



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 221 603**

51 Int. Cl.:
A23K 1/00 (2006.01)
A23K 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

86 Número de solicitud europea: **00112997 .2**
86 Fecha de presentación : **21.06.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1062877**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **27.12.2000**

54 Título: **Suplementos acuosos que contienen lisina para piensos animales, y procedimiento para su preparación.**

30 Prioridad: **23.06.1999 US 140449 P**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.01.2005**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **01.04.2008**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **01.04.2008**

73 Titular/es: **Degussa GmbH**
Bennigsenplatz 1
40474 Düsseldorf, DE

72 Inventor/es: **Binder, Michael y**
Uffmann, Klaus

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 221 603 T5

ES 2 221 603 T5

DESCRIPCIÓN

Suplementos acuosos que contienen lisina para piensos animales, y procedimiento para su preparación.

5 La invención se refiere a suplementos acuosos que contienen L-lisina para piensos animales que contienen microorganismos, preferentemente inactivados por la fermentación, y a un procedimiento para la fabricación de esta forma de preparación.

Estado de la técnica

10 El aminoácido esencial L-lisina se utiliza extensamente como suplemento para piensos animales.

15 Es sabido que la L-lisina se prepara por fermentación de cepas de bacterias corineformes, en especial *Corynebacterium glutamicum*. Debido a su gran importancia, se trabaja constantemente en la mejora del procedimiento de preparación. Las mejoras del procedimiento pueden referirse a las propiedades intrínsecas de los microorganismos, por ejemplo, por mutagénesis y selección, a medidas técnicas de fermentación tales como, por ejemplo, agitación y aportación de oxígeno, a la composición de los medios de nutrición tales como, por ejemplo, la concentración de azúcares durante la fermentación, o al procesamiento de la forma del producto, por ejemplo, por cromatografía de intercambio iónico o cristalización.

20 Según el estado de la técnica se conocen tres grupos diferentes de formas de producto que contienen L-lisina, preparados a partir de caldos de fermentación que contienen L-lisina.

25 El grupo más conocido está compuesto por formas de producto pulverulentas o cristalinas de L-lisina purificada o pura, que se presenta, típicamente, en forma de una sal tal como, por ejemplo, monohidrócloruro de L-lisina.

Otro grupo adicional de formas de producto sólidas, como las descritas, por ejemplo, en el documento EP-B-0533039, contiene, además de L-lisina, las sustancias adicionales utilizadas durante la preparación por fermentación y, eventualmente, la biomasa inactivada de los microorganismos empleados.

30 Las formas de producto pulverulentas, cristalinas o, también, granuladas muestran claros inconvenientes en cuanto a su manipulación y aplicación. Influencias climáticas tales como, por ejemplo, una elevada humedad del aire, afectan en grado considerable a la calidad del producto, ya que debido a la posible aglomeración se ven afectadas la capacidad de almacenamiento y la dosificación del producto durante su aplicación. El procesamiento de productos secos y pulverulentos que contienen L-lisina puede dar lugar, asimismo, a un desarrollo indeseado de polvo.

35 El tercer grupo de productos que contienen L-lisina comprende soluciones concentradas, acuosas, alcalinas y solución, de esta forma, los problemas anteriormente citados (documento EP-B-0534865).

40 En concordancia con las diferentes formas de producto, se conocen también los más variados procedimientos para la preparación de productos que contienen L-lisina a partir de caldos de fermentación que contienen L-lisina.

45 Para la elaboración de L-lisina pura sólida se conocen, hasta la fecha, básicamente dos procedimientos diferentes.

50 La lisina se puede obtener como monohidrócloruro (Lys-HCl) por cristalización a partir de los correspondientes caldos de fermentación, tras lo cual la biomasa inactivada se separa por métodos adecuados. La purificación del filtrado, antes de una posterior concentración adicional, tiene lugar, en general, por cromatografía de intercambio iónico a través de múltiples etapas. En este caso, y en primer lugar, se facilita la adsorción de la lisina sobre las resinas de intercambio por medio de la adición preferente de ácido clorhídrico (HCl) o ácido sulfúrico (H₂SO₄), que acidifica el caldo de fermentación separado de la biomasa. Además de la L-lisina preparada por fermentación, se unen otros cationes inespecíficamente diferentes, que se encuentran presentes en el caldo de fermentación. En general, se requieren distintas columnas de intercambio, conectadas en serie, para obtener un producto puro. La lisina adsorbida se eluye a continuación, preferentemente por medio de una solución amoniacal, y se regenera la columna de intercambio. 55 La solución de lisina obtenida de esta forma se concentra entonces y, tras la neutralización con ácido clorhídrico, se obtiene lisina-HCl en forma cristalina.

60 Otro método permite la obtención de lisina en forma de una sal cristalina tras una purificación con carbón activo (documento SU-183581). En este caso, el caldo de fermentación que contiene lisina se inactiva, mediante procedimientos convencionales con calor húmedo, y se separa por filtración de la biomasa. Tras la acidificación del filtrado a pH 5, se agregan 4-5% de carbón activo bajo agitación constante a 50-55°C, para separar las impurezas no deseadas del filtrado y evitar la coloración del cristalizado. En una filtración inmediatamente posterior, se separa el carbón activo y, a continuación, por adición de hidróxido de calcio precipita el sulfato disuelto en forma de sulfato de calcio. Éste se sigue filtrando, se separa al vacío la fracción amoniacal en un evaporador rotativo y se concentra la solución hasta 65 que, bajo refrigeración, se produce la cristalización.

El inconveniente de estos dos métodos de procesamiento radica en las múltiples etapas aisladas de trabajo y en el costoso procedimiento de purificación por medio de cromatografía de intercambio iónico. Mediante la eliminación de

ES 2 221 603 T5

las sales de interferencia o el uso de distintos medios de elución, se generan corrientes adicionales de residuos que se deben purificar de manera costosa o se deben desechar de forma también onerosa desde el punto de vista económico.

5 Estos inconvenientes se obvian en el documento EP-B-0533039, concentrando la totalidad de la mezcla de fermentación, eventualmente incluida la biomasa, y secando por pulverización a temperatura elevada.

10 En el documento US-A 5.990.350 se describe un procedimiento para la preparación de un granulado de L-lisina exento de biomasa. En dicho procedimiento, se separa inicialmente la biomasa del caldo de fermentación por ultrafiltración, y se desecha. El filtrado obtenido de esta forma se concentra, seguidamente, por evaporación extensa de la fracción acuosa. El concentrado obtenido de esta forma se seca finalmente por una cuidadosa granulación por pulverización en un lecho fluidizado hasta formar un granulado y se procesa.

15 En el documento EP-B-0534865 se da a conocer un procedimiento para la preparación de soluciones acuosas y básicas que contienen L-lisina a partir de caldos de fermentación. En el procedimiento descrito, se separa la biomasa del caldo de fermentación y se desecha. Por medio de una base tal como, por ejemplo, hidróxido de sodio, potasio o amonio, se ajusta a un valor de pH entre 9 y 11. Los componentes minerales (sales inorgánicas) se separan del caldo por cristalización, tras la concentración y refrigeración, y se utilizan como abono o se desechan.

20 Misión de la invención

La misión de la invención consiste en poner a disposición nuevas formas acuosas de preparación de la L-lisina y sus sales como suplemento para piensos.

25 Adicionalmente, es misión de la invención poner a disposición un procedimiento para la preparación, que resulte más económico y de mayor rendimiento que los procedimientos conocidos hasta la fecha.

Descripción de la invención

30 El aminoácido esencial lisina se utiliza en gran medida como suplemento para piensos animales.

Los microorganismos del género *Corynebacterium* se distinguen por su capacidad para excretar, en un espacio de tiempo relativamente breve, grandes concentraciones de L-lisina al correspondiente medio de fermentación. Los procesos de producción tienen lugar, en general, como procedimientos de alimentación ("Fedbatch"). La L-lisina preparada por fermentación se procesa, en la actualidad, principalmente como producto cristalino, en polvo o granulado.

35 Objeto de la invención es un suplemento para piensos animales basado en un caldo de fermentación, caracterizado porque se compone de

- 40 a) L-lisina y/o sus sales,
- b) la biomasa formada durante la fermentación, en una cantidad de 0 hasta 100%, preferentemente, desde 50 hasta 100% y, de forma muy especial, de 90 a 100%;
- 45 c) al menos, la parte predominante de las restantes sustancias disueltas y suspendidas contenidas en el caldo de fermentación;
- d) se presenta en forma de suspensión, y
- 50 e) presenta un pH < (menor) 7.

55 El suplemento para piensos animales tiene un contenido en lisina (como lisina base) de 18% en peso a 35% en peso y, de forma especialmente preferida, de 21% en peso a 34% en peso, referido a la cantidad total del suplemento. El pH es < (menor) 7, preferentemente, de 2 a 6,5 y, de forma especialmente preferida, de 2,5 a 6 y, de manera muy especialmente preferida, de 2,5 a 5.

60 La fracción de la masa seca total del suplemento asciende a 10% en peso hasta 55% en peso, preferentemente, 20% en peso a 55% en peso, de forma especialmente preferida, 35% en peso a 55% en peso y, de manera muy especialmente preferida, 45% en peso a 54% en peso. La masa seca contiene, además de lisina,

- 65 - la biomasa del microorganismo productor,
- los componentes inorgánicos y los restantes componentes orgánicos del caldo de fermentación, y
- los productos secundarios formados durante la fermentación

siempre que no hayan sido separados por procedimientos adecuados tales como separación o filtración.

ES 2 221 603 T5

Si la biomasa se deja completa o parcialmente en el suplemento, éste contiene la proteína del microorganismo en una concentración máxima de 4% en peso.

5 El suplemento contiene, como componentes inorgánicos, entre otros, calcio, magnesio, fósforo en forma de fosfato, y azufre en forma de sulfato, y como componentes orgánicos, entre otros, vitaminas tales como, por ejemplo, biotina y tiamina, o azúcares tales como, por ejemplo, isomaltosa.

10 A los productos secundarios orgánicos, formados en pequeñas cantidades durante la fermentación, pertenecen L-aminoácidos seleccionados de los grupos de L-alanina, L-asparagina, L-glutamina, L-metionina, L-treonina y L-valina. Adicionalmente, comprenden ácidos orgánicos portadores de uno hasta tres grupos carboxilo tales como, por ejemplo, ácido láctico, ácido acético y ácido málico. Por último, se incluyen también azúcares tales como, por ejemplo, trehalosa.

15 Estos compuestos son eventualmente deseados cuando mejoran el valor del suplemento.

Un objeto adicional de la invención es un procedimiento para la preparación de suspensiones acuosas que contienen lisina y/o sus sales, consistente en las etapas:

- 20 a) preparación por fermentación de un caldo que contiene L-lisina;
 - b) eventualmente, mediante la adición de L-lisina o una solución que contiene L-lisina, ajuste de la concentración deseada;
 - 25 c) ajuste del caldo obtenido a un pH < (menor) 7, y
 - d) eventualmente concentración,
- siendo posible cambiar el orden de las etapas b), c) y d), y
- 30 e) obtención de un producto según las reivindicaciones 1 a 3 con un contenido de 18 a 35% en peso de L-lisina (en forma de base de L-lisina).

35 Un objeto adicional de la invención es, por último, un procedimiento para la preparación de suspensiones acuosas que contienen lisina y/o sus sales, consistente en las etapas:

- a) preparación por fermentación de un caldo que contiene L-lisina, y
- b) ajuste del caldo obtenido a un valor del pH < (menor) 7, y
- 40 c) separación, eventualmente parcial, de la biomasa de ésta,
- d) eventualmente, mediante la adición de L-lisina o una solución que contiene L-lisina, ajuste a una concentración deseada,
- 45 e) y el caldo obtenido de esta forma se concentra eventualmente, siendo posible variar el orden de las etapas b), c), d) y e), y
- f) obtención de un producto según las reivindicaciones 1 a 3 con un contenido de 18 a 35% en peso de L-lisina (en forma de base de L-lisina).

50 Los mutantes de bacterias corineformes, productores de L-lisina, se han descrito exhaustivamente en el estado de la técnica tal como, por ejemplo, en el documento US-A-4.657.860.

55 Estas cepas se pueden cultivar en procedimientos de lote continuo o discontinuo (cultivos en tanda), o en procedimientos de alimentación ("fedbatch") o de alimentación repetida ("repeated fedbatch"), para la producción de L-lisina. En el libro de texto de Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (editorial Gustav Fischer, Stuttgart, 1991) o en el libro de texto de Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Editorial Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden, 1994) se describe recopilaciones sobre métodos de cultivo conocidos.

60 El medio de cultivo a utilizar debe satisfacer de manera adecuada las necesidades de las correspondientes cepas. Como fuente de carbono se puede utilizar azúcares e hidratos de carbono tales como, por ejemplo, glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melaza, almidón y celulosa, aceites y grasas tales como, por ejemplo, aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y aceite de coco, ácidos grasos tales como, por ejemplo, ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes tales como, por ejemplo, glicerina y etanol, y ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético. Estas sustancias se pueden utilizar de manera aislada o mezcladas entre sí. Como fuente de nitrógeno se pueden utilizar compuestos orgánicos que contienen nitrógeno, tales como peptona, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, agua usada para remojar el maíz, harina de semillas de soja y urea, o compuestos inorgánicos tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio.

ES 2 221 603 T5

Las fuentes de nitrógeno se pueden emplear de forma aislada o como mezcla. Como fuente de fósforo se pueden utilizar hidrógeno-fosfato de potasio o hidrógeno-fosfato dipotásico, o las correspondientes sales de sodio. El medio de cultivo debe contener, además, sales de metales tales como, por ejemplo, sulfato de magnesio o sulfato de hierro, necesarias para el crecimiento. Adicionalmente, se pueden emplear elementos esenciales para el crecimiento tales como aminoácidos y vitaminas agregados a las sustancias anteriormente mencionadas. Es posible agregar al medio de cultivo, además, precursores adecuados. Los citados componentes se pueden agregar al cultivo en forma de una sola adición o de manera adecuada durante el cultivo.

Para el control de pH del cultivo se utilizan, de manera adecuada, compuestos básicos tales como hidróxido sódico, hidróxido de potasio, amoníaco, o compuestos ácidos tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Para el control del desarrollo de espuma se pueden utilizar antiespumantes tales como, por ejemplo, éster poliglicólico de ácidos grasos. Para el mantenimiento de la estabilidad de los plasmidios se pueden agregar al medio sustancias adecuadas de acción selectiva, por ejemplo, antibióticos. Para mantener las condiciones aeróbicas se suministran al cultivo oxígeno o mezclas gaseosas que contienen oxígeno tales como, por ejemplo, aire, mezclándolo mediante sistemas de agitación adecuados o con la corriente de gas. La temperatura del cultivo se encuentra, típicamente, entre 25°C hasta 37°C. El cultivo se continúa durante el tiempo necesario para que se forme la cantidad máxima de L-lisina. Este objetivo se alcanza, normalmente, en un plazo de 10 horas a 160 horas.

Ejemplos de medios de fermentación adecuados se encuentran, por ejemplo, en las memorias descriptivas de las patentes EP-B-0 532 867, US-A-5.840.551 y US-A-5.990.350.

El análisis de L-lisina se puede llevar a cabo por cromatografía de intercambio aniónico con derivatización de ninhidrina, como lo describen Spackman *et al.* (Analytical Chemistry, 30 (1958), 1190), o se puede efectuar por HPLC de fase inversa, como lo describen Lindroth *et al.* (Analytical Chemistry (1979), 51: 1167-1174).

Los caldos de fermentación utilizados para el procedimiento según la invención tienen, preferentemente, un contenido en L-lisina > (mayor) 60 g/l (como lisina base), con una fracción de azúcar no metabolizada < (menor) 5,0 g/l. Con una fracción total de masa seca de > 10% en peso, la fracción de la biomasa seca asciende, preferentemente, a 1 hasta 4% en peso. El contenido en productos secundarios y vitaminas de la fermentación (aminoácidos, ácidos orgánicos) es, preferentemente, < (menor) 2% en peso.

En el procedimiento según la invención, la biomasa presente en el caldo de fermentación se inactiva o destruye inicialmente, en general, por un tratamiento, por ejemplo, térmico. Eventualmente, la inactivación puede estar ausente. A continuación, se ajusta el caldo de fermentación a un valor de pH < (menor) 7, preferentemente, 2 a 6,5, de forma especialmente preferida, 2,5 a 6 y de manera muy especialmente preferida, 2,5 a 5, por medio de un ácido inorgánico tal como, por ejemplo, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico o ácido fosfórico, o por medio de un ácido orgánico tal como, por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético o ácido fórmico, o por una mezcla de diferentes ácidos. Eventualmente, antes o después de la acidificación, se separa completa o parcialmente la biomasa por métodos conocidos en general de separación o filtración. En general, no es necesaria una separación de los componentes minerales. La solución o suspensión ácida que contiene L-lisina se concentra, seguidamente, mediante métodos conocidos (tales como, por ejemplo, evaporación rotativa, evaporación de capa fina o evaporación molecular por gravedad), preferentemente, al vacío, hasta obtener un producto líquido con un contenido en lisina (como L-lisina base) de preferentemente 20% en peso a 35% en peso y, de manera muy especialmente preferida, 21% en peso hasta 34% en peso, con un contenido en masa seca total de 10% en peso hasta 55% en peso, preferentemente, 20% en peso hasta 55% en peso, de forma especialmente preferida, 35% en peso hasta 55% en peso y, de manera muy especialmente preferida, de 45% en peso hasta 54% en peso. En general, también es válido concentrar el caldo de manera que no precipite, preferentemente, ningún componente mineral (sales inorgánicas) del caldo de fermentación y la lisina se encuentre disuelta. Eventualmente, se puede ajustar una concentración deseada de L-lisina en el producto mediante la adición de una sustancia que contenga L-lisina durante una cualquiera de las etapas del procedimiento.

La suspensión obtenida de esta forma tiene un valor de pH ácido, es fácil de transportar, se dosifica sin problemas, es estable desde el punto de vista bacteriológico y se puede almacenar de mejor manera que una solución alcalina.

La acidificación se puede llevar a cabo también después o durante la concentración. Los aniones que actúan como sulfato, cloruro, fosfato, citrato, etc. se pueden alimentar ya antes de la fermentación al medio en forma de sales habituales en el comercio.

El concepto de suspensión considera que los microorganismos, preferentemente inactivados, no estén disueltos en el producto según la invención.

Ejemplos

La presente invención se explicará de manera más detallada a continuación, sobre la base de ejemplos de realización.

ES 2 221 603 T5

Ejemplo 1

Preparación de un caldo de fermentación que contiene L-lisina

5 En diversas patentes anteriores (EP-B 0 532 867 y US-A 5.840.551) se han descrito exhaustivamente procedimientos de fermentación para la preparación de caldos que contienen lisina, los cuales se procesan de acuerdo con la invención.

Ejemplo 2

10 (No objeto de la invención)

Preparación de un producto libre de biomasa

15 Según el Ejemplo 1, se prepararon 20 kg de un caldo de fermentación con un contenido de aprox. 9,5% en peso (como lisina base). La biomasa presente en el caldo de fermentación se inactivó, inicialmente, por tratamiento térmico durante 30 minutos a 80°C. La biomasa inactivada se separó, a continuación, por centrifugación durante 20 minutos a 4000 rpm (centrifugadora de laboratorio Biofuge-Stratos, Heaeus, Düsseldorf, Alemania). 1,0 litro del sobrenadante aclarado de esta forma se ajustó a un valor de pH de aprox. 4 mediante la adición gradual de ácido sulfúrico concen-
20 trado. En el centrifugado, se redujo la fracción de líquido seguidamente en un evaporador rotativo (evaporador rotativo de laboratorio Büchi Rotavapor RE-120, Büchi-Labortechnik GmbH, Constanca, Alemania) al vacío, a un contenido en seco de aproximadamente 50%.

25 El producto líquido obtenido de esta manera tuvo un contenido en L-lisina de 31,5% en peso (como lisina base) y un valor de pH de 4. La masa seca total ascendió a 49,3% en peso.

Ejemplo 3

Preparación de un producto que contiene biomasa

30 Según el Ejemplo 1, se prepararon 20 kg de un caldo de fermentación con un contenido de aprox. 9,5% en peso (como lisina base). La biomasa presente en el caldo de fermentación se inactivó directamente en el biorreactor por tratamiento térmico durante 30 minutos a 80°C. 1,0 litro de este caldo de fermentación que contiene biomasa se ajustó, seguidamente, a un valor de pH de aprox. 4 mediante la adición gradual de ácido sulfúrico concentrado. La fracción
35 líquida de este caldo de fermentación ácido que contiene lisina se redujo, a continuación, en un evaporador rotativo (evaporador rotativo de laboratorio Büchi Rotavapor RE-120, Büchi-Labortechnik GmbH, Constanca, Alemania) al vacío, a un contenido en seco de aproximadamente 50%.

40 El producto líquido obtenido de esta forma tuvo un contenido en L-lisina de 21,8% en peso (como lisina base) y un valor de pH de 4. La masa seca total ascendió a 50,7% en peso. Tras un almacenamiento de 16 meses a 20°C, no se detectó ninguna variación significativa del contenido.

45

50

55

60

65

ES 2 221 603 T5

REIVINDICACIONES

5 1. Suplemento para piensos animales a base de un caldo de fermentación altamente estable, **caracterizado** porque está compuesto por

- 10 a) L-lisina y/o sus sales, en una cantidad de 18 hasta 35% en peso (como L-lisina base), referido a la cantidad total de la suspensión,
- 15 b) la biomasa formada durante la fermentación, en una cantidad de 50 a 100% y, de forma muy especial, de 90 a 100%,
- 15 c) al menos, la parte predominante de las restantes sustancias disueltas o suspendidas, contenidas en el caldo de fermentación,
- 15 d) se presenta en forma de suspensión, y
- 15 e) tiene un valor de pH < (menor) 7.

20 2. Suspensiones que contienen L-lisina según la reivindicación 1, con un valor de pH de 2 a 6,5.

3. Suplemento para piensos animales según la reivindicación 1, **caracterizado** porque contiene L-lisina en forma de sal sulfato.

25 4. Procedimiento para la preparación de un suplemento para piensos animales que contiene lisina y/o sus sales, compuesto por las etapas de:

- 30 a) preparación de un caldo que contiene L-lisina por fermentación, y
- 30 b) eventual ajuste a la concentración deseada por la adición de L-lisina o de una solución que contiene L-lisina,
- 35 c) ajuste del caldo obtenido a un pH < (menor) 7,
- 35 d) eventualmente, concentración,

en el que el orden de las etapas b), c) y d) puede ser el que se desee, y

- 40 e) obtención de un producto según las reivindicaciones 1 a 3 con un contenido de 18 hasta 35% en peso de L-lisina (como L-lisina base).

5. Procedimiento para la preparación de un aditivo para piensos animales que contiene lisina y/o sus sales según la reivindicación 4, compuesto por las etapas de:

- 45 a) preparación de un caldo que contiene L-lisina por fermentación, y
- 45 b) ajuste del caldo obtenido a un valor de pH < (menor) 7, y
- 50 c) separación eventualmente parcial de la biomasa a partir del mismo,
- 50 d) eventual ajuste a la concentración deseada mediante la adición de L-lisina o de una solución que contiene L-lisina,
- 55 e) y eventual concentración del caldo obtenido de esta forma,

en el que el orden de las etapas b), c), d) y e) puede ser el que se desee, y

- 60 f) obtención de un producto según las reivindicaciones 1 a 3 con un contenido de 18 hasta 35% en peso (como L-lisina base).

6. Procedimiento según la reivindicación 4 ó 5, **caracterizado** porque el valor de pH se ajusta con ácido sulfúrico o ácido fosfórico.

65 7. Procedimiento según la reivindicación 4 ó 5, **caracterizado** porque el valor de pH se ajusta con un ácido orgánico.