



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 338 798**

51 Int. Cl.:
A01N 63/04 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05707267 .0**
96 Fecha de presentación : **08.02.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1725113**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.11.2006**

54 Título: **Procedimiento para la producción de gránulos o microgránulos que contienen hongos filamentosos.**

30 Prioridad: **15.03.2004 EP 04006142**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.05.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.05.2010

73 Titular/es: **UREA CASALE S.A.**
Via Giulio Pocobelli, 6
6900 Lugano-Besso, CH

72 Inventor/es: **Panchaud-Mirabel, Elisabeth**

74 Agente: **Arizti Acha, Mónica**

ES 2 338 798 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de gránulos o microgránulos que contienen hongos filamentosos.

5 **Campo de aplicación**

La presente invención se refiere al campo técnico de los agentes fitosanitarios.

10 En particular, la invención se refiere a un procedimiento para la producción a escala industrial de gránulos o microgránulos que contienen hongos filamentosos, más específicamente hongos nematófagos.

Técnica anterior

15 El uso de microorganismos y en particular hongos como agentes fitosanitarios constituye una práctica cada vez más común.

Ya se comercializan productos a base de hongos para luchar contra insectos, hongos fitopatógenos y otros parásitos de cultivos.

20 Por ejemplo, en la patente estadounidense US 5 811 092, se describen agentes nematófagos para combatir nematodos de los géneros *Meloidogyne*, *Heterodera* y *Ditylenchus* que consisten en cepas particulares de *Arthrobotrys conoides* Dreschsler, un hongo filamentosos.

25 Los nematodos mencionados anteriormente son responsables de graves enfermedades de vegetales y hongos y pueden provocar enormes pérdidas económicas, ya que pueden conducir a que se ponga en peligro un 50-70% de la cosecha.

30 El uso de hongos nematófagos, como alternativa a los productos químicos antiparasitarios habituales (por ejemplo bromuro de metilo, tricloronitrometano, dicloropropeno, etc.), para su aplicación sobre el suelo antes del cultivo, o a los carbamatos, aplicados a los cultivos, permite que se eviten graves inconvenientes, tales como la esterilización del suelo, la destrucción del equilibrio ecológico y la posible toxicidad para el hombre y los animales.

35 Por tanto, los hongos nematófagos son particularmente adecuados para su uso en la agricultura ecológica, pero en la actualidad existe una dificultad sustancial para producirlos industrialmente con altos rendimientos y en formas adecuadas para garantizar un estado de conservación satisfactorio antes de su uso.

40 De hecho, en la técnica anterior, los hongos nematófagos se producen en un medio de cultivo adecuado. Entonces, los hongos nematófagos, junto con su medio de cultivo, o bien se dispersan directamente sobre el suelo que va a tratarse o bien se mantienen en el medio de cultivo antes de su uso. Sin embargo, en estas condiciones de conservación, los hongos nematófagos siguen reproduciéndose bastante rápidamente y experimentan un declive tras un corto periodo de tiempo (1-2 semanas) a medida que se agotan las fuentes de nutrientes.

45 El problema que subyace a la presente invención era el de proporcionar un procedimiento para la producción a escala industrial de hongos filamentosos, con alto rendimiento, bajo coste y en una forma adecuada para garantizar su estabilidad y viabilidad durante un largo tiempo de almacenamiento antes de su uso sobre el suelo que va a tratarse.

Sumario de la invención

50 La idea para solucionar un problema técnico de este tipo fue la de incorporar los hongos filamentosos en fórmulas sólidas adecuadas que garantizarían su estabilidad y viabilidad durante largos periodos de tiempo. En este sentido, se ha demostrado que fórmulas granulares o microgránulos que contienen hongos filamentosos son adecuados para los fines de la presente invención.

55 En vista de la idea mencionada anteriormente, el problema técnico que subyace a la presente invención se soluciona mediante un procedimiento para la producción de gránulos o microgránulos que contienen hongos filamentosos que comprende las etapas de:

- 60 - seleccionar y hacer crecer los hongos filamentosos en un medio de cultivo adecuado durante un periodo de tiempo predeterminado,
- mezclar dicho medio de cultivo, tras dicho periodo de tiempo predeterminado, con un agente gelificante y al menos un vehículo, de modo que se obtiene una mezcla,
- 65 - someter dicha mezcla a gelificación, mediante contacto gota a gota, con una disolución que contiene una sal de calcio, obteniendo así gránulos o microgránulos gelificados que contienen dichos hongos filamentosos,
- secar dichos gránulos o microgránulos gelificados hasta un contenido en humedad del 13-18%.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá adicionalmente con referencia a varias realizaciones de ejemplo proporcionadas con fines ilustrativos y no limitativos.

5

Antes de proceder con la ilustración de los ejemplos, puede ser útil definir los materiales usados para llevar a cabo las diversas etapas del procedimiento de producción según la invención.

10

Los hongos filamentosos usados en el procedimiento según la invención pertenecen a la familia Moniliales, preferiblemente hongos filamentosos de *Arthrobotrys conoides* Dreschsler.

15

El medio de cultivo para hongos filamentosos comprende al menos una fuente de carbono elegida entre el grupo que consiste en melaza, extracto de malta y sacarosa y al menos una fuente de nitrógeno orgánico elegida entre extracto de levadura y "macerado de maíz".

20

Preferiblemente, la al menos una fuente de carbono mencionada anteriormente constituye entre el 70 y el 85% en peso del peso seco del medio de cultivo y la al menos una fuente de nitrógeno orgánico mencionada anteriormente constituye entre el 15 y el 30% en peso del peso seco del medio de cultivo.

25

El medio de cultivo también puede incluir una fuente de nitrógeno mineral, que consiste en sales o nitratos de amonio. La fuente de nitrógeno mineral mencionada anteriormente se añade habitualmente de manera gradual al medio de cultivo durante el crecimiento de los hongos en una cantidad no superior al 10% en peso del peso seco del medio de cultivo y habitualmente de entre el 5 y el 8% en peso.

30

Una composición preferida del medio de cultivo consiste en un 75-85% de extracto de malta y un 15-25% de extracto de levadura, siendo los porcentajes en peso del peso seco del medio de cultivo.

Otro medio de cultivo preferido comprende un 60-65% de melaza, un 10-15% de sacarosa, un 10-15% de macerado de maíz y un 10-15% de extracto de levadura. Ventajosamente, un medio de cultivo de este tipo contiene, además, entre un 5 y un 8% de una fuente de nitrógeno mineral, en particular hidrogenofosfato de diamonio.

35

Un medio de cultivo preferido adicional contiene dos fuentes de carbono, es decir, extracto de malta, en una cantidad del 25-30%, y melaza, en una cantidad del 40-45%, así como macerado de maíz, en una cantidad del 25-30%.

El extracto de malta se obtiene mediante la germinación de los granos de cereales (habitualmente cebada). En el momento de la germinación, se producen enzimas específicas (amilasas), que permiten la conversión del almidón en azúcares. El extracto de malta contiene aproximadamente un 60% de maltosa, vitaminas y varios micronutrientes.

40

La melaza constituye un subproducto de la industria azucarera y viene en forma de un líquido viscoso marrón negruzco, que contiene un 10% de agua, un 35% de sacarosa, un 20% de otros azúcares y 15% de cenizas.

45

El extracto de levadura se obtiene mediante autólisis de *Saccharomyces cerevisiae* y viene en forma de polvo amarillo pálido fino, fácilmente soluble en agua. El extracto de levadura contiene péptidos, aminoácidos libres, bases púricas y pirimidínicas, así como vitaminas solubles en agua del grupo B. El extracto de levadura tiene un contenido en nitrógeno total del 10% y un contenido en nitrógeno α -amínico del 5%.

50

El macerado de maíz se obtiene a través de la maceración de los granos de maíz a 50°C durante 24-48 horas en agua que contiene dióxido de azufre. Este reactivo permite la desnaturalización de la red proteica que rodea a los granos de almidón y ofrece la ventaja de evitar el crecimiento de microorganismos no deseados durante la maceración. El macerado de maíz tiene un contenido en nitrógeno total del 7% y un contenido en nitrógeno α -amínico del 1,7% y también contiene un 5% de azúcares, un 4% de potasio, un 3% de fósforo y un 17% de otros minerales.

55

En el procedimiento de producción según la invención, el crecimiento del hongo filamentosos en los medios de cultivo mencionados anteriormente se lleva a cabo preferiblemente durante 5-10 días a una temperatura constante de 23-30°C.

60

El agente gelificante consiste preferiblemente en una disolución que contiene alginato de sodio a una concentración del 1-2%, preferiblemente el 1,3% en peso del peso de la disolución. Una disolución de este tipo se añade preferiblemente al medio de cultivo del hongo filamentosos según una razón en volumen de medio de cultivo:disolución de alginato de entre 40:60 y 60:40.

65

Como se sabe, el alginato de sodio puede promover la gelificación de una mezcla líquida a la que se añade, mediante el contacto de la mezcla con una disolución que contiene sales de calcio.

Un aspecto importante consiste en la adición de vehículos al medio de cultivo. En la presente invención, mediante el término "vehículo" quiere decirse tanto un producto que proporciona estabilidad y/o nutrientes a los hongos dispersados en los gránulos de modo que permanezcan viables durante el almacenamiento hasta su uso, como una "carga", es decir, un producto que confiere el volumen y la consistencia deseados a los gránulos.

ES 2 338 798 T3

Preferiblemente, los vehículos mencionados se seleccionan del grupo que comprende tierra de diatomeas, harinas y azúcares.

5 Un vehículo preferido es Celatom FPM 0.08. Se trata de un producto comercial a base de cubiertas de diatomeas (algas unicelulares silíceas) y tiene una granulometría de aproximadamente 0,08 micrómetros. Este producto puede absorber una cantidad de agua definida y por tanto ayuda a la consecución de un volumen deseado de los gránulos finales.

10 Entre las harinas que pueden usarse como vehículos en la presente invención, la harina de maíz es la más preferida. Es un producto natural que puede absorber una cantidad de agua equivalente a muchas veces su volumen y, en este caso específico, también ayuda a la consecución de un volumen deseado de los gránulos finales. Además, la harina de maíz constituye una importante fuente de nutrientes para los hongos filamentosos dispersados en los gránulos durante el almacenamiento y cuando se diseminan los gránulos sobre el suelo que va a tratarse.

15 En particular, el uso de harina de maíz como fuente de nutrientes es particularmente ventajoso en el caso de *Arthrobotrys conoides* Dreschsler, ya que, sorprendentemente, en tal caso puede verse que el hongo desarrolla un mayor número de trampas de nematodos con un consiguiente aumento de la eficacia de la lucha contra ellos.

20 Ventajosamente, los azúcares permiten que los hongos filamentosos permanezcan viables durante el almacenamiento, estabilizando las membranas celulares. Entre los azúcares que pueden usarse en el procedimiento según la invención, se prefiere especialmente la sacarosa.

25 Preferiblemente, en la presente invención, los vehículos se añaden al medio de cultivo a través del agente gelificante. En la práctica, mediante el uso de una disolución de alginato de sodio como agente gelificante, los vehículos se añaden preferiblemente a dicha disolución de alginato de sodio en porcentajes que oscilan entre el 6% y el 22% en peso del peso de la disolución. En un método particularmente preferido los vehículos se añaden a la disolución de alginato de sodio en un porcentaje del 15% en peso del peso de la disolución.

30 En el procedimiento según la invención, la gelificación de la mezcla que contiene los hongos filamentosos y el medio de cultivo relativo así como el promotor de la gelificación y los vehículos se lleva a cabo preferiblemente añadiendo dicha mezcla, gota a gota, a una disolución de sal de calcio.

35 La sal de calcio se elige preferiblemente entre cloruro de calcio y gluconato de calcio. La concentración de la sal de calcio en la disolución es de entre 0,2 M y 0,3 M y es preferiblemente de 0,25 M en el caso del cloruro de calcio. Habitualmente, la gelificación avanza más rápido con una concentración creciente de sal de calcio.

40 Los gránulos o microgránulos en gelificación que se forman mediante el contacto de las gotas de la mezcla mencionada anteriormente con la disolución de sal de calcio predeterminada se dejan reposar en la disolución mencionada anteriormente durante un periodo de tiempo predeterminado, preferiblemente 2-3 minutos, de modo que se complete la gelificación. La eliminación de los gránulos o microgránulos gelificados de la disolución de sal de calcio se lleva a cabo de manera convencional, por ejemplo mediante filtración.

45 El secado de los gránulos o microgránulos gelificados puede llevarse a cabo ventajosamente a través de flujo de aire estéril a una temperatura de 25-30°C. En general, los gránulos o microgránulos gelificados obtenidos a partir de la gelificación de las gotas de la mezcla añadidas a la disolución de sal de calcio predeterminada tienen un contenido en humedad del 80-90%. Un contenido en humedad de este tipo se reduce por medio de secado hasta un valor del 13-18%. De tal forma, los gránulos alcanzan el volumen y la consistencia deseados, también con la ayuda de los vehículos añadidos previamente al medio de cultivo.

50 Preferiblemente, con el procedimiento según la invención, se obtienen gránulos o microgránulos que tienen un diámetro de 1-3 mm, que ofrecen una diseminación mejorada de los hongos filamentosos sobre el suelo que va a tratarse.

55 El procedimiento según la invención puede llevarse a cabo ventajosamente a escala industrial a través de aparatos que son económicos y fáciles de diseñar. Un aparato adecuado, descrito brevemente más adelante en el presente documento como ejemplo no limitativo, comprende un reactor para el crecimiento de los hongos filamentosos deseados en el medio de cultivo adecuado, una mezcladora en la que el agente gelificante y los vehículos se mezclan con el medio de cultivo de modo que se forma una mezcla, medios adecuados para alimentar cantidades medidas de la mezcla a elementos perforados adecuados de modo que se forman gotas de la mezcla que tienen un volumen predeterminado, 60 un recipiente que contiene una disolución acuosa de sal de calcio para recoger las gotas mencionadas anteriormente y permitir su gelificación, y una secadora para secar los gránulos o microgránulos gelificados recuperados en el recipiente que contiene la disolución acuosa de sal de calcio.

65 Los medios para alimentar cantidades medidas de la mezcla pueden comprender, por ejemplo, una bomba peristáltica o dispositivos similares mientras que los elementos perforados pueden ser tubos que terminan en la parte inferior en un orificio de diámetro predeterminado, por ejemplo de 1-4 mm.

ES 2 338 798 T3

Es importante que el aparato mencionado anteriormente funcione en condiciones estériles con el fin de evitar la contaminación por microorganismos, en particular los antagonistas de los hongos filamentosos deseados. Los productos usados para llevar a cabo el procedimiento según la invención, en particular los productos añadidos al medio de cultivo en la mezcla también deben esterilizarse adecuadamente antes de su uso.

5 Los gránulos o microgránulos obtenidos según el procedimiento de la invención están listos para su uso pero ventajosamente los hongos filamentosos contenidos en los mismos se mantienen estables y viables durante largos periodos de tiempo. Por tanto, los gránulos o microgránulos mencionados anteriormente se prestan a conservarse o almacenarse durante un largo tiempo antes de su uso, tras el cual los hongos filamentosos mantienen una viabilidad
10 totalmente satisfactoria para las aplicaciones para las que están destinados.

La duración del tiempo conservación de los gránulos o microgránulos según la invención antes de su uso es ventajosamente superior a 8 semanas y es generalmente de entre 4 y 6 meses.

15 Los siguientes ejemplos de actuación del procedimiento según la invención se llevaron a cabo con hongos filamentosos de la familia Moniliales, y preferiblemente hongos filamentosos *Arthrobotrys conoides* Dreschsler.

Ejemplo 1

20 El cultivo del hongo filamentoso se llevó a cabo en un reactor de 2 litros que contenía 1,2 litros del medio de cultivo.

25 El reactor consiste preferiblemente en un depósito que tiene un fondo redondeado, dotado de un agitador de paletas, medios de calentamiento y enfriamiento, medios de soplado de aire, así como sondas de pH, O₂ y temperatura.

El medio consistía en 20 g/l de extracto de malta y 4 g/l de extracto de levadura y se esterilizó antes de sembrarse con conidios del hongo en cuestión.

30 Se incubó el cultivo durante 6 días desde la siembra a una temperatura de aproximadamente 27°C.

Durante la incubación, se tomaron muestras del medio de cultivo para determinar la masa seca (g/l) y el número de propágulos (UFC/l). Para determinar la masa seca, se filtraron 20 ml del medio de cultivo y entonces se secaron en un horno a 100°C durante 24 horas. Se determinó el número de propágulos en 1 ml de medio de cultivo.

35 Al final del tiempo de incubación, se obtienen por tanto casi 8 g/l de hongo con un número de propágulos de 6 x 10⁹ por litro.

40 Se transfiere entonces el medio de cultivo que contiene el hongo al interior de una mezcladora y se añaden al medio de cultivo 1800 ml de una disolución acuosa al 1,3% en peso de alginato de sodio, disolución a la que se le ha añadido un 6,6% de Celatom FPM 0.08 (en peso del peso de la disolución).

45 Se homogeneiza entonces la mezcla resultante en la mezcladora y se añade, gota a gota, a través de un tubo perforado (diámetro del orificio de 1,6 mm) al interior de un recipiente que contiene una disolución de cloruro de calcio 0,25 M.

Se obtienen así gránulos gelificados de la mezcla mencionada anteriormente que se dejan reposar en la disolución de cloruro de calcio durante 3 minutos.

50 Al final del tiempo de reposo, se separan los gránulos gelificados mediante decantación y se secan en una cinta transportadora hasta un contenido en humedad del 17%. El diámetro promedio de los gránulos secos es de 2,2 mm.

55 El número promedio de propágulos en los gránulos secos, tal como se determina inmediatamente tras su formación, es sustancialmente el mismo que el determinado al final de la incubación del hongo filamentoso, lo que demuestra que los propágulos mencionados anteriormente han sobrevivido completamente al procedimiento de granulación de la presente invención.

60 Los gránulos secos mencionados anteriormente se mantienen durante 3 meses a temperatura ambiente. Al final del periodo de almacenamiento, el número promedio de propágulos supervivientes es igual al 50% del determinado tras la formación de los gránulos.

Ejemplo 2

65 Se repitió la prueba del ejemplo 2 usando las mismas condiciones experimentales que el ejemplo 1 con la excepción de que se añadieron al medio de cultivo 1800 ml de una disolución acuosa al 1,3% en peso de alginato de sodio, disolución a la que se le habían añadido un 6,6% de Celatom FPM 0.08 y un 3,3% de harina de maíz (en peso del peso de la disolución).

ES 2 338 798 T3

El diámetro promedio de los gránulos secos es de 2,5 mm y su contenido en humedad era del 17%.

5 El número promedio de propágulos en los gránulos secos, tal como se determina inmediatamente tras su formación, es sustancialmente el mismo que el determinado al final de la incubación del hongo filamentoso, lo que demuestra que los propágulos mencionados anteriormente han sobrevivido completamente al procedimiento de granulación de la presente invención.

10 Los gránulos secos mencionados anteriormente se mantienen durante 3 meses a temperatura ambiente. Al final del periodo de almacenamiento, el número promedio de propágulos supervivientes es igual al 90% del determinado tras la formación de los gránulos, lo que permite que los gránulos secos puedan usarse eficazmente sobre el suelo como agentes fitosanitarios.

Ejemplo 3

15 Se repitió la prueba del ejemplo 3 usando las mismas condiciones experimentales que el ejemplo 1 con la excepción de que se añadieron al medio de cultivo 1800 ml de una disolución acuosa al 1,3% en peso de alginato de sodio, disolución a la que se le habían añadido un 6,6% de Celatom FPM 0.08, un 3,3% de harina de maíz y un 5% de sacarosa (en peso del peso de la disolución).

20 El diámetro promedio de los gránulos secos es de 2,9 mm y su contenido en humedad es del 17%.

25 El número promedio de propágulos en los gránulos secos, tal como se determina inmediatamente tras su formación, es sustancialmente el mismo que el determinado al final de la incubación del hongo filamentoso, lo que demuestra que los propágulos mencionados anteriormente han sobrevivido completamente al procedimiento de granulación de la presente invención.

30 Los gránulos secos mencionados anteriormente se mantienen durante 3 meses a temperatura ambiente. Al final del periodo de almacenamiento, el número promedio de propágulos supervivientes es igual al 100% del determinado tras la formación de los gránulos, lo que permite que los gránulos secos puedan usarse eficazmente sobre el suelo como agentes fitosanitarios.

35 Además, en el uso de los gránulos mencionados anteriormente, hay una mayor eficacia del hongo en el combate contra los nematodos debido al hecho de que el hongo desarrolla un mayor número de trampas contra ellos.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la producción de gránulos o microgránulos que contienen hongos filamentosos que comprende las etapas de:
- seleccionar y hacer crecer hongos filamentosos en un medio de cultivo adecuado durante un periodo de tiempo predeterminado,
 - 10 - mezclar dicho medio de cultivo, tras dicho tiempo predeterminado, con un agente gelificante y al menos un vehículo, de modo que se obtiene una mezcla,
 - someter dicha mezcla a gelificación, a través de contacto gota a gota, con una disolución que contiene una sal de calcio obteniendo así gránulos o microgránulos gelificados que contienen dichos hongos filamentosos,
 - 15 - secar dichos gránulos o microgránulos gelificados hasta un contenido en humedad del 13-18%.
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha etapa de gelificación se lleva a cabo añadiendo dicha mezcla, gota a gota, a dicha disolución que contiene una sal de calcio.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho medio de cultivo para hongos filamentosos comprende al menos una fuente de carbono elegida entre el grupo que consiste en melaza, extracto de malta y sacarosa y al menos una fuente de nitrógeno orgánico elegida entre extracto de levadura y "macerado de maíz".
- 25 4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que dicha al menos una fuente de carbono constituye entre el 70 y el 85% en peso del peso seco del medio de cultivo y dicha al menos una fuente de nitrógeno orgánico constituye entre el 15 y el 30% en peso del peso seco del medio de cultivo.
- 30 5. Procedimiento según la reivindicación 3 ó 4, en el que dicho medio de cultivo comprende además una fuente de nitrógeno mineral.
6. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que dicha fuente de nitrógeno mineral está contenida en una cantidad no superior al 10% en peso del peso seco del medio de cultivo y preferiblemente de entre el 5 y el 8% en peso.
- 35 7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente gelificante consiste en una disolución que contiene entre el 1 y el 2% en peso de alginato de sodio.
- 40 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicha disolución de alginato de sodio se añade al medio de cultivo del hongo filamentoso preferiblemente según una razón en volumen de medio de cultivo/disolución de alginato de entre 40:60 y 60:40.
- 45 9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichos vehículos se eligen del grupo que comprende tierra de diatomeas, preferiblemente Celatom FPM 0.08, harinas, preferiblemente harina de maíz, y azúcares.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que dichos hongos filamentosos son de *Arthrobotrys conoides* Dreschsler y dichos vehículos comprenden al menos harina de maíz.
- 50 11. Procedimiento según la reivindicación 9 ó 10, en el que los vehículos se añaden a la disolución de alginato de sodio en porcentajes que oscilan entre el 6% y el 22% en peso del peso de la disolución.
- 55 12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la disolución que contiene una sal de calcio es preferiblemente una disolución acuosa de cloruro de calcio o gluconato de calcio que tiene una concentración de 0,2-0,3 M.
- 60 13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los gránulos o microgránulos secados tienen un diámetro promedio de entre 1 y 3 mm.