SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(22) Dátum podania: 24.07.96

(31) Číslo prioritnej prihlášky: 95202066.7

(32) Dátum priority: 28.07.95

(33) Krajina priority: EP

(40) Dátum zverejnenia: 08.10.97

(86) Číslo PCT: PCT/EP96/03286, 24.07.96

(21) Číslo dokumentu:

406-97

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[6] :

C 12N 9/96,
A 23L 1/00,
C 12N 9/16,
C 12N 9/24,
C 12N 9/42

(71) Prihlasovateľ: GIST-BROCADES B.V., Delft, NL;

(72) Pôvodca vynálezu: Barendse Rudolf Carolus Maria, Delft, NL;
Harz Hans-Peter, Dudenhofen, DE;
Betz Roland Jürgen, Niederkirchen, DE;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Enzýmové prípravky stabilizované pomocou solí**

(57) Anotácia:
Sú opísané spôsoby zvyšovania spracovateľskej a skladovateľskej stability suchých enzýmových prípravkov. Určitá dávka anorganickej soli, napríklad $MgSO_4$, sa rozpustí v roztoku obsahujúcom enzým, ktorý sa potom usuší napríklad pomocou sušenia rozprašovaním. Okrem zvýšenia enzymatickej aktivity po vysušení pridanie soli takisto zvýši skladovaciu a spracovateľskú stabilitu získanej pevnej kompozície obsahujúcej enzým a anorganickú soľ.

Enzýmové prípravky stabilizované pomocou solí

Oblasť techniky

Vynález sa týka prevedenia enzýmových roztokov na enzýmové prípravky s vyšším obsahom sušiny a zlepšenou skladovacou a spracovateľskou stabilitou.

Doterajší stav techniky

V súčasnosti sa dôležitosť enzýmov v modernej technológii rýchlo zvyšuje. Jedným z hlavných nedostatkov týchto zlúčenín avšak je ich schopnosť dezaktivovať sa nie len v dôsledku extrémnych teplôt, pH hodnôt a ďalších podmienok počas spracovania, ale aj úplne spontánne pri dlhodobom skladovaní pri inak normálnych podmienkach.

Často aplikované metódy známe v danom obore, ktoré sa snažia tento problém zmierniť, zahrnujú použitie množstva aditív, ktoré by mali stabilizovať enzýmy v roztoku, alebo prevedenie enzýmového roztoku na suchú formuláciu vymrazením, sušením rozprašovaním alebo pomocou ďalšej techniky vhodnej pre tento cieľ. Prevedenie enzýmu v roztoku na suchú formu je časté, ak si to aplikácia (napríklad konvenčné zmiešavanie s ďalšími suchými zložkami), vyžiada.

Aj keď sucho v ňom samotnom je cenným nástrojom zlepšovania skladovacej stability enzýmu, samotný spracovateľský krok často spôsobí podstatnú stratu aktivity a konečný produkt je stále schopný inaktivovať sa. Táto strata aktivity počas skladovania alebo spracovania je silne závislá od obsahu vlhkosti v prípravku a aby sa udržala stabilita produktu, musí byť tento obsah čo najprísnejšie kontrolovaný. To takisto zahrnuje podstatné zúženie výberu zlúčenín vhodných na pridanie do konečného enzýmového produktu kvôli štandardizácii alebo z iných dôvodov.

V množstve prípadov je suchý enzým určený pre aplikácie, v

ktorých musí byť zabudovaný do produktu, ktorého obsah vlhkosti sa nedá striktne kontrolovať. V týchto prípadoch sa stabilita enzýmu vážne znižuje.

Stabilizovaním enzýmov proti navlhnutiu a následnému skladovaniu a manipulácii sa zaoberá niekoľko vynález.

Obsah týchto vynálezov (ako je prezentovaný v patentoch (patentových prihláškach) US 351 5642, EP 0501375 A1 a WO 91/14773) sa zaoberá pridaním uhľovodíka a presnejšie cukru alebo polyolových zlúčenín do enzýmového koncentrátu.

V danom obore je takisto známe pridanie určitých zložiek do formulácie s cieľom pripraviť sklený produkt pri skladovacej teplote a teda zlepšiť enzymatickú stabilitu (EP 0383569A2).

Ďalším prístupom je pridanie jednej alebo niekoľkých zložiek, ktoré sú schopné viazať vlhkosť, do kompozície. To zníži aktivitu vody konečného prípravku alebo dočasne zabráni reakcii vody prenikajúcej z okolia so samotným enzýmom.

Použitie organických a anorganických solí ako pomocného spracovateľského prostriedku (napríklad s cieľom zlepšiť chovanie produktu pri tečení) alebo činidla zväčšujúceho objem/štandardizačného činidla je dobre známe. Avšak použitie anorganických solí s cieľom zlepšenia stability enzýmových prípravkov počas spracovanie a skladovania, ako sa zdá, nebolo zatiaľ v danom obore popísané. V niektorých prípadoch bola dokonca špecificky uvedená enzýmová destabilizácia, ku ktorej došlo v dôsledku pridania soli (pozri napríklad Mikhailova a kol., 1989, Vestsi Akad Navuk BSSR, Ser Biyal Navuk 6: 62-65).

Dokument EP 0522269A2 popisuje pridanie nerozpustného uhličitanu vápenatého do enzýmového roztoku, ktorý má byť sušený rozprašovaním.

WO 92/11347 popisuje zabudovanie vodou rozpustných solí do

granulátov obsahujúcich enzým. Vodou rozpustného soli musia byť zvolené tak, aby neovplyvňovali nežiadúcim spôsobom stabilitu enzýmového granulátu. WO 92/11347 poskytuje niekoľko sodných a draselných solí, ktoré sú vhodné pre tento cieľ. Vodou rozpustné anorganické soli sú však k enzýmom pridávané v suchej forme pred ich granuláciou vytláčaním.

Podstata vynálezu

Vynález poskytuje spôsob prípravy pevných enzýmových formulácií so zlepšenou schopnosťou sušiť sa a zvýšenou stabilitou finálnych produktov pri skladovaní a spracovaní. To sa dosiahne prípravou roztoku obsahujúceho enzým a vodou rozpustnú anorganickú soľ, výhodne anorganickú soľ divalentného katiónu, výhodnejšie zinočnatú, horečnatú alebo vápenatú soľ, najvýhodnejšie síran zinočnatý alebo horečnatý a následne vysušením tohto produktu. Takisto sa dá pre tento cieľ použiť kombinácia solí a rovnako tak aj kombinácia enzýmov. Divalentné katióny sú výhodné pretože poskytujú najlepšiu stabilitu pri spracovaní a skladovaní. Síran je ako katión výhodný, pretože poskytuje najlepšiu schopnosť sušiť sa. Vynález poskytuje pevné enzýmové formulácie získané pripravením roztoku obsahujúceho enzým a vodou rozpustnú anorganickú soľ, výhodne anorganickú soľ divalentného katiónu, výhodnejšie zinočnatú, horečnatú alebo vápenatú soľ, najvýhodnejšie síran zinočnatý alebo horečnatý a následne vysušením roztoku obsahujúce enzým a vodou rozpustnú anorganickú soľ.

Pri spôsobe podľa vynálezu je soľ prítomná, zatiaľ čo enzým je stále v roztoku. Nielen že sa dosiahne vyšší výťažok počas sušenia, ale takisto sa zlepší skladovacia stabilita získaných suchých enzýmových prípravkov a rovnako tak sa zlepší aj ich stabilita pri spracovaní. Spracovateľskou stabilitou, či stabilitou pri skladovaní sa tu rozumie stabilita enzýmového prípravku počas akejkoľvek manipulácie s týmto enzýmovým prípravkom iná ako skladovanie, napríklad zmiešavanie enzýmového prípravku s ďalšími zložkami alebo stabilita pri aplikácii

enzýmu.

Sušením roztoku neobsahujúceho enzým a soľ sa získa pevná kompozícia, ktorá je homogénna pokiaľ ide o distribúciu enzýmu a soli.

Vysušenie roztoku obsahujúceho enzým a soľ sa dá dosiahnuť pomocou ľubovoľného spôsobu sušenia dostupného odborníkovi v danom obore, napríklad pomocou sušenia rozstrekovaním, vymrazovaním, vákuového sušenia, sušenia vo fluidnom lôžku a mikrovlnového sušenia. Sušenie roztoku obsahujúceho enzým a soľ sa dá tiež skombinovať s granulačnými metódami, ktoré zahrnujú napríklad použitie fluidného lôžka alebo viacstupňového sušiaku (MSD). V prípade použitia týchto granulačných metód, vie osoba zbehlá v danom obore, že získaná kompozícia nemusí byť nevyhnutne úplne homogénna. Získané častice budú zvyčajne obsahovať aglomeráty homogénnych častíc alebo budú tvorené obalené častice s homogénnym jadrom, s homogénnou povrchovou vrstvou a/alebo s ich kombináciami. V niektorých prípadoch sa vytvorí navzájom homogénna vnútorná disperzia enzýmu a soli.

Špecifické príklady vynálezu demonštrujú, že stabilizujúci účinok soli sa zvyšuje so zvyšujúcou sa dávkou soli pridávanej do enzýmového roztoku až do určitého medzného bodu. Nad týmto bodom už pri zvyšovaní dávky soli nedochádza k zvyšovaniu stability enzýmu. Pre tento cieľ sa do enzýmového roztoku pridáva aspoň 5%, výhodne aspoň 15%, výhodnejšie aspoň 30%, ešte výhodnejšie aspoň 60% a najvýhodnejšie aspoň 90% (hm./hm.), pričom dávka soli je vyjadrená ako hmotnostné percento (hm./hm.) pridanej soli vztiahnuté na hmotnosť enzýmu v roztoku, kde sa nezahrnuje hmotnosť kryštalickej vody kryštálov soli.

Aj keď vynález neudáva žiadnu hornú medzu pre pridanie soli, vyplýva toto obmedzenie z maximálnej rozpustnosti soli v enzýmovom koncentráte. Vyššie pomery soli a enzýmov sa potom dajú dosiahnuť len zriedením enzýmového roztoku alebo použitím kombinácie solí.

Ďalším zvažujúcim bodom by mohla byť dávka, pri ktorej je enzým "vysolený", pričom táto dávka závisí ako od typu soli, tak aj od špecifického enzýmu. Kombinácie solí a enzýmov, ktoré sú príčinou vzniku javu označovaného ako "vysoľovanie" nie sú vybrané z rozsahu vynálezu.

Vynález sa dá použiť pre enzýmy alebo zmesi enzýmov ľubovoľného typu, ktoré neobmedzujúcim spôsobom zahrnujú fytázy a ďalšie fosfatázy, amylázy, proteázy, lipázy a fosfolipázy, celulázy, napríkald beta-glukanázy, pektinázy, hemicelulázy, napríklad xylanázy a ďalšie rastlinné enzýmy degradujúce bunkovú stenu, esterázy, syridlá, napríklad fungálne proteázy alebo chymozín a beta-galaktozidázy. Je zrejmé, že všetko, čo sa v tejto prihláške týka enzýmov, sa takisto týka zmesí enzýmov (tj. výraz enzým, ako je tu použitý, takisto zahrnuje zmesi enzýmov), bez ohľadu na to, či je možné tieto zmesi získať priamo v jedinej fermentácii, alebo zmiešaním enzýmov získateľných v rôznych fermentáciách; a ďalej zahrnuje enzýmy získateľné pomocou fermentácie rekombinovaných organizmov.

Enzým sa výhodne zvolí zo skupiny obsahujúcej fungálne fytázy, fungálne hemicelulázy, fungálne celulázy a bakteriálne proteázy. Výhodnejšie sa enzým zvolí zo skupiny obsahujúcej fytázy a endoxylanázy odvoditeľné z huby patriacej do skupiny *Aspergillus niger* definovanej Raperom a Fenelom (1965, v The Genus *Aspergillus*, The William& Wilkins Company, Baltimor, str. 293-344), beta-glukanázy a endoxylanázy odvoditeľné od druhov *Trichoderma* a proteázy odvoditeľné do druhov *Bacillus*.

Vynález takisto poskytuje pevné kompozície obsahujúce aspoň jeden enzým a anorganickú soľ, pričom dávka anorganickej soli je aspoň 5% (hm./hm.) hmotnosti enzýmu. Výhodnej je anorganická soľ soľ divalentného katiónu, výhodnejšie zinočnatá, horečnatá alebo vápenatá, najvýhodnejšie síran zinočnatý alebo horečnatý. Dávka anorganickej soli v kompozícii je aspoň 5% (hm./hm.), výhodne aspoň 15%, výhodnejšie aspoň 30%, ešte výhodnejšie aspoň 60%

a najvýhodnejšie aspoň 90% hmotnosti enzýmu. Enzýmy, ktoré sa dajú pripraviť v kompozíciách podľa vynálezu zahrnujú všetky vyššie uvedené, najmä potom tie, ktoré sú označené ako výhodné.

Pri ďalšej realizácii vynálezu sa vyššie popísané pevné kompozície použijú pre prípravu zvieracej potravy. Príprava zvieracej potravy často zahrnuje peletačný krok, počas ktorého môže dôjsť k značnej strate enzýmovej účinnosti. Použitie pevných kompozícií podľa vynálezu znižuje tieto straty enzýmovej aktivity počas peletovania. Zloženie zvieracej potravy často zahrnuje surové materiály s rastlinným pôvodom poskytujúce energiu a metabolity pre rast. Táto potrava je obohatená o minerály a vitamíny a zvyčajne sa do tejto potravy pridávajú živočíšne tuky a živočíšne bielkoviny.

Ďalšia realizácia podľa vynálezu je pevná kompozícia obsahujúca fytázu so zvýšenou skladovacou stabilitou. Skladovacia stabilita fytázy v tejto pevnej kompozícii je taká, že po osemtýždňovom skladovaní, výhodne v uzatvorenom zásobníku, pri 30 °C dôjde k menšej ako 35%, výhodne menšej akom 20%, výhodnejšie menšej ako 10% a najvýhodnejšie menšej ako 5% strate začiatočnej aktivity fytázy. Fytázové kompozície môžu obsahovať organický alebo anorganický fyziologicky prijateľný nosič (napr. nosiče na báze zŕn, ako je napríklad hrubo mletá pšenica, pšeničná múka, ryžové šupky atď. a ďalšie organické nosiče, ako je tapioka, zemiakový škrob, trstinový cukor atď., anorganické nosiče, ako napríklad chlorid sodný, síran draselný, kremík atď) v kombinácii s fytázovým enzýmom, prípadne kombinovaným s ďalšími enzýmami a činidlami, ktoré budú ďalej zlepšovať vzhľad produktu, poprípade jeho ďalšie vlastnosti, napríklad farbu chovania pri tečení, fyzikálnu, chemickú alebo mikrobiálnu stabilitu, vôňu, chuť atď. Je zrejmé, že podobné kompozície sa dajú pripraviť aj pre ďalšie potravinové enzýmy a nie len pre fytázu.

Cieľom nasledujúcich príkladov je podrobnejšie popísať predložený vynález.

Príklady realizácie vynálezu

Príklad 1

Koncentrát fungálnej fytázy (ktorá sa získala od Gistbrocedes) obsahujúci približne 11 hm. % enzýmu sa rozdelil na dve časti. Do jednej časti sa pridalo 240 g/l $MgSO_4.7H_2O$. Po rozpustení soli, ktorého výsledkom bol číry roztok, sa obidva roztoky sušili rozprašovaním použitím Bruchiovho laboratórneho sprchového sušiaku so vstupnou teplotou 130 °C a výstupnou teplotou 85 °C.

Výsledné prášky sa zmiešali s hrubo mletou pšenicou v hmotnostnom pomere 1:10 s cieľom neutralizovať všetky rozdiely vo vodnej aktivite medzi prípravkami. Po uvedení do rovnováhy sa táto rovnováha potvrdila meraním vodných aktivít, ktorých nameraná hodnota pri izbovej teplote bola 0,45.

Finálne produkty sa potom skladovali pri 30 °C v uzatvorených fľašiach a po skladovaní sa analyzovala enzymatická aktivita jednotlivých produktov. Po osemtýždňovom skladovaní bola v prípravku neobsahujúceho soľ zistená 35% strata enzymatickej aktivity, zatiaľ čo pokiaľ ide o prípravok s prídavkom soli, táto strata bola len 5%.

Príklad 2

Do oddelených častí koncentrátu alkalickej proteázy odvodenej od Bacillu (získané od spoločnosti Genencor Internatiional Inc.) obsahujúcich približne 12 hm. % enzýmového proteínu, sa rozpustilo 0 a 85 g/l $MgSO_4.0H_2O$. Tieto koncentráty sa potom naniesli použitím laboratórneho poťahovača s fluidným lôžkom Niro STREA-1 na nosič tvorený síranom sodným. Straty účinnosti pri tomto spracovateľskom kroku boli 28%, resp. 14%.

Výsledné častice sa zmiešali s prebytkom komerčného pracieho prášku obsahujúceho bielidlo a určeného pre európsky trh a

inkubovali sa v otvorených fľašiach pri teplote 35 °C a 55% relatívnej vlhkosti. Po 6 týždňoch skladovania bola zvyšná enzymatická účinnosť prípravkov 42% s prídavkom soli a len 30% bez soli.

Príklad 3

V časti enzýmového koncentrátu odvodeného od Trichodermy (získanej od Gist-brocades) s celkovým obsahom sušiny 25 hm. % a s obsahom ako beta-glukanázy, tak aj endoxylázového enzýmu, sa rozpustilo 240 g/l $MgSO_4.7H_2O$. Výsledný roztok a pôvodný koncentrát sa oddelene naniesli na nosič tvorený síranom sodným v poťahovači s fluidným lôžkom Glatt WSG-60. Straty počas spracovania boli 5% a 10% pre beta-glukanázu a 10% a 25% pre endoxylázu pre koncentrát s prídavkom soli, resp. bez nej.

Výsledné častice sa inkubovali pri 30 °C a 62% relatívnej vlhkosti. Po 12 mesačnom skladovaní boli straty aktivity pre beta-glukanázu 10% a v druhom prípade boli neurčité a straty účinnosti pre endoxylázu boli 10% a 25%, pre enzým s prídavkom soli, resp. bez nej.

Granuláty sa takisto zabudovali do potravinovej zmesi a podrobili sa laboratórnemu peletačnému spracovaniu pri teplote 70 °C. Straty aktivity beta-glukanáza boli 46% a 59% a straty aktivity endoxylázy boli 37°C a 66°C s prídavkom soli, resp. bez nej.

Potravinová zmes použitá pri peletačnom spracovaní bola tvorená:

Zložky	% (hm./hm.)
Kukurica	50,00
Hrach (22,9% surového proteínu)	3,50
Odtučnená sója (45,5% surového proteínu)	28,00
Tapioka	2,38

Zvieracie mäso (58% surového proteínu)	3,60
Rybie mäso (72,7% surového proteínu)	1,00
Hydrolyzované hydinové mäso	1,00
Sójový olej	1,75
Živočíšny tuk	3,50
Vitamínová a minerálna predzmes	3,15
Vápenec	0,86
Kyslý ortofosforečnan vápenatý	0,96
Chlorid sodný	0,30

Príklad 4

V 100 ml demineralizovanej vody sa rozpustili rôzne množstvá síranu horečnatého a potom sa do každej časti pridal koncentrát fungálnej fytázy (dostupná od Gist-brocades) s obsahom približne 17 hm. % čistého enzýmu. Po premiešaní sa výsledné roztoky usušili rozprašovaním použitím laboratórneho sprchového sušiča Bruchi 190 Mini Spray Dryer s vstupnou teplotou 140 °C a výstupnou teplotou 80 °C.

Výsledné práškové podiely sa zmiešali s hrubo namletou pšenicou v pomere 1:9. Po nastavení rovnovážneho stavu sa zmerali hodnoty aktivity pri 35 °C pre kontrolnú vzorku a pre vzorku s najvyšším obsahom soli s cieľom eliminovania účinkov vodnej aktivity. Zmesi sa potom inkubovali v uzatvorených fľašiach pri 35 °C 8 týždňov a po uplynutí tejto doby sa zmerali straty vodnej aktivity v jednotlivých prípadoch.

Výsledky sú zhrnuté do tejto tabuľky:

Dávka $MgSO_4$ (g/g enzýmu)	Vodná aktivita v zmesi [-]	Straty po 8 týždňoch skladovania pri 35 °C
0	0,292	52%
0,31	-	37%
0,61	-	26%
1,19	-	15%
1,84	-	15%
2,38	0,303	17%

Príklad 5

Podľa rovnakého protokolu ako v príklade 4 sa pre prípravu stabilizovaných enzýmových práškov použili rôzne soli v množstve 80 mmol/100 ml fytázového koncentrátu. Zmiešania s hrubo namletou pšenicou a testy stability sa uskutočnili spôsobom analogickým so spôsobom použitým v príklade 4.

Výsledky sú uvedené v tejto tabuľke:

Typ soli	Vodná aktivita [-]	Straty pri sušení rozprašovaním	Straty pri 8 týždňoch skladovania pri 35 °C
Žiadna	0,29	6%	52%
Síran horečnatý	-	7%	15%
Chlorid horečnatý	0,30	26%	43%
Dusičnan horečnatý	0,31	32%	27%
Síran zinočnatý	-	5%	9%
Chlorid zinočnatý	-	48%	5%
Chlorid vápenatý	-	40%	18%
Dusičnan vápenatý	-	44%	13%
Síran sodný	-	11%	51%
Síran draselný	-	17%	36%
Síran amónny	-	6%	46%

Príklad 6

Použitím protokolu popísaného v príklade 5 sa pripravili tri roztoky obsahujúce fytázu, ktoré neobsahovali buď žiadnu soľ alebo obsahovali síran horečnatý, alebo síran zinočnatý, tieto roztoky sa následne sušili vymrazovaním namiesto sušenia

rozprašovaním. Po vymrazení sa roztoky zmrazili v banke tak, že sa uvedená banka ponorila do kvapalného dusíka a potom sa vystavili pôsobeniu vysokého podtlaku, pri ktorom dôjde k odstráneniu vody z roztokov. Výsledné suché prípravky sa rozdrvili v mažiari a zmiešali s hrubo namletou pšenicou. Potom sa nechali inkubovať 8 týždňov pri teplote 35 °C v uzatvorených fľašiach a po uplynutí tejto doby sa zmerali straty stability. Získané výsledky sú uvedené v tejto tabuľke:

Typ soli	Vodná aktivita zmesi	Straty pri 8 týždňoch skladovania pri 35 °C
Žiadna	0,31	46%
Síran horečnatý	0,31	16%
Síran zinočnatý	-	3%

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Spôsob zvyšovania spracovateľskej stability alebo skladovacej stability pevného enzýmového prípravku, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrnuje sušenie roztoku obsahujúceho enzým a vodou rozpustnú anorganickú soľ, pričom množstvo anorganickej soli pridanej do roztoku predstavuje aspoň 5% (hm./hm.) hmotnosti enzýmu.

2. Spôsob prípravy pevnej kompozície obsahujúcej enzým, ktorá je stabilná pri spracovaní a skladovaní, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrnuje:

a) prípravu roztoku obsahujúceho enzým a vodou rozpustnú anorganickú soľ, pričom množstvo anorganickej soli pridanej do roztoku predstavuje aspoň 5% (hm./hm.) hmotnosti enzýmu a

b) vysušenie uvedeného roztoku.

3. Spôsob podľa nároku 1 alebo 2, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že anorganická soľ obsahuje divalentný katión.

4. Spôsob podľa nároku 3, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa uvedený divalentný katión zvolí zo skupiny tvorenej zinkom, horčíkom a vápnikom.

5. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 až 4, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že anorganická soľ obsahuje síranový anión.

6. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 až 5, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa uvedený enzým zvolí zo skupiny zahrnujúcej fytázu, výhodne odvodenú od *Aspergillu*, proteázu, výhodne odvodenú od *Bacillu*, hemicelulázu, výhodne odvodenú od *Aspergillu*, hemicelulázu a celulázu, obidve výhodne odvodené od *Trichodermy*.

7. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 až 6, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sušenie roztoku obsahujúceho enzým a anorganickú soľ zahrnuje použitie sušiaku zvoleného zo skupiny tvorenej sprchovým sušiakom, sušiakom s fluidným lôžkom a vymrazovacím sušiakom.

8. Pevná kompozícia obsahujúca aspoň jeden enzým a vodou rozpustnú anorganickú soľ, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že dávka anorganickej soli ej aspoň 5% (hm./hm.) hmotnosti enzýmu a anorganická soľ obsahuje divalentný katión.

9. Pevná kompozícia, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že sa dá získať:

a) prípravou roztoku obsahujúceho enzým a vodou rozpustnú anorganickú soľ, pričom množstvo anorganickej soli pridanej do roztoku predstavuje aspoň 5% (hm./hm.) hmotnosti enzýmu a

b) vysušením uvedeného roztoku.

10. Pevná kompozícia podľa nárokov 8 alebo 9, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že uvedená soľ je soľ definovaná v niektorom z nárokov 3 až 5.

11. Pevná kompozícia podľa niektorého z nárokov 8 až 10, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že uvedený enzým je enzým definovaný v nároku 6.

12. Pevná kompozícia podľa niektorého z nárokov 8 až 11, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že je homogénna, pokiaľ ide o distribúciu anorganickej soli a enzýmu.

13. Pevná kompozícia podľa niektorého z nárokov 8 až 11, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že obsahuje častice, ktoré sú homogénne, pokiaľ ide o distribúciu anorganickej soli a enzýmu.

14. Pevná kompozícia podľa niektorého z nárokov 8 až 11, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že obsahuje povlak, ktorý je homogénny, pokiaľ ide o distribúciu anorganickej soli a enzýmu.

15. Pevná kompozícia obsahujúca fytázu so skladovacou stabilitou, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že po osemtýždňovom skladovaní pevnej kompozície pri 30 °C je strata menšia ako 35% začiatočnej aktivity fytázy.

16. Zvieracia strava obsahujúca pevnú kompozíciu, ktorá je definovaná v niektorom z nárokov 8 až 15.