.0%)
3550 John Hopkins Court
San Diego, CA 92121, US

(72) Inventor/es:

HAN, YUN;
PRATT, MICHAEL y
WU, YI

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

Formulación de fitasa

Campo técnico

Esta invención se refiere a una formulación enzimática líquida, en la que la enzima es termoestable sin la necesidad de un recubrimiento termoestable.

Los procedimientos de elaboración de alimentos para animales están bien establecidos. La producción a escala industrial de alimentos para animales generalmente implica: obtener una materia prima, moler la materia prima, mezclar la materia prima con ingredientes secos y/o líquidos, granular y secar.

Las materias primas, que son los ingredientes crudos del alimento para animales, provienen de una variedad de fuentes que incluyen: plantas; animales; subproductos comestibles; y aditivos, tales como vitaminas, minerales, enzimas y otros nutrientes (SAPKOTA; Environ Health Perspect. mayo de 2007; 115(5): 663-670).

Los aditivos para alimentos para animales, tales como enzimas, están diseñados para aumentar el valor nutricional del alimento al liberar nutrientes y permitir una mayor absorción de vitaminas y minerales esenciales en el animal, lo que a su vez mejora el rendimiento del producto animal, al tiempo que reduce los materiales nocivos en los desechos animales.

Las enzimas utilizadas como aditivos en la elaboración de alimentos para animales incluyen, entre otros: fitasa, celulasa, lactasa, lipasa, proteasa, catalasa, xilanasa, beta-glucanasa, mananasa, amilasa, amidasa, epóxido hidrolasa, esterasa, fosfolipasa, transaminasa, amina oxidasa, celobiohidrolasa, amoniaco liasa o cualquier combinación de las mismas.

Las enzimas se introducen normalmente en el procedimiento de elaboración de alimentos para animales como un gránulo enzimático seco o como una formulación enzimática líquida. La selección de una formulación de enzima seca o formulación de enzima líquida depende de las condiciones de operación utilizadas en una fábrica de alimentos para animales. Por ejemplo, las temperaturas varían de 37 grados C a 95 grados C o más durante el procedimiento de mezcla y granulado de la producción de alimentos para animales.

Las formulaciones de enzimas líquidas se pueden agregar al alimento o producto alimenticio después del granulado para evitar la inactivación por calor de la(s) enzima(s) que ocurriría durante el procedimiento de granulado. Sin embargo, las cantidades de enzima en el alimento final o en las preparaciones alimenticias son generalmente muy pequeñas, lo que dificulta lograr una distribución homogénea de la enzima en el alimento o producto alimenticio, y los líquidos son notoriamente más difíciles de mezclar uniformemente que los ingredientes secos. Además, se necesita un equipo especializado (costoso) para agregar líquidos al alimento después del granulado, que actualmente no está disponible en la mayoría de las fábricas de alimentos (debido al costo adicional). Incluso cuando se aplican formulaciones líquidas que comprenden enzimas, la estabilidad de almacenamiento de tales formulaciones a menudo es un problema, véase el documento WO 2005/074705.

El documento WO 93/16175 A1 se refiere a una formulación de fitasa líquida. El documento WO 03/057247 A1 describe un método de preparación de una fitasa termotolerante. El documento US 5.707.843 se refiere a formas en polvo de composiciones enzimáticas.

Se puede agregar una formulación enzimática seca o granulada al mezclador antes del procedimiento de granulado. Sin embargo, las altas temperaturas utilizadas durante el procedimiento de mezcla y granulado generalmente requieren una formulación de enzima granulada con recubrimiento especial para que la enzima permanezca activa en los granulados finales de alimento. Adicionalmente, las enzimas se elaboran generalmente en una formulación líquida, por lo que el procedimiento de secado de una enzima en un gránulo, recubrimiento del gránulo, transporte de gránulos al molino para alimentos y adición de los gránulos al mezclador de alimentos presenta costos y tiempo añadidos.

Hay una variedad de tecnologías de granulación que incluyen, entre otras, extrusión, granulación de alto cizallamiento y granulación en lecho fluidizado.

La extrusión y la esferonización es un procedimiento de producción de gránulos mediante la mezcla de una enzima, un vehículo y la extrusión de la mezcla para formar gránulos.

La granulación de alto cizallamiento generalmente incluye mezclar ingredientes secos e ingredientes líquidos con una paleta mezcladora, picadora y/o impulsor. La mezcla puede ser de alta o baja intensidad.

La granulación en lecho fluidizado implica un único recipiente en el que los ingredientes se suspenden en un aire caliente, se produce una aglomeración de ingredientes, los gránulos se secan y caen al lecho. Una ventaja de la granulación en lecho fluidizado es que reduce las operaciones unitarias y el tiempo de elaboración. Sin embargo, el aire caliente puede desnaturalizar, reducir la actividad de una enzima o ambas. Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar una formulación enzimática termoestable, que puede usarse en un procedimiento de granulación en lecho fluidizado.

Los gránulos enzimáticos producidos pueden usarse como aditivos para alimentos para animales.

Una variedad de animales puede beneficiarse de un alimento para animales que contiene una enzima que incluye: animales no rumiantes, p. ej., aves domésticas, pollos de engorde, aves, pollos, gallinas ponedoras, pavos, patos, gansos y aves de corral; animales rumiantes p. ej., vacas, ganado, caballos y ovejas; cerdos, marranos, lechones, cerdos en crecimiento y cerdas; animales de compañía que incluyen, entre otros: gatos, perros, roedores y conejos; pescado, entre otros, salmón, trucha, tilapia, bagre y carpa; y crustáceos, incluyendo, entre otros, camarones y gambas.

Descripción detallada

La invención se describe en la reivindicación.

Una "enzima", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier enzima que se puede usar como un aditivo para alimentos para animales. Por ejemplo, las enzimas incluyen, pero no se limitan a: una fitasa, lactasa, lipasa, proteasa, catalasa, xilanasa, celulasa, glucanasa, mananasa, amilasa, amidasa, epóxido hidrolasa, esterasa, fosfolipasa, transaminasa, amina oxidasa, celobiohidrolasa, amoniaco liasa o cualquier combinación de las mismas.

Una "fitasa" es una enzima que cataliza la eliminación de uno o más grupos fosfato de un sustrato de fitato. En otra realización, una fitasa es una enzima monoéster fosfórico hidrolasa que cataliza la hidrólisis del ácido fítico (mio-inositol-hexaquisfosfato) a fosfato y mio-inositol que tiene menos de seis grupos fosfato. De acuerdo con las recomendaciones del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB, por sus siglas en inglés) y Bairoch A., "The ENZYME database in 2000", Nucleic Acids Res 28:304-305 (2000), se puede describir una fitasa en una variedad de nombres y números de identificación. En otro ejemplo, una fitasa se caracteriza por tener el número EC 3.1.3.8 de la Comisión de Enzimas (EC, por sus siglas en inglés), y también se refiere como: 1-fitasa; mio-inositol-hexaquisfosfato 3-fosfohidrolasa; fitato 1-fosfatasa; fitato 3-fosfatasa; o fitato 6-fosfatasa. En otra realización, una fitasa se caracteriza como EC 3.1.3.26, también referida como: 4-fitasa; 6-fitasa (nombre basado en el sistema de numeración IL y no la numeración ID); o fitato 6-fosfatasa. En otro ejemplo, una fitasa se caracteriza como EC 3.1.3.72, también referida como 5-fitasa. En otro ejemplo, una fitasa es una histidina fosfatasa ácida (HAP); una fitasa β-propulsora; fosfatasa ácida púrpura (PAP); y proteína tirosina fosfatasa (PTP). En algunos ejemplos, se describe una fitasa usando la nomenclatura conocida en la técnica.

Una "inositol fosfatasa" es una enzima que cataliza la eliminación de uno o más grupos fosfato de una molécula de fosfato de inositol.

Un "fitato" o ácido fítico es un hexafosfato de mio-inositol. Es la forma totalmente fosforilada de fosfato de inositol.

Un "fosfato de inositol" es mio-inositol que se fosforila en una o más de sus posiciones hidroxilo.

Una "celulasa" es una enzima que cataliza la hidrólisis de un compuesto de carbohidrato polimérico, tal como celulosa, glucomanano, manano, glucano y xiloglucano, por ejemplo.

Una "xilanasa" es una enzima que cataliza la degradación del polisacárido lineal beta-1,4-xilano en xilosa.

Una "glucanasa" es una enzima que cataliza la degradación de los glucanos que comprenden subunidades de glucosa. Los ejemplos de glucanasas incluyen alfa-1,4-glucanasas, alfa-1,6 glucanasas, pululanasas, beta-1,3,-glucanasas, beta-1, 4-glucanasas y beta-1, 6-glucanasas.

Una "mananasa" es una enzima que cataliza la degradación de los polímeros de polisacárido de manosa.

Una "amilasa" es una enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces 1,4-alfa-D-glucosídicos para degradar polisacáridos, oligosacáridos y/o almidón en subunidades de glucosa.

La expresión "que comprende", como se usa en la presente memoria, es sinónimo de "que incluye", "que contiene" o "se caracteriza por", y es inclusivo o es abierta y no excluye elementos etapas del método adicionales no enumerados.

Una enzima es "termoestable" si retiene una cantidad sustancial de su actividad después de un tratamiento a alta temperatura de al menos aproximadamente 65 ºC a aproximadamente 95 ºC; o a una temperatura superior a 95 ºC.

En algunos ejemplos, la enzima termoestable retiene al menos: 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97%, 98%, 99 % o 100 % de su actividad después de un procedimiento de granulado. En un ejemplo, el procedimiento de granulado se realiza a una temperatura de al menos 75 ºC, 80 ºC, 85 ºC, 88 ºC, 90 ºC o 93 ºC.

Una "combinación de enzimas" es cualquier combinación de enzimas que se pueden usar como aditivos para un alimento para animales. Los ejemplos de tales combinaciones de enzimas se exponen en la Tabla 1.

Tabla 1:

Combinación de enzimas	Fitasa	Xilanasa	Glucanasa	Amilasa	Proteasa
1	X	X			
2	X		X		
3	X			X	
4	X				X
5	X	X	X		
6	X	X		X	
7	X	X			X
8	X		X	X	
9	X		X		X
10	X			X	X
11	X	X	X	X	
12		X	X	X	X
13		X	X		
14		X		X	
15					
16		X			X
17			X	X	
18			X		X
19				X	X
20			X	X	X
21	X	X	X	X	X

Como se usa en la presente memoria, "formulación enzimática líquida" es una composición que comprende una enzima, un tampón, un estabilizador y un antimicrobiano.

En un ejemplo, una formulación enzimática líquida comprende una enzima, en la que la enzima es una fitasa, una celulasa, una lactasa, una lipasa, una proteasa, una catalasa, una xilanasa, una beta-glucanasa, una mananasa, una amilasa, una amidasa, una epóxido hidrolasa, una esterasa, una fosfolipasa, una transaminasa, una amina oxidasa, una celobiohidrolasa, una amoniaco liasa o cualquier combinación de las mismas.

En un ejemplo, una formulación enzimática líquida comprende un tampón que incluye, pero no se limita a citrato de sodio, citrato de potasio, ácido cítrico, acetato de sodio, ácido acético, fosfato de sodio, fosfato de potasio y cualquier combinación de los mismos.

En un ejemplo, una formulación enzimática líquida comprende un estabilizador, en la que el estabilizador es un cloruro de sodio, un sorbitol, un glicerol, una sacarosa, un manitol, una trehalosa o cualquier combinación de los mismos. En otro ejemplo, una formulación enzimática líquida puede incluir dos estabilizadores.

En un ejemplo, una formulación enzimática líquida comprende un antimicrobiano, en la que el antimicrobiano es un sorbato de potasio; un sorbato de sodio, un ácido sórbico; un benzoato de sodio; un ácido benzoico, un propionato de calcio, un propionato de sodio, un propionato de amonio; un ácido propiónico o cualquier combinación de los mismos.

En un ejemplo, la formulación enzimática líquida se expone en la Tabla 2:

Categoría	Opciones	Ingrediente	Concentración (% en p/v)
Enzima		Fitasa	10.000 unidades/ml (5.000-20.000 unidades/ml)
Tampón		Citrato de sodio, pH 5,0 (4,5-5,5)	1,25 % (0,5-2,5 %)
Estabilizador	1	Cloruro de sodio	15 % (1-20 %)
	2	Sorbitol	20 % (2-40 %)
	3	Glicerol	20 % (2-40 %)
	4	Sacarosa	20 % (2-40 %)
Antimicrobiano	1	Sorbato de potasio	0,20 % (0,05-0,40 %)
	2	Benzoato de sodio	0,20 % (0,05-0,40 %)
	3	Metil parabeno	0,20 % (0,05-0,40 %)
	4	Propionato de calcio/sodio/amonio	0,20 % (0,05-0,40 %)

En una realización, la formulación enzimática líquida es un producto líquido, en la que el producto líquido se aplica al granulado posterior. En otro ejemplo, el producto líquido es una enzima, cloruro de sodio, sorbitol, citrato de sodio, sorbato de potasio y benzoato de sodio. En una realización de la invención, el producto líquido es una composición que tiene una fitasa que tiene 11.000-12.000 unidades/g, en la que la fitasa es una 6-fitasa (según el sistema de numeración IL, 15 % de cloruro de sodio, 4 % de sorbitol, un citrato de sodio 50 mM, 0,2 % de sorbato de potasio, 0,1 % de benzoato de sodio, y 0,1 % de propionato de sodio (todos los % son % en p/v). En otro ejemplo, el producto líquido es una composición que tiene una fitasa que tiene 11.000-12.000 unidades/g, 15 % de cloruro de sodio, 6 % de sacarosa, citrato de sodio 50 mM, 0,2 % de sorbato de potasio, 0,1 % de benzoato de sodio, 0,1 % de propionato de sodio (todos los % son % en p/v).

En un ejemplo, la formulación enzimática líquida es un concentrado líquido, en la que el concentrado líquido se agrega a la masa de alimentación antes del procedimiento de granulado. En un ejemplo, el concentrado líquido es una enzima, y sacarosa, y cloruro de sodio, y citrato de sodio y sorbato de potasio, benzoato de sodio y propionato de sodio. En otro ejemplo, el concentrado líquido es una composición que comprende: una fitasa que tiene 44.000-48.000 unidades/g, 20 % de sacarosa, 1 % de NaCl, citrato de sodio 50 mM, pH 5,1, 0,1 % de benzoato de sodio, 0,4 % de sorbato de potasio, 0,4 % de propionato de sodio. En otro ejemplo, el concentrado líquido es una composición que comprende: una fitasa que tiene 44.000-48.000 unidades/g, 2 %-40 % de sorbitol, 1 % de NaCl, citrato de sodio 50 mM, un pH 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4 o 5,5, 0,1 % de benzoato de sodio, 0,4 % de sorbato de potasio, 0,4 % de propionato de sodio. En otro ejemplo, el concentrado líquido no es el producto final, sino que es una composición o formulación intermedia que luego se usa para la producción de un producto líquido a partir de un producto seco granulado.

Como se usa en la presente memoria, "una formulación enzimática granulada" es una composición que comprende: un vehículo; una solución primaria que comprende una enzima, un tampón, un estabilizador, un agente aglutinante, un plastificante, un antimicrobiano o cualquier combinación de los mismos. En otro ejemplo, una formulación enzimática granulada es una composición que comprende: un vehículo; una solución primaria que comprende una enzima, un tampón, un estabilizador, un agente aglutinante, un plastificante, un antimicrobiano y una solución secundaria que comprende un potenciador, un plastificante o cualquier combinación de los mismos. En un ejemplo, una formulación enzimática granulada es termoestable sin la necesidad de que el gránulo enzimático tenga un recubrimiento protector. En otro ejemplo, el producto granulado es una enzima, sacarosa, cloruro de sodio, citrato de sodio, sorbato de potasio, benzoato de sodio, propionato de sodio, goma guar, harina de trigo.

En un ejemplo, la solución primaria es una formulación enzimática líquida. En otro ejemplo, la formulación enzimática líquida es un producto líquido o un concentrado líquido.

En un ejemplo, una formulación enzimática granulada comprende un vehículo, en la que el vehículo es una harina. En otro ejemplo, el vehículo es un almidón. En un ejemplo, la harina es una harina de trigo. En otro ejemplo, la harina de trigo es harina de trigo blanqueada. En otro ejemplo, el vehículo es una harina de trigo y una maltodextrina. En otro ejemplo, el vehículo es una harina de trigo y un almidón pregelatinizado. En otro ejemplo, la maltodextrina o el almidón pregelatinizado se usa como una mezcla seca con harina. En otro ejemplo, la harina es una harina de trigo o harina blanqueada. En un ejemplo, la maltodextrina o el almidón pregelatinizado se usa como una mezcla seca. En un ejemplo, la harina de trigo y el caolín es una mezcla seca.

En un ejemplo, una formulación enzimática granulada comprende una enzima, en la que la enzima es una fitasa, una celulasa, una lactasa, una lipasa, una proteasa, una catalasa, una xilanasa, una beta-glucanasa, una mananasa, una amilasa, una amidasa, una epóxido hidrolasa, una esterasa, una fosfolipasa, una transaminasa, una amina oxidasa, una celobiohidrolasa, una amoniaco liasa o cualquier combinación de las mismas.

En un ejemplo, una formulación enzimática granulada comprende un tampón, en la que el tampón es un citrato de sodio, citrato de potasio, ácido cítrico, acetato de sodio, ácido acético, fosfato de sodio, fosfato de potasio y cualquier combinación de los mismos.

En un ejemplo, una formulación enzimática granulada comprende un estabilizador, en la que el estabilizador es una sacarosa, un cloruro de sodio, un sorbitol, un glicerol, una sacarosa, un manitol, una trehalosa, caolín, silicato de aluminio, silicato de magnesio o cualquier combinación de los mismos.

En un ejemplo, una formulación enzimática granulada comprende un agente aglutinante, en la que el agente aglutinante es una goma guar, un xantano, un algenado de sodio, una goma de algarrobilla, una goma de carragenano, un almidón modificado pregelatinizado, una maltodextrina, gelatina, metilcelulasa, hidroxipropilcelulasa, hidroxipropilmetilcelulasa, carboximetilcelulasa, o cualquier combinación de los mismos. En otro ejemplo, las gomas naturales pueden usarse individualmente o como una combinación de al menos dos gomas. En otro ejemplo, se usa almidón o maltodextrina en combinación con goma guar. En otro ejemplo, el almidón o la maltodextrina también actúan como estabilizantes.

En un ejemplo, una formulación enzimática granulada comprende un plastificante, en la que el plastificante se selecciona entre un grupo que consiste en: un glicerol, polietilenglicol, citrato de trietilo, triacetina, trietilcitrato de acetilo.

En un ejemplo, una formulación enzimática granulada comprende un antimicrobiano, en la que el antimicrobiano es un sorbato de potasio, sorbato de sodio, ácido sórbico, ácido propiónico, benzoato de sodio, ácido benzoico, propionato de sodio, propionato de calcio, propionato de amonio, metil parabeno o cualquier combinación de los mismos. En otro ejemplo, se usan al menos dos antimicrobianos en la formulación enzimática granulada.

En un ejemplo, una formulación enzimática granulada comprende una solución de granulación secundaria, en la que la solución de granulación secundaria es una composición que comprende un potenciador de gránulos y un plastificante. En otro ejemplo, la solución de granulación secundaria mejora el tamaño del gránulo, crea una variabilidad mayor, o ambas. En otro ejemplo, el tamaño de gránulo es cualquier tamaño de malla numérico entre el intervalo de aproximadamente 12 mallas a aproximadamente 100 mallas. En otro ejemplo, el tamaño de gránulo es cualquier tamaño de malla numérico entre el intervalo de aproximadamente 20 mallas a aproximadamente 80 mallas. En otro ejemplo, el tamaño de gránulo es cualquier tamaño de malla numérico entre el intervalo de aproximadamente 30 mallas a aproximadamente 60 mallas.

En un ejemplo, una formulación enzimática granulada comprende un potenciador de gránulos, en la que el potenciador de gránulos es almidón modificado pregelatinizado, maltodextrina, algenado de sodio, carragenano con CaCl2, carragenano sin CaCl2, goma guar con borato de sodio, goma guar sin borato de sodio, gelatina; metilcelulosa; hidroxipropilcelulosa; hidroxipropilmetilcelulosa; carboximetilcelulosa; cloruro de sodio; sulfato de sodio; caolín; silicato de aluminio, silicato de magnesio y cualquier combinación de los mismos. En otro ejemplo, el potenciador es una adición opcional a la formulación enzimática granulada. En otro ejemplo, la combinación de goma natural e iones reticulará la goma en un gel protector; sin embargo, si la goma ya se usa como agente aglutinante, entonces la adición de iones solos bastará sin la adición de goma extra.

En un ejemplo, una formulación enzimática granulada comprende un plastificante, en la que el plastificante es un glicerol. En otro ejemplo, se puede usar glicerol cuando se usa almidón modificado pregelatinizado.

En un ejemplo, una formulación enzimática granulada que comprende además un auxiliar de flujo o lubricante, en la que el auxiliar de flujo se selecciona entre un grupo que consiste en: un dióxido de silicio, un estearato de magnesio, un caolín, un talco, tierra de diatomeas o cualquier combinación de los mismos. En otra realización, la adición de una formulación enzimática granulada es un auxiliar de flujo o el lubricante es opcional. En otra realización, el fluido o lubricante auxiliar es una mezcla seca después del secado. En otro ejemplo, el auxiliar de flujo o lubricante se agrega como una suspensión en la solución de granulación secundaria. En otro ejemplo, el producto seco granulado es una composición que comprende: una fitasa que tiene 11.000-12.000 unidades/g, 4,5 % de sacarosa, 0,3 % de citrato de sodio, 0,1 % de sorbato de potasio, 0,1 % de benzoato de sodio, 0,1 % de propionato de sodio, 0-0,25 % de goma guar, y 95 % de harina de trigo (todos los % son % en p/p).

En un ejemplo, una formulación enzimática granulada se expone en la Tabla 3:

Material	**Categoría**	**Opciones**	**Ingrediente**	**Concentración en alimento líquido (% en p/v)**	**Cantidad por kg de producto seco (g)**
Vehículo	Vehículo	1	Harina de trigo		850-950 g
		2	Harina de trigo		700-800 g
			Maltodextrina o almidón pregelatinizado		100-200 g

(continuación)

Material	Categoría	Opciones	Ingrediente	Concentración en alimento líquido (% en p/v)	Cantidad por kg de producto seco (g)
Solución enzimática/solución de granulación primaria	Enzima		fitasa	40.000 unidades/ml (10,00-50.000 unidades/ml)	10.000 unidades/ml (5.000-20.000 unidades/g)
	Tampón		Citrato de sodio, pH 5,0 (4,5-5,5)	1 % (0,5-2,0 %)	3 g (1,5-6,0 g)
	Estabilizador	1	sacarosa	20 % (10-30 %)	50 g (25-100 g)
		2	Cloruro de sodio, o sulfato de sodio	1 % (0,5-10 %)	2 g (1-20 g)
	Agente aglutinante	1	Goma guar	0,5 % (0,2-1 %)	1,25 g (0,5-2,5 g)
		2	Xantano, algenato de sodio, goma de algarrobilla, o carragenano	0,5 % (0,2-1 %)	1,25 g (0,5-2,5 g)
		3	Almidón modificado pregelatinizado (maíz)	5 % (2-10 %)	12,5 g (5-25 g)
		4	maltodextrina	10 % (5-20 %)	25 g (12,5-50 g)
	Plastificante		glicerol	0,5 % (0,2-1 %)	1,25 g (0,5-2,5 g)
	Antimicrobiano	1	Sorbato de potasio	0,4 %	1,0 g
		2	Benzoato de sodio	0,4 %	1,0 g
		3	Propionato de sodio/calcio/amonio	0,4 %	1,0 g
		4	Metil parabeno	0,10 %	0,25 g
Solución de granulación secundaria	Potenciador de gránulo	1	Almidón modificado pregelatinizado (maíz)	12 % (10-15 %)	25 g (5-50 g)
		2	maltodextrina	25 % (10-50 %)	50 g (25 g-100 g)
		3	Algenato de sodio o carragenano con CaCl2	5 % (2-10 %)	10 g (5 g-25 g)
		4	Goma guar con borato de sodio	0,5 % (0,2-1,0 %)	1,25 g (0,5-2,5 g)
		5	Cloruro de sodio, o sulfato de sodio	20 % (10-30 %)	40 g (20 g-80 g)
		6	caolín	10 % (1-20 %)	20 g (10-40 g)
	Plastificante		glicerol	1,2 % (0,2-1 %)	2,5 g (1-5 g)
Auxiliar de flujo/lubricante	Flujo/lubricante	1	Dióxido de silicio		10 g (1-20 g)
		2	Estearato de magnesio		10 g (2,5-15 g)
		3	Caolín		20 g (5-50 g)
		4	Talco		30 g (10-100 g)

Debe entenderse que todos los números que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción, etc. utilizados en la memoria descriptiva están modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la presente memoria son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se desean obtener. Como mínimo, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de los equivalentes al alcance de cualquier reivindicación en cualquier solicitud que reivindica prioridad a la presente solicitud, cada parámetro numérico debe interpretarse a tenor del número de dígitos significativos y enfoques de redondeo ordinarios. Además, los intervalos numéricos desvelados en esta solicitud son inclusivos y desvelan todos los dígitos numéricos dentro de un intervalo. Por ejemplo, un intervalo de pH de 4,5 a 5,5 incluye un pH de 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4 y 5,5.

La descripción anterior desvela varios métodos y materiales. Esta divulgación es susceptible a modificaciones en los métodos y materiales, así como a alteraciones en los métodos y equipos de fabricación. Dichas modificaciones

resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de una consideración de esta divulgación o práctica de la divulgación en la presente memoria.

Ejemplos

Ejemplo 1

(Ejemplo comparativo de fitasa no granulada)

Formulación 1 - Una formulación de fitasa concentrada líquida que contiene 10 % de cloruro de sodio y 10 % de sorbitol se secó por liofilización. El polvo enzimático seco se diluyó luego mezclándolo con carbonato de calcio y cascarillas de arroz para formar un producto enzimático de cascarilla de arroz.

Formulación 2 - Una formulación de fitasa concentrada líquida que contiene 10 % de cloruro de sodio y 10 % de sorbitol se empapó en las cascarillas de arroz. La combinación húmeda resultante se secó por liofilización. El material seco se diluyó mezclándolo con carbonato de calcio para formar un producto enzimático de cascarilla de arroz.

Ensayos de granulado - El producto enzimático de cascarilla de arroz se combinó con masa de alimento para aves domésticas a una concentración de 25-100 ppm, y se granuló en un molino de granulados de California a varias temperaturas controladas en el intervalo de 75 ºC a 93 ºC. La mezcla de masa se acondicionó primero mediante vapor directo a dicha temperatura durante 15 segundos, y luego se granuló a través de la prensa de granulado. Los granulados se secaron posteriormente.

Determinación de la estabilidad de la enzima - La masa inicial y los granulados terminados (que se molieron hasta la masa) se extrajeron en un tampón Tris. Las actividades de fitasa en los extractos se determinaron mediante un método AOAC modificado. El método AOAC modificado es el tampón AOAC que comprende agua destilada más 0,01 % de Tween 20 (GIZZI, J. of AOAC International, Vol. 91, n.º 2, 2008) y se modificó a una composición que comprende: Tris 50 mM pH 8.0, 0,01 % de Tween 20, $CaCl_2$ 10 mM.

El porcentaje de recuperación de la actividad enzimática del producto granulado a cada temperatura se comparó con el de la masa de partida. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4: Actividades residuales de fitasa (%) en alimentos para aves domésticas después del granulado a diferentes temperaturas de acondicionamiento

N.º de muestra	75 ºC	80 ºC	85 ºC	88 ºC	90 ºC	93 ºC
Formulación 1	70 %	63 %	55 %	49 %	16 %	6 %
Formulación 2	63 %	64 %	51 %	43 %	27 %	13 %

Los resultados muestran que la actividad de fitasa extraída del alimento granulado fue inferior a altas temperaturas de acondicionamiento tanto para la formulación 1 como para la formulación 2.

Ejemplo 2

Formulación 3 - Se cargaron 250 g de cascarillas de arroz en un granulador en lecho fluidizado Strea-1 de Aeromatic-Fielder de GEA; se pulverizaron 50 ml de una formulación de fitasa concentrada líquida que contenía 10 % de sorbitol y 10 % de cloruro de sodio sobre las cascarillas de arroz a través de una boquilla de dos fluidos con pulverización superior. Se usaron los siguientes ajustes de lecho fluidizado: temperatura del aire de entrada de 55 ºC, velocidad de pulverización de 5 ml/min, presión de atomización de 1 bar, boquilla de pulverización de 0,8 mm. El producto enzimático de cascarilla de arroz se secó después de la pulverización enzimática.

Formulación 4: Se cargaron 200 g de cascarillas de arroz en un granulador de lecho fluidizado Strea-1 de Aeromatic-Fielder de GEA; se pulverizaron 100 ml de una formulación de fitasa concentrada líquida que contenía 20 % de sacarosa sobre las cascarillas de arroz a través de una boquilla de dos fluidos con pulverización superior. Los ajustes del lecho fluidizado fueron los mismos que la Formulación 3 y se usaron para formar un producto enzimático de cascarilla de arroz.

Formulación 5 - Se cargaron 200 g de harina de trigo en un granulador de lecho fluidizado Strea-1 de Aeromatic-Fielder de GEA; se pulverizaron 100 ml de una formulación de fitasa concentrada líquida que contenía 20 % de sacarosa y 7 % de almidón pregelatinizado sobre la harina de trigo a través de una boquilla de dos fluidos con

pulverización superior. Se usaron los siguientes ajustes de lecho fluidizado: temperatura del aire de entrada de 50 ºC, velocidad de pulverización de 10-15 ml/min, presión de atomización de 1,5-2 bar, boquilla de pulverización de 0,8 mm. La harina de trigo y el producto enzimático se secaron después de la pulverización enzimática para formar gránulos de fitasa.

Los ensayos de granulado y la determinación de la estabilidad de la enzima fueron los mismos que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

TABLA 5: Actividades residuales de fitasa (%) en alimentos para aves domésticas después del granulado a diferentes temperaturas de acondicionamiento

N.º de muestra	75 ºC	80 ºC	85 ºC	88 ºC	90 ºC	93 ºC
Formulación 3	67 %	70 %	80 %	56 %	29 %	9 %
Formulación 4	72 %	75 %	58 %	56 %	36 %	17 %
Formulación 5	95 %	89 %	93 %	79 %	77 %	38 %

Las cascarillas de arroz se usaron como vehículo en las Formulaciones 3 y 4. Las cascarillas de arroz no estaban finamente molidas ni eran muy absorbentes; además, no se usó aglutinante en estas formulaciones. Como resultado, no se observó granulación efectiva en los productos enzimáticos de cascarilla de arroz. La estabilidad térmica para ambas formulaciones fue relativamente baja a altas temperaturas de acondicionamiento en comparación con la Formulación 5. Cambiar el estabilizador de cloruro de sodio y sorbitol a sacarosa mejoró la termoestabilidad de la fitasa. Sin embargo, cuando el vehículo se cambió de cascarillas de arroz a harina de trigo finamente molida en combinación con el uso de un almidón pregelatinizado como aglutinante como en la formulación 5. El producto enzimático de harina de trigo se granuló, y la estabilidad térmica de la fitasa extraída de un granulado para alimentos para animales mejoró en todas las temperaturas, especialmente a 90 ºC.

Ejemplo 3

Formulación 6 - Se cargaron 3 kg de harina de trigo en un granulador de lecho fluidizado VFC-Lab 3 de Vector; se pulverizaron 1,6 kg de formulación de fitasa concentrada líquida que contenía 20 % de sacarosa y 0,5 % de goma guar sobre la harina de trigo a través de una boquilla de dos líquidos con pulverización superior. Los ajustes del lecho fluidizado eran 1,2 mm de diámetro de boquilla, presión de atomización de 20 psi, temperatura del aire de entrada de 50-55 ºC, temperatura del producto de 23-27 ºC, velocidad de pulverización de 25-50 g/min durante la pulverización; temperatura del aire de entrada de 70-80 ºC durante el secado, secado a una temperatura del producto final de 45 ºC para formar gránulos de fitasa.

Formulación 7 - Se cargaron 3 kg de harina de trigo en un granulador de lecho fluidizado VFC-Lab 3 de Vector; se pulverizaron 1,6 kg de formulación de fitasa concentrada líquida que contenía 20 % de sacarosa, 10 % de maltodextrina y 0,5 % de goma guar sobre la harina de trigo a través de una boquilla de dos líquidos con pulverización superior. Los ajustes del lecho fluidizado eran 1,2 mm de diámetro de boquilla, presión de atomización de 20 psi, temperatura del aire de entrada de 50-55 ºC, temperatura del producto de 23-29 ºC, velocidad de pulverización de 25-50 g/min durante la pulverización; temperatura del aire de entrada de 70-80 ºC durante el secado, secado a una temperatura del producto final de 45 ºC para formar gránulos de fitasa.

Los ensayos de granulado y la determinación de la estabilidad de la enzima fueron los mismos que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 6. Todas las actividades residuales se normalizaron a una estabilidad de 75 ºC de la misma muestra.

TABLA 6: Actividades residuales de fitasa (%) en alimentos para aves domésticas después del granulado a diferentes temperaturas de acondicionamiento

N.º de muestra	75 ºC	88 ºC	90 ºC	93 ºC
Formulación 3	100 %	31 %	9 %	9 %
Formulación 6	100 %	92 %	35 %	5 %
Formulación 7	100 %	76 %	40 %	4 %

La Formulación 3 fue la misma muestra del Ejemplo 2, y se usó como control en este experimento. La estabilidad

térmica para la formulación 3 es más baja aquí que el valor del Ejemplo 2, probablemente debido a las condiciones de granulado más duras en este ensayo. Las dos Formulaciones 6 y 7 dieron como resultado gránulos de fitasa que mejoraron la estabilidad térmica de la fitasa cuando se extrajeron de un alimento para animales granulado.

Ensayos de granulado adicionales - Para confirmar la mejora en la estabilidad térmica, los gránulos de fitasa producidos a partir de las dos muestras (Formulación 6 y 7) se sometieron a un ensayo de granulado adicional utilizando un molino de granulados de California diferente. La duración del acondicionamiento con vapor fue de 40 segundos, que es significativamente más largo que los ensayos previos de granulado. Los resultados se muestran en la Tabla 7. Todas las actividades residuales de fitasa se normalizaron a una estabilidad de 75 ºC de la misma muestra.

TABLA 7: Actividades residuales de fitasa (%) en alimentos para aves domésticas después del granulado a diferentes temperaturas de acondicionamiento.

N.º de muestra	75 ºC	85 ºC	90 ºC	92 ºC
Formulación 6	100 %	82 %	66 %	12 %
Formulación 7	100 %	94 %	50 %	8 %

Los resultados confirmaron que incluso bajo acondicionamiento prolongado con vapor, ambos gránulos de fitasa de las Formulaciones 6 y 7 proporcionaron una alta actividad de fitasa para la fitasa extraída de los granulados para alimentos para animales generados a alta temperatura de granulado.

Ejemplo 4

Formulación 8 - Se cargaron 3 kg de harina de trigo en un granulador de lecho fluidizado VFC-Lab 3 de Vector; se pulverizaron 1,6 kg de formulación de fitasa concentrada líquida que contenía 20 % de sacarosa, 10 % de caolín y 0,5 % de goma guar sobre la harina de trigo a través de una boquilla de dos líquidos con pulverización superior. Los ajustes del lecho fluidizado eran 1,2 mm de diámetro de boquilla, presión de atomización de 20 psi, temperatura del aire de entrada de 50-55 ºC, temperatura del producto de 22-30 ºC, velocidad de pulverización de 25-50 g/min durante la pulverización; temperatura del aire de entrada de 70-80 ºC durante el secado, secado a una temperatura del producto final de 45 ºC para formar gránulos de fitasa.

Formulación 9 - Se cargaron 3 kg de harina de trigo en un granulador de lecho fluidizado VFC-Lab 3 de Vector; se pulverizaron 1,6 kg de formulación de fitasa concentrada líquida que contenía 20 % de sacarosa, 10 % de maltodextrina y 0,5 % de goma guar sobre la harina de trigo a través de una boquilla de dos líquidos con pulverización superior. Los ajustes del lecho fluidizado eran los mismos que en la Formulación 8 para formar gránulos de fitasa.

Formulación 10 - Se cargaron 2 kg de harina de trigo en un granulador de lecho fluidizado VFC-Lab 3 de Vector; se pulverizaron 1 kg de formulación de fitasa concentrada líquida que contenía 20 % de sacarosa y 0,5 % de goma guar sobre la harina de trigo a través de una boquilla de dos líquidos con pulverización superior; 1 kg de solución de granulación secundaria que contenía 10 % de almidón modificado, 10 % de caolín y 1 % de glicerol. Los ajustes del lecho fluidizado eran los mismos que en la Formulación 8; durante la pulverización de la solución de granulación secundaria, la velocidad de pulverización de 17-18 g/min; la temperatura del aire de entrada era de 60 ºC, y la temperatura del producto era de 30-31 ºC, durante el secado, la temperatura de entrada de aire era de 70-80 ºC para formar gránulos de fitasa.

Los ensayos de granulado y la determinación de la estabilidad de la enzima fueron los mismos que en el Ejemplo 1 y los resultados se muestran en la Tabla 8.

TABLA 8: Actividades residuales de fitasa (%) en alimentos para aves domésticas después del granulado a diferentes temperaturas de acondicionamiento

N.º de muestra	80 ºC	85 ºC	88 ºC	90 ºC	93 ºC
Formulación 8	74 %	61 %	79 %	52 %	20 %
Formulación 9	132 %	71 %	68 %	58 %	25 %
Formulación 10	104 %	92 %	79 %	74 %	28 %

Los resultados mostraron que la inclusión de caolín en la pulverización de la solución de granulación secundaria condujo a una mayor estabilidad térmica de fitasa; y el uso de una solución de granulación secundaria mejoró aún más la estabilidad térmica de fitasa de la fitasa extraída del granulado para alimentos para animales.

Ejemplo 5

Formulación 11 - Se cargaron 3 kg de harina de trigo en un granulador de lecho fluidizado VFC-Lab 3 de Vector; se pulverizaron 1,3 kg de formulación de fitasa concentrada líquida que contenía 20 % de sacarosa y 0,5 % de goma guar sobre la harina de trigo a través de una boquilla de dos líquidos con pulverización superior. Los ajustes del lecho fluidizado eran 1,2 mm de diámetro de boquilla, presión de atomización de 20 psi, temperatura del aire de entrada de 50-55 ºC, temperatura del producto de 22-29 ºC, velocidad de pulverización de 25-50 g/min durante la pulverización; temperatura del aire de entrada de 70-80 ºC durante el secado, secado a una temperatura del producto final de 45 ºC para formar gránulos de fitasa.

Formulación 12 - Se cargaron 4,6 kg de harina de trigo en un granulador de lecho fluidizado personalizado a una escala de 5 kg; se pulverizaron 1,25 kg de formulación de fitasa concentrada líquida que contenía 20 % de sacarosa y 0,5 % de goma guar sobre la harina de trigo a través de una boquilla de dos líquidos con pulverización superior; luego se pulverizó solo 1 kg de solución de granulación secundaria que contenía 0,5 % de goma guar. Los ajustes del lecho fluidizado eran temperatura del aire de entrada de 60-80 ºC, temperatura del producto de 28-36 ºC y velocidad de pulverización de 40 g/min para formar gránulos de fitasa.

Los ensayos de granulado y la determinación de la estabilidad de la enzima fueron los mismos que en el Ejemplo 1 y los resultados se muestran en la Tabla 9.

TABLA 9: Actividades residuales de fitasa (%) en alimentos para aves domésticas después del granulado a diferentes temperaturas de acondicionamiento

N.º de muestra	75 ºC	80 ºC	85 ºC	88 ºC	90 ºC	93 ºC
Formulación 11	93 %	111 %	76 %	113 %	57 %	38 %
Formulación 12	108 %	108 %	107 %	129 %	91 %	73 %

Los resultados mostraron que ambas muestras habían mejorado la estabilidad térmica de la fitasa; y el uso de una solución de granulación secundaria mejoró aún más la estabilidad térmica de la fitasa extraída de un granulado para alimentos para animales generado a altas temperaturas de granulado.

Ejemplo 6

La mayoría de las enzimas de alimentación térmicamente estables actualmente disponibles comercialmente dependen del recubrimiento protector térmico. Se ha demostrado que algunos de estos revestimientos retrasan inadvertidamente la liberación de la enzima en la solución, lo que conduce a una reducción de la eficacia de la enzima. Por lo tanto, se examinó el perfil de liberación en el tiempo de la actividad de fitasa del producto granulado de la presente divulgación.

Cien miligramos de Fitasa granulada de la Formulación 12 se mezclaron con 400 ul de tampón de acetato de sodio 100 mM a pH 5,5. La mezcla se agitó durante hasta 60 minutos. En el punto de tiempo designado, se eliminó una alícuota y se centrifugó. Se ensayó la actividad de fitasa en el sobrenadante límpido. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

TABLA 10: Perfil de liberación en el tiempo de la actividad de fitasa

Tiempo (minutos)	2,5	5	7,5	10	15	20
Formulación 12	94 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

Los resultados muestran que la fitasa se volvió soluble en muy poco tiempo. Por otra parte, algunos gránulos de fitasa recubiertos térmicamente disponibles comercialmente mostraron un retraso significativo en la liberación de la actividad enzimática en la solución, en hasta 20 minutos (datos no mostrados).

1. Una formulación enzimática líquida que comprende:

(a) una fitasa;
(b) un tampón, en el que el tampón se selecciona entre el grupo que consiste en: un citrato de sodio, citrato de potasio, ácido cítrico, acetato de sodio, ácido acético, fosfato de sodio, fosfato de potasio y cualquier combinación de los mismos;
(c) un estabilizador, en el que el estabilizador se selecciona entre el grupo que consiste en: una sacarosa, un sorbitol, un manitol, un glicerol, una trehalosa, un cloruro de sodio, un sulfato de sodio, o cualquier combinación de los mismos; y,
(d) un antimicrobiano, en el que el antimicrobiano se selecciona entre el grupo que consiste en: un sorbato de potasio, sorbato de sodio, un ácido sórbico, un benzoato de sodio, un ácido benzoico, un metil parabeno, un propionato de calcio, un propionato de sodio, un propionato de amonio, un ácido propiónico o cualquier combinación de los mismos.

2. La formulación enzimática líquida del artículo 1, en la que el tampón tiene un pH en un intervalo de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5,50.

3. La formulación enzimática líquida del artículo 1, en la que el estabilizador es una combinación de al menos dos estabilizadores.

4. La formulación enzimática líquida del artículo 1, en la que el estabilizador está a una concentración entre aproximadamente 5 % y aproximadamente 30 %.

5. La formulación enzimática líquida del artículo 1, en la que el antimicrobiano es una combinación de al menos dos antimicrobianos.

6. Una formulación enzimática granulada que comprende:

(a) un vehículo;
(b) una solución primaria que comprende una fitasa, un tampón, un estabilizador, un agente aglutinante, un primer plastificante, un antimicrobiano o cualquier combinación de los mismos; y
(c) una solución secundaria que comprende un potenciador, un segundo plastificante o cualquier combinación de los mismos.

7. La formulación enzimática granulada del artículo 6, en la que el vehículo se selecciona entre el grupo que consiste en:

(a) una harina;
(b) una harina de trigo;
(c) una harina blanqueada;
(d) una harina de trigo y una maltodextrina;
(e) una harina de trigo y un almidón pregelatinizado; y
(f) un almidón.

8. La formulación enzimática granulada del artículo 6, en la que el tampón es un citrato de sodio.

9. La formulación enzimática granulada del artículo 6, en la que el estabilizador se selecciona entre el grupo que consiste en: una sacarosa, un sorbitol, un manitol, un glicerol, una trehalosa, un cloruro de sodio, un sulfato de sodio, caolín, silicato de aluminio, silicato de magnesio, y cualquier combinación de los mismos.

10. La formulación enzimática granulada del artículo 6, en la que el agente aglutinante se selecciona entre el grupo que consiste en: una goma guar, un xantano, un algenato de sodio, una goma de algarrobilla, una goma de carragenano, un almidón modificado pregelatinizado, una maltodextrina, gelatina, una metilcelulosa, una hidroxipropilcelulosa, una hidroxipropilmetilcelulosa, una carboximetilcelulosa y cualquier combinación de los mismos.

11. La formulación enzimática granulada del artículo 6, en la que el primer plastificante se selecciona entre el grupo que consiste en: un glicerol, polietilenglicol, citrato de trietilo, triacetina y trietilcitrato de acetilo.

12. La formulación enzimática granulada del artículo 6, en la que el antimicrobiano se selecciona entre el grupo que consiste en: un sorbato de potasio, sorbato de sodio, benzoato de sodio, propionato de sodio, propionato de calcio, propionato de amonio, metil parabeno, ácido benzoico, ácido sórbico y cualquier combinación de los mismos.

13. La formulación enzimática granulada del artículo 6, en la que el potenciador se selecciona entre el grupo que consiste en: almidón modificado pregelatinizado, maltodextrina, algenato de sodio, carragenano con CaCl2,

carragenano sin CaCl2, goma guar con borato de sodio, goma guar sin borato de sodio, gelatina; metil celulasa; hidroxipropilcelulasa; hidroxipropilmetilcelulasa; carboximetilcelulasa; cloruro de sodio; sulfato de sodio; caolín; silicato de aluminio, silicato de magnesio y cualquier combinación de los mismos.

14. La formulación enzimática granulada del artículo 6, en la que el segundo plastificante se selecciona entre el grupo que consiste en un glicerol, polietilenglicol, citrato de trietilo, triacetina y trietilcitrato de acetilo.

15. La formulación enzimática granulada del artículo 6, que comprende además un auxiliar de flujo, en la que el auxiliar de flujo se selecciona entre el grupo que consiste en: dióxido de silicio, estearato de magnesio, caolín, talco, tierra de diatomeas, y cualquier combinación de los mismos.

16. Un método de elaboración de un gránulo enzimático en un lecho fluidizado, en el que la enzima retiene al menos un 63 % de actividad a 75 ºC que comprende:

(a) cargar un vehículo seco en un granulador de lecho fluidizado;
(b) añadir una solución enzimática primaria al vehículo seco; y
(c) secar la combinación de (a) y (b) hasta un contenido de humedad deseado.

17. El método del artículo 16, que comprende además: (b) (i) agregar una solución de granulación secundaria a (a) y (b).

18. El método del artículo 16, que comprende además (d) añadir un auxiliar de flujo al secador de lecho fluidizado o al combinador seco después del secado.

19. El método del artículo 16, en el que la solución de granulación secundaria comprende además un auxiliar de flujo.

20. El método del artículo 16, en el que la enzima se selecciona entre el grupo que consiste en: una fitasa, una celulasa, lactasa, lipasa, proteasa, catalasa, xilanasa, beta-glucanasa, mananasa, amilasa, amidasa, epóxido hidrolasa, esterasa, fosfolipasa, transaminasa, amina oxidasa, celobiohidrolasa, amoniaco liasa y cualquier combinación de las mismas.

21. El método del artículo 16, en el que el contenido de humedad deseado está comprendido entre aproximadamente 3 % a aproximadamente 10 %.

22. Una formulación para fitasa, en la que la fitasa retiene una actividad a una temperatura que comprende:

(a) al menos 63 % de actividad a 80 ºC;
(b) al menos 58 % de actividad a 85 ºC;
(c) al menos 43 % de actividad a 88 ºC;
(d) al menos 27 % de actividad a 90 ºC; y
(e) al menos 6 % de actividad a 93 ºC.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación enzimática líquida que consiste en:

(a) una fitasa que tiene 11.000-12.000 unidades/g, en la que la fitasa es una 6-fitasa (según el sistema de numeración 1L);
(b) un tampón, en el que el tampón es citrato de sodio 50 mM;
(c) un estabilizador, en el que el estabilizador es una combinación de 4 % de sorbitol y 15 % de cloruro de sodio; y,
(d) un antimicrobiano, en el que el antimicrobiano es una combinación de 0,2 % de sorbato de potasio, 0,1 % de benzoato de sodio y 0,1 % de propionato de sodio.