



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101287381 B

(45) 授权公告日 2012.03.21

(21) 申请号 200680037973.6

代理人 黄革生 刘金辉

(22) 申请日 2006.10.12

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

A23K 1/165(2006.01)

60/726,494 2005.10.12 US

C12N 9/96(2006.01)

C12N 9/98(2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

A61K 9/16(2006.01)

2008.04.11

(86) PCT申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/US2006/040394 2006.10.12

US 2004/0033927 A1, 2004.02.19, 全文.

CN 1615085 A, 2005.05.11, 全文.

(87) PCT申请的公布数据

W02007/044968 EN 2007.04.19

CN 1615086 A, 2005.05.11, 全文.

CN 1382212 A, 2002.11.27, 全文.

CN 1371247 A, 2002.09.25, 全文.

(73) 专利权人 金克克国际有限公司

地址 美国加利福尼亚州

审查员 王文庆

(72) 发明人 N·T·贝克尔 K·A·克拉克森

D·戴尔 B·弗吕克斯代尔

M·S·格伯特 M·帕特苏夫

T·格拉文森

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

权利要求书 1 页 说明书 41 页

(54) 发明名称

具有活性剂的稳定、持久颗粒

(57) 摘要

用于饲料组合物的稳定、持久颗粒,其含有核,至少一种活性剂;和至少一层包衣。在选自下述一个或多个的条件之后,颗粒的活性剂保留至少 50% 的活性,至少 60% 的活性,至少 70% 的活性,至少 80% 的活性,所述一个或多个的条件是: a) 饲料微丸化过程, b) 蒸汽-加热饲料预处理过程, c) 存储, d) 作为成分存储在未微丸化的混合物中, 和 e) 作为成分存储在饲料基础混合物中或饲料预混和物中, 其中饲料基础混合物或饲料预混和物包括至少一种化合物, 该化合物选自微量矿物质、有机酸、还原糖、维生素、氯化胆碱、以及导致酸性或碱性饲料基础混合物或饲料预混合物的化合物。

1. 用于饲料组合物的颗粒,所述颗粒的组成为:
由 40.0%硫酸钠组成的核;
施加在核上的含活性剂的包衣,所述包衣由 5.0%的酶、1.0%的 PVA 和 5.0%的玉米淀粉组成;
施加在该活性剂包衣上的水分水合包衣,所述包衣由 40.0%硫酸钠组成;和
施加在该水分水合包衣上的水分屏障包衣,所述包衣由 3.0%的 PVA 和 6.0%的滑石;
上述百分比指相应组分相对于整个颗粒重量的重量百分比,
所述颗粒具有小于 0.5 的水活性。

具有活性剂的稳定、持久颗粒

[0001] 相关申请

[0002] 【0001】本申请要求根据 35 U. S. C. § 119 而基于在 2005 年 10 月 12 日提交的美国临时申请序号 60/726, 494 的优先权。

发明领域

[0003] 【0002】本发明涉及具有活性剂的稳定、持久颗粒。具体地,本发明涉及含有活性剂的热稳定、持久颗粒,该颗粒特别地适合包含在蒸汽处理过程中,包括微丸化和压片过程以及饲料的蒸汽处理过程;而活性剂的活性没有明显损失。这种稳定的、持久颗粒具有适合释放活性剂的溶解曲线,以便给其预定目标提供效率。在未成微丸的混合物中存储和蒸汽处理之后,活性剂的活性被保留下来。

[0004] 发明背景

[0005] 【0003】在动物饲料中使用活性剂,例如酶,是普遍的。酶众所周知地可以提高饲料消化率,降低饲料中抗营养因素,以及提高动物生产力。众所周知在工业中,酸性和碱性饲料成分以及动物饲料的具体成分,包括,但不限于:微量矿物质、有机或无机酸或碱、还原糖、以及吸湿性物质,特别是氯化胆碱和氯化钠,对活性剂具有不良作用,例如其他维生素、蛋白质、抗微生物剂、益生元 (prebiotics)、益生菌 (probiotics) 和酶;并且,还众所周知一些饲料生产过程对于活性剂是不利的。

[0006] 【0004】在工业中存在一个问题,要提供保护性制剂,以便活性剂在未成微丸态的动物饲料混合物中适合储存,例如在可能是酸性的或碱性的以及含有对活性剂的稳定性具有相反作用的成分的基础混合物或预混和物中。关于不良作用的一个机理被认为是氧化-还原反应 (oxidation-reduction (redox)),在预混和物中的氧化性化合物与还原性化合物——在出现水时——发生氧化-还原反应。一份在 BASF Technical Bulletin NU0013 上报告的研究报道:二种可商业获得的酶,在饲料预混合物中储存 3 周之后,其含有颗粒留存活性相应地为 86% 和 81%;在饲料预混合物中储存 6 周之后,其含有颗粒留存活性相应地为 55% 和 33%。目前一些用于饲料工业的酶制造商建议,如果酶被储存在预混合物中,则需要用阻隔性包装被保护,或者它们与预混合物被分别储存,或者它们仅被储存在预混合物中很短的一段时间。

[0007] 【0005】另外,用于食品和饲料中的很多活性剂是热不稳定的。在工业上,特别是在动物饲料微丸 (pellet) 的生产中,酶的热稳定性以及能在动物饲料生产加热工艺步骤中存活下来的能力是个问题。当与干燥饲料混合物相比,饲料微丸具有有利工业的性质,例如提高的饲料质量,降低了病原体,制造过程中的更低粉尘水平,易操作性,和更均匀的成分剂量。优选的工业微丸化过程利用蒸汽注射,在被已知为调理过程里,其在微丸化步骤前加入水份并且将温度升高,然后微丸化步骤强制蒸汽加热饲料成分、或经过调理的配合粉料 (调质料浆 (conditioned mash)) 通过冲模 (die)。微丸化过程温度可以从大约 70°C 到 90°C,或更高。

[0008] 【0006】酶是重要的饲料成分,必须能够承受在微丸化过程中使用的日益增高的工

艺温度,具体是那些使用膨化器的过程,而同时持续输送体内效率。

[0009] **【0007】**鉴于用于微丸化过程的蒸汽、温度和压力,酶和其他活性剂的稳定性是个问题,其如以下事实示例:饲料酶经常作为稳定的液体产品被提供给工业,为避免酶钝化,在微丸过程之后这种稳定的液体产品被加入到饲料微丸中。例如,当酶以喷涂到微丸上的方式,被用于后微丸化过程时(post pelleting),均匀的剂量是个问题,以及将酶加入到后-微丸的装备费用很高。可选地,液体酶制剂,或干燥混合酶制剂可以在微丸化过程之前被加入到混合物。在一些情况,为补偿在微丸化过程中的损失,加入比需要的更多水平的酶。

[0010] **【0008】**片剂形成过程也利用压缩力,以及可能或可能不应用热量。片剂被用于家用护理工业,例如,在洗衣房中、碟子和表面清洁应用。

[0011] **【0009】**在食品、饲料、和家用护理工业方面,需求具有活性成分的稳定、持久颗粒剂,该颗粒作为制剂的组成成分需要经历蒸汽处理,例如,微丸化过程和压片过程,而活性剂活性没有明显损失并且该颗粒具有适于释放活性成分的溶解特性,以便为它们的预计目标提供效率。还需求,当具有活性成分的稳定、持久颗粒剂;当其被用作动物饲料制剂的成分时,例如,在包含对活性剂具有相反作用成分的未微丸化的混合物中时,保留它们的活性。

[0012] 发明概述

[0013] **【0010】**本发明涉及用于饲料组合物的颗粒,包括:核(芯,core);活性剂;和至少一层包衣,所述颗粒的活性剂在选自下述的一种或更多情况后,至少存留50%活性,至少存留60%活性,至少存留70%活性,至少存留80%活性,情况为:a)饲料微丸化过程,b)蒸汽-加热饲料预处理过程,c)存储,d)作为成分在未微丸化的(造粒,粒化, pellet)混合物中的存储,e)作为成分在饲料基础混合物或饲料预混和物中的存储,饲料基础混合物或饲料预混和物包括至少一种化合物,该化合物选自微量矿物质、有机酸、还原糖、维生素、氯化胆碱、和能导致酸性或碱性饲料基础混合物或预混和物的化合物。

[0014] **【0011】**在本发明的一个实施方式中,被提供用于动物饲料的颗粒包括:核;活性剂,当颗粒是一种成分的情况下,在储存和蒸汽-加热微丸化过程之后,颗粒的活性剂留存至少80%的活性;水分屏障包衣(潮气隔离包衣(moisture barrier coating));和至少是颗粒的25% w/w 的水分水合包衣(moisture hydrating coating),在蒸汽-加热微丸化过程之前,颗粒含有少于0.5的水活性。

[0015] **【0012】**在本发明的另一个实施方式中,提供了动物饲料成分,包括:包含核的颗粒;环绕核的活性剂;和至少一层环绕活性剂的包衣,活性剂在选自下述一个或更多情况后,至少存留50%活性,至少存留60%活性,至少存留70%活性,至少存留80%活性,情况为a)饲料微丸化过程,b)蒸汽-加热饲料预处理过程,c)存储,d)作为成分在未制丸混合物中的存储,e)作为成分在饲料基础混合物或饲料预混和物中的存储,饲料基础混合物或饲料预混和物包括至少一种化合物,所述化合物选自微量矿物质、有机酸、还原糖、维生素、氯化胆碱和能导致酸性或碱性饲料基础混合物或预混和物的化合物。

[0016] **【0013】**在本发明为生产用于饲料的包括活性剂的颗粒之方法中,所述方法包括:准备具有核、至少一种活性剂、和至少一层包衣的稳定颗粒;将稳定颗粒与a)稀释剂、b)基础混合物、c)预混和物、和d)用于微丸化过程的饲料混合物之一或多种混合在一起。

[0017] 【0014】在本发明的另一个实施方式中,提供了制备稳定颗粒的方法,该颗粒含有在饲料预混和物中进行存储的酶,其中饲料预混和物中包含氯化胆碱,该方法包括:提供核材料和酶,酶被分散到核材料或层覆到核材料之上;在核材料与酶上应用潮气吸收材料(水分水合材料,moisturehydrating material),以形成是稳定颗粒的至少 25% w/w 的层;再用潮气阻挡材料(水分屏障材料,moisture barrier material)涂布该层,以形成是颗粒的至少 2% w/w 的包衣,在选择的条件下应用与进行包衣,因此稳定颗粒的水活性是少于 0.5 的。

[0018] 【0015】上面实施方式中的稳定、持久颗粒,在蒸汽加热微丸化过程或预处理过程条件下——其中升高微丸化材料的温度高至 85℃ 到大约 90℃ 保持达到大约几分钟,留存至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、和至少 95% 的活性剂活性。本发明的稳定、持久颗粒特别适合作为动物饲料微丸中的成分,以及作为家用护理片剂中的成分。

[0019] 【0016】在本发明的实施方式中,稳定持久颗粒包括潮气吸收材料,其至少占颗粒的大约 55% w/w。

[0020] 【0017】在本发明的其他实施方式中,稳定持久颗粒具有潮气吸收包衣,其占颗粒的至少大约 25%、大约 30%、大约 35%、大约 40%、大约 50%、和大约 60% w/w,以及潮气隔离包衣,其包含颗粒的至少大约 2% 到大约 40% w/w、大约 2% 到大约 10%、大约 2% 到大约 7%、大约 5% 到大约 15%。

[0021] 【0018】在本发明的实施方式中,稳定持久颗粒包括三层保护包衣,其中一层包衣占颗粒大约 20% 到 25% w/w 的潮气吸收材料和其他二层包衣占颗粒大约 5% 到 15% w/w 的潮气阻挡材料。在这个实施方式中,为给潮气阻挡材料退火,热退火工艺程序步骤被使用。

[0022] 【0019】在本发明的实施方式中,稳定持久颗粒包括:硅酸盐或粘土核和在基体里的内在热稳定活性剂;可选的无机盐潮气吸收保护性包衣;以及,可选的潮气隔离包衣。在这个实施方式中,所述的可选择的包衣占颗粒大约 0% 到大约 15% w/w。

[0023] 【0020】本发明进一步包括:制造稳定持久颗粒以及饲料微丸;宠物食品;和家用护理和含有这种稳定、持久颗粒的食物片剂的方法。

[0024] 发明详述

[0025] 【0021】本发明提供含有活性剂的稳定、持久颗粒,当其被加入到制剂中,在制剂经历,例如,加热蒸汽预处理过程,饲料微丸化过程和压片过程时,可以耐受高温和压缩压力,而保持适合释放活性剂的溶解特性,以便能够为它们的预定目标提供效率。

[0026] 【0022】本发明的第一方面出人意料地提供具有饲料活性剂的稳定持久颗粒,其能承受蒸汽预处理过程、和饲料微丸化蒸汽-加热过程温度和压力,而保持适合释放活性剂的溶解特性,以便提供预计的效率。在这个实施方式中,优选地,颗粒成分被批准在饲料中使用。

[0027] 【0023】本发明的第二个方面提供具有酶的稳定持久颗粒,其能承受蒸气-加热饲料预处理过程、和微丸化过程温度和压力,而保持释放酶以提供体内生物利用度效率的溶解特性。在这个实施方式中,颗粒成分可以被动物食用,以及优选地,并且是可以消化的。

[0028] 【0024】本发明的第三个方面提供具有活性剂的稳定、持久颗粒,其用于动物饲料未微丸化混合物,例如,预混和物。在未微丸化混合物喂给动物之前,当未微丸化混合物被

加热和蒸汽预处理时,或未微丸化混合物被微丸化之后,该稳定持久颗粒保持效能。在本发明的这个方面中,令人惊喜地,存储在含有对酶稳定性不利成分的未微丸化混合物中的活性剂保持活性。在本发明的这个方面,不希望被任何特别的理论所限制,可以相信,在颗粒中的潮气吸收材料与颗粒中的潮气阻挡材料相结合,扮演着保护活性成分,从而不受未微丸化的混合物中之不利成分的影响。潮气吸收材料延缓或降低水扩散到活性剂的区域中的速率或程度。并且潮气阻挡材料排除水。潮气吸收材料与潮气阻挡材料的结合提供了机械稳定性,以便在潮气阻挡材料层被损坏事件中,进一步保护活性剂。此外,本发明的一些实施方式中,潮气阻挡材料被使用,它们仅仅在极端情况下氧化,因此,在与潮气吸收材料结合的情况下,颗粒是化学性稳定的,因为据信:颗粒在未微丸化混合物中的存储期间,氧化还原反应被降低了。

[0029] **[0025]** 本发明的第四个方面提供具有活性剂的稳定、持久颗粒,其能承受压片程序,而颗粒保持释放活性剂的溶解特性,以便在家用护理应用,例如,洗衣间、碟子、和表面清洁应用方面,以提供效能。在这个实施方式中,颗粒成分包括不能被动物消化的原料,例如,表面活性剂、沸石、漂白材料、和色料。

[0030] **[0026]** 本发明的稳定、持久颗粒是球形或近似球形的颗粒,尽管其他形状,例如,圆盘形、椭圆形、圆柱形和长方形,如果期望则可以被使用。颗粒具有环绕活性剂的一个或更多个保护层。

[0031] **[0027]** 在用于微丸化过程或压片过程,或在被用在干性饲料混合物中以及在未微丸的粉料中之前,颗粒可以与干性成分,例如,饲料或家用护理制剂,或未微丸化混合物,例如,预混和制剂混合在一起。颗粒特别地适合用于饲料微丸化生产过程中,并且也适合用于食品,包括宠物食品,以及用在家用护理片剂生产过程中。

[0032] **[0028]** 除非以其他方式定义,否则本文所用的所有技术及科学术语都具有与本发明相关的具有本领域的普通技术的人员所普遍理解的不同含义。如在说明书和权利要求书中所用,单数“一个 (a)”、“一种 (an)”和“该”包括复数指代,除非上下文清楚地指明其他情况。例如,术语颗粒可以包括许多颗粒。

[0033] **[0029]** 对于本公开内容的目的,“活性剂 (active agent)”可以是任何物质,其被加入到稳定、持久颗粒中。活性剂可以是生物学上的有生命物质,食品或饲料成分,抗微生物剂,抗菌素取代剂,益生菌,益生菌,农业化学成分,例如杀虫剂、化肥或除草剂;药物成分或家用护理活性成分,或它们的混合物。在一个优选实施方式中,活性成分是蛋白质,酶,肽,多肽,氨基酸;碳水化合物,脂类或油,维生素,辅-维生素,或激素,或它们的混合物。在另一个实施方式中,活性成分是酶,漂白剂,漂白剂催化剂,香料,或其他生物活性成分。内在热稳定活性剂被本发明所包括,并且在本发明的颗粒中显示增强的热稳定性。作为可选择的,当提供含有内在热稳定活性剂的颗粒时,更少的包衣材料可以被使用;并且,这里提供的保护包衣材料数量主要是针对非内在热稳定的活性剂予以选择的。

[0034] **[0030]** 用于食品和饲料应用而言,大多数优选活性成分是酶,肽和多肽,氨基酸,抗生物剂,内脏健康促进剂,维生素,以及它们的混合物。

[0035] **[0031]** 任何酶可以被使用,并且非限定性的酶名单包括:肌醇六磷酸酶,木聚糖酶, β -葡聚糖酶,磷酸(酯)酶,蛋白酶,淀粉酶(α 或 β 或葡糖糖化酶)纤维素酶,脂肪酶,角质酶,氧化酶,转移酶,还原酶,半纤维素酶,甘露聚糖酶,酯酶,异构酶,果胶酶,乳糖

分解酵素, 过氧(化)物酶, 漆酶, 其他氧化还原酶和它们的混合物。

【0036】 【0032】特别地优选的酶包括: 从里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 中得到的木聚糖酶和从里氏木霉中得到的变异体木聚糖酶, 两者可以从 Danisco A/S, Denmark 和/或 Genencor International, Inc., Palo Alto, California 获得, 或者在 EP1222256B1 中所描述的内在热稳定性木聚糖酶, 以及从黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、白曲霉 (*Aspergillus kawachii*)、塔宾曲霉 (*Aspergillus tubigenensis*) 芽孢杆菌 (*Bacillus circulans*)、短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、*Neocallimastix patriciarum* (水生真菌)、青霉菌 (*Penicillium species*)、变铅青链霉菌 (*Streptomyces lividans*)、热紫链霉菌 (*Streptomyces thermoviolaceus*)、褐色高温单孢菌 (*Thermomonospora fusca*)、木黴菌 (*Trichoderma harzianum*)、里氏木霉 (*Trichoderma reesei*)、绿木霉 (*Trichoderma viride*) 得到的其他木聚糖酶; 肌醇六磷酸酶的实例是 **Finase L[®]** (芬拿斯植酸酶 L[®]), 是一种从曲霉菌某种 (*Aspergillus sp.*) 得到的肌醇六磷酸酶, 可以从 ABEnzymes, Darmstadt, 德国获得; **Phyzyme[™] XP**, 是一种来源于 *E. Coli* 的肌醇六磷酸酶, 可以从 Danisco, Copenhagen, Denmark 获得, 以及其他肌醇六磷酸酶从, 例如, 下面种类中获得: 木霉菌 (*Trichoderma*), 青霉菌 (*Penicillium*), 镰刀菌 (*Fusarium*), 布丘氏菌 (*Buttiauxella*), 柠檬酸杆菌 (*Citrobacter*), 肠杆菌 (*Enterobacter*), 青霉菌属 (*Penicillium*), 腐质霉 (*Humicola*), 杆菌 (*Bacillus*), 和 *Peniophora*。

【0037】 【0033】纤维素酶的实例是: **Multifect[®]BGL**, 是一种纤维素酶 (β 葡聚糖酶), 可以从 Danisco A/S, Denmark 中获得, 和其他纤维素酶, 从例如曲霉菌 (*Aspergillus*), 木霉菌 (*Trichoderma*), 青霉菌 (*Penicillium*), 腐质霉 (*Humicola*), 杆菌 (*Bacillus*), 纤维单胞菌属 (*Cellulomonas*), 青霉菌 (*Penicillium*), 热单孢子 (*Thermomonospora*), 梭菌 (*Clostridium*), 以及肉座菌属 (*Hypocrea*) 的物种获得。在 US20060193897A1 中描述的纤维素酶和内切葡聚糖酶也可以被使用。淀粉酶可以从, 例如, 从种类, 例如, 曲霉菌 (*Aspergillus*), 木霉菌 (*Trichoderma*), 青霉菌 (*Penicillium*), 杆菌 (*Bacillus*), 例如, 枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*), 嗜热脂肪芽孢杆菌 (*B. stearothermophilus*), 豆形杆菌 (*B. lentus*), 地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*), 凝结芽孢杆菌 (*B. coagulans*), 以及淀粉液化芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) 中获得。适合的真菌淀粉酶可以从曲霉菌 (*Aspergillus*), 例如, 米曲霉 (*A. oryzae*) 和黑曲霉 (*A. niger*) 中获得。蛋白酶可以从淀粉液化芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*), 豆形杆菌 (*Bacillus lentus*), 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*), 和曲霉菌 (*Aspergillus*) 以及木霉菌 (*Trichoderma*) 种类中获得。

【0038】 【0034】肌醇六磷酸酶, 木聚糖酶, 磷酸(酯)酶, 蛋白酶, 淀粉酶, 酯酶, 氧化还原酶, 脂肪酶, 转移酶, 纤维素酶, 以及 β -葡聚糖酶, 是经常被使用而包括在动物饲料中的酶。家用护理应用中适合包含入片剂中的酶是相似的, 特别是蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、半纤维素酶、氧化还原酶、过氧(化)物酶、转移酶以及纤维素酶。

【0039】 【0035】在本发明的特别优选方面中, 酶选自肌醇六磷酸酶, 木聚糖酶, β -葡聚糖酶, 淀粉酶, 蛋白酶, 脂肪酶, 酯酶, 和它们的混合物。在本发明的一个实施方式中, 在颗粒中有二种酶被提供, 即: 木聚糖酶, β -葡聚糖酶。酶可以被混合在一起或分别用于颗粒。在另一个实施方式中, 在颗粒中有三种酶—— β -葡聚糖酶, 木聚糖酶, 肌醇六磷酸酶——被

提供。

[0040] 【0036】上述酶的名单仅仅是实例，并不意味是排他的。在本发明的持久颗粒中任何酶可以被使用，包括细菌、真菌、酵母、植物、昆虫和动物来源的野生类型、重组类型和变异类型的酶，以及酸性、中性或碱性酶。

[0041] 【0037】本领域的那些技术人员可以认识到所使用的酶数量——将由，至少部分由——所选择的酶的类型及性质和预定用途所决定。

[0042] 【0038】本发明持久颗粒包括：在干重基础上，大约 0.0005 到大约 20% 之间的颗粒酶成分。例如，在本发明的实施方式中，在颗粒中，酶的重量百分比至少 0.0005 到大约 15%，至少 0.001 到大约 15%，至少 0.01 到大约 10%，至少 0.1 到大约 10%，至少 1.0 到大约 10%，至少 1.0 到大约 8%，至少 1.0 到大约 5%，至少 2.0 到至少 5%。每吨饲料中，25 到 400 克典型剂量的稳定持久酶颗粒可以输送每吨饲料大约 0.0001 到大约 80 克活性酶蛋白质，并且酶颗粒可以以每吨饲料 5000 克而被剂量使用。对于其他活性成分，典型地，剂量是 0.001 到大约每吨饲料 400 克，或更高。当本发明的热稳定颗粒被用作动物饲料未微丸化混合物——例如，预混和物——的成分时，剂量可能更高，所述颗粒可能含有几种活性剂并且被加入到饲料组合物中。例如，被加入到预混和物的酶颗粒之剂量可能是预混和物的大约 0.2% 到 10%，或原始混合物的大约 0.1% 到大约 3%。在一个代表性的实施方式中，存储在预混和物中的包含肌醇六磷酸酶之稳定、持久颗粒的活性水平，是大约 500U/g，或更高。典型地，预混和物以大约 0.5% 到 2% 被加入到食物中，原始混合物以大约 2% 到大约 6% 被加入。

[0043] 【0039】包含活性剂，包括任何过程固体、粘结剂和存在于其中的其他成分，没有本发明的保护包衣（多层包衣）的持久颗粒部分，可能包含少于大约 70%，少于大约 60%，少于大约 50%，少于大约 40%，少于大约 30%，少于大约 20% 的颗粒重量；而且，通常地，重量百分数是大约 25% 到大约 50% w/w，大约 40% 到大约 60%，或者大约 50% 到大约 60%。

[0044] 【0040】包衣层（多层包衣）可能包括多于大约 30%，多于大约 40%，多于大约 50%，多于大约 60%，多于大约 70%，以及多于大约 80% 的颗粒重量，而且，通常地，重量百分数取决于包衣层的类型和数量，可以是大约 50% 到大约 75% w/w，大约 40% 到大约 60% w/w，或者大约 40% 到大约 50%。

[0045] 【0041】对于使用内在热稳定活性剂的实施方式，核可能占颗粒含量的大约 85 到大约 100% w/w，包衣层可能占颗粒的大约 0% 到大约 15% w/w。

[0046] 【0042】本发明的持久颗粒可以如希望般被设计制作尺寸，直径大约在 300um 到 1000um 之间，大约在 300um 到 900um 之间，大约在 400um 到 800um 之间，以及大约在 400um 到 600um 之间。

[0047] 【0043】对于本公开的目的，“压缩力 (compression forces)”通常地指能使物质原子紧凑的轴向方向应用的力。压缩力，如这里被使用的，发生在制丸过程和压片过程中，并且，当所施加的力相对于该材料的纵向轴不是完全对称的情况下，可能包括弯曲应力的因素的，。

[0048] 【0044】“内在热稳定酶或蛋白质 (inherently thermostable enzyme or protein)”指具有熔点温度在大约 60°C 之上到大约 65°C 的酶和蛋白质。例如，在表 2 中颗粒 28、29、和 30 中被使用的内在热稳定酶，其在 pH 为 5.5 时的熔点为 69°C，pH 为 8.0 时

的熔点为 72℃。在整个申请文件中所提及的许多热稳定酶具有,例如,在 pH 值为 5.5 和 8.0 时,熔点小于 60℃。

[0049] **【0045】**“潮气阻挡材料(水分屏障材料,moisture barrier materials)”所指材料排除、阻止、或实质上阻碍水气进入。典型地,这些材料是疏水的或两亲的,提供对水的绝缘并且内在地不吸收和/或结合水,以及包括,并不限于成膜材料。潮气阻挡材料的实例包括:聚合物,蛋白质,脂质,脂肪和油,脂肪酸以及橡胶。成膜潮气阻挡材料的实例是天然的和改性的聚合物,例如,阿拉伯橡胶,乳清,乳清蛋白质浓缩物,PVA,包括改性 PVA 和合成聚合物,例如,乳胶,HPMC 和酸解羟丙基淀粉,例如,PureCote™,氧化淀粉,和改性淀粉。非-成膜潮气阻挡材料包括,例如,蜡,脂肪,油和脂质,和卵磷脂。不容易氧化的精选潮气阻挡材料为,例如,乳胶聚合物和乳胶多种聚合物,例如阿拉伯橡胶。

[0050] **【0046】**“潮气吸收材料(水分水合材料,moisture hydrating materials)”是指通过一种或几种机理吸收含水液体——例如,水——的材料。在第一个机理中,材料吸收自由水。在第二个机理中,材料吸收结合水,结合水一般以水合作用的晶态水存在。因此,材料可以以部分地或完全地水合材料被提供,或以未-水合材料被提供,这种未-水合材料将吸收或结合含水液体,并阻止或降低这种液体向活性剂迁移的速率或程度。在第三个机理中,通过阻止热量传递给颗粒中的活性剂和通过保持活性剂在比颗粒外表面温度更低的温度下的方式,潮气吸收材料使活性剂热力地绝缘。潮气吸收材料包括碳水化合物和无机盐,包括水合盐,例如,硫酸镁,硫酸钠,和硫酸铝;麦芽糖糊精;糖,例如,蔗糖;和玉米淀粉。

[0051] **【0047】**在本发明的示例性实施方式中,潮气吸收材料是无机盐,当无机盐以多于大约 25% w/w 被加入到颗粒中时,潮气吸收材料是无水的或含有相对低数量的结合水或自由水,因此全部颗粒的水活性少于 0.5。没有希望能够被任何具体理论所束缚,当颗粒经历蒸汽-加热过程时,无机盐潮气吸收材料将开始从蒸汽-加热处理中吸收水,水分以动力过程经过蒸汽-处理的短暂时间进入潮气吸收材料,以防止水分渗透进入载有活性剂的颗粒区域。在颗粒的水分活性小于 0.5 的这些实施方式中,潮气吸收材料可以少到占颗粒的 25% w/w。在潮气吸收材料占颗粒的大约 40-70% w/w 的实施方式中,潮气吸收材料的比较厚的层允许使用水合或部分水合材料,特别是无机盐。对于本公开的目的,“水合的(hydrated)”,“部分水合的(partially hydrated)”,“不水合的(non-hydrated)”指在颗粒经历蒸汽-加热之前平衡时物质的水合潜能。“水合”材料指包含以自由或束缚方式存在的水的材料,或它们的组合物。水可以在包衣过程之中或包衣过程之后被加入,并且颗粒的水合程度是颗粒材料和它所接受的温度、湿度和干燥条件的函数。

[0052] **【0048】**“微丸(Pellets)”和“微丸化(Pelleting)”指固体圆形的、球形的、和圆柱形的片剂或微丸,以及形成这样固体形状的过程,特别饲料微丸和固体的、挤压的动物饲料。众所周知的饲料微丸化生产过程一般包括混合饲料成分在一起达到大约 1 到大约 5 分钟,将混合物移入缓冲仓,将混合物传送入蒸汽调理器,任选地将蒸汽调理的混合物移入膨化器,将混合物转移入微丸压榨机或挤压机,最后将微丸移入微丸冷却机。Fairfield, D. 1994. Chapter 10, Pelleting Cost Center. 在 FeedManufacturing Technology IV. (McElhiney, 编者), American Feed Industry Association, Arlington, VA, pp 110-139 中。

[0053] **【0049】**蒸汽调理器在大约 85℃ 到大约 95℃ 时,将混合物处理大约 20 到大约 90

秒,直到几分钟。蒸汽的数量随湿度的数量和饲料混合物质的初始温度而变化。在微丸化过程中,大约 4%到 6%被加入蒸汽被报道,并且在微丸化过程之前选择该数量,以便在饲料浆中产生少于 18%的潮气数量,或在预计用于的挤压过程的饲料浆中产生直到大约 28%的潮气数量。

[0054] **【0050】**在大约 100°C到大约 140°C温度范围,可选择的膨化器过程发生持续大约 4到大约 10 秒钟。生产过程的微丸压榨部分在大约 85°C到大约 95°C的温度时,典型地运行大约 3 到大约 5 秒钟。

[0055] **【0051】**“稳定的”颗粒指当颗粒作为制剂中的成分,此制剂经历蒸汽加热预处理过程、蒸汽加热微丸化过程、蒸汽加热压片过程、单独储存后以及在未微丸化和未片化混合物中作为成分而储存之后,活性剂的活性实质上予以保持的颗粒。当含有活性剂的颗粒在未微丸化或未片化混合物中储存和 / 或经历蒸汽加热和加压的微丸化过程和压片过程时,稳定性包括:热稳定性,货架寿命或储藏稳定性,机械稳定性,和 / 或化学稳定性。机械稳定性指颗粒的物理强度或结构完整性,结构完整性包括对微生物的抵抗性,对灰尘产生的抗性和可能导致气味产生的成分的释放的抗性。化学稳定性指当颗粒与对活性剂有害的成分在未微丸化和未片化混合物中被储存时,活性的实质上保持。这里热稳定性被进一步限定,并且一般指当稳定、持久颗粒是微丸、片剂以及未微丸化和未片化混合物的成分时,在暴露给直到大约 85°C到 95°C的温度之后,保持活性。

[0056] **【0052】**“片化过程 (Tableting)”指通过在压片机上压缩混合的成份而形成固体小块或片剂的过程,压片机在 EP1257631B1 中被描述,在此引用,以作参考。

[0057] **【0053】**片剂可以通过直接压缩成片——活性剂,填料 / 粘结剂,润滑剂,和任何其他可选择成分组成的混合物——的压片过程而被制备。活性剂成分——在进入压片机器之前,与其它片剂成分充分混合。成分在任何适合混合的装置中,例如,双筒混合机或类似装置,或使用能导致片剂成分混合的任何混合方法而被混合。

[0058] **【0054】**随后,使用任何压片装置,例如压片机 (Stokes Model R-4, Warminster, PA),混合物被压制成片剂。一般情况,压片机具有高和低形状 - 对应冲床,其可以从冲模的上面或下面插入冲模。混合的片剂材料被填充到冲模空穴中,并且至少一个冲床,典型地,为上面冲床,进入到冲模空穴。压力被用于上面和下面冲床。上和下面冲床互相移动的行为对冲床之间的材料使用压力,因此形成片剂。

[0059] **【0055】**广泛种类的片剂形状可以被制作。片剂形状由冲床的模具所决定。压紧力随冲床的几何形状、设备的类型、和所使用的配方而变化。作为可选择地,片剂可以使用干式或湿式粒化过程被制备,此过程在 U. S. Pat. No. 6, 852, 336 中所描述,这里引入它的全部内容,以作参考。‘336 专利陈述到:当成分中的一种具有足够被制成片剂的粘着性质的情况下,干式粒化过程可以被使用。如果需要,这种方法用润滑剂混合这些成分。被描述的湿粒化过程用双筒混合机或双锥混合机,在剪切混合条件下,混合干的成分;然后,在混合的粉末中加入粘结溶液,以取得粒化。

[0060] **【0056】**“热稳定”颗粒指具有活性剂的颗粒,在颗粒被加入到制剂中之后,随后暴露到热量或热量和蒸汽中,这样以致制剂接触直到大约 85°C到大约 95°C的温度长达到几分钟,通过具体针对所选择的活性剂所使用的常规化验所测量,其保留至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、和至少 95%的活性。在本领域那些技术人员将认识

到,被暴露在小于 85°C 的温度的制剂中的热稳定颗粒是稳定的,并且在 80°C 所做的测试结果确立这是真实情况。因此,可以认为直到 85°C 到 95°C 意味着包含小于 85°C 的温度,这被包括在本发明的范围内。

【0061】 【0057】在一个实施方式中,“热稳定”指活性剂在被加入到制剂中之后,随后暴露到蒸汽中,这样以致制剂接触大约 85°C -95°C 的温度达到 30 秒,通过具体针对所选择的活性成分所使用的常规化验所进行的测量,其保留至少 80% 的活性。在另一个实施方式中,“热稳定”指活性剂在被加入到制剂中之后,随后暴露到蒸汽中,这样制剂接触达到大约 85°C -95°C 的温度达到 30 秒,通过具体对所选择的活性成分使用常规方法所测量,其保留至少 50% 的活性。

【0062】 【0058】“未微丸化混合物 (Unpelleted mixtures)”指预混和物或先驱物,基础混合物,粉料,和稀释剂。典型地,预混和物包括维他命和微量矿物质。典型地,基础混合物包括食品和饲料成分,例如,磷酸二钙,石灰石,盐和维生素和矿物质的前混合物,但没有谷物和蛋白质成分。稀释剂包括,但不限于谷物(例如粗小麦粉和米糠)和粘土,例如页硅酸盐(硅酸镁海泡石,膨润土,高岭土,蒙脱土,汉克特石,皂石,贝得石,绿坡缕石,和硅镁石)。粘土还具有作为载体和液化试剂,或针对饲料前混合物而言,作为稀释剂的功能。麦芽浆典型地包括完全动物食物。

【0063】 【0059】本发明的稳定颗粒可以被加入到这些未微丸化混合物,和粉料混合物中,其随后可以用蒸汽和 / 或蒸汽微丸化、或干燥处理。

【0064】 【0060】“水活性 (water activity)”,以 a_w 进行符号表征,指与固相或液相材料相平衡的大气中的部分相对湿度;即,在相同温度下,水蒸汽的分压相对于纯水之上存在的压强的比率。在所有相中水分配达到平衡,可以定义是相等的。术语“相对湿度 (relative humidity)”一般用于描述大气中的水分或与固体平衡的气相,以及被表示为百分数,用 100% 作为在密闭系统中纯水的相对湿度。因此,对于任何水活性值,相应的相对湿度用 $\% RH = 100 * a_w$ 给出。水活性可以通过本领域熟知的方法被测量,典型地通过在水活度计的温度控制室中放置材料的样品,例如水活度系统模型 D2100,可以从 Rotronic Instrument Corp. (Huntington, N. Y.) 获得,并且允许达到平衡的测量值在显示器上显示。这里所指的水活性,是在应用所有的包衣后颗粒自身的水活性。

【0065】 【0061】对于本发明颗粒,尤其当聚合物外围包衣被使用时,优选的水活性是小于 0.5。

【0066】 【0062】本发明的稳定、持久颗粒是可以通过任何方法制备的颗粒,该方法能够导致一个或更多保护包衣应用到核上。活性剂可以是颗粒的核的成分,或可以被包衣到核材料之上,并且对于本公开的目的,核指持久颗粒的所有成分,除了应用于颗粒之核的任何保护包衣而外。

【0067】 【0063】核可以通过本领域熟知的任何方法而被制备,例如,粒化过程、挤出过程、锅包衣、滚圆过程、转鼓造粒过程、高剪切结块、流化床喷涂包衣、结晶过程、沉淀过程、和促使固体物变成颗粒过程。在本领域,这些方法众所周知;并被描述在美国专利号 (U. S. Pat. No.) 4,689,297 和美国专利号 5,324,649 (流化床工艺过程);EP656058B1 和美国专利号 454332 (挤出过程);美国专利号 6,248,706 (粒化过程,高剪切过程);和 EP804532B1 和美国专利号 6,534466 (使用流化床、核与混合包衣的结合过程),引入这些的所有公开内容

的全部,以作参考。

[0068] **【0064】**本发明的保护性包衣可以应用于如上面陈述中所描述的粒化过程、挤出过程、流化床和使固体变成颗粒过程里。此外,保护性包衣可以通过浇铸方法被应用,包括旋转圆盘浇铸方法,正如在 W003/000625 中被描述的,其在此被引用它的全部内容,以作参考。

[0069] **【0065】**另外,在一个实施方式中,该方法可能包括热退火步骤,其中加热颗粒到潮气隔离成分的玻璃转化温度(glass transition temperature(Tg))之上,并且随后逐级降低温度,从而使隔离材料变硬,或变成玻璃状的。

[0070] 核(CORES)

[0071] **【0066】**核是颗粒的内部核,并且正如上面陈述的一样,可以包括活性成分,或者活性成分可以被包覆在核材料周围。适合用于本发明的核优选地是可以水合的或多孔的材料(即,可以分散或溶解在水中的物质),该可以水合的或多孔的材料是饲料级物质。核材料应该分散在水中(当被水合时,崩解)或通过进入真正的水溶液中而在水中加解。粘土(例如,页硅酸盐斑脱土,高岭土,蒙脱土,汉克特石,皂石,贝得石,绿坡缕石,和硅镁石,硅酸盐,例如沙子(硅酸钠),粘有糖粒的小糖丸(nonpareils)和结块的马铃薯淀粉或面粉,或其他淀粉颗粒资源——例如小麦和玉米芯粉颗粒(corn cobs),被认为是可以分散的。粘有糖粒的小丸是包含种子晶体的球状微粒,在旋转球体容器中通过粘结粉末层和种子晶体的溶质,种子晶体被建立并且发展为球形形状。粘有糖粒的小糖丸典型地可以从糖——例如蔗糖,和粉末——例如谷物淀粉的组合物制备。在本发明的一个实施方式中,核是氯化钠或硫酸钠晶体,有时也称作种子,或者是其他无机盐晶体。本发明的另一个实施方式中,核是蔗糖晶体。

[0072] **【0067】**包括无机盐和/或糖和/或小有机分子的微粒,可以被用作本发明的核。结合进入核中的适宜的水溶解成份,包括:无机盐,例如氯化钠、硫酸铵、硫酸钠、硫酸镁、硫酸锌;或尿素,柠檬酸,糖——例如蔗糖、乳糖和类似物。

[0073] **【0068】**本发明的核可以进一步包括下面的一个或多个:活性剂,饲料或食物级聚合物,填料,增塑剂,纤维材料,增量剂,和其他被用在核中的已知化合物。适合聚合物包括:聚乙烯醇(polyvinyl alcohol(PVA)),聚乙二醇,聚环氧乙烷,聚乙烯基吡咯烷,和碳水化合物聚合物(例如淀粉,直链淀粉,支链淀粉, α 和 β -葡聚糖,果胶,糖原),包括它们的混合物和衍生物。

[0074] **【0069】**在实例中所使用的核包括糖晶体、无机盐晶体、谷物圆块核、粘土和硅酸盐。

[0075] **【0070】**在核中有用的适合填料包括惰性物质,其被大量加入而降低费用,或被用于在成品颗粒中调节预定酶活性的目的。这样的填料实例包括,但不限于:水溶解试剂,例如盐,糖;和水分散试剂,例如粘土,云母,硅酸盐,纤维素和淀粉;以及纤维素和淀粉衍生物。

[0076] **【0071】**用于本发明核的适合的增塑剂是低分子量的有机化合物,并且是高度特异于欲被增塑的聚合物。实例包括,但不限于,糖(例如,葡萄糖、果糖、和蔗糖),糖醇(例如,山梨(糖)醇、木糖醇、麦芽糖醇和其他二元醇),极性低分子量有机化合物——例如尿素,或其他已知的增塑剂——例如水或饲料级增塑剂。

[0077] 【0072】在本发明的核中有用的合适纤维材料包括,但不限于:纤维素,和纤维素衍生物,例如 HPMC(hydroxy-propyl-methyl cellulose(羟基-丙基-甲基纤维素)), CMC(carboxy-methyl cellulose(羧基-甲基纤维素)), HEC(hydroxy-ethyl cellulose(羟基-乙基纤维素))。

[0078] 【0073】在本发明一个实施方式中,特别地,对于饲料应用,核是水溶性的或水可分散的谷物圆块物质或糖或盐晶体。在另一个实施方式中,尤其适合于家居清洁用品应用,核是水溶性或分散型的糖或盐晶体或蔗糖小丸(non pareil)。

[0079] 【0074】本领域的技术人员将认识到,对于饲料和食品应用,核(和任何聚合物、填料、增塑剂、纤维物质、和增量剂)对于食品和/或饲料应用是可接受的。对于家居清洁用品应用,不需要应用这样的限制。

[0080] 【0075】本发明颗粒的核——包括其中具有活性成分的任何包衣,并且排除下面描述的保护性包衣——优选地占持久颗粒的少于大约 70%,少于大约 60%,少于大约 50%,少于大约 40%,少于大约 30%,少于大约 20% w/w。

[0081] 活性剂(ACTIVE AGENT)

[0082] 【0076】活性剂或多种试剂,尤其是上面讨论的酶,是可以从发酵液中取得的并且可以是整个发酵液、裂解液、或是从发酵过程中回收的经过澄清的发酵液。从发酵液中利用回收过程所获得的酶,可以是液体、浆液、干燥的、冻干的、或晶体形式。可选择地,酶与增塑剂——例如碳氢化合物,和聚合物——例如改性的或天然淀粉混和在一起,以形成基质。增塑剂的非限制性名单包括:糖——葡萄糖、果糖、和蔗糖,糊精, PVA, 和糖醇,例如,山梨(糖)醇,木糖醇,麦芽糖醇,或上面列出的增塑剂的任何一种。改性淀粉包括,但不限于:谷物淀粉和酸解羟丙基淀粉,例如, PureCote®,和氧化淀粉。可选择地,活性剂可以被加入到核中,或被加入到核和包围核的层二者中。

[0083] 保护性包衣(PROTECTIVE COATINGS)

[0084] 【0077】当活性剂不是内在热稳定的时候,本发明的保护性包衣一般作为一个或多个围绕核的层被应用。实施方式包括一个、二个、三个、或四个保护性包衣层。

[0085] 【0078】适合的保护包衣材料包括聚合物,碳氢化合物,蛋白质,脂质,脂肪和油,脂肪酸,无机盐,以及胶,和它们的混合物。

[0086] 【0079】保护包衣包括潮气隔离包衣(水分屏障包衣,moisture barriercoatings)和潮气吸收包衣(水分水合包衣,moisture hydrating coatings)。潮气隔离包衣通过排出潮气,例如通过形成壳层(shell layer)而起作用,其中壳层典型地不吸收潮气并且阻止或延缓潮气迁移进入颗粒的速率。颗粒上的潮气吸收包衣或者以自由水或者以水合作用水方式吸收或结合潮气,因此发挥作用,从而阻止或延缓外界潮气传送入颗粒的程度或速率。潮气吸收包衣典型地占颗粒的至少大约 35% W/W。存在于包衣中的潮气吸收材料使活性剂热力地绝缘,并且将吸收一定数量的潮气并且将潮气保留在吸收材料中,而不允许它穿过并进入具有活性剂的颗粒部分。对于在稳定、持久颗粒上的潮气吸收包衣,其在蒸汽处理之前不含有可观的水,这样的包衣可以占颗粒的大约 25% W/W。

[0087] 【0080】潮气隔离包衣典型地包括疏水材料,例如疏水聚合物,例如, PVA, HPMC, 酸解羟丙基淀粉和氧化淀粉;蛋白质,例如乳清和乳清蛋白质浓缩物;脂质,例如,卵磷脂;脂肪和油,脂肪酸,乳胶和树胶,例如,阿拉伯树胶。当本发明的颗粒被储存在未成微丸或未成

片剂混合物中,例如,在含有氯化胆碱的预混合物中,一些潮气隔离包衣,例如 PVA 和阿拉伯树胶,不是容易被氧化的,并且在提供化学稳定性方面发现了特别的可以应用性。典型地,潮气吸收包衣是亲水物质,例如碳水化合物和无机盐,包括水合盐。潮气吸收物质的实例是硫酸镁,硫酸钠,麦芽糊精,硫酸铵,糖,例如,蔗糖,以及天然谷物淀粉。

[0088] 【0081】用于保护性包衣的聚合物是聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol (PVA)), 聚乙二醇, 聚乙烯基吡咯烷酮, 聚丙烯酸酯, 聚环氧乙烷 (polyethyleneoxides (PEO)), 聚乳酸, 聚氯乙烯, 聚醋酸乙烯酯, 聚乙烯基吡咯烷酮类 (polyvinyl pyrrolidones (PVP)), 纤维素醚, 藻酸盐, 白明胶, 改性淀粉和它们的取代衍生物、水解产物、和共聚物, 例如, 酸解羟丙基淀粉, 例如, **PureCote®**, 羟基 - 丙基 - 甲基纤维素 (HPMC), 甲基纤维素 (methyl cellulose (MC)), 羧基 - 甲基纤维素 (CMC), 和乙基纤维素。用于保护性包衣的最优选聚合物是 PVA, 改性 PVA, 正如在美国专利 6, 872, 696 被描述的, 和改性维生素, 例如甲基维生素和羟基丙基甲基纤维素, 其在 PCT 出版物第 WO 99/51210 号中被描述, 这二个文件在这里被引用, 以作参考。

[0089] 【0082】用于保护性包衣的碳水化合物是麦芽糊精, 羟甲基纤维素, 从玉米、高粱、竹芋、稻、小麦、黑麦、大麦、燕麦、马铃薯、山药、木薯粉 (tapioca)、木薯 (cassava)、西米制备的改性或天然的淀粉, 以及糖, 包括蔗糖, 玉米糖浆干粉, 糖蜜, 葡萄糖, 果糖和乳糖。

[0090] 【0083】用于保护性包衣的蛋白质是乳清粉, 乳清蛋白浓缩物, 乳清蛋白分离物, 酪蛋白酸盐, 大豆蛋白浓缩物和分离物, 玉米蛋白, 白蛋白和白明胶。

[0091] 【0084】可以在保护性包衣中被使用的简单的、化合的和衍生的脂质是蜡 (例如, 植物的, 矿物质的和合成的, 例如巴西棕榈、蜡大戟、蜂蜡、耳蜡、巴西蜡 (carnuba)、虫漆、石蜡、以及微晶蜡); 卵磷脂 (例如单酸甘油二酯和单甘油二酸酯); 脂肪酸 (例如硬脂酸的、棕榈酸的、亚油酸的、油酸的, 丁酸的, 和花生四烯酸脂肪酸, 以及它们的钠, 钾, 钙, 锌盐); 和脂肪和油 (例如氢化或部分氢化的脂肪和油, 例如大豆、玉米、棉籽、动物脂、卡诺拉油和亚麻籽油)。用于保护性包衣的优选脂质是卵磷脂。

[0092] 【0085】用于保护性包衣的无机盐包括硫酸盐, 柠檬酸盐, 氯化物, 碳酸盐, 亚硫酸盐, 磷酸盐, 膦酸盐, 和碳酸钠, 碳酸铵, 碳酸钾, 碳酸钙, 碳酸镁, 和碳酸锌盐。优选盐是硫酸镁, 硫酸钠和硫酸铵。

[0093] 【0086】被用于保护性包衣的树胶包括: 阿拉伯树胶, 瓜耳胶, 琼脂, 黄蓍胶, karyagum, 刺槐豆胶, 红藻胶, 黄原胶, 以及藻酸盐。

[0094] 【0087】本发明的保护性包衣进一步可以包括增塑剂, 滑润剂, 色素和粉末, 例如滑石, 斑脱土, 高岭土, 玉米淀粉, 硅酸镁, 碳酸钙和聚氨基葡萄糖 (chitosan)。

[0095] 【0088】本发明的一些实施方式典型地具有单层的潮气吸收材料, 其是颗粒的至少大约 55% w/w。因为潮气吸收材料吸收和隔离水分的能力是具有有限度的, 相对高水平的单一层包衣被应用。可以选择地, 潮气吸收材料 (多种材料) 可以以二层被应用。本发明的其他实施方式使用潮气吸收材料和潮气阻挡材料共同作为保护性包衣。在这些实施方式中, 潮气吸收材料的数量更低, 至少是颗粒含量的大约 25% w/w; 和潮气阻挡材料占颗粒含量的大约 2% 到 25% w/w。使用潮气吸收材料和潮气阻挡材料一同组成保护机制, 并且典型地降低了费用, 尤其是潮气阻挡材料的费用。如果这些材料以薄包衣方式被单独使用, 潮气阻挡材料, 则潮气阻挡材料, 尤其成膜材料可能经历机械损坏, 其可能导致对活性剂的保护

损失。这种组合允许比材料单独使用时所需要的更少材料。考虑到潮气吸收材料的存在，这种组合物允许对潮气阻挡材料的一些损坏。正如上面讨论的，当颗粒被存储在未微丸混合物中时，通过保持活性，材料的组合特别地适合提供化学稳定性。

[0096] 【0089】对于具有热退火工艺过程步骤的颗粒，潮气吸收材料的数量是可以被降低到颗粒的大约至少 20% w/w，因为融合的潮气隔离层已经提高了连续性并且更少遭遇机械损失。

[0097] 【0090】本发明的方法，除了所描述的用于稳定、持久颗粒的生产的方法，包括将颗粒与未微丸饲料混合物进行混合以及最终混合物的储存。其他的方法包括蒸汽 - 处理最终混合物和 / 或微丸化最终混合物。当然，本发明的稳定、持久颗粒，还可以根据希望，被单独地储存，以及与饲料混合，或被微丸化。

[0098] 【0091】下面的实施例并不意味被限定。

[0099] 实施例

[0100] 【0092】表 1 是在下面实施例中所使用的成分和缩写的列表。

[0101]

表 1

成分	名字 & 产品编号	供应商
蔗糖	Domino Pure Cane Extra Fine Granulated Sugar	Tate & Lyle American Sugars, Baltimore, MD
玉米淀粉	Corn Starch	Cargill Foods, Minneapolis, MN
MgSO ₄	Magnesium sulfate heptahydrate, MgSO ₄ ·7H ₂ O (Epsom salts)	PQ Corporation, Berwyn, PA
HPMC	Hydroxypropyl Methycellulose, 商标名字: METHOCEL	Dow Chemical
巴西棕榈蜡	Michem Lube 160HS (巴西棕榈乳状液, 50% 固体)	Michelman Inc. Cincinnati, OH
改性淀粉	PURE-COTE	Grain Processing Corporation, Muscatine, IA
卵磷脂	ULTRALEC P soy lecithin	ADM Corp., Decatur, IL
PVA	polyvinyl alcohol, Elvanol @51-05	DuPont, Wilmington, DE
硫酸钠	Sodium Sulfate Anhydrous	Cooper Natural, Tulsa, Oklahoma
硫酸铝	Ammonium Sulfate CAS#7783-20-2	General Alum & Chemical Corp. Searaport, Maine
滑石	NYTAL4000 TALC	RTVanderbilt Co, Inc. Norwalk, CT
乳清粉	PC42010	Leprino Foods, Denver CO
乳清蛋白质	Proliant insantized whey protein concentrate, #8010, lotH4212	HilmarCheese Company, Hilmar, CA (WPC 形式上通过 Proliant 销售)
亚麻子油	ASTM Raw Linseed Oil	Cargill Industrial Oils, Chicago, IL
麦芽糊精	Maltodextrin M150	Grain Processing Corp (GPC) Muscatine, IA
阿拉伯橡胶	TICPRETESTED Gun Arabic FT PreHydrated	TIC Gums, Belcamp, MD
芥花子油	Canola Oil	Safeway
乳胶	Aquacoat ECD (Ethylcellulose dispersion 30%)	FMC Biopolymer, Philadelphia, PA
沙子	Sodium silicate	Sigma-Aldrich Chemical Co.
玉米棒粉	Ground corn cobs or corn pith	ICBP Independence, IA

[0102] 【0093】表 2 示例了本发明的许多代表性的稳定、持久颗粒的组成,以及在具体的微丸化条件下,没有表现出至少 50%回收活性剂活性的几种颗粒的组成。

[0103] 表 2

[0104] 制剂 #1 *

[0105] 成分 % (w/w) 干基

[0106]

核材料	蔗糖 35-50 目	36.9
活性剂	酶 蔗糖 玉米淀粉	7.4 12.6 12.6
第一层包衣	蔗糖 玉米淀粉	10.5 10.5
第二层包衣	卡那巴蜡 (carnuaba wax)	6.0
第三层包衣	HPMC	3.5

[0107] * 热退火步骤

[0108] 制剂 #2

[0109]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	蔗糖 30-50 目	17.5
活性剂	酶	3.5
	蔗糖	6.0
	玉米淀粉	6.0
第一层包衣	MgSO ₄	67.0

[0110] 制剂 #3

[0111]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	硫酸钠	16.5

[0112]

活性剂	酶	4.8
	蔗糖	4.0
	玉米淀粉	8.0
第一层包衣	MgSO ₄	66.7

[0113] 制剂 #4

[0114]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	蔗糖 35-50 目	17.5
活性剂	酶	3.5
	蔗糖	4.0
	玉米淀粉	8.0
第一层包衣	麦芽糊精	67

[0115] 制剂 #5

[0116]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	硫酸钠	14.8
活性剂	酶	2.9
	蔗糖	3.3
	玉米淀粉	6.6
第一层包衣	MgSO ₄	55.6
第二层包衣	阿拉伯树胶	17.0

[0117] 制剂 #6

[0118]

		% (w/w) 干基

[0119]

	成分	
核材料	硫酸钠	14.8
活性剂	酶	2.9
	蔗糖	3.3
	玉米淀粉	6.6
第一层包衣	MgSO ₄	55.6
第二层包衣	乳清	16.7

[0120] 制剂 #7

[0121]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	硫酸钠	14.8
活性剂	酶	2.9
	蔗糖	3.3
	玉米淀粉	6.6
第一层包衣	MgSO ₄	55.6
第二层包衣	乳清蛋白质浓缩物	17.0

[0122] 制剂 #8

[0123]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	硫酸钠	13.4
活性剂	酶	2.6
	蔗糖	3.0
	玉米淀粉	6.0
第一层包衣	PureCote® 淀粉	15.0
第二层包衣	卵磷脂	10.0

[0124]

第三层包衣	MgSO ₄	50.0
-------	-------------------	------

[0125] 制剂 #9

[0126]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	硫酸钠	9.1
活性剂	酶	1.8
	蔗糖	2.0
	玉米淀粉	4.1
第一层包衣	MgSO ₄	83.0

[0127] 制剂 #10 (热不稳定的)

[0128]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	蔗糖 35-50 目	26.5
活性剂	酶	5.3
	蔗糖	9.1
	玉米淀粉	9.1
第一层包衣	卡那巴蜡 (carnuaba wax)	50

[0129] 制剂 #11

[0130]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	硫酸钠	10.7
活性剂	酶	2.1
	蔗糖	2.4
	玉米淀粉	4.8
第一层包衣	PVA	4
	滑石	36

[0131]

第二层包衣	MgSO ₄	40
-------	-------------------	----

[0132] 制剂 #12 (无保护包衣的测试颗粒)

[0133]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	蔗糖 35-50 目	53.1
活性剂	酶	10.6
	蔗糖	18.1
	玉米淀粉	18.1

[0134] 制剂 #13(热不稳定的)

[0135]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	蔗糖 35-50 目	44.2
活性剂	酶	8.9
	蔗糖	15.1
	玉米淀粉	15.1
第一层包衣	蔗糖&淀粉 (1: 1 比率)	16.7

[0136] 制剂 #14(热不稳定的)

[0137]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	蔗糖 35-50 目	48.3
活性剂第一层包衣	酶	9.7
	蔗糖	16.5
	玉米淀粉	16.5
第一层包衣	卡那巴蜡	9.1

[0138] 制剂 #15(热不稳定的)

[0139]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	蔗糖 35-50 目	49.6
活性剂	酶	9.9
	蔗糖	16.9
	玉米淀粉	16.9
第一层包衣	乙基纤维素	11.5

[0140] 制剂 #16 (热不稳定的)

[0141]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	蔗糖 35-50 网眼	48.3
活性剂第一层包衣	酶	9.7
	蔗糖	16.5
	玉米淀粉	16.5
第一层包衣	羟基丙基甲基纤维素	9.1

[0142] 制剂 #17

[0143]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	硫酸钠	10.7
活性剂第一层包衣	酶	2.1
	蔗糖	2.4
	玉米淀粉	4.8
第一层包衣	MgSO ₄	40

[0144]

第二层包衣	PVA 滑石	4 36
-------	-----------	---------

[0145] 制剂 #18

[0146]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	硫酸钠	13.4
活性剂	酶	2.6
	蔗糖	3.0
	玉米淀粉	6.0
第一层包衣	MgSO ₄	50.0
第二层包衣	卵磷脂	10.0
第三层包衣	PureCote®淀粉	15.0

[0147] 制剂 #19

[0148]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	硫酸钠	16.6
活性剂	酶	4.8
	蔗糖	4.0
	玉米淀粉	0.0
	滑石	8.0
第一层包衣	MgSO ₄	66.7

[0149] 制剂 #20

[0150]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	硫酸钠	14.8
活性剂	酶	2.9
	蔗糖	3.3
	玉米淀粉	6.6

[0151]

第一层包衣	阿拉伯树胶	17.0
第二层包衣	MgSO ₄	55.6

[0152] 制剂 #21 (热不稳定的)

[0153]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	蔗糖 35-50 目	51.9
活性剂	酶	10.4
	蔗糖	17.7
	玉米淀粉	17.7
第一层包衣	芥花籽油 (卡诺拉油 (canola oil))	2.2

[0154] 制剂 #22

[0155]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	研磨的玉米棒	17.5
活性剂	酶	3.5
	蔗糖	6.0
	玉米淀粉	6.0
第一层包衣	MgSO ₄	67

[0156] 制剂 #23

[0157]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	硫酸钠	31.1
活性剂	酶	2.4
	玉米淀粉	9.4
第一层包衣	MgSO ₄	43.7

[0158]

第二层包衣	阿拉伯树胶	3.4
	麦芽糊精	10.1

[0159] 制剂 #24 (热不稳定的)

[0160]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	硫酸钠	29.9
活性剂	酶	3.3
	玉米淀粉	9.3
第一层包衣	PureCote	12.0
第二层包衣	卵磷脂	8.0
第三层包衣	MgSO ₄	37.5

[0161] 制剂 #25 (热不稳定的)

[0162]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	硫酸钠	47.8
活性剂	酶	5.3
	玉米淀粉	14.9
第一层包衣	PureCote	19.2
第二层包衣	卵磷脂	12.8

[0163] 制剂 #26

[0164]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	硫酸钠	31.0
活性剂	酶	2.4
	玉米淀粉	9.4

[0165]

第一层包衣	硫酸钠	43.7
第二层包衣	阿拉伯树胶	13.5

[0166] 制剂 #27

[0167]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	硫酸钠	31.0
活性剂	酶	2.4
	玉米淀粉	9.4
第一层包衣	MgSO ₄	43.7
第二层包衣	乳清	13.5

[0168] 制剂 #28**

[0169]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	硫酸钠	32.7
活性剂#1	酶#1	9.1
	蔗糖	4.1
	玉米淀粉	8.5
活性剂#2**	酶#2	1.9
	蔗糖	0.9
	玉米淀粉	1.8
第一层包衣	硫酸钠	33.6
第二层包衣	PVA 51-05	2.5
	滑石	5.0

[0170] ** 内在热稳定酶

[0171] 制剂 #29**

[0172]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	硫酸钠	32.7
活性剂#1 和 活性剂#2 混 合	酶#1 和酶#2	10.9
	蔗糖	5.0
	玉米淀粉	10.3
第一层包衣	硫酸钠	33.6
第二层包衣	PVA 51-05	2.5
	滑石	5.0

[0173] ** 内在热稳定酶

[0174] 制剂 #30**

[0175]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	沙子	84.8
活性剂#1 和 活性剂#2 混 合	酶#1	3.52
	蔗糖	1.62
	全磨小麦	3.31
第一层包衣	硫酸钠	5.50
第二层包衣	PVA 51-05	0.42
	滑石	0.83

[0176] ** 内在热稳定酶

[0177] 制剂 #31

[0178]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	硫酸钠	40.0%
喷雾 1	酶	5.0%
	PVA	1.0%

[0179]

	玉米淀粉	5.0%
喷雾 2	硫酸钠	40.0%
喷雾 3	PVA	3.0%
	滑石	6.0%

[0180] 制剂 #32

[0181]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	硫酸钠	40.0%
喷雾 1	酶	5.0%
	玉米淀粉	9.0%
喷雾 2	硫酸钠	39.0%
喷雾 3	阿拉伯树胶	7.0%

[0182] 制剂 #33

[0183]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	硫酸钠	54.8
活性剂 (2)	混合酶	11.8
	蔗糖	5.4
	玉米淀粉	11.1
第一层包衣	硫酸钠	26.0
第二层包衣	PVA	2.5
	滑石	4.9

[0184] 制剂 #34

[0185]

	成分	% (w/w) 干基
核材料	硫酸钠	54.8

[0186] [0186]

活性剂 (2)	酶混合物	11.8
第一层包衣	硫酸钠	26.0
第二层包衣	PVA	2.5
	滑石	4.9

[0187]

实施例 1. 表 2 中的颗粒的制备

[0187] 【0094】表 2 中的所有颗粒,除了颗粒编号 1 外,都是使用美国专利 5,324,649 中所描述的流化床工艺而制备的颗粒。流化床工艺流化核材料,是在 Vector FL-1 处理器(由 VectorCorp, Marion, IA, USA 制造), Glatt 3 或 Uniglatt 处理器(二者都由 Glatt Air Techniques, Binzen, Germany 制造)中流化。酶/糖/淀粉混和物被喷涂包衣在核材料上。

随后,任何保护包衣被按顺序地喷涂在酶层之上,并且让其干燥。

[0188] 【0095】例如, #3 制剂颗粒由以下所述制备:

[0189] 【0096】在 Glatt 3 顶喷雾流化床涂布机中,筛分为 -45/+140 目的硫酸钠晶体被加入并利用加热床温度流化。来自里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 的木聚糖酶超滤浓缩物与玉米淀粉和蔗糖混合,并被喷涂在晶体之上。溶液为大约 33% 干固体。最终批重量为 4000 克。

[0190] 【0097】在 Vector FL-1 顶喷雾涂布机中,潮气吸收材料,硫酸镁溶液,被喷涂在上面描述的 833 克材料上面。床温度为 50°C。最终批重量是 2500 克。

[0191] 【0098】颗粒编号 1 的制备进一步包括热退火步骤,在热退火过程中,颗粒被加热到足够超过卡那巴蜡之玻璃转化温度 (T_g) 的温度,随后通过逐渐冷却产生硬化的、玻璃状的蜡层。

[0192] 实施例 2:带有颗粒的麦芽浆样品的制备和微丸化过程

[0193] 【0099】使用三种不同饲料制剂和微丸化方法,采用表 2 中列出的颗粒,进行微丸制备。相对高剂量的颗粒被加入到饲料制剂中,以优化活性剂保留活性测定法。

[0194] 碾磨 #1

[0195] 【0100】来自表 2 中的选定颗粒与饲料制剂混合在一起。饲料制剂的组成如下:

[0196] 75% (w/w) 玉米粉(富含黄色去胚玉米粉,编号 50956, General Mills Operation, Minneapolis, MN);和 25% (w/w) 豆粕(Pro Soybean meal, Cargill Oilseed Co., Cedar Rapids, IA)。

[0197] 12 千克的上述饲料混合物与每份样品颗粒(剂量为:5g/kg 饲料制剂)混合,并且在大型的 Hobart 混合机(型号 D-300T, Troy OH)中混合 8 分钟。每种样品的大约 150 克被留作麦芽浆样品,或未微丸饲料混合物。每批随后被分成三个 4 千克的子组,在三份重复的丸粒压制机运转批次中,被微丸化。

[0198] 【0101】使用的丸粒压制机是 CPM 型号 CL5(California Pellet Mill Co., Crawfordville, IN)。在蒸汽调理机中,温度由以 1.36 标准大气压(atm)所注入蒸汽的数量控制。浆液的调理温度,在进入丸粒压制机的模具之前被测定,目标指标是 89-90°C。使用温度计和“J”型热电偶(OMEGA Engineering, Inc. Stamford, CT)可以进行温度测量。在调理器中的停留时间大约为 5 秒钟。冲模尺寸为内径 12.7cm(厘米),外径 17.8cm(厘米),孔径 4.7mm(毫米)。丸粒压制机持续转动,样品有顺序地通过压制机被处理,以在样品之间运行大约 2kg(公斤)的玉米粉/大豆混合物而被分隔开。在测试浆液被加入调理器中大约 1 分钟之后,调理器温度稳定在目标温度,在 30 秒时间间隔上收集微丸,允许每种样品大约 1kg 的微丸被收集。收集的微丸被放置在工作条件下 30 秒,随后用空气冷却器冷却 2-3 分钟到室温。

[0199] 碾磨 #2

[0200] 【0102】来自表 2 中的已经制备好的持久颗粒,与谷物和大豆饲料制剂被制成微丸。饲料制剂的准确组成如下:61.2% (w/w) 玉米粉,31.6% (w/w) 豆粕,3.0% 肉骨粉,2.5% 豆油,1.3% 石灰石,0.28% 盐,和 0.08% 蛋氨酸。对于每种被测试的颗粒,取决于酶的类型和活性,370 克到 2000 克的颗粒与 450 公斤的无油饲料混合,并且在犁片混合机中搅拌掺混 2 分钟。随后大豆油被加入,并且样品被额外混合 3 分钟。丸粒压制机为 Master 型

号,由 California Pellet Mill 生产。冲模微丸孔径为 4.5mm。代表性的饲料速率为每小时 780kg。蒸汽调理器中的温度由手工控制,并且从调理器的饲料出口处进行测量。二个被使用的调理温度是 ;85℃和 95℃。在调理器中的停留时间为大约 30 秒。当达到目标温度时,在取样发生之前,系统运行大约 5 分钟。大约 5kg 的微丸饲料样品被制备,并通过铺在筛板之上而被冷却。

[0201] 碾磨 #3

[0202] 【0103】将制备的持久颗粒,与小麦和大豆饲料制剂,或与小麦和大麦制剂,一起被微丸化。饲料制剂的组成,或者为 60%小麦,31.5%大豆粉,4%大豆油,1.5%磷酸二钙,1.23%维生素矿物质预混合物,1.2%石灰石,0.4%盐,和 0.2% DL 蛋氨酸;或 60%小麦,30%大麦,以及二个被使用的调节温度是 :90℃和 95℃。对于每种受测试的颗粒,取决于酶类型和活性,将 200 到 500 克的颗粒与 160kg 的饲料混合,并且在水平式螺条混合器中搅拌大约 15 分钟。微丸压制机为 Simon Heesen,单辊型,其配备有 17.3cm 内径冲模,具有 3mm 的微丸孔径。冲模速度为 500rpm,被 7.5kW 马达驱动。典型的饲料速度为每小时 300kg。在蒸汽调理器中的温度保持在 +/-0.1 摄氏度,从调理器的饲料出口处测量。调理器具有阶式混合系统。被使用的三个调理温度为 85℃,90℃和 95℃。蒸汽入口压力为 2 个标准大气压 (atm),通过手工调节控制蒸汽运送的三个阀门来控制调理器中的温度。调理器中的停留时间为大约 30 秒。当达到目标温度时,在取样发生之前,系统运行大约 5 到 10 分钟。样品被取走,持续 1-1.5 分钟时间期间,相当于 5-7.5kg 的微丸化的饲料,并且立即被放入冷却箱中,冷却箱底部带孔,其每小时空气流量 1500 立方米。在冷却 15 分钟之后,样品被通过使用样品分样器被缩小二次,并且 1kg 被拿出,用于实验室测试。

[0203] 实施例 3 :酶活性测量

[0204] 酶活性的测定

[0205] 【0104】为测定微丸化之后酶的活性,浆液和微丸化样品随后被放入厨房咖啡研磨机 (型号 203-42, Krups North American Inc., Medford MA) 中被研磨 30 秒,并且如下面所描述分析酶的活性。替代性地,样品在配有 1mm 筛网的 ZM-200 离心式粉碎机中 (Retsch GmbH, Germany) 研磨。

[0206] 【0105】恢复活性的百分比计算

[0207] 对于每个试验样品,浆液和相应的微丸样品被测试活性。恢复的活性百分比由下面计算:

[0208]

$$\% \text{恢复活性} = \frac{\text{在微丸中的活性}}{\text{在浆液中的活性}} \times 100$$

[0209] 【0106】肌醇六磷酸酶化验根据 AOAC (Association of Analytical Chemists) (分析化学家学会) 官方方法 2000.12 被测定,正如在“Determination of phytase activity in feed by a colorimetric enzymatic method: collaborative interlaboratory study” (“通过酶比色法:合作实验室间研究饲料中肌醇六磷酸酶活性的确定”) 中所描述的。Engelen AJ, van der Heeft FC, Randsdorp PH, Somers WA, Schaefer J, van der Vat B.J. J AOAC Int. 2001 May-Jun ;84(3) :629-33。简短地来说,研磨样品在 220mM 三水醋酸钠,68.4mM 二水氯化钙,0.01% Tween 20, pH 为 5.5 中被萃取。随后,上清液被测试分析。

在 pH 5.5, 37°C 下, 测试持续 60 分钟, 该测试从水稻植酸中测量无机磷酸盐的释放。测试用酸性钒酸 / 钒酸试剂终止, 磷酸盐由钒钼磷 (vanadomolybdophosphor) 的黄色显色复合物的强度量化。

[0210] 【0107】木聚糖酶试验使用木聚糖酶试剂盒 (Xylanase Assay Kit) 进行 (Xylazyme AX Format), Cat No :K-XYLS Megazyme International Ireland Ltd., Wicklow, Ireland。用于试验的材料包括 16×125mm 可抛弃的玻璃培养试管 ; 萃取缓冲液 : pH 为 6.0 的 100mM MES 钠盐缓冲液 ; 试验缓冲液 : pH 为 6.0 的 25mM 磷酸钠缓冲液 ; 终止溶液 : 处于 1 升 MilliQ 水中的 20 克 NaPO₄12H₂O ; 聚苯乙烯细胞培养瓶, 225ml (Corning Incorporated-life Sciences Big Flats, New York)。在 20–25°C 下, 在培养瓶里, 6–12 克的研磨饲料在 120ml 的萃取缓冲剂中被萃取 1 小时, 同时在设置于 100rpm 的轨道胶体搅拌器上进行摇动。样品随后以 2000g 被离心 1 分钟, 并且上清液被试验分析。对于这个试验, 使用试验缓冲液, 将 20 到 100 μl 的饲料上清液在培养管中被稀释到 500 μl, 并且在 40°C 的水浴中平衡 10 分钟。随后, 一个酶底物片剂被放入每个培养管, 样品在 40°C 下额外温育 10 分钟。10ml 的终止溶液随后被加入到每个试管。样品被短暂地涡旋, 随后通过 Whatman#1 滤纸过滤。滤出液的吸收率通过分光光度计阅读, 波长为 590nm。分光光度计最初用空白调设为零, 空白由组合 20 到 100 μl 的饲料上清液、500 μl 的试验缓冲液、和 10ml 的终止溶液制备。然后加入一个酶底物片剂, 随后, 用与样品相同的方式进行漩涡和过滤。从一些饲料成分而来的干扰可以影响试验结果。为了纠正任何干扰, 饲料背景的标准曲线被制备。未包衣的木聚糖酶颗粒, 以几种水平被加入到空白浆液中, 以及加入到空白微丸中。随后, 加上颗粒的浆液和微丸样品被研磨, 并且如上面所描述的, 进行准确地萃取。从这个系列萃取中, 生成对于浆液和微丸的标准曲线。

[0211] 【0108】使用 β-葡聚糖酶试验试剂盒 (Beta-Glucazyme Tablet format), CatNo : T-BGZ2000, Megazyme International Ireland Ltd. Wicklow, Ireland, 进行 β-葡聚糖酶试验。用于试验的材料包括 16×125mm 一次性玻璃培养管 ; 萃取缓冲液和实验缓冲液 : 25mM 醋酸钠缓冲液 ; 终止溶液 : 在 1 升 MilliQ 水中的 2% NaPO₄12H₂O 溶液 ; 140ml 玻璃烧杯。在 100ml 的萃取缓冲液中, 在 20–25°C 下, 通过在烧杯中搅拌 1 小时, 10g 研磨饲料被萃取。样品随后以 2000 克被离心 1 分钟, 并且上清液被试验。对于该测试, 20 到 100 μl 的饲料上清液被使用试验缓冲液在培养管中稀释到 500 μl, 并且在 40°C 的水浴平衡 10 分钟。随后, 一个酶底物片剂被放入每个培养管, 样品在 40°C 额外温育 10 分钟。随后, 10ml 的终止溶液被加入到每个试管。样品被短暂地涡旋, 随后通过 Whatman#1 滤纸过滤。滤出液的吸光值, 通过分光光度计阅读, 波长在 590nm 下。分光光度计最初用空白调整为零, 空白是由组合 20 到 100 μl 的饲料上清液、500 μl 的试验缓冲液、和 10ml 的终止溶液而制备。随后, 一个酶底物片剂被加入, 跟着的是与样品相同方式的漩涡和过滤。通过在试验缓冲液中测试一系列稀释到合适水平酶的测试过程, 制作标准曲线。

[0212] 留存的酶活性结果

[0213] 表 3 : 微丸化结果 - 微丸化之后恢复活性百分比

[0214] 制剂 压制机 #1, 90°C 在 85°C -95°C, 压制机 #2, 3, 或 4

[0215] 10 < 30% 木聚糖酶

[0216] 12 < 30% 木聚糖酶

[0217]	13	< 30%木聚糖酶	
[0218]	14	< 30%木聚糖酶	
[0219]	15	< 30%木聚糖酶	
[0220]	16	< 30%木聚糖酶	
[0221]	21	< 30%木聚糖酶	
[0222]	25	< 30%木聚糖酶	
[0223]	1	> 50%木聚糖酶	
[0224]	2	> 50%木聚糖酶	
[0225]	3	> 70%木聚糖酶	> 70%木聚糖酶
[0226]	5	> 50%木聚糖酶	> 50%木聚糖酶, > 80%大肠杆菌肌醇六磷酸酶
[0227]			
[0228]	6	> 50%木聚糖酶	
[0229]	7	> 50%木聚糖酶	
[0230]	9	> 50%木聚糖酶	
[0231]			> 50%木聚糖酶, > 70%曲霉菌肌醇六磷酸酶
[0232]	11		
[0233]	30		> 60%热稳定木聚糖酶
[0234]	22	> 50%木聚糖酶	
[0235]	23	> 60%大肠杆菌肌醇六磷酸酶	> 50%木聚糖酶, > 80%大肠杆菌肌醇六磷酸酶
[0236]			
[0237]	27	> 50%木聚糖酶	> 80%大肠杆菌肌醇六磷酸酶
[0238]	33		> 90% BGL, > 70%热稳定木聚糖酶
[0239]	4	> 70%木聚糖酶	
[0240]	8	> 70%木聚糖酶	
[0241]	17	> 70%木聚糖酶	
[0242]	18	> 70%木聚糖酶	
[0243]	19	> 70%木聚糖酶	
[0244]	20	> 70%木聚糖酶	
[0245]	26	> 70%木聚糖酶	> 90%曲霉菌肌醇六磷酸酶
[0246]	28		> 90% BGL, > 90%热稳定木聚糖酶
[0247]	29		> 70% BGL, > 70%热稳定木聚糖酶
[0248]	31		> 90%曲霉菌肌醇六磷酸酶
[0249]	32		> 90%曲霉菌肌醇六磷酸酶

[0250] 所使用的微丸压制机被分为二组。碾磨 #1 (Mill#1) 是实验室等级的压制机, 其比在商业实践中典型遇见的压制机要更为更加严酷。严酷性归因于大量的蒸汽, 其被传递给相对小的浆液部分, 这与饲料混合物不含有油的事实相配合, 当蒸汽穿过冲模时, 这典型地润滑了饲料。压制机 #2 到 #4 被认为更加代表商业条件。

[0251] 【0109】被测试颗粒的留存活性在表 3 中显示。在本发明中, 不被认为是稳定、持久颗粒的是编号 10、12、13、14、15、16、21 和 25, 所有这些颗粒证明少于 30% 的恢复活性。

这些颗粒含有酶基质层所包覆的核,其中包衣核更大,其大约占整个核的 50w/w%。大部分这些不稳定颗粒仅仅具有一层潮气阻挡材料保护包衣,例如巴西棕榈蜡,或乙基纤维素,或 HPMC,或卡诺拉油。不希望被任何特定的理论所束缚,并且认识到这些颗粒在 70-85°C 时可以显示出大于 50% 的存留活性剂活性,在这些测试条件下,相对于稳定、持久颗粒,这些颗粒的弱热稳定性可能由于包衣材料作为相对薄层的供应,在五个实例中,包衣材料占颗粒的大约 2.0 到大约 17.0% w/w,和 / 或应用特定的包衣试剂。例如,颗粒编号 10 具有占 50w/w% 的潮气阻挡材料(巴西棕榈蜡)的单层包衣材料;和颗粒编号 25 具有二层潮气隔离保护包衣,其共同占颗粒的 32% w/w。

[0252] 【0110】本发明的特别稳定、持久颗粒是编号 4、8、17、18、19、20、26、28、29、31 和 32,所有这些颗粒,当在大约 90°C 下被微丸化大约 5 秒钟时,具有超过 70% 的恢复木聚糖酶活性。此外,颗粒 26、31 和 32 证实在大约 85°C 和 95°C 之间被微丸化大约 30 秒钟,具有超过 90% 恢复肌醇六磷酸酶活性。颗粒 28 和 29 被证实:当在大约 85°C 和 95°C 之间被微丸化大约 30 秒钟时,在酶混合物中的一种内在热稳定木聚糖酶具有超出 90% 存留活性;以及一种热不稳定的 β -葡聚糖酶具有超出 70% -90% 存留活性。那些具有不是内在热稳定的活性剂的稳定、持久颗粒是以下二种情况之一,或者;1) 涂布有单个、厚的潮气吸收材料保护层,或 2) 用二层到三层的保护层涂布,其中至少一层为潮气吸收材料并且一层为潮气阻挡材料。

[0253] 【0111】一般地,当潮气吸收材料以单个层被应用时,包衣必须至少占颗粒的大约 55%,以提供适合的热保护;并且,在使用单一层时,当潮气吸收材料的数量低到少于 55% 时,则存留活性的百分数降到小于 50%。但是,当潮气吸收材料与潮气阻挡材料合并使用时,潮气吸收保护层可以低到颗粒的至少大约 25% W/W,而潮气阻挡材料可以是颗粒的大约 2% 到 40% W/W。

[0254] 【0112】本发明的其他稳定,持久颗粒是数字 1,2,3,5,6,7,9,11,22,23,27,30 和 33,所有这些证实在大约 90°C 被微丸化大约 5 秒钟,或在大约 85°C 和 95°C 之间被微丸化大约 30 秒钟,具有超过 50% 恢复肌醇六磷酸酶或木聚糖酶活性。正如从这些结果可以看出,无机盐外部或内部包衣单独提供对酶的优良保护并且当与潮气隔离包衣合并时增强保护。如先前陈述,颗粒数字 1 使用热退火步骤被制备,因此确信热退火步骤地加入增强潮气阻挡材料的隔离性质,例如,聚合物,蛋白质,和脂质,因此减少了需要提供热稳定性的潮气吸收材料的数量。当与颗粒 #1 相同的其他颗粒没有通过热退火被制备,恢复活性是 35%。颗粒 2,3,和 22 显示不包含颗粒稳定性的不同的核材料可以被使用。

[0255] 【0113】颗粒 3 证实了在 5 秒和 30 秒的微丸化(粒化)时间段,70% 以上的恢复酶活性。颗粒 11 证实了在当 85°C 至 95°C 之间微丸化大约 30 秒钟时,50% 以上的恢复木聚糖酶活性,和当在 85°C 至 95°C 之间被微丸化大约 30 秒钟时,70% 以上的恢复肌醇六磷酸酶活性。颗粒 #23 证实了在 90°C 被微丸化大约 5 秒钟,具有 60% 以上的恢复肌醇六磷酸酶活性,和当在 85°C 至 95°C 之间被微丸化 30 秒钟,具有超过 50% 恢复木聚糖酶活性;和当在 85°C 至 95°C 之间被微丸化 30 秒钟时,具有超过 80% 的恢复肌醇六磷酸酶活性。

[0256] 实施例 4:直接蒸汽测试

[0257] 【0114】包含 75% 玉米粉和 25% 大豆的 100 克粉料部分,以 1 千克浆液配 1.25 克颗粒的混入比率,加入颗粒,该颗粒含有大肠杆菌(E. coli)肌醇六磷酸酶。浆液样品随后

被包裹在奶酪布包中,通过将布包放入漏斗,并向漏斗底部施用 30psi 蒸汽,蒸 20 秒。蒸完之后,样品被冷却直到环境温度,被干燥过夜,随后测试肌醇六磷酸酶活性。相对于未加热浆液,报告蒸汽样品的恢复活性的百分数。

[0258] 【0115】在这些测试条件下,不被认为适合抗蒸汽的颗粒是第 25 号颗粒,其在蒸汽之后含有少于 35% 恢复活性。本发明的稳定,持久颗粒是颗粒 #5 和颗粒 #23,其在蒸汽之后具有 50% 以上的恢复活性。

[0259] 实施例 5:微丸化颗粒的生物利用率测试

[0260] 【0116】使用众所周知的生物利用率测试方法,本发明的稳定、持久颗粒可以被测试活性剂酶的生物利用率,生物利用率测试,例如在 W000/47060 中公开的肌醇六磷酸酶生物利用率研究;在 *Enzymes in Animal Nutrition, Proceedings of the 1st Symposium, Kartause Ittingen, Switzerland, October 13016, 1993* 中描述的生物利用率测试;在 Chemgen 专利中描述的生物利用率测试。

[0261] 【0117】在微丸化之后,本发明的稳定颗粒被评估以确定在商业饲料喂制的肉雏鸡 (broiler chick) 中的生物利用率。

[0262] 材料和方法

[0263] 【0118】测试酶和颗粒和膳食处理包括单独的 **Phyzyme®** XP (6-肌醇六磷酸酶; E. C. 3. 1. 1. 26) 酶,以及包含 Phyzyme XP 酶的本发明 PVA- 包被的和 Gum Arabic (GA) 包被的稳定颗粒 (参看表 4)。受测试的酶和颗粒以浆液膳食或丸粒 (在 90°C 被制备) 膳食被喂给肉雏鸡。实验膳食为:正对照 (商业膳食),负对照,负对照 +500U/kg **Phyzyme®** XP, 负对照 +500U/kg PVA- 包被的 - 肌醇六磷酸酶,负对照 +500U/kg GA- 包被的 - 肌醇六磷酸酶,负对照 +500U/kg 在 90°C 时被微丸化的 PVA- 包被的 - 肌醇六磷酸酶,负对照 +500U/kg 在 90°C 时被微丸化的 GA- 包被的 - 肌醇六磷酸酶。除了钙和磷,所有的膳食是等热量的和等氮的 (参考表 6)。在正和负对照膳食中的钙和可用磷分别为 0.90% 和 0.78%,以及 0.37% 和 0.26%。二氧化钛 (0.10%), 其作为帮助评估营养消化率的不消化标记,被加入到膳食中。实验膳食由 ADAS Gleadthorpe 以商业规格生产并且在 ADAS Gleadthorpe 存留,保存在冰箱中。酶添加剂混合物 (25g), 谷类 (250g), 豆粕 (250g) 的样品和所有膳食 (250g) 样品被送到 Danisco Animal Nutrition Enzymes Feed Services, Edwin Rahrs Vej 38, DK-8220 Brabrand, Denmark.。在喂之前所有的饲料样品被测试其肌醇六磷酸酶。

[0264] 实验动物与设计:

[0265] 【0119】鸡为年龄 0 到 21 天的雄性 Ross 308 肉雏鸡,其每次处理使用八倍栏,每栏 30 只鸡。鸡仔被称重之前,被随意放置在箱中并且随意分配到处理栏中。每栏包括一个进料管和鸡仔可以通过奶嘴饮水器 (每栏 4 个) 自由喝水并且在所有时间进食。饮水器的高度定期调节以保持在鸡仔背部顶端的水平。干草 (litter) 以 5cm 厚度的干净刨木花的形式被提供。房间通过暖气孵化系统 (brooding system) 被加热,孵化目标温度方案在开始时是 31°C,每隔一天降低 1°C,直到在第 21 天降到 21°C。最小通风速率被自动地计算,以提供每 kg^{0.75} 体重每秒 $1.9 \times 10^4 \text{ m}^3$ 的空气并且这个速率由 Farm-ExDiacam 控制仪表板控制的一个 610mm 风扇所提供。照明程序为 23 小时照明和 1 小时黑暗。光线强度从在开始时 (day old) (40-60lux) 可达到的最大量减少到 10 天年龄时大约 10lux 的强度。使用 **Tinytalk®** 数据记录器,在每天基础上监测相对湿度。鸡用 IB H120 & 50% Avinue (ND) 在

Hatchery 接种疫苗。

[0266] 饲料摄入 / 体重

[0267] 【0120】在 0 到 21 天之间测量饲料利用率。通过称量在期末剩余的饲料数量和将之从提供的数量中减去,测量在每栏中的饲料。在开始时鸡仔在栏中被称量。在 21 天所有栏中的所有鸡仔被分批称量。每栏中的所有鸡仔的总重量被测定并且平均值被计算。所有死去的鸡仔被称量并且详细记录,任何跛的或不能进食和喝水的鸡仔从研究中挑选出,并且列出挑选原因。

[0268] 【0121】使用颈脱臼和左腿移动,从每个栏中选出 21 天年龄的 2 个鸡仔。胫骨被解剖并且骨头被送到 Eurofins 实验室, Woodthorne, Wolverhampton. 在试验基础 (plot basis) 上进行灰化。使用普遍的 SAS 线性模型程序 (SASInst. Inc., Cary, NC) 分析所有数据。当发现显著差异时, Duncant 的测试常常被用于比较各个处理手段。

[0269] 结果与讨论

[0270] 【0122】在实验食谱中被分析肌醇六磷酸酶活性为 < 50, < 50, 563, 467, 558TTU/kg (PVA- 包被的 - 肌醇六磷酸酶), 和 554 和 440 (GA- 包被的 - 肌醇六磷酸酶), 对于正对照, 负对照, 负对照 +500U/kg **Phyzyme**[®] XP, 负对照 +500U/kg PVA- 包被的 - 肌醇六磷酸酶, 和 GA- 包被的 - 肌醇六磷酸酶, 负对照 + 分别在 90°C 时被微丸化的 500U/kg PVA- 包被的 - 肌醇六磷酸酶和 GA- 包被的 - 肌醇六磷酸酶, (表 5), 这显示 PVA- 包被的 - 肌醇六磷酸酶和 GA- 包被的 - 肌醇六磷酸酶在 90°C 被微丸化之后, 没有被毁坏。

[0271] 【0123】用在 90°C 时微丸化的 +500U/kg PVA- 包被的 - 肌醇六磷酸酶和 GA- 包被的 - 肌醇六磷酸酶补充的膳食喂养的鸡仔, 在 21 天时比用正对照, 负对照, 负对照 +500U/kg **Phyzyme**[®] XP 食谱喂的鸡仔更重 (表 7)。用负对照膳食喂的鸡仔, 比在 90°C 时微丸化的 500U/kg PVA- 包被的 - 肌醇六磷酸酶和 GA- 包被的 - 肌醇六磷酸酶补充的膳食喂的鸡仔, 消费更少的饲料 (表 8)。用 500U/kg **Phyzyme**[®] 和 PVA- 包被的 - 肌醇六磷酸酶和 GA- 包被的 - 肌醇六磷酸酶补充的配合粉料膳食喂的鸡仔没有与正对照显示出统计学差异。那些用在 90°C 时微丸化的 500U/kg PVA- 包被的 - 肌醇六磷酸酶和 GA- 包被的 - 肌醇六磷酸酶补充膳食喂的鸡仔, 在 21 天时比用负对照 +500U/kg **Phyzyme**[®] XP 和正对照膳食喂的鸡仔, 具有更好的饲料转化率 (表 9)。对于用负对照膳食喂的鸡仔与所有其他处理相比较, 胫骨灰最低。用正对照膳食和肌醇六磷酸酶 - 补充膳食喂的鸡仔具有相同的胫骨灰 (表 10)。

[0272] 【0124】被测试的肌醇六磷酸酶, 或者作为 **Phyzyme**[®] XP 或用 PVA 或 GA 包被, 当被作为粉料喂食时, 作用相同于正对照膳食。当 PVA 或 GA- 包被的肌醇六磷酸酶被加入到在 90°C 时粒化的商业膳食时, 产物的回收保持在未微丸化的水平, 并且性能至少与正对照膳食一样好或更好。结果显示, 用 PVA 或 GA 包被的酶提高了其在 90°C 粒化温度中的热稳定性, 没有损失喂饲商业食谱的肉雏鸡中的生物功效。

[0273]

饮食处理	酶, U/Kg	包含量 (g/T)
正对照	0, 粉料膳食	0
负对照	0, 粉料膳食	0
Phyzyme XP 麦芽浆食谱	500U/kg Phyzyme XP, 粉料膳食	100
PVA- 包被的麦芽浆食谱	500U/kg PVA- 包被的肌醇六磷酸酶, 粉料膳食	100

PVA- 包被的微丸食谱	500U/kg PVA- 包被的肌醇六磷酸酶 (在 90°C 微丸化)	100
GA- 包被的麦芽浆食谱	500U/kg GA- 包被的肌醇六磷酸酶, 粉料膳食	100
GA- 包衣微丸食谱	500U/kg GA- 包被的肌醇六磷酸酶 (在 90°C 微丸化)	100

[0274] 表 5 在实验膳食中的肌醇六磷酸酶活性

[0275]

饮食处理	期望值	观察值	观察值, %
	FTU/Kg		
正对照, 麦芽浆	<50	<50	
负对照, 麦芽浆	<50	<50	
Phyzyme XP, 麦芽浆食谱	500	563	<u>112.6</u>
PVA-包被的, 麦芽浆食谱	500	467	<u>93.4</u>
PVA-包被的, 在 90°C 粒化	500	558	<u>111.6</u>
GA-包被的, 麦芽浆食谱			
GA-包被的, 在 90°C 粒化	500	440	<u>88.0</u>

[0276] 表 6 试验食谱

[0277]

成分: %	正对照	负对照
玉米	58.56	59.49
豆粕餐-48	34.65	34.55
大豆油	2.82	2.48
盐	0.30	0.30
碳酸氢钠	0.20	0.20
磷酸氢二钙	1.59	0.83
石灰石	0.95	1.12
维生素预混合物	0.50	0.50
赖氨酸-盐酸	0.10	0.10
DL-蛋氨酸	0.23	0.23
二氧化钛	0.10	0.10
酶预混合物载体 (谷物)	0	0.10

[0278] [0279]

营养组合物		
粗蛋白, %	21.68	21.68
家禽可新陈代谢能量, MJ/Kg	12.8	12.8
钙, %	0.90	0.78

磷, %	0.67	0.54
可利用磷, %	0.37	0.26
蛋氨酸+胱氨酸, %	0.92	0.92
蛋氨酸, %	0.56	0.56
赖氨酸, %	1.25	1.25
苏氨酸, %	0.82	0.82
色氨酸	0.25	0.25

[0279] 表 7 喂食试验膳食肉雏鸡的最初及最后体重

[0280]

饮食处理	体重, g	
	第 0 天	第 21 天
正对照, 粉料	44.43	789 ^b
负对照, 粉料	43.55	680 ^d
500U/kg Phyzyme XP, 粉料	43.72	753 ^c
500U/kg PVA-包被的肌醇六磷酸酶, 粉料	43.75	740 ^c
500U/kg GA-包被的肌醇六磷酸酶, 粉料		
500U/kg PVA-包被的肌醇六磷酸酶, 在 90°C 微丸化	43.70	899 ^a
500U/kg GA-包被的肌醇六磷酸酶, 在 90°C 微丸化	43.67	934 ^a
不同平均值之间差异的标准误差	0.261 (PVA)	6.015(PVA)
	0.228 (GA)	7.741(GA)
P 值	0.165 (PVA)	<0.001(PVA)
		<0.001(GA)

[0281]

	0.053 (GA)	
--	------------	--

[0282] 在同一栏中的不同上标显示明显差异

[0283] 表 8 喂食试验膳食 d 肉雏鸡总饲料摄入

[0284]

饮食处理	饲料摄入 (g/ 鸡仔 / 每天)
正对照, 粉料	56.69 ^b
负对照, 粉料	46.00 ^a
500U/kg Phyzyme XP, 粉料	59.03 ^b
500U/kg PVA-包被的肌醇六磷酸酶, 粉料	56.70 ^b
500U/kg PVA-包被的肌醇六磷酸酶, 在 90°C 微丸化	57.18 ^b
500U/kg GA-包被的肌醇六磷酸酶, 在 90°C 微丸化	64.33 ^b

不同平均值之间差异的标准误差	2.321 (PVA)	2.260 (GA)
P 值	0.004 (PVA)	0.001 (GA)

[0285] 在同一栏中的不同上标显示明显差异

[0286] 表 9 喂食试验食谱肉雏鸡的饲料转化率

[0287]

饮食处理	饲料转化率
正对照, 粉料	1.617 ^{ab}
负对照, 粉料	1.548 ^{ab}
500U/kg Phyzyme XP, 粉料	1.752 ^a
500U/kg PVA- 包被的肌醇六磷酸酶, 粉料	1.715 ^a
500U/kg PVA- 包被的肌醇六磷酸酶, 在 90°C 微丸化	1.412 ^b
500U/kg GA- 包被的肌醇六磷酸酶, 在 90°C 微丸化	1.537
不同平均值之间差异的标准误差	0.715 (PVA)

[0288] [0289]

	0.069 (GA)
P 值	0.016 (PVA) 0.061 (GA)

[0289] 在同一栏中的不同上标显示明显差异

[0290] 表 10 喂试验膳食肉雏鸡的胫骨灰内容

[0291]

饮食处理	胫骨灰内容 (g/100g)
正对照, 粉料	14.03 ^b
负对照, 粉料	10.86 ^a
500U/kg Phyzyme XP 粉料膳食	13.93 ^b
500U/kg PVA- 包被的肌醇六磷酸酶, 粉料	13.24 ^b
500U/kg PVA- 包被的肌醇六磷酸酶, 在 90°C 微丸化	13.50 ^b
500U/kg GA- 包被的肌醇六磷酸酶, 在 90°C 微丸化	13.84 ^a
不同平均值之间差异的标准误差	0.403 (PVA) 0.302 (GA)
P 值	< 0.001 (PVA) < 0.001 (GA)

[0292] 在同一栏中的不同上标显示明显差异

[0293] 实施例 6 :酶预混合物及微丸化稳定性

[0294] 【0125】根据表 2 中具有 PVA 或阿拉伯树胶包衣和水分水合包衣的配方所制备的含有肌醇六磷酸酶的颗粒, 与粘土海泡石混合, 或与含有或不含有氯化胆碱的标准肉雏鸡维生素矿物质预混合物混合。混合比率为 100 克的颗粒被加入到 900 克的粘土 (海泡石), 或 100 克的颗粒被加入到 500 克的维生素矿物预混合物。样品在 35°C 被保存在密封容器中 3 周, 随后被经历如在上面对 #3 (Mill#3) 中描述的微丸化过程。实验对照为没被存储在预混合中、并且被放置在适宜条件下 3 周的颗粒。

[0295] 【0126】表 11 和 12 显示在 90°C 和 95°C 粒化之后, 这些混合物的肌醇六磷酸酶恢复活性的百分数。与海泡石或维生素矿物预混合物的混合的颗粒被发现, 在微丸化之后, 具有显著增加的恢复活性。

[0296]

表 11				
PVA 配方颗粒				
预混合物	相对于粉料 (mash), 微丸化后恢复活性的百分数		相对于对照颗粒, 恢复活性的增加百分数	
	90°C	95°C	90°C	95°C
单独颗粒(对照)	71%	57%		
海泡石+颗粒	95%	88%	34%	53%
维生素矿物质预混合物, 不含氯化胆碱+颗粒	93%	80%	32%	40%
维生素矿物质预混合物, 不含氯化胆碱+颗粒	98%	85%	39%	48%

[0297]

表 12				
GA 配方颗粒				
预混合物	相对于粉料, 微丸化后恢复活性的百分数		相对于对照颗粒, 恢复活性的增长百分数	
	90°C	95°C	90°C	95°C
单独颗粒(对照)	92%	81%		
海泡石+颗粒	99%	88%	8%	9%
维生素矿物质预混合物, 不含氯化胆碱+颗粒	100%	81%	8%	0%
微生物矿物质预混合物, 含氯化胆碱+颗粒	97%	80%	5%	-2%

[0298] 【0127】不希望被任何特定理论所束缚,可以相信粘土和维生素矿物预混合物具有吸收水分的能力,并且在与稳定颗粒储存期间,它们从颗粒中吸收剩余水分。为了示例这个效应,表 13 显示了实验的结果,在这个实验中,颗粒和海泡石被储存在开放的容器中,并排放置,在密闭的室中。颗粒的水活性,和海泡石的水活性,在 25°C 储存之前和之后 7 天被测量。在储存期间,海泡石从颗粒中吸收水分直到系统达到平衡。储存之后,颗粒在水活性方面显示了下降,而海泡石在水活性方面显示了上升。

[0299]

	最初水活性		共同储存七天后水活性	
	海泡石	颗粒	海泡石	颗粒
制剂 GA 颗粒	0.312	0.558	0.359	0.373
制剂 PVA 颗粒	0.312	0.516	0.354	0.365

[0300] 实施例 7:含有氯化胆碱的存储稳定性

[0301] 【0128】氯化胆碱,或 N-(2-羟乙基)三甲基氯化铵,是在家禽,猪和其他动物饲料重要的饲料添加剂,维生素营养物。氯化胆碱是反应性分子,对其他维生素和酶具有众所周知的破坏作用。氯化胆碱经常包含在预混合物和原始混合物中。在预混和物中,对猪,被使用的最高水平的是 74,800mg/kg,对家禽,为 150,000mg/kg。对猪原始混合物的典型水平为大约 966 到 1282.9mg/kg。

[0302] 【0129】当在氯化胆碱存在下保存的,本发明的稳定,持久的颗粒被显示为保持了酶活性。从具有 PVA 或阿拉伯橡胶和水分水合材料的配方所制备的包含肌醇六磷酸酶的颗粒,与含有或不含有氯化胆碱的标准肉雏鸡微生物矿物质预混合物混合。混合比率为 100 克的颗粒被加入到 500 克的维生素矿物预混合物。样品在 35°C 被存储在密封容器中 3 周,随后使用上面描述的肌醇六磷酸酶实验方案,测试活性。实验对照为没有被储存在预混合物中并且在 35°C 保持 3 周的颗粒。表 14 和 15 显示了在储存之前和之后混合物的活性测量,以及在活性方面的变化百分比。没有一个样品在储存之后显示活性的显著损失。这个实验的误差,包括取样,萃取,和活性分析的误差为大约 15%。

[0303]

表 14

[0304]

PVA 制剂颗粒			
样品	最初活性 (FTU/g)	在 35°C 储存 3 周后的活性 (FTU/g)	活性变化 百分比
单独颗粒(对照)	11,600	11,858	2%
颗粒+维生素矿物质预混合物, 不含氯化胆碱	1,933	1,727	-12%
颗粒+维生素矿物质预混合物, 含氯化胆碱	1,933	1,720	-12%

[0305]

GA 制剂颗粒			
样品	最初活性 (FTU/g)	在 35°C 储存 3 周后的活性 (FTU/g)	活性变化 百分比
单独颗粒(对照)	10,373	10,528	1%
颗粒+维生素矿物质预混合物, 不含氯化胆碱	1,729	1,543	-12%
颗粒+维生素矿物质预混合物, 含氯化胆碱	1,729	1,622	-7%

[0306] 实施例 8 :水活性对微丸化稳定性的影响

[0307] 【0130】根据具有 PVA 包衣和 / 或无机盐层包衣的配方,肌醇六磷酸酶颗粒在前面已描述的流化床过程中被制备。如果颗粒的水活性在工艺之后超过 0.5,额外的干燥步骤可以被使用,以便在流化床涂布机中,或其他合适过程中,颗粒可以被干燥直到达到水活性 < 0.5。结果在表 16 中被显示,并且证实当水活性少于 0.5,微丸化之后,存留活性被增强。

[0308]

PVA 制剂颗粒					
颗粒	水活性	相对于粉料, 在微丸 化后, 恢复活性百分 数		相对于对照颗粒, 恢 复活性的增长百分数	
		90°C	95°C	90°C	95°C
A(对照)	0.57	81%	69%		
B	0.41	98%	87%	21%	26%
C	0.49	110%	97%	36%	41%