



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: 2 450 015

51 Int. Cl.:

A23K 1/00 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01) A23K 1/165 (2006.01) C12N 9/98 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 17.05.2000 E 00936749 (1)
 (97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: 22.01.2014 EP 1185634
- (54) Título: Formulaciones instantáneas de enzimas para la alimentación de animales
- (30) Prioridad:

18.05.1999 DE 19922753

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 21.03.2014

(73) Titular/es:

BASF SE (100.0%) 67056 Ludwigshafen, DE

(72) Inventor/es:

HARZ, HANS-PETER; BETZ, ROLAND; HEINZL, WOLFGANG y GAUS, GÜNTER

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

DESCRIPCIÓN

Formulaciones instantáneas de enzimas para la alimentación de animales

La presente invención se refiere a formulaciones instantáneas de enzimas novedosas, a procedimientos para su preparación y a su uso para la alimentación de animales.

Las enzimas se emplean ampliamente en la alimentación de animales. Las enzimas se utilizan con el objetivo de aumentar la biodisponibilidad de determinados nutrientes o para mejorar la explotabilidad de piensos. Así, se utiliza por ejemplo la enzima fitasa para liberar el fósforo unido en fitato y garantizar de este modo su biodisponibilidad. Se conoce además agregar enzimas NSP (*Non Starch Polysaccarids*, (polisacárido no almidón) a los piensos, para reducir, entre otras cosas, la viscosidad del pienso en el tubo digestivo y mejorar de este modo la explotabilidad del pienso.

Sin embargo, los piensos mezclados con una preparación enzimática se peletizan con frecuencia, se expanden o extruyen, mediante lo cual, debido a las temperaturas resultantes relativamente elevadas, la actividad enzimática se reduce o destruye por completo. Para evitar esta desventaja, se pulverizan enzimas en forma de formulaciones líquidas sobre el pienso ya peletizado.

Sin embargo, el uso de preparaciones enzimáticas líquidas tiene también desventajas. Debido al alto contenido en agua o a la alta actividad acuosa, las formulaciones enzimáticas de este tipo pueden estabilizarse solamente con gran dificultad. Frecuentemente se observa una pérdida de actividad considerable, un número de gérmenes creciente así como un empeoramiento de la apariencia de la preparación durante el almacenamiento. En particular, debido a fluctuaciones de temperatura, se puede observar frecuentemente una precipitación de las enzimas u otras proteínas contenidas en la misma. Además de la estabilidad en almacenamiento insuficiente, la baja actividad por unidad de volumen en las formulaciones líquidas representa una grave desventaja.

Por el documento WO 97/12958 se conocen microgranulados que contienen enzimas que se obtienen mediante aglomeración. Comprenden una preparación enzimática aplicada sobre un soporte y por lo menos un aglutinante o agente acelerador de descomposición. Los granulados están, además, revestidos con polímero y tienen un tamaño de grano inferior a 0,4 mm. El contenido en enzima para una composición típica asciende a menos del 40 % en peso. En ese documento no se describe la preparación de una formulación instantánea de enzimas, que sea adecuada en particular como aditivo para piensos de manejo fácil.

Por consiguiente, es un objetivo proporcionar una formulación enzimática mejorada que evite las desventajas descritas anteriormente de las formulaciones líquidas. En particular, se prepararán formulaciones enzimáticas que presenten un alto contenido en enzimas y en particular una alta actividad enzimática por unidad de volumen, que sean estables en almacenamiento y que pueden aplicarse a los piensos de manera sencilla.

Sorprendentemente este objetivo pudo resolverse mediante la provisión de formulaciones instantáneas de enzimas sólidas.

Los polvos instantáneos de enzimas de acuerdo con la invención presentan una serie de ventajas decisivas:

En las instalaciones del usuario, pueden convertirse rápidamente en una formulación líquida debido a su alta solubilidad o capacidad de dispersión en medio acuso. Las excelentes propiedades instantáneas garantizan una disolución rápida sin complejidad técnica particular. Después de su disolución en medio líquido como por ejemplo agua, una solución acuosa o dispersión, las preparaciones de acuerdo con la invención pueden aplicarse de manera convencional a los piensos. Puesto que las preparaciones enzimáticas de acuerdo con la invención se encuentran en forma aglomerada, pueden manejarse de manera en particular adecuada. En particular, tienen una excelente fluidez, son prácticamente libres de polvo y no tienen tendencia a aglutinarse durante la disolución. Sin embargo, es de particular importancia que, en comparación con preparaciones líquidas, presentan una estabilidad en almacenamiento claramente mejorada. Además, tienen una actividad enzimática relativamente elevada por unidad de volumen, mediante lo cual se consigue minimizar los costes de almacenamiento y de transporte.

Las formulaciones instantáneas de enzimas de acuerdo con la presiente invención se preparan de manera novedosa mediante aglomeración.

Por lo tanto, un primer objeto de la invención es un procedimiento para la preparación de una formulación instantánea de enzimas, caracterizada porque

a) se disponee un material en polvo, que se selecciona entre

25

30

50

- i) una preparación enzimática soluble en medio acuoso, que puede obtenerse mediante secado por pulverización de una solución que contiene enzimas, y
- ii) mezclas de i) y un soporte orgánico o inorgánico soluble o dispersable en medio acuoso;

У

5

15

35

40

45

50

55

b) se aglomera el material en polvo mediante el pulverización simultánea o escalonada en el tiempo de uno o varios medios de pulverización para formar un polvo instantáneo, seleccionándose los medios de pulverización entre soluciones enzimáticas, soluciones de aglutinantes, dispersiones de aglutinantes y soluciones enzimáticas que contienen aglutinante,

aglomerándose hasta un tamaño de grano medio de 0,8 a 8 mm, y presentando la formulación instantánea obtenida un porcentaje de proteína de aproximadamente el 50-95 % en peso, con respecto al peso total de la formulación.

El procedimiento de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo tanto de manera continua o como discontinua (por lotes).

10 Una primera variante preferida del procedimiento de acuerdo con la presente invención se refiere a la preparación discontinua de un polvo instantáneo.

Se aglomera por lotes en lecho fluidizado usando un material en polvo de acuerdo con la definición anterior. En este caso se dispone este polvo en un lecho fluidizado. La fluidificación se realiza, por ejemplo, mediante la alimentación de aire precalentado. Se pulveriza una solución que contiene enzima en el lecho fluidizado, mediante lo cual el polvo se humedece con esta solución y se aglomera cada vez más debido a sus propiedades adhesivas. La pulverización en el lecho fluidizado puede realizarse desde arriba (procedimiento de pulverización superior) o desde abajo (procedimiento de pulverización inferior). Si se logra el tamaño de aglomerado deseado, o cuando se alcanza la actividad o cantidad enzimática deseada, el producto se descarga de la secadora y se clasifica, por ejemplo, con ayuda de un tamiz.

Para lograr la mayor actividad posible en el polvo instantáneo, en el modo de proceder por lotes, la introducción de soporte debe mantenerse lo más baja posible y el lecho fluidizado al final del procedimiento debe llevarse en la medida de lo posible hasta la altura de llenado máxima. El modo de proceder específico del lecho fluidizado depende de la altura de llenado respectiva. Con una altura de llenado creciente durante el procedimiento, aumentan también la cantidad de aire y la tasa de pulverización. Al principio del procedimiento, preferentemente, se debe asegurar una cantidad mínima de material introducido puesto que de otra forma pueden surgir problemas, por ejemplo, debido a la pegajosidad y a la formación de grumos en el producto. Los parámetros individuales de procedimiento deben adaptarse cuidadosamente a la altura de llenado respectiva en el lecho fluidizado durante la duración del procedimiento. En caso de un modo de proceder demasiado seco, se aglomera demasiado poco, y en caso de un modo de proceder demasiado húmedo, el producto se pega considerablemente, lo que resulta en la formación de grumos y el pegado del aparato.

El material introducido en el lecho fluidizado puede ser también una preparación enzimática en polvo obtenida mediante secado por pulverización, que se aglomera previamente antes de la pulverización de la solución enzimática.

El secado por pulverización de las preparaciones enzimáticas líquidas puede llevarse a cabo de manera convencional. Para ello, la solución enzimática se bombea hacia el atomizador en la torre de pulverización. La atomización se realiza, por ejemplo, a través de una boquilla de presión (boquilla de componente único) o una boquilla de dos componentes o un atomizador centrífugo. El secado de las gotas se realiza a través de una corriente de aire caliente que pasa a la secadora por pulverización. Cuando se utilizan atomizadores centrífugos, el secado se realiza preferentemente en un flujo en el mismo sentido. En el caso de boquillas, el secado puede también realizarse en flujo a contracorriente o flujo mixto. El polvo puede ser descargado en la torre o puede arrastrarse por la corriente de aire y separarse en un ciclón y/o filtro. Según el producto y el modo de proceder, puede ser necesario un secado posterior, que puede realizarse en un lecho fluidizado interno integrado en la secadora por pulverización o en un lecho fluidizado externo.

Una variante preferida adicional del procedimiento de acuerdo con la invención se refiere a la aglomeración de lecho fluidizado continua sin utilizar un soporte orgánico o inorgánico mediante el pulverización continuo de una solución enzimática. Para ello, en una secadora de lecho fluidizado, al principio del procedimiento, se introduce un material en polvo, por ejemplo un polvo de enzima obtenido por secado por pulverización. La fluidificación se realiza, por ejemplo, mediante la alimentación de aire precalentado. Una solución que contiene enzima se pulveriza en el lecho fluidizado, mediante lo cual el polvo introducido se humedece con esta solución y se aglomera cada vez más debido a sus propiedades adhesivas. Simultáneamente, una cantidad parcial de aglomerado se descarga de el lecho fluidizado de manera continua o semicontinua, es decir a intervalos por ciclos. La cantidad de aglomerado que se descarga corresponde aproximadamente a la cantidad de enzima que se alimenta a través de la boquilla de pulverización, corregida por el contenido diferente de disolvente en la solución de pulverización o en el aglomerado. En este modo de proceder, por consiguiente, el material debe ser introducido solamente una vez durante el arranque del procedimiento. La descarga se clasifica, por ejemplo, con ayuda de un tamiz. El material grueso que se produce durante puede molerse y recircularse continuamente al lecho fluidizado. Las fracciones finas como por ejemplo, de la unidad de filtro de aire de escape, pueden recircularse también continuamente.

De acuerdo con una variante adicional de procedimiento, la preparación del aglomerado de acuerdo con la invención

se realiza de manera continua, concretamente con alimentación continua de un material de introducción en polvo seco, tal como por ejemplo, un polvo de enzima, en la secadora de lecho fluidizado.

Para ello son adecuadas en particular secadoras de lecho fluidizado con varias zonas de pulverización y, dado el caso, zonas de secado. En la primera zona, el soporte o el polvo de enzima seco se alimenta y fluidifica, y se pulveriza una solución enzimática y/o aglutinante. El aglomerado formado en esta zona se transfiere a la zona siguiente. En esta zona y posiblemente en una o varias zonas adicionales, una solución de enzima y/o solución de aglutinante de la misma composición o de composición diferente puede también pulverizarse. El agua se retira de la solución enzimática o de aglutinante pulverizada mediante una corriente de aire de alimentación común a todas las zonas o corrientes de aire de alimentación separadas correspondientemente calentadas. En una o varias de las últimas zonas, se puede llevar a cabo un secado posterior. La descarga de producto se realiza también aquí. El tratamiento del producto se realiza de tal como se describe anteriormente.

5

10

35

40

45

50

55

Una variante de procedimiento preferida adicional comprende un secado por pulverización de solución enzimática acoplado con la aglomeración posterior del polvo de enzima secado por pulverización. Esto puede llevarse a cabo de manera discontinua o continua. Se prefiere el modo de proceder continuo.

Procedimientos de este tipo pueden llevarse a cabo utilizando instalaciones de secado por pulverización convencionales. De manera ventajosa, sin embargo, la realización se realiza en dispositivos que se conocen como FSD (Fluidized Spray Dryer (secadora de pulverización fluidificada)), SBD (Spray Bed Dryer (secadoras de lecho de pulverización)) o MSD (Multi Stage Dryer (secadora de etapas múltiples)).

En esta variante de procedimiento es ventajoso que se produzcan partículas más grandes por secado por pulverización (diámetro medio > 80 um). La fracción de finos resultante del polvo puede reincorporarse ya al 20 procedimiento en la secadora de pulverización, cuando esta, por ejemplo después de separación en un ciclón o filtro, se recircula a la zona húmeda de la secadora. La verdadera aglomeración tiene lugar entonces en una etapa adicional en un lecho fluidizado. Esta etapa puede estar integrada en la secadora de pulverización (lecho fluidizado interno) o bien puede llevarse a cabo en un aparato separado (lecho fluidizado adicional). En el lecho fluidizado se 25 inyecta una solución enzimática con secado simultáneo, una solución enzimática que contiene además aglutinante o solamente aglutinante en forma dispersa o disuelta. El polvo preparado por el secado por pulverización contiene una enzima que preferentemente es idéntica a la enzima pulverizada. La composición y cantidad de los líquidos inyectados depende de las propiedades adhesivas de la solución pulverizada, el tamaño de aglomerado que se debe de lograr y las condiciones de procedimiento. Con respecto al polvo a aglomerar, la cantidad de solución de 30 pulverización, es decir, la cantidad de líquido inyectado, puede ser de aproximadamente el 10 al 200 %. Según la cantidad pulverizada, puede ser necesario un secado posterior en una etapa adicional. El tratamiento del producto se realiza entonces de la manera descrita anteriormente.

Parámetros de procedimiento preferidos adicionales del procedimiento de acuerdo con la invención:

debido al carácter lábil generalmente a altas temperaturas de las enzimas pulverizadas, el control de la temperatura del producto es especialmente importante durante el procedimiento de acuerdo con la invención. Debe seleccionarse de tal manera que sea la más baja posible puesto que con la temperatura y/o duración del procedimiento de secado por pulverización y procedimiento de aglomeración creciente, se incrementan las pérdidas de actividad. Típicamente, la temperatura de producto durante el secado por pulverización, es decir, la temperatura del polvo secado por pulverización sólido, es de aproximadamente 50 a 75 °C, en particular inferior a aproximadamente 70 °C, frecuentemente inferior a 60 °C. Cuando mayor sea el tiempo de permanencia en el lecho fluidizado, más baja debe seleccionarse la temperatura.

La temperatura de producto durante la aglomeración y el secado en el lecho fluidizado, es decir, la temperatura del aglomerado que se encuentra en el lecho fluidizado debe seleccionarse para que sea baja debido al tiempo de permanencia más largo en el dispositivo y se encuentra en valores de aproximadamente 30 a 50 $^{\circ}$ C, en particular inferior a 45 $^{\circ}$ C y preferentemente inferior a 40 $^{\circ}$ C.

Para reducir el contenido en humedad residual adicionalmente, se prefiere llevar a cabo una etapa de secado posterior. También durante el secado posterior, la temperatura de producto debe encontrarse también dentro del intervalo mencionado anteriormente y en particular debe ser de 50 °C o menos. Mediante el secado posterior se disminuye el contenido en humedad residual en las preparaciones de acuerdo con la invención hasta valores menores que aproximadamente el 15 % en peso, preferentemente de aproximadamente el 2 al 10 % en peso.

El secado durante la aglomeración o durante el secado posterior se logra mediante la utilización de aire de alimentación precalentado. La temperatura de aire de alimentación que puede ser diferente según la temperatura de producto preestablecida seleccionada, la cantidad de aire y la tasa de pulverización, se encuentra generalmente en un intervalo de 30 a 80 °C. El secado posterior se realiza a una temperatura más baja, concretamente, en un intervalo de aproximadamente 35 a 55 °C.

La duración de la aglomeración depende también del tamaño del lote seleccionado pero se encuentra aproximadamente en un intervalo de una o varias horas.

Para mejorar adicionalmente la calidad del producto puede ser ventajoso dotar al aglomerado resultante de un recubrimiento soluble en agua. De esta manera se impide en gran medida la formación de producto sometido a abrasión y por consiguiente formación de polvo. Debido al potencial alergénico de ciertas enzimas, dicha medida es especialmente interesante. Ejemplos de materiales de recubrimiento adecuados son los aglutinantes descritos anteriormente, tales como por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa y polivinilpirrolidona, o polietilenglicoles y polímeros de bloque de polioxietileno y polioxipropileno. El procedimiento de recubrimiento puede llevarse a cabo, por ejemplo, en un lecho fluidizado, en particular si para aplicar el recubrimiento se utiliza una solución o suspensión de los materiales de recubrimiento, por ejemplo los materiales mencionados anteriormente. Las soluciones o dispersiones utilizadas tienen un contenido en agente de recubrimiento en un intervalo de aproximadamente el 5 al 50 % en peso, con respecto al peso total de la solución o dispersión. Si se emplean masas fundidas, tal como por ejemplo masas fundidas de PEG (polietilenglicol) o polímeros de bloque de polioxietileno y polioxipropileno, es conveniente efectuar la etapa de recubrimiento en un lecho fluidizado o una mezcladora, por ejemplo, una mezcladora de rejilla de la empresa Lödige.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Después de la aplicación del recubrimiento, puede ser necesario un nuevo secado. En este caso, la temperatura de producto debe encontrarse en el intervalo de aproximadamente 30 a 50 °C.

El porcentaje en peso del material de recubrimiento en el producto final es de aproximadamente el 5 al 20 %, con respecto al peso total de la formulación instantánea.

El material de introducción utilizado de acuerdo con la invención para la aglomeración se selecciona preferentemente entre polvos inorgánicos solubles en agua o que pueden dispersarse en agua inertes, polímeros orgánicos solubles en agua o que pueden dispersarse en agua, en polvo, o bien preparaciones enzimáticas en polvo, preferentemente solubles en agua. Un soporte "inerte" o un material de introducción "inerte" no debe presentar ninguna interacción perjudicial con la(s) enzima(s) de la formulación instantánea, por ejemplo, provocar una inhibición reversible de la actividad enzimática, y debe ser seguro para su uso como agente auxiliar en un aditivo para piensos. Además, debe poseer una distribución de tamaños de grano adecuada para la graduación de lecho fluidizado. El tamaño medio de partículas (diámetro medio) es de aproximadamente 30 a 300 μm, preferentemente de aproximadamente 50 a 200 μm. En principio, la aglomeración es también posible utilizando partículas más grandes; sin embargo, esto provoca la formación de aglomerados más grandes que tienen un mayor tiempo de disolución.

Como ejemplos de soportes inorgánicos de bajo peso molecular adecuados o materiales de introducción han de mencionarse cloruro de sodio, carbonato de calcio, sulfato de sodio y sulfato de magnesio. Como ejemplos de polvos orgánicos adecuados han de mencionarse, en particular, azúcares, tales como por ejemplo glucosa, fructosa, sacarosa, así como dextrinas y productos de degradación de almidón. Como ejemplos de soportes de polímero orgánicos han de mencionarse, en particular, preparaciones de almidón y de celulosa, en particular almidón de maíz.

La solución enzimática utilizada de acuerdo con la invención para el secado por pulverización o aglomeración contiene por lo menos una enzima que puede ser empleada como aditivo para piensos, disuelta en una fase acuosa, tal como por ejemplo agua desmineralizada, libre de gérmenes. La solución tiene un porcentaje de proteína en un intervalo de aproximadamente el 1 al 50 % en peso, preferentemente de aproximadamente el 10 al 35 % en peso, con respecto al el peso total de la solución. El valor de pH se encuentra generalmente en un intervalo de aproximadamente 4 a 9. La solución puede contener otros aditivos habituales. Como ejemplos han de mencionarse: tampones tales como por ejemplo tampón de fosfato; estabilizadores de enzima, tales como por ejemplo sales de metales alcalinos o sales de metales alcalinotérreos tales como por ejemplo sulfato de sodio o sulfato de magnesio; solubilizantes tales como por ejemplo etanol o agentes tensioactivos y similares.

En el caso en el que las propiedades adhesivas de la solución de enzima pulverizada y el soporte en polvo introducido no sean suficientes para asegurar que las partículas se peguen de manera estable después del pulverización, el uso adicional de un aglutinante es ventajoso. De este modo se evita que los aglomerados se disgreguen otra vez durante el secado. En estos casos, se prefiere pulverizar en el lecho fluidizado un aglutinante que sea soluble o que pueda dispersarse en un medio acuoso. El aglutinante puede ser pulverización o bien disuelto en la solución enzimática a pulverizar o bien por separado, de manera simultánea o de manera escalonada en el tiempo. Como ejemplos de aglutinantes adecuados han de mencionarse soluciones de hidratos de carbono, tales como por ejemplo, glucosa, sacarosa, dextrinas, entre otros, alcoholes de azúcar tales como por ejemplo manitol, o soluciones de polímero, tales como por ejemplo soluciones de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), polivinilpirrolidona (PVP), celulosa etoxilada (EC), etilcelulosa o propilcelulosa. Mediante la elección controlada de cantidad y propiedades adhesivas del aglutinante pulverización, se forman aglomerados de tamaños y resistencia diferentes.

Si el aglutinante se pulveriza en una mezcla con la enzima, el contenido en aglutinante se encuentra habitualmente en un intervalo de aproximadamente el 0,5 al 20 % en peso, preferentemente de aproximadamente el 1 al 10 % en peso, con respecto al peso total de la solución.

Si el aglutinante se pulveriza como solución separada, el contenido en aglutinante en la solución se encuentra en un intervalo de aproximadamente el 1 al 30 %, con respecto al peso total de la solución. El aglutinante se presenta en este caso también disuelto en un medio acuoso, preferentemente agua desmineralizada estéril. Aditivos habituales,

por ejemplo aglutinantes o solubilizadores, pueden también estar presentes.

5

10

20

25

30

35

50

El porcentaje del aglutinante en el producto final es de acuerdo con la invención del 0 a aproximadamente el 20 % en peso, por ejemplo de aproximadamente el 1 al 6 % en peso. La cantidad óptima depende también del tipo de aglutinante seleccionado. Se debe tomar cuidado de evitar efectos adversos sobre el producto, tales como por ejemplo, sus propiedades de solución, claridad de la solución después de la disolución del polvo instantáneo.

Son también objeto de la invención las formulaciones instantáneas de enzimas que pueden obtenerse con ayuda de los procedimientos descritos anteriormente.

Son objeto de la invención en particular formulaciones instantáneas de enzimas que comprenden un material en polvo aglomerado que se selecciona entre

- i) una preparación enzimática soluble en medio acuoso, que puede obtenerse mediante secado por pulverización de una solución que contiene enzimas, y
 - ii) mezclas de i) y un soporte orgánico o inorgánico soluble o dispersable en medio acuoso;

presentando esta un porcentaje de proteína de aproximadamente el 50-95 % en peso, con respecto al peso total de la formulación y presentando sus partículas de aglomerado un tamaño de grano medio de 0,8 a 8 mm.

15 Este material en polvo ha sido aglomerado utilizando un agente de aglomeración, preferentemente una enzima, un aglutinante o una mezcla de enzima-aglutinante.

Preferentemente, se preparan formulaciones enzimáticas cuyas partículas de aglomerado tienen un tamaño de grano medio de hasta aproximadamente 6 mm, en particular hasta 3 mm.

Además las formulaciones instantáneas de acuerdo con la invención presentan un alto porcentaje de proteína enzimáticamente activa.

Las formulaciones instantáneas de acuerdo con la invención contienen por lo menos una enzima que se selecciona entre oxidorreductasas, transferasas, liasas, isomerasas, ligasas e hidrolasas. Ejemplos de hidrolasas, es decir, enzimas que disocian hidrolíticamente enlaces químicos, son esterasas, glicosidasas, éter hidrolasas, proteasas, amidasas, aminidasas, nitrilasas y fosfatasas. Las glicosidasas comprenden tanto las endoglucosidasas como las exoglucosidasas que disocian tanto los enlaces α -glicosídicos como β -glicosídicos. Ejemplos típicos de éstas son amilasas, maltasas, celulasas, endoxilanasas, β -glucanasas, mananasas, lisozimas, galactosidasas, β -glucuronidasas y similares. Se prefieren en particular las enzimas de disociación de polisacárido no almidón, como por ejemplo amilasa, glucanasa y xilanasa, así como fosfatasas, en particular fitasa. Las formulaciones instantáneas de enzimas en particular preferidas contienen de 1 x 10 4 a 1 x 10 5 U de fitasa por gramo de peso total de formulación. 1 U de fitasa se define a este respecto como la liberación de 1 micromol de fosfato inorgánico por minuto a partir de un exceso de fitato.

Según el modo de proceder del procedimiento de preparación de acuerdo con la invención, las formulaciones instantáneas se estructuran de manera diferente. Algunas estructuras típicas se mencionan a modo de ejemplo:

- aglomerado de partículas de un soporte orgánico o inorgánico, aglomerado con por lo menos una enzima, dado el caso dotado de un recubrimiento.
- aglomerado de partículas de un soporte orgánico o inorgánico, aglomerado con por lo menos una mezcla enzima/aglutinante, dado el caso dotado de un recubrimiento,
- aglomerado de partículas de una preparación enzimática seca, aglomerado con por lo menos una enzima igual
 o diferente, dado el caso dotado de un recubrimiento.
- aglomerado de partículas de una preparación enzimática seca, aglomerado con una mezcla de por lo menos un aglutinante y por lo menos una enzima idéntica o diferente, dado el caso dotado de un recubrimiento.
 - aglomerado de partículas de una preparación enzimática seca, aglomerado con por lo menos un aglutinante, dado el caso dotado de un recubrimiento.

Si se desea, en los productos secos de la invención, otros constituyentes pueden estar presentes, tales como aditivos relevantes para la alimentación, por ejemplo vitaminas, aminoácidos, oligoelementos o conservantes.

Son también objeto de la invención formulaciones instantáneas enzimáticas del tipo descrito anteriormente, envasadas en porciones en bolsas de lámina solubles. El tamaño de la porción puede seleccionarse libremente en principio, pero generalmente se encuentra en un intervalo de aproximadamente 100 g a 2000 g. Las láminas solubles en agua que pueden utilizarse para hacer las porciones se conocen del estado de la técnica y se encuentran disponibles en el comercio. Preferentemente, se utilizan láminas de poli(alcohol vinílico) que están comercializadas en varios grados de calidad, por ejemplo, bajo los nombres comerciales Hydrosol® o Solublon®. El

tiempo de disolución para láminas de este tipo es del orden de magnitud de aproximadamente 3 minutos. El espesor de lámina depende del tamaño de la porción. Una lámina de 30 µm puede emplearse, por ejemplo, para envasar una porción de 500 g. Una o varias bolsas de lámina pueden dotarse de manera conveniente de un envase externo forrado de aluminio con el objeto de evitar la penetración de humedad en la película.

- Un objeto adicional de la invención son composiciones para piensos que, además de los constituyentes para piensos habituales comprenden por lo menos una formulación instantánea de enzimas de acuerdo con la invención como mezcla. Son objeto de la invención también una composición para pienso en la que se ha aplicado por lo menos una de las formulaciones instantáneas de enzimas descritas anteriormente después de la disolución o dispersión en una fase acuosa.
- 10 Un objeto adicional de la presente invención refiere al uso de formulaciones instantáneas de enzimas de acuerdo con la invención como aditivos para piensos.

La presente invención se describe a continuación en más detalle por medio de los siguientes ejemplos no limitativos y las figuras adjuntas.

En la figura 1 se muestra esquemáticamente una instalación de secadora de lecho fluidizado para la preparación 15 discontinua de un polvo instantáneo de enzima soportado. Aire L, que ha sido precalentado por el calentador 6, se introduce desde abajo utilizando el ventilador 5 en una secadora de lecho fluidizado 1 equipada con un filtro interno 2 y una placa perforada 3. A través de la alimentación de producto 4, se dispone una carga de material de soporte T al principio del proceso en la secadora de lecho fluidizado 1 y se fluidifica mediante aire precalentado. En la secadora de lecho fluidizado, por encima del lecho fluidizado se pulveriza en el lecho fluidizado formado de esta 20 manera una solución de enzima E, que dado el caso está mezclada con aglutinante, mediante el dispositivo de pulverización 7 con ayuda de aire comprimido D. Tan pronto como la cantidad deseada ha sido pulverizada, la alimentación de solución de enzima E se interrumpe, el aglomerado bruto se seca posteriormente dado el caso en lecho fluidizado y se conduce a través de la descarga de producto 9 fuera de la secadora de lecho fluidizado 1 al dispositivo de tamizado 10, en donde se separa en material grueso G y producto P que tiene el tamaño de grano 25 deseado. El aire de salida de proceso A, después de pasar a través del filtro interno 2, pasa a través de la línea de salida A hacia el filtro de aire de salida 11, se libera ahí de partículas muy finas que se recogen en el recipiente 12 y se retira del sistema por medio del ventilador 13.

La figura 2 muestra una modificación de la instalación de lecho fluidizado de acuerdo con la figura 1, diseñado para funcionamiento continuo. A diferencia del dispositivo de acuerdo con la figura 1, en la secadora de lecho fluidizado 1 se dispone un material de soporte V al principio del proceso de preparación continuo. En este caso se trata preferentemente de un polvo de enzima ya secado, que se fluidifica posteriormente, tal como se describe en la figura 1, mediante el soplado de aire precalentado, y se pulveriza con una solución enzimática E y se aglomera. A diferencia del modo de proceder mostrado en la figura 1, en este caso el aglomerado formado no se descarga a través de la línea de salida 9 de manera discontinua, sino que se descarga continuamente de manera correspondiente con la cantidad de enzima pulverizada y se procesa en el tamiz 10 tal como se describe anteriormente.

30

35

40

45

50

55

60

La figura 3 muestra una instalación de lecho fluidizado de varias etapas para la preparación continua de un polvo instantáneo de acuerdo con la invención. La secadora de lecho fluidizado 21, equipada con una placa perforada 23, se divide en su región de base en las zonas a, b, c, d y e con ayuda de paredes de división 22 verticales, que se proyectan por encima de la parte superior de la base. Tres dispositivos de pulverización 27 idénticos están asociados a las zonas de pulverización a, b y c, que sobresalen desde la parte superior hacia la secadora de lecho fluidizado y a través de los cuales las soluciones enzimáticas E de composiciones idénticas o diferentes se pulverizan utilizando aire comprimido D. Las zonas pulverización van seguidas de las zonas de secado d y e. Las zonas a, b, c, d y e están diseñadas abiertas hacia arriba, definiendo paredes de separación que sobresalen por encima de la placa perforada 23 las distintas zonas del lecho fluidizado. Las paredes de separación pueden estar diseñadas como vertedores de rebose o corriente de fondo. El material de soporte T, que puede ser o bien un polvo orgánico o inorgánico o bien un polvo de enzima secado por pulverización, se alimenta a través de la línea de alimentación 24 a la zona a y se fluidifica en la misma. La fluidifificación se realiza utilizando aire L, que se aspira a través de un ventilador 25, se precalienta en el calentador 26 y se introduce en la zona "a" desde abajo. Mediante la pulverización de la solución enzimática E, se produce una aglomeración en la zona "a". De la misma manera, una solución enzimática E se pulveriza en las zonas "b" y "c". La fluidificación se lleva a cabo en estas zonas utilizando aire apropiadamente precalentado, efectuándose también en ellas una aglomeración adicional. Una parte del agua, como también en la zona "a" se elimina mediante aire calentado. Las zonas "d" y "e" están diseñadas como zonas de secado puro. El aglomerado terminado se descarga de la zona "e" a través de la conducción de salida 29 y se separa utilizando el tamiz 210 en material grueso G y producto P que tiene el tamaño deseado de partículas. El aire de escape A se expulsa de la secadora 21 a través de la conducción 28, se libera de partículas finas en el filtro de aire de escape 211 y se retira del proceso por medio del ventilador 213. Las partículas finas separadas se reúnen en el recipiente 212.

La figura 4 muestra una representación esquemática de una instalación de secado de secadora de pulverización fluidificada (FSD) para la preparación continua de un polvo instantánea de enzimas de acuerdo con la invención. En

este caso, una solución enzimática E se conduce a través de la conducción de alimentación 31 a la parte superior de la secadora FSD 30 y se atomiza con la ayuda del atomizador 32. El secado se realiza mediante la introducción de aire en un flujo en el mismo sentido a través del sistema de conducción 33. El aire se precalienta en este caso mediante el calentador 34. El polvo de enzima secado por pulverización se recoge en el lecho fluidizado integrado 38a en el fondo de la secadora de tipo FSD 30 y ahí se pulveriza con la solución enzimática E y/o el aglutinante B utilizando un dispositivo de pulverización 35, usando aire comprimido D, y se fluidiza con aire introducido. El aire se precalienta para ello utilizando el calentador 37 y se alimenta a través de la conducción de alimentación 36 por debajo del fondo de entrada del lecho fluidizado integrado 38a. El preaglomerado VA resultante llega a continuación a un lecho fluidizado externo 38b, aguas abajo,. En el lecho fluidizado 38b se introduce desde abajo a través de la alimentación 39 aire que se ha precalentado previamente por medio del calentador 40. El preaglomerado VA dispuesto en el lecho fluidizado se pulveriza de nuevo con una solución enzimática E y/o aglutinante B con ayuda del dispositivo de pulverización 41, utilizando aire comprimido D, y se aglomera para formar el producto acabado. El aglomerado acabado se descarga del lecho fluidizado y puedeprocesarse adicionalmente (no mostrado) tal como se ha descrito anteriormente. El aire de escape procedente del lecho fluidizado 38b y de la secadora de tipo FSD 30 se conduce a través del sistema de conducción 42, 43, 44 al ciclón 45 y se separa allí del material fino, que se recircula a través de la conducción 46 a la secadora 30. El aire de escape purificado previamente se retira del proceso a través de la conducción 47 después de pasar a través del filtro 48.

Los productos instantáneos de acuerdo con la invención preparados con ayuda de dispositivos de acuerdo con las figuras 1 a 4 pueden dotarse de un recubrimiento externo adicional en una etapa adicional de procesamiento. El dispositivo que puede emplearse para este fin es prácticamente idéntico a la instalación que funciona de manera discontinua mostrada en la figura 1. En lugar de material de soporte T, se introduce para ello un aglomerado enzimático en la secadora de lecho fluidizado 1, se fluidifica utilizando aire precalentado y se calienta simultáneamente. En lugar de una solución enzimática E, se pulveriza una solución de recubrimiento por medio del dispositivo de pulverización 7. El aglomerado recubierto de esta forma, dado el caso después de enfriamiento posterior y secado, se retira de la secadora de lecho fluidizado 1 y se libera de material de grueso G en el tamiz 10. El aire de escape de proceso se trata tal como se describe en la figura 1.

Ejemplo 1:

5

10

15

20

25

40

45

50

Aglomeración en el lecho fluidizado con soporte inorgánico dispuesto (modo de proceder en lotes)

Como soporte (800 g) se usó fracción de tamiz de sulfato de sodio (< 150 μm, anhidro). En la solución enzimática (fitasa; materia seca 25,2 %; 15500 U/g) se disolvió MgSO₄*7H₂O al 20 %. El soporte se dispuso previamente en el lecho fluidizado y la solución enzimática (7900 g) se pulverizó hasta lograr la actividad final deseada y el tamaño deseado de aglomerado.

En el ensayo se utilizó un lecho fluidizado de laboratorio de Niro-Aeromatic, tipo MP-1, con un cono de plexiglas grande (diámetro de placa de insuflación: 170 mm) y una placa perforada que tenía 16 % de área libre).

35 Se pulverizó con una boquilla de dos componentes de 1,2 mm que, al principio, estaba instalada en la posición inferior del cono y después, con un lecho fluidizado más alto, en la posición superior del cono (procedimiento de pulverización superior). La solución se dosificó con una bomba de membrana de la empresa ProMinent.

La duración de pulverización ascendió a aproximadamente 4 horas, a continuación se secó adicionalmentedurante aproximadamente 1 h. La temperatura del aire alimentado, que fue diferente según la temperatura de producto preestablecida, cantidad de aire y tasa de pulverización, estaba entre 52 y 56 °C durante la primera hora, después a 50 °C, elevándose lentamente hasta 65 °C al final de la pulverización. Durante el secado adicional, la temperatura del aire de alimentación cayó nuevamente hasta 42 °C. La cantidad de aire fue de 40 m³/h al principio, y se elevó después de manera escalonada hasta 120 m³/h al final del pulverización. Durante el secado adicional, se trabajó con 80 m³/h. La tasa de pulverización al principio fue de aproximadamente 230 g/h, después se incrementó paulatinamente hasta aproximadamente 3500 g/h al final del pulverización. Al principio, la presión de pulverización fue de 0,12 MPa, y después se incrementó paulatinamente hasta llegar a 0,18 MPa después de 2 horas de tiempo de pulverización.

La aglomeración empezó después de aproximadamente 1,5 h y se aglomeró cada vez más con una duración de pulverización adicional. La descarga de producto fue gruesa y se aglomeró de manera relativamente uniforme y no contenía apenas fracción de finos. Se descargaron 3700 g de producto con una humedad residual del 10 %.

Se obtiene un polvo instantáneo con los siguientes datos característicos:

humedad residual : del 6 al 12 %

actividad : de 22000 a 25000 U/g (aun mayor con soluciones enzimáticas

(fitasa) con alta actividad)

55 comportamiento de polvo : prácticamente libre de polvo con observación visual

comportamiento de fluidez : fluye libremente con observación visual

apariencia : aglomerado grueso, uniforme y de color parduzco,

eventualmente con algunos pequeños grumos que pueden

eliminarse por tamizado

diámetro de partícula medio : 1900 μm

Ejemplo 2:

15

20

25

30

45

50

55

Aglomeración de un polvo de enzima en lecho fluidizado con aglutinante (modo de proceder en lotes)

En comparación con el proceso de acuerdo con el ejemplo 1, en lugar de material de soporte inerte, se utilizó un polvo de fitasa (600 g; 33000 U/g, humedad residual 14 %; dado el caso aglomerado finamente) como material introducido en el lecho fluidizado. En el caso del polvo de enzima se trata de un polvo seco que se obtuvo mediante secado por pulverización. La solución de pulverización empleada fue una solución de fitasa (600 g; materia seca 25,2 %; 15500 U/g de actividad). Después de pulverizar la solución de fitasa sobre el polvo de fitasa dispuesto, se pulverizó inmediatamente una solución de HPMC (17 g de HPMC en 153 g de agua desmineralizada) como adlutinante sobre la mezcla aglomerada en condiciones húmedas y el polvo de enzima se aglomeró adicionalmente.

En el ensayo se utilizó un lecho fluidizado de laboratorio de Niro-Aeromatic, tipo MP-1 que tenía un cono de plexiglas grande (diámetro de placa de insuflación: 170 mm) y una placa perforada que tenía un área libre del 12 %. Se pulverizó con una boquilla de dos componentes de 1,0 mm que estaba instalada en el cono en la posición inferior (procedimiento de pulverización superior). Las soluciones se agregaron utilizando una bomba de membrana de la empresa ProMinent.

La duración de pulverización de la solución de pulverización que contenía enzima ascendió a 30 minutos (tasa de pulverización: aproximadamente 1500 g/h) y la solución de pulverización que contenía aglutinante a 26 minutos (tasa de pulverización: aproximadamente 1700 g/h). A continuación se secó adicionalmente durante 30 minutos y se enfrió durante 26 minutos. La temperatura del aire alimentado se reguló de acuerdo con la temperatura de producto con un valor preestablecido de 40 °C. La temperatura de aire de alimentación, que fue diferente según cantidad de aire y tasa de pulverización, fue de 80 a 85 °C durante el pulverización. Durante el secado adicional, la temperatura del aire de alimentación se redujo hasta 41 °C. La cantidad de aire fue de 25 m³/h al principio, y después se aumentó progresivamente, conforme al incremento del tamaño de las partículas, hasta 70 m³/h al final de la pulverización y fue de 25 m³/h durante el secado adicional y enfriamiento. La presión de pulverización fue de 0,25 MPa.

El polvo de enzima estaba ligeramente aglomerado al final de la pulverización de la solución de enzima y se aglomeró adicionalmente pulverizando la solución de aglutinante. Mediante el aglutinante se estabilizaron adicionalmente los aglomerados de tal manera que estos se mantuvieron después del secado. Bajo el microscopio, los aglomerados tenían una apariencia firmemente unida y uniforme. Se descargaron 840 g de producto con una humedad residual del 9 %.

En el proceso, se obtiene un polvo instantáneo con los siguientes datos característicos:

humedad residual: del 6 al 13 %

actividad : de 30000 a 35000 U/g (aun mayor con una solución enzimática de alta

actividad)

35 comportamiento de polvo : prácticamente libre de polvo con observación visual

comportamiento de fluidez : fluye libremente con observación visual

apariencia : aglomerado grueso, uniforme y de color parduzco, posiblemente con pequeños

grumos que pueden eliminarse por tamizado

diámetro de partícula medio : 700 µm

40 **Ejemplo 3:**

Recubrimiento de un polvo instantáneo en lecho fluidizado (modo de proceder en lotes)

Sobre el polvo instantáneo (1500 g) obtenido de acuerdo con el ejemplo 1, con eliminación por tamizado previa de grumos, se pulverizó una solución de Lutrol F68 al 20 % (395 g; copolímero de bloque de polioxietileno/polioxipropileno). El producto final tenía una cantidad de recubrimiento de aproximadamente el 5 %. El recubrimiento se realizó en el mismo aparato con la misma estructura que en el ejemplo 1. La boquilla de dos componentes estaba instalada en el cono en la posición inferior. La duración de pulverización fue de aproximadamente 45 minutos, a continuación se secó adicionalmente durante aproximadamente 55 minutos. La temperatura de aire alimentado se reguló según la temperatura de producto con un valor preestablecido de 40 °C. La temperatura del aire de alimentación, según la cantidad de aire y tasa de pulverización, fue de entre 45 y 50 °C. Durante el secado adicional, la temperatura de aire de alimentación cayó hasta 40 °C. La cantidad de aire fue de 80 a 100 m³/h al principio. Durante el secado adicional, la cantidad de aire fue de 80 m³/h. La tasa de pulverización fue de aproximadamente 530 g/h y la presión de pulverización fue de 0,15 MPa.

El producto mostraba una apariencia gruesa y uniforme, se aglomeró adicionalmente todavía algo más mediante pulverización y contenía pocos grumos. Bajo el microscopio se pudo observar una capa de recubrimiento lisa y cerrada. Se descargaron 1544 g de producto con una humedad residual de aproximadamente el 8 %.

Ejemplo 4:

Pruebas para evaluar las propiedades instantáneas

Para examinar las propiedades de disolución, se desarrolló una prueba que debe simular la capacidad de manejo del producto en las instalaciones del cliente.

Para este propósito, se dispusieron 1960 g de agua en un recipiente de vidrio de 3 litros y se agitó de aproximadamente 220 a 240 rpm empleando un agitador intensivo. Se mezclaron después rápidamente (de aproximadamente 1 a 2 segundos) 40 g del polvo instantáneo. La mezcla corresponde a una solución al 2 % y, en el caso de fitasa, a una actividad de 400 a 600 U/g cuando se usa un polvo instantáneo con una actividad de aproximadamente 20000 a 30000 U/g. Si la actividad del polvo instantáneo se encuentra fuera de los límites habituales, la mezcla debe calcularse para la actividad respectiva. (Actividad preestablecida de la solución en el caso de fitasa - 500 U/g). En el caso de adición de polvo, se activa un cronómetro al mismo tiempo.

En la evaluación de las propiedades instantáneas se presta especial atención a los siguientes puntos:

- formación de grumos cuando se agrega el polvo instantáneo
- momento de disgregación de los aglomerados
- momento en el que el polvo está casi totalmente disuelto (solamente unas pocas grandes partículas pueden todavía estar presentes)
 - momento en el que el polvo está totalmente disuelto
 - formación de espuma durante la disolución
 - claridad de la solución
- 20 otras observaciones.

25

Si el polvo instantáneo de acuerdo con el ejemplo 1 se somete a esta prueba, se obtiene el siguiente perfil:

- ausencia de formación de grumos al agregar el polvo instantáneo o durante el proceso de disolución;
- los aglomerados se disgregan después de aproximadamente 30 segundos:
- el polvo instantáneo está disuelto después de aproximadamente 1,5 minutos hasta pocas partículas pequeñas;
- después de un total de 2,5 minutos, se han disuelto también las últimas partículas;
 - no se produce formación de espuma
 - después de la disolución completa, la solución no muestra turbiedad.

REIVINDICACIONES

- 1. Procedimiento para la preparación de una formulación instantánea de enzimas, caracterizado porque
 - a) se dispone un material en polvo, que se selecciona entre

5

10

15

20

30

- i) una preparación enzimática soluble en medio acuoso, que puede obtenerse mediante secado por pulverización de una solución que contiene enzimas, y
- ii) mezclas de i) y un soporte orgánico o inorgánico que soluble o dispersableen medio acuoso;

b) se aglomera el material en polvo mediante el pulverización simultánea o escalonada en el tiempo de uno o varios medios de pulverización para formar un polvo instantáneo, seleccionándose los medios de pulverización entre soluciones enzimáticas, soluciones de aglutinantes, dispersiones de aglutinantes y soluciones enzimáticas que contienen aglutinante.

aglomerándose hasta un tamaño de grano medio de 0,8 a 8 mm, y presentando la formulación instantánea obtenida un porcentaje de proteína de aproximadamente el 50-95 % en peso, con respecto al peso total de la formulación.

- 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la aglomeración se realiza de manera continua o discontinua en un lecho fluidizado.
- 3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** se aglomera hasta un tamaño de grano medio de hasta aproximadamente 6 mm.
- 4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la aglomeración de la preparación enzimática secada por pulverización se realiza por medio de un lecho fluidizado integrado internamente en el secador por pulverización o por medio de un lecho fluidizado externo.
- 5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** el soporte soluble o dispersable en medio acuoso es un polvo de bajo peso molecular orgánico o inorgánico inerte o un polímero orgánico en polvo.
- 6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el aglomerado se seca hasta un contenido en humedad residual inferior a aproximadamente el 15 % en peso.
 - 7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** las partículas de aglomerado se dotan de un recubrimiento soluble en agua y a continuación, dado el caso, se secan de nuevo.
 - 8. Formulación instantánea de enzimas, que comprende un material en polvo aglomerado que se selecciona entre
 - i) una preparación enzimática soluble en medio acuoso; que puede obtenerse mediante secado por pulverización de una solución que contiene enzimas. y
 - ii) mezclas de i) y un soporte orgánico o inorgánico soluble o dispersable en medio acuoso,

presentando la misma un porcentaje de proteína de aproximadamente el 50-95 % en peso, con respecto al peso total de la formulación y presentando sus partículas de aglomerado un tamaño de grano medio de 0,8 a 8 mm.

- 9. Formulación instantánea de enzimas de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizada porque** la enzima se selecciona entre oxidorreductasas, transferasas, liasas, isomerasas, ligasas, fosfatasas e hidrolasas.
 - 10. Formulación instantánea de enzimas de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizada porque** la hidrolasa es una enzima de disociación de polisacárido no almidón.
 - 11. Formulación instantánea de enzimas de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizada porque** la fosfatasa es fitasa.
- 40 12. Formulación instantánea de enzimas de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizada porque** comprende de 1 · 10⁴ a 1 · 10⁵ U de fitasa por gramo de peso total.
 - 13. Formulación instantánea de enzimas de acuerdo con una de las reivindicaciones 8 a 12 **caracterizada porque** las partículas de aglomerado están dotadas adicionalmente de un recubrimiento soluble en agua.
- 14. Formulación instantánea de enzimas de acuerdo con una de las reivindicaciones 8 a 13, evasada en porciones en bolsas de lámina solubles.
 - 15. Composición para pienso peletizada, en la que se aplicó al menos una formulación instantánea de enzimas de acuerdo con una de las reivindicaciones 8 a 14 después de disolver o dispersar en una fase acuosa.
 - 16. Uso de una formulación instantánea de enzimas de acuerdo con una de las reivindicaciones 8 a 14 o que puede

obtenerse de acuerdo con un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7 para la producción de una composición para pienso peletizada de acuerdo con la reivindicación 15.







