

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 552**

51 Int. Cl.:
C08G 73/02 (2006.01)
C12N 9/14 (2006.01)
C12N 9/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01990903 .5**
96 Fecha de presentación: **07.12.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1337576**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.08.2003**

54 Título: **Composiciones de poliamina-epiclorohidrina con alto contenido en sólidos y subproductos reducidos**

30 Prioridad:
09.12.2000 US 254439 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.11.2012

73 Titular/es:
HERCULES INCORPORATED (100.0%)
500 Hercules Road
Wilmington, DE 19808, US

72 Inventor/es:
RIEHLE, RICHARD J.;
BUSINK, RONALD;
BERRI, MASSIMO y
STEVELS, WIM

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 391 552 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

Composiciones de poliamina-epiclorohidrina con alto contenido en sólidos y subproductos reducidos.

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a procedimientos para convertir composiciones de resina en estables al almacenamiento, especialmente composiciones de resina para la industria papelera, que incluyen sustancias de resistencia, como sustancias de resistencia en húmedo y en seco y sustancias de acresponado. La presente invención se refiere así mismo a procedimientos para la producción de productos de papel que contienen las resinas que tienen residuos reducidos, como epihalohidrinatos y productos de hidrólisis de epihalohidrina. En la presente invención, las resinas, composiciones y productos, como productos de papel, mantienen una baja concentración de residuos, como epihalohidrinatos y productos de hidrólisis de epihalohidrina, cuando se almacenan. En la presente invención, las composiciones contienen la resina en un extracto seco elevado.

Antecedentes de la invención

15 Las resinas de resistencia en húmedo se añaden con frecuencia al papel y al cartón en el momento de la fabricación. En ausencia de resinas de resistencia en húmedo, el papel conserva normalmente sólo de un 3% a un 5% de su resistencia una vez humedecido con agua. Sin embargo, el papel fabricado con resina de resistencia en húmedo generalmente conserva al menos 10%-50% de su resistencia cuando se humedece. La resistencia en húmedo es útil en una amplia variedad de aplicaciones del papel, algunos ejemplos de las cuales son la fabricación de toallitas, cartones de leche y zumo, bolsas de papel y cartones de revestimiento para recipientes corrugados.

20 La resistencia en seco también es una propiedad crítica del papel, particularmente a la vista de la tendencia reciente de los fabricantes de papel a usar pulpas de madera de elevado rendimiento en papel, a fin de lograr costes más reducidos. Estas pulpas de madera de elevado rendimiento producen en general papel con resistencia significativamente reducida, cuando se comparan con papel obtenido de pulpas muy refinadas.

25 Las resinas de resistencia en húmedo disponibles comercialmente incluyen Kymene® 557H, Kymene® 557LX, Kymene® SLX, Kymene® Plus, Kymene® 450 and Kymene 736, disponibles de Hercules Incorporated, Wilmington, Del. Las resinas de resistencia en húmedo como las enumeradas anteriormente, también proporcionan resistencia en seco incrementada al papel.

30 Resinas similares a las usadas para proporcionar resistencia al papel se usan también frecuentemente como adhesivos de acresponado. En la fabricación de algunos productos de papel, como papeles faciales, papel de baño o toallitas de papel, la banda del papel se somete convencionalmente a un procedimiento de acresponado, a fin de proporcionarle características de textura deseables, como suavidad y masa. El procedimiento de acresponado implica típicamente adherir la banda, una banda de celulosa en el caso del papel, a un cilindro rotativo de acresponado, de forma que el aparato conocido como secador Yankee, y luego desprender la banda adherida con una cuchilla limpiadora. El impacto de la banda contra la cuchilla limpiadora rompe algunos de los enlaces entre fibras en la banda, y hace que la banda se encoja o frunza.

35 La intensidad de esta acción de acresponamiento depende de diversos factores, incluyendo el grado de adhesión entre la banda y la superficie del cilindro de acresponado. Una mayor adhesión produce una suavidad incrementada, aunque generalmente con alguna pérdida de resistencia. A fin de incrementar la adhesión, se puede usar un adhesivo de acresponado para incrementar cualquier adhesión producida naturalmente que pueda tener la banda, debido a su contenido en agua, que variará ampliamente dependiendo del punto hasta el que la banda se haya secado previamente. Los adhesivos de acresponado deberían evitar también el desgaste de la superficie del secador, y proporcionar lubricación entre la cuchilla limpiadora y la superficie del secador, y reducir la corrosión química, así como controlar la extensión del acresponado. Un recubrimiento adhesivo de acresponado que adhiera la lámina de manera suficientemente fuerte al tambor proporcionará un buen crepé, proporcionando absorbancia y suavidad con la menor pérdida posible de resistencia del papel. Si la adhesión al tambor de secado es demasiado fuerte, la lámina puede romperse o incluso "tapar", es decir, introducirse desde abajo sobre la cuchilla limpiadora y envolver el tambor de secado. Si no hay suficiente adhesión, la lámina se desprenderá demasiado fácilmente y experimentará un acresponado demasiado débil.

50 El adhesivo de acresponado, normalmente como solución acuosa o dispersión, se pulveriza generalmente sobre la superficie del cilindro o tambor de acresponado, p.ej., un secador Yankee. Esto mejora la transferencia de calor, permitiendo un secado más eficiente de la lámina. Si la pulpa de pasta de papel se adhiere demasiado fuertemente al cilindro de acresponado, se pueden pulverizar sustancias de eliminación sobre el cilindro. Las sustancias de eliminación son típicamente aceites hidrocarbonados. Estas sustancias ayudan a la liberación uniforme de la banda de tejido en la cuchilla de acresponado, y también lubrican y protegen la cuchilla del uso excesivo.

55 Ejemplos de composiciones adhesivas de acresponado incluyen las descritas en la patente de EE.UU. N° 5.187.219 de Furman. Las composiciones comprenden un polímero de acrilamida glioxilada/cloruro de dialil-dimetil-amonio hidrosoluble, y un poliol hidrosoluble, con un peso molecular inferior a 3000, como plastificante para el polímero.

- 5 La patente de EE.UU. N° 5.246.544 de Hollenberg et al., describe un adhesivo de acresponado reticulado reversiblemente, que contiene un material no autoreticulable, que es un polímero u oligómero que tiene grupos funcionales que se pueden reticular mediante reticulación iónica y al menos un reticulante catiónico, metálico, que tiene una valencia de cuatro o más. El adhesivo puede contener también aditivos para modificar las propiedades mecánicas de los polímeros reticulados, p.ej., glicoles, polietilenglicoles y otros polioles como azúcares simples y oligosacáridos.
- En la patente de EE.UU N° 5.338.807 de Espy et al., patente de EE.UU N° 5.994.449 de Maslanka y patente canadiense 979.579 de Giles et al., se describen adhesivos de acresponado de poliaminoamida/epiclorohidrina.
- 10 La patente de EE.UU N° 5.374.334 de Sommese et al, describe un adhesivo de acresponado que es un polímero reticulado de vinilamina/alcohol vinílico, que contiene aproximadamente de 1 a aproximadamente 99% de vinilamina. Se describe la epiclorohidrina como reticulante.
- Las patentes de EE.UU N° 4.684.439 y 4.788.243 de Soerens, describen adhesivos de acresponado que comprenden mezclas de alcohol de polivinilo y resina de poliamida termoplástica hidrosoluble, que comprende el producto de reacción de una polialquilen-poliamina, un ácido carboxílico dibásico alifático saturado y una poli(oxietilen)diamina.
- 15 En las patentes de EE.UU. N° 4.501.640 y 4.528.316 de Soerens, se describe un adhesivo de acresponado que comprende una mezcla de alcohol polivinílico y una resina de poliamida catiónica termoendurecible.
- Adhesivos de acresponado disponibles comercialmente incluyen los polímeros catiónicos Crepetrol® 190, Crepetrol® 290 y Crepetrol® 80E, disponibles de Hercules Incorporated, Wilmington, Del.
- 20 Adicionalmente, las resinas de poliamina-epihalohidrina, como resinas de poliaminopoliámida-epihalohidrina, contienen frecuentemente grandes cantidades de productos de hidrólisis de epihalohidrina. Por ejemplo, las resinas comerciales de poliaminopoliámida-epiclorohidrina típicamente contienen 1-10% (en seco) de los subproductos de epiclorohidrina (epi), 1,3-dicloropropanol (1,3-DCP), 2,3-dicloropropanol (2,3-DCP) y 3-cloropropanodiol (CPD). Los subproductos epi se conocen también como residuos epi. La producción de tales resinas con concentraciones reducidas de subproductos epi ha sido objeto de muchas investigaciones. Las presiones ambientales para producir resinas con concentraciones reducidas de especies halógenas orgánicas adsorbibles (AOX), se ha incrementado. "AOX" se refiere al contenido de halógeno orgánico adsorbible de la resina, que se puede determinar mediante medios de adsorción sobre carbono. AOX incluye epiclorohidrina (epi) y subproductos epi (1,3-dicloropropanol, 2,3-dicloropropanol y 3-cloropropanodiol), así como halógeno orgánico unido a la cadena polimérica principal.
- 25 Se han proporcionado diversas maneras de reducir las cantidades de productos de hidrólisis de epihalohidrina. La reducción en la cantidad de epihalohidrina usada en la etapa de síntesis es una alternativa mostrada en la patente de EE.UU. N° 5.171.795. Se produce un tiempo de reacción más largo. El control sobre el procedimiento de fabricación se muestra en la patente de EE.UU. N° 5.017.642, para producir composiciones de concentración reducida de productos de hidrólisis.
- 30 También se muestran tratamientos pos-síntesis. La patente de EE.UU. N° 5.256.727 muestra que hacer reaccionar la epihalohidrina y sus productos de hidrólisis con sales de fosfato dibásico o alcanolaminas en proporciones equimolares convierte los compuestos clorados orgánicos en especies no cloradas. Para realizar esto es necesario llevar a cabo una segunda etapa de reacción durante al menos 3 horas, que se añade significativamente a los costes y genera cantidades de materiales orgánicos e inorgánicos indeseadas en la composición de resistencia en húmedo. En composiciones que contienen grandes cantidades de epihalohidrina y productos de hidrólisis de epihalohidrina (p.ej., aproximadamente 1-6% en peso de la composición), la cantidad de material orgánico formado esta presente probablemente en cantidades indeseablemente altas.
- 35 La patente de EE.UU N° 5.516.885 y WO 92/22601 describen que los subproductos halogenados se pueden eliminar de los productos que contienen elevadas concentraciones de subproductos halogenados, así como concentraciones reducidas de subproductos halogenados, mediante el uso de resinas de intercambio iónico. Sin embargo, está claro a partir de los datos presentados, que hay pérdidas significativas de rendimiento en la composición de resistencia en húmedo y una reducción en la efectividad de la resistencia en húmedo.
- 40 Se sabe que los compuestos que contienen organohalógeno, exentos de nitrógeno, se pueden convertir en una sustancia relativamente inocua. Por ejemplo, el 1,3-dicloro-propanol, 3-cloro-1,2-propanodiol (también conocido como 3-cloropropanodiol, 3-monocloropropanodiol, monocloropropanodiol, cloropropanodiol, CPD, 3-CPD, MCPD y 3-MCPD) y epiclorohidrina, se han tratado con álcali para producir glicerol.
- 50 Se conoce la conversión de compuestos organohalogenados exentos de nitrógeno con microorganismos que contienen una deshalogenasa. Por ejemplo, C. E. Castro, et al. ("Biological Cleavage of Carbon-Halogen Bonds Metabolism of 3-Bromopropanol by *Pseudomonas* sp.", *Biochimica et Biophysica Acta*, 100, 384-392,1965), describe el uso de *Pseudomonas* sp. aislado del suelo, que metaboliza 3-bromopropanol secuencialmente hasta ácido 3-bromopropiónico, ácido 3-hidroxipropiónico y CO₂.
- 55

Diversas patentes de EE.UU. describen también el uso de microorganismos para deshalogenar halohidrinatos, p.ej., patentes de EE.UU. 4.452.984; 4.477.570; y 4.493.895.

5 Las patentes de EE.UU. N^{os} 5.470.742, 5.843.763 y 5.871.616, describen el uso de microorganismos o enzimas derivadas de microorganismos para eliminar epihalohidrina y productos de hidrólisis de epihalohidrina de composiciones de resistencia en húmedo, sin reducción en la efectividad en la resistencia en húmedo.

La solicitud de EE.UU. N^o 09/629.629, presentada el 31 de julio de 2000, se refiere al uso de microorganismos o enzimas derivadas de microorganismos a eliminar la epihalohidrina y productos de hidrólisis de epihalohidrina de composiciones de resina, y describe un método secuencial preferido para cultivar los microorganismos.

10 Aún adicionalmente, la patente de EE.UU. N^o 5.972.691 y WO 96/40967 describen el tratamiento de composiciones de resistencia en húmedo con una base inorgánica, después de completar la etapa de síntesis (es decir, tras la reacción de polimerización para formar la resina) y de que la resina se haya estabilizado a pH reducido, para reducir el contenido de halógenos de las composiciones de resistencia en húmedo (p.ej., productos de hidrólisis clorados) hasta concentraciones moderadas (p.ej., aproximadamente 0,5% basado en el peso de la composición). La composición así formada se puede tratar luego con microorganismos o enzimas para producir de forma económica composiciones de resistencia en húmedo con concentraciones muy reducidas de epihalohidrina y productos de hidrólisis de epihalohidrina.

15 También se sabe que la epihalohidrina e hidrolizados de epihalohidrina se pueden hacer reaccionar con bases para formar ion cloruro y alcoholes polihídricos. La patente de EE.UU. N^o 4.975.499 muestra el uso de bases durante la etapa de síntesis para reducir los contenidos de cloro orgánico de una composición de resistencia en húmedo hasta concentraciones moderadas (p.ej., hasta concentraciones moderadas de aproximadamente 0,11 hasta aproximadamente 0,16%), basadas en el peso de la composición. La patente de EE.UU. N^o 5.019.606 muestra la reacción de composiciones de resistencia en húmedo con una base orgánica o inorgánica.

20 Adicionalmente, las solicitudes de EE.UU. N^{os} 09/001.787, presentada en 31 de diciembre de 1997, y 09/224.107, presentada el 22 de diciembre de 1998, de Riehle, y WO 99/33901, presentan, entre otras características, un procedimiento para reducir el contenido AOX de una materia prima de resina de resistencia en húmedo, hidrosoluble, que comprende iones azetidinio y aminohalohidrina terciaria, que incluye tratar la resina en una solución acuosa con una base para formar resina tratada, en la que al menos 20% en moles de la aminohalohidrina terciaria presente en la resina de partida se convierte en epóxido, y la concentración de ion azetidinio está sustancialmente inalterada, y la efectividad de la resina tratada en impartir resistencia en húmedo es al menos aproximadamente tan grande como la de la resina de resistencia en húmedo de partida.

30 Aún adicionalmente, las solicitudes de patente de EE.UU. N^{os} 09/592.681, presentada el 12 de junio de 2000, y 09/363.224, presentada el 30 de julio de 1999, 09/330.200, presentada el 11 de junio de 1999, se refieren a productos de poliamina-epihalohidrina, particularmente productos de resina de poliamina-epihalohidrina, que se pueden almacenar con al menos formación reducida de residuos que contienen halógenos, como 3-cloropropanodiol (CPD). Adicionalmente, estas solicitudes describen el uso de microorganismos o enzimas derivadas de microorganismos para eliminar epihalohidrina y productos de hidrólisis de epihalohidrina de composiciones de resistencia en húmedo, sin reducción en la efectividad de la resistencia en húmedo.

40 WO 99/09252 describe resinas de resistencia en húmedo termoendurecibles, preparadas a partir de polímeros de poliaminoamida protegidos terminalmente. Los protectores terminales usados son ácidos monocarboxílicos o ésteres carboxílicos monofuncionales, y se usan para controlar el peso molecular de la poliamida, a fin de obtener resinas de resistencia en húmedo con un elevado contenido en sólidos.

45 Cada una de las soluciones anteriores ha proporcionado diversos resultados, y ha existido una necesidad continua de mejora en el uso de resina de poliamina-epihalohidrina, especialmente con contenido de sólidos elevado. En particular, existe aún una necesidad de composiciones de resina, como resinas de resistencia en húmedo, resistencia en seco y sustancias de acresponado, que se pueden proporcionar en soluciones o dispersiones de viscosidad razonable, a concentraciones de sólidos poliméricos relativamente elevadas. Por tanto, existe aún una necesidad de resinas que se puedan preparar, almacenar, tratar y transportar en forma de dispersión o solución que contiene concentraciones de sólidos elevadas, sin deterioro del producto a partir de la reticulación polimérica, como problemas de gelificación.

50 **Sumario de la invención**

El tratamiento enzimático de resinas basadas en aminas terciarias se puede realizar a una concentración más elevada que la que se describió previamente, cuando se utiliza el equilibrio correcto de condiciones de tiempo, temperatura, pH y concentración enzimática.

55 La presente invención se refiere a un procedimiento para convertir los productos de resina de poliamina-epihalohidrina en estables al almacenamiento, particularmente productos de resina de poliamina-epihalohidrina que se pueden almacenar con al menos formación reducida de residuos que contienen halógeno, como 3-cloropropanodiol (CPD).

La presente invención se refiere también a diversos tratamientos de resinas de poliamina-epihalohidrina, incluyendo tratamientos para reducir la concentración de residuos que contienen halógeno, asociados con las resinas y/o composiciones que contiene las resinas.

5 La presente invención se refiere también a la preparación de un producto de papel y/o al tratamiento de resinas de poliamina-epihalohidrina para convertir tales resinas en estables al almacenamiento, es decir, a una concentración de extracto seco de al menos 15% en peso.

Descripción detallada de la invención

A menos que se indique otra cosa, todos los porcentajes, partes, proporciones, etc., son en peso.

10 A menos que se indique otra cosa, una referencia a un compuesto o componente incluye el compuesto o componente en sí mismo, así como en combinación con otros compuestos o componentes, como mezclas de tales compuestos.

Adicionalmente, cuando una cantidad, concentración, u otro valor o parámetro, se proporciona como lista de valores máximos preferibles y valores mínimos preferibles, esto se tiene que entender como describir específicamente todos los intervalos formados por cualquier par de valor preferido máximo y valor preferido mínimo, independientemente de si los intervalos se describen por separado.

15 Las solicitudes de patente de EE.UU N^{os} 09/592.681, presentada el 12 de junio de 2000, 09/363.224, presentada el 30 de julio de 1999, y 09/330.200, presentada el 11 de junio de 1999, se refieren al descubrimiento de que el CPD que se forma en las resinas de poliamina-epihalohidrina, tras el almacenamiento, se debe a especies formadoras de CPD, que se asocian con el componente oligomérico y/o polimérico de la resina. Se describe en estas solicitudes que las resinas de poliamina-epihalohidrina se pueden tratar durante y/o posteriormente a su producción, de tal manera que se inhibe, elimina, y/o se evita la formación de elementos asociados con la resina de poliamina-epihalohidrina que forman CPD al almacenarse. Por ejemplo, estas solicitudes describen el tratamiento ácido, tratamiento básico, grupos terminales ácidos inferiores en el precursor polimérico, y tratamiento enzimático para eliminar o reducir las especies formadoras de CPD.

25 Por tanto, en un aspecto de la invención descrita en la solicitud de patente de EE.UU. N^o 09/592.681, los productos de resina de poliamina-epihalohidrina que tienen concentraciones reducidas de formación de CPD tras el almacenamiento y concentraciones minimizadas de CPD en productos de papel, se pueden producir tratando la resina con una sustancia enzimática. Así, se pueden reducir y/o eliminar las especies formadoras de CPD en la resina, tratando la resina con una sustancia enzimática que es capaz de liberar las especies formadoras de CPD de la resina. La sustancia enzimática puede comprender una o más enzimas que son capaces de liberar las especies formadoras de CPD de la resina, como al menos una de esterases, lipasas y proteasas. Se prefiere que la sustancia enzimática tenga actividad esterasa. El técnico medio en la materia sabe que la clase proteasa de enzimas puede tener actividad esterasa y la clase esterasa de enzimas puede tener actividad proteasa. Una clase preferida de proteasas es el grupo subtilisina (E.C. 3.4.21.62. Homology modeling and protein engineering strategy of subtilases, the family of subtilisin-like serine proteinases, Siezen RJ, de Vos WM, Leunissen JA, Dijkstra BW, Protein Eng. 1991,4,719-37), particularmente las enzimas producidas por *Bacillus licheniformis* (N^o de acceso de Swiss-Prot: P00780), *Bacillus amyloliquefaciens* (P00782), y *Bacillus lentus* (P29600). La enzima puede estar en forma pura o sin purificar. Aún adicionalmente, se pueden usar mezclas de enzimas, las cuales incluyen mezclas de enzimas puras, mezclas de enzimas sin purificar, o mezclas de ambas. Particularmente, sustancias enzimáticas preferidas son Alcalasa y Savinasa, que se pueden obtener de Novozymes North America, Inc. Franklinton, North Carolina (anteriormente conocida como Novo Nordisk Biochem, North America, Inc.).

45 Extendiéndose en lo anterior, en trabajos previos, resinas de poliamina-epiclorohidrina con aproximadamente 12-13,5% en peso de sólidos se trataron con Alcalasa 2,5 L tipo DX (Novozimas), para reducir o eliminar las especies formadoras de CPD. En las condiciones de tratamiento, como pH 8, 40°C, 6-8 horas y 0,25 g de Alcalasa para 30 g de resina, las resinas tenían una tendencia a desarrollar elevada viscosidad y convertirse en inutilizables. Sorprendentemente, se ha descrito, de acuerdo con la presente invención, que mediante condiciones de tratamiento equilibrantes, incluyendo pH, temperatura, concentración de sustancia enzimática, viscosidad de partida y concentración de sólidos de composiciones que contienen resina de poliamina-epihalohidrina, como composiciones de resina de poliaminopoliamida-epiclorohidrina, se podrían tratar con la sustancia enzimática para reducir o eliminar las especies formadoras de CPD con características de viscosidad deseadas y excelente liberación de CPD. Estas condiciones descubiertas recientemente para el tratamiento enzimático permiten incrementar, reducir o mantener la viscosidad de la resina a la concentración deseada, y permiten el tratamiento enzimático a contenidos de sólidos reducidos, así como a concentraciones de sólidos elevadas, de 15% en peso o mayores.

55 Sin querer ceñirse a ninguna teoría, se cree que a medida que aumenta el contenido de sólidos activos, se incrementa la tasa de reticulación y, por tanto, se incrementa la viscosidad. Mediante la elección juiciosa de las condiciones de reacción, la tasa de la reacción de reticulación que incrementa la viscosidad se puede equilibrar con la velocidad de la reacción de hidrólisis, que reduce la viscosidad, hasta obtener predicablemente la viscosidad deseada.

La presente invención es útil porque permite un mayor rendimiento de producción para el tratamiento enzimático y porque se pueden usar concentraciones inferiores de la costosa enzima. Esta tecnología debería, por tanto, permitir (1) producción de resinas de elevado contenido en sólidos y elevada efectividad, permitiendo un tiempo más largo para la formación de azetidinio y (2) producción de resinas que contienen AOX reducido mediante el incremento de la conversión de la funcionalidad aminoclorohidrina terciaria a la funcionalidad azetidinio.

Por tanto, según la presente invención, se ha descubierto que el tratamiento enzimático para reducir o eliminar las especies formadoras de CPD, se puede realizar a un contenido en sólidos de la resina mayor de lo que se esperaría. A este respecto, los ejemplos de tratamientos enzimáticos en la solicitud de patente de EE.UU N° 09/592.681, anteriormente mencionada, se realizaron a aproximadamente 13-14% en peso de sólidos. Sin embargo, en contraste con el estado de la técnica previo, el contenido en sólidos de la composición de resina acuosa tratada con la sustancia enzimática según la presente invención es de al menos 15% en peso, más preferiblemente superior a aproximadamente 20% en peso y puede ser superior a aproximadamente 25% en peso, especialmente con sustancias de acresponado. Los intervalos de contenido en sólidos preferidos incluyen de aproximadamente 10 a 50% en peso, más preferiblemente aproximadamente 18 a 40% en peso. Preferiblemente, para sustancias de resistencia en húmedo, el contenido en sólidos es aproximadamente de 15 a 40% en peso, más preferiblemente aproximadamente 18 a 25% en peso, siendo un valor de sólidos preferido aproximadamente 21% en peso; y, para sustancias de acresponado, el contenido en sólidos es aproximadamente de 20 a 40% en peso, más preferiblemente aproximadamente de 22 a 30% en peso, siendo uno de los valores de sólidos preferido aproximadamente 21% en peso; y, para sustancias de acresponado, el contenido en sólidos es aproximadamente 20 a 40% en peso, más preferiblemente aproximadamente 22 a 30% en peso, siendo uno de los valores de sólidos preferido aproximadamente 26% en peso.

Los términos auxiliar de acresponado, resina de acresponado, sustancia de acresponado y adhesivo de acresponado se usan de forma intercambiable y todos tienen el mismo significado a lo largo de la memoria.

La sustancia enzimática o sustancias enzimáticas se añaden a la resina en condiciones adecuadas para lograr una hidrólisis suficiente de especies formadoras de CPD en la composición de resina con elevado contenido en sólidos. Preferiblemente, las condiciones de tiempo, temperatura, pH, concentración de enzimas, viscosidad de partida y contenido en sólidos se equilibran para permitir la reacción de hidrólisis, minimizando la degradación de la actuación de la resina, como resistencia en húmedo o efectividad de acresponado de la resina, o previniendo una viscosidad de la resina indeseablemente elevada. Por tanto, inesperadamente, la hidrólisis de las especies formadoras de CPD se puede realizar a concentraciones de sólidos elevadas equilibrando las condiciones de tiempo, temperatura, pH, concentración de enzimas, viscosidad de partida y contenido de sólidos. Por ejemplo, a medida que se incrementa la concentración de sólidos, el pH y/o temperatura deberían normalmente reducirse. Adicionalmente, a medida que la concentración de sólidos se incrementa, la concentración de enzimas debería normalmente incrementarse.

Hay que destacar que la viscosidad de la composición de resina se puede incrementar o reducir a partir de una viscosidad de partida durante el tratamiento enzimático, y puede mantenerse igual o sustancialmente igual, dependiendo de las condiciones de reacción, según se indicó anteriormente. Para sustancias de acresponado, se prefiere normalmente, pero no de forma limitativa, que la viscosidad al final del tratamiento enzimático sea igual o sustancialmente igual a la viscosidad de partida. Por ejemplo, con sustancias de resistencia en húmedo, se prefiere normalmente, pero no de forma limitativa, que la viscosidad se mantenga o se reduzca desde la viscosidad de partida en la parte inicial del tiempo de tratamiento y luego se mantenga o incremente hasta la viscosidad deseada al final del tiempo de tratamiento. Por ejemplo, con una resina que tenga una viscosidad de partida de Brookfield de aproximadamente 100 a 300 cps y aproximadamente 20-22% en peso de sólidos activos, se prefiere que las condiciones se elijan de forma que, tras el tratamiento, la viscosidad de la resina se mantenga o se reduzca, siendo los sólidos activos aproximadamente 19-22% en peso. Además, por ejemplo, con una resina que tenga una viscosidad de partida de Brookfield de aproximadamente 100 a 300 cps y aproximadamente 20-22% en peso de sólidos activos, se prefiere que la viscosidad de Gardner Holdt al principio de la reacción sea aproximadamente G a J, luego es deseable que la viscosidad de Gardner Holdt se reduzca durante la reacción hasta aproximadamente F al final de la reacción. Además, por ejemplo, con una resina que tenga una viscosidad de partida de Brookfield de aproximadamente 100 a 300 cps y aproximadamente 20-22% en peso de sólidos activos, se prefiere así mismo que la viscosidad de Gardner Holdt al principio de la reacción sea aproximadamente G a J, luego es deseable que la viscosidad de Gardner Holdt se reduzca durante la reacción hasta aproximadamente A hasta E. Hacia el final de la reacción, es deseable incrementar la temperatura de tratamiento hasta que la viscosidad de Gardner-Holt se haya incrementado desde aproximadamente F hasta I. Además, por ejemplo, con Kymene® E7219 (disponible de Hercules Incorporated, Wilmington, Del) que tiene una viscosidad de Brookfield de partida de aproximadamente 200 a 300 cps con aproximadamente 20-22% en peso de sólidos activos. Si la viscosidad de Gardner-Holt al inicio de la reacción es aproximadamente I, entonces es deseable que la viscosidad de Gardner-Holt se reduzca durante la reacción hasta aproximadamente F al final de la reacción, produciendo una resina final (estabilizada a aproximadamente pH 3-3,5) con una viscosidad de Brookfield de aproximadamente 100-150 cps. Por ejemplo, con Kymene® E7219 (disponible de Hercules Incorporated, Wilmington, DE) que tiene una viscosidad de Brookfield de partida de aproximadamente 200 a 300 cps con aproximadamente 20-22% en peso de sólidos activos, si la viscosidad de Gardner-Holt al inicio de la reacción es aproximadamente I, entonces es deseable que la viscosidad de Gardner-Holt se reduzca durante la reacción hasta aproximadamente C hacia el final de la reacción, es deseable incrementar la temperatura de tratamiento hasta que la viscosidad de Gardner-Holt se haya incrementado hasta

aproximadamente F.

Por ejemplo, con sustancias de acresponado, se prefiere normalmente, pero no limitado a, que la viscosidad de partida sea inferior a aproximadamente 150 cps, más preferiblemente inferior a aproximadamente 100 cps, más preferiblemente inferior a aproximadamente 80 cps, e incluso más preferiblemente inferior a aproximadamente 40 cps. Preferiblemente, la viscosidad de partida de la mezcla de reacción varía de aproximadamente 10 cps hasta 150 cps, más preferiblemente de aproximadamente 20 cps hasta 100 cps, incluso más preferiblemente de aproximadamente 40 hasta 80 cps.

Con respecto a lo anterior, se prefiere minimizar o al menos equilibrar las reacciones secundarias, como la ruptura de polímeros o el incremento de peso molecular, a fin de que la viscosidad de la mezcla de reacción se mantenga por debajo de una viscosidad que no permitiría realizar la reacción. Preferiblemente, la viscosidad se mide usando un Viscosímetro programable Brookfield LVDV-II+ a 25°C o un equivalente como un Brookfield DVII+, husillo LV2 a 60 o 100 rpm dependiendo de la viscosidad. Para el viscosímetro programable, el procedimiento usado se basó en las Instrucciones de Funcionamiento, Manual N° M/97-164. Este viscosímetro determinará la viscosidad sólo si se usan el husillo y rpm correctos para la viscosidad de la muestra, según el manual de instrucciones.

Es preferible que las propiedades de una sustancia de acresponado sean aproximadamente las mismas después del tratamiento que previamente al tratamiento. Por tanto, según se indicó anteriormente, preferiblemente, la viscosidad de la mezcla de reacción se mantiene constante o sustancialmente constante durante la reacción para sustancias de acresponado. En particular, la viscosidad de la mezcla de reacción no se incrementa más de aproximadamente el 50%, más preferiblemente no más de aproximadamente el 20%, y con la máxima preferencia no más de aproximadamente el 10%, a partir de la viscosidad de partida.

Hay que destacar además que las condiciones, preferiblemente temperatura, pH y concentración de la sustancia enzimática, se pueden variar durante la reacción. Por ejemplo, si la viscosidad de la mezcla de reacción es mayor de la deseada, el pH y/o temperatura se pueden reducir y/o se puede añadir sustancia enzimática adicional. A la inversa, por ejemplo, si la viscosidad de la mezcla de reacción es inferior a la deseada, el pH y/o la temperatura se pueden incrementar.

Para resinas de resistencia en húmedo y usando Alcalasa 2,5L tipo DX como enzima, ejemplos específicos de las condiciones preferidas incluyen las siguientes. Con una resina que tenga una viscosidad de Brookfield de partida de aproximadamente 150 a 300 cps y aproximadamente 20-22% de sólidos activos, se prefiere usar una temperatura de aproximadamente 20-33°C, un pH de aproximadamente 6,8-7,8, una Alcalasa 2,5L tipo DX (tal como se recibió), hasta una proporción de sólidos activos de aproximadamente 1,0:20 hasta 1,0:5,0. Más específicamente, con Kymene® E7219 (disponible de Hercules Incorporated, Wilmington, DE) que tiene una viscosidad de Brookfield de partida de aproximadamente 200 a 300 cps con aproximadamente 20-22% en peso de sólidos activos, es preferible usar una temperatura de aproximadamente 23-27°C, un pH de aproximadamente 6,8-7,5, una Alcalasa 2,5L tipo DX (tal como se recibió), hasta una proporción de sólidos activos de aproximadamente 1,0:8,0 hasta 1,0:18,0, con un tiempo de tratamiento de 6-10 horas. Se debería tener en cuenta que, a medida que se incrementa el tiempo de tratamiento, la cantidad de CPD liberado de las especies productoras de CPD, es deseablemente incrementado, siendo el tiempo de tratamiento preferido de 6 a 10 horas. Otro ejemplo de condiciones es el siguiente: Kymene® E7219 (disponible de Hercules Incorporated, Wilmington, DE) que tiene una viscosidad de Brookfield de partida de aproximadamente 200 a 300 cps con aproximadamente 20-22% en peso de sólidos activos, una temperatura de aproximadamente 35°C, un pH de aproximadamente 7,5, una Alcalasa 2,5L tipo DX (tal como se recibió), hasta una proporción de sólidos activos de aproximadamente 1,0:8,3.

La temperatura puede ser al menos aproximadamente 0°C, más preferiblemente aproximadamente 10°C hasta 80°C, incluso más preferiblemente aproximadamente 20°C hasta 60°C, más preferiblemente aproximadamente 20°C hasta 40°C y más preferiblemente aproximadamente 20°C hasta 30°C. El tiempo de reacción puede ser de aproximadamente 3 minutos hasta aproximadamente 350 horas, más preferiblemente de aproximadamente 30 minutos hasta 48 horas, más preferiblemente de aproximadamente 30 minutos hasta 96 horas, más preferiblemente de aproximadamente 1 hora hasta 24 horas, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 2 horas hasta 12 horas. El pH del tratamiento enzimático dependerá de la dependencia del pH de la enzima específica y de las demás condiciones de tratamiento, y puede variar entre 1 y 11, preferiblemente de 2 a 10, incluso más preferiblemente aproximadamente de 2,5 a 9, e incluso más preferiblemente aproximadamente 7-9, e incluso más preferiblemente de 7 a 8. Intervalos adicionales de pH preferidos incluyen 5,0 a 8,0, 5,5 a 7,5, 6 a 9, 6 a 8,5 y 6,5 a 8.

Por ejemplo, el tratamiento combinado se puede empezar a pH 6,8-7,8 durante las primeras 4-24 horas, y luego reducirse hasta pH 5,5-7,0 o se puede permitir que el pH vare hasta 6,5-7,2 durante las últimas 8-48 horas del tratamiento combinado.

La concentración de la enzima dependerá de su actividad. Por ejemplo, pero sin ser limitativo, la enzima puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0,04 g de enzima activa (en seco) frente a 1600 g de resina de poliamina-epiclorohidrina (en seco) hasta 0,04 g de enzima activa (en seco) frente a 1,5 g de resina de poliamina-epiclorohidrina (en seco), así mismo, la enzima puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0,04 g de enzima activa (en seco) frente a 160 g de resina de poliamina-epiclorohidrina (en seco) hasta 0,04 de enzima

activa (en seco) frente a 4 g de de poliamina-epiclorohidrina (en seco).

La concentración de la enzima dependerá de su actividad. Por ejemplo, pero sin ser limitativo, en el caso de la Alcalasa, la enzima puede estar presente en una cantidad desde aproximadamente 1g de Alcalasa 2,5L tipo DX (tal y como se recibió) frente a 1600 g de resina de poliamina-epiclorohidrina (en seco) hasta 1g de Alcalasa 2,5L tipo DX (tal y como se recibió) frente a 1,5 g de resina de poliamina-epiclorohidrina (en seco), así mismo, la enzima puede estar presente en una cantidad desde aproximadamente 1g de Alcalasa 2,5L tipo DX (tal y como se recibió) frente a 160 g de resina de poliamina-epiclorohidrina (en seco) hasta 1g de Alcalasa 2,5L tipo DX (tal y como se recibió) frente a 4 g de resina de poliamina-epiclorohidrina (en seco).

Hay que destacar que siguiendo las pautas y los ejemplos no limitativos enunciados en la presente solicitud, un técnico medio en la materia sería capaz de determinar las condiciones de tratamiento y el equilibrio de las condiciones de tratamiento para obtener la hidrólisis de las especies formadoras de CPD a concentraciones de sólidos elevadas y/o para obtener una reducción en el peso molecular o viscosidad. Por ejemplo, a medida que aumenta la concentración de sólidos, el pH y/o la temperatura normalmente deberían reducirse, y la concentración de sustancias enzimáticas normalmente se incrementaría. Adicionalmente, siguiendo las pautas, un técnico medio en la materia sería capaz de determinar las sustancias enzimáticas que son útiles para eliminar especies formadoras de CPD y/o para obtener una reducción en el peso molecular o viscosidad.

Adicionalmente, las condiciones de reacción se pueden variar usando tipos y cantidades apropiados de enzimas. Por ejemplo, si la sustancia enzimática tiene mayor cantidad de actividad proteasa, comparada con la actividad esterasa (equilibrio proteasa/esterasa), con una resina de poliamina-epiclorohidrina, las condiciones de reacción se podrían variar hasta mayor pH, temperatura y/o sólidos, como las condiciones de reacción anteriores, aproximadamente pH 8 y/o temperatura superior a aproximadamente 40°C y/o cantidad de sólidos hasta aproximadamente 40% en peso. La práctica se define como obtener una resina con formación reducida de CPD, aunque proporcionando una resina de viscosidad deseada. Aunque las condiciones dependerán del equilibrio de actividad esterasa y proteasa de una enzima particular, las condiciones preferidas en la presente invención con Alcalasa 2,5L tipo DX son las siguientes: 10-50% en peso de sólidos activos, pH 6,9 a 7,9, de 0 a 35°C, durante 4 a 24 horas y 8-20 g de sólidos activos para 1 g de Alcalasa 2,5L tipo DX (según se recibió) y viscosidad de partida de 10cP a 1000cP. Así mismo, hay que destacar que a lo largo de la solicitud se utiliza la terminología sustancia enzimática. Sin embargo, un técnico medio en la materia entendería que las enzimas pueden tener diferentes actividades, y la concentración de la enzima se puede ajustar dependiendo de la actividad.

El tratamiento enzimático se puede aplicar sobre resinas tal y como se producen en un procedimiento de síntesis sin tratamiento posterior. Adicionalmente, las resinas se pueden tratar mediante diversos procedimientos previamente a la reducción y/o eliminación de las especies formadoras de CPD. Más aún, tras el tratamiento para reducir y/o eliminar las especies formadoras de CPD, la resina se puede tratar mediante diversos procedimientos. Aún adicionalmente, la resina se puede tratar mediante diversos procedimientos previamente a la reducción y/o eliminación de las especies formadoras de CPD, y la resina se puede tratar también mediante diversos procedimientos tras el tratamiento, para reducir y/o eliminar las especies formadoras de CPD. En beneficio de la brevedad, no se repite aquí una descripción completa de estos procedimientos, y se hace referencia a las solicitudes de patente de EE.UU anteriormente identificadas, N^{os} 09/629.629, 09/592.681, 09/363.224 y 09/330.200.

Las resinas según la presente invención son susceptibles de almacenarse sin formación excesiva de CPD. Más específicamente, como ejemplo, la solución contendrá menos de aproximadamente 10 ppm (partes por millón), más preferiblemente menos de aproximadamente 5 ppm, y con la máxima preferencia menos de 1 ppm de CPD, cuando se almacenan a aproximadamente 13,5% en peso de contenido en sólidos de resina. En el contexto de la presente invención, la frase "sólidos de resina" significa la poliamina-epihalohidrina activa de la composición.

Para determinar la estabilidad al almacenamiento de las soluciones de resina según la presente invención, se realiza un ensayo de estabilidad de la solución de resina, en el que la solución de resina se almacena durante un período de 2 semanas a 50°C, y a un pH de aproximadamente 2,5 a 8, preferiblemente 2,8, y el contenido de CPD se mide al final del período de 2 semanas. Por tanto, una solución que contiene resina de poliamina-epihalohidrina según la presente invención, será estable al almacenamiento si contiene menos de aproximadamente 250 ppm en seco de CPD, cuando se mide al final del período de dos semanas, más preferiblemente menos de aproximadamente 150 ppm en seco de CPD, cuando se mide al final del período de 2 semanas, más preferiblemente menos de aproximadamente 75 ppm en seco de CPD, cuando se mide al final del período de 2 semanas, e incluso más preferiblemente menos de aproximadamente 10 ppm en seco de CPD, cuando se mide al final del período de 2 semanas.

El ensayo de estabilidad de la solución de resina se puede realizar sobre soluciones que contienen un porcentaje de contenido de sólidos de resina variable; sin embargo, el CPD producido se debería corregir para el contenido de sólidos. Por ejemplo, para una solución con un contenido de sólidos de resina de un 15% en peso, que tiene un contenido de CPD medido de 15 ppm, el CPD corregido, en seco, será de 100 ppm en seco (15 ppm/0,15 en peso de contenido en sólidos de resina).

El ensayo de estabilidad de la solución de resina se realiza cargando una porción de resina de poliamina-

epihalohidrina en un recipiente que contiene un agitador. El recipiente se coloca en un baño de agua a 50°C y se mantiene a 50°C con agitación. Se elimina una alícuota del recipiente y se somete a análisis GC (cromatografía gaseosa), según el procedimiento de GC indicado anteriormente. Típicamente, se usa primeramente un detector de ionización de llama (FID) para analizar la muestra. Cuando se necesita una sensibilidad incrementada, se usa un

5 detector de conductividad electrolítica (ELCD) o un detector específico de halógenos (XSD), especialmente a menos de aproximadamente 20 ppm de la especie a analizar. Se pueden usar otros detectores sensibles, p.ej., detectores de captura de electrones. Este ensayo es un ensayo acelerado de envejecimiento para realizar modelos de envejecimiento a períodos mayores de tiempo a aproximadamente 32°C.

Un ensayo adicional para determinar la estabilidad al almacenamiento de soluciones de resina según la presente invención es el siguiente ensayo ("Ensayo Ácido"): una porción de resina a ensayar se carga en un recipiente que contiene un agitador. El pH se ajusta hasta 1,0 con ácido sulfúrico al 96% en peso. El recipiente se cierra y se coloca en un baño de agua a 50°C y se mantiene a 50°C con agitación. Se elimina una alícuota del recipiente a las 24 horas, y se somete a análisis de GC de la forma descrita anteriormente, para proporcionar una indicación de la estabilidad al almacenamiento.

15 El ensayo ácido se puede realizar sobre soluciones que contienen un contenido de sólidos de resina en tanto por ciento variable; sin embargo, el CPD producido debería de corregirse para el contenido de sólidos. Por ejemplo, para una solución de contenido de sólidos de resina de 15% en peso con un contenido de CPD medido de 15 ppm, el CPD corregido, en seco, será de 100 ppm en seco (15 ppm/0,15 en peso de contenido de sólidos de resina).

20 Para la realización de la invención en la que el tratamiento enzimático se aplica a las resinas en un procedimiento de síntesis de resina sin necesidad de tratamiento adicional, aunque se puede usar un tratamiento posterior, la cantidad de CPD liberado y/o producido por la resina, cuando se almacena a pH 1 durante 24 horas a 50°C y se mide a las 24 horas, libera y/o produce menos de aproximadamente 1000 ppm en seco de CPD, más preferiblemente libera y/o produce menos de aproximadamente 750 ppm en seco de CPD, incluso más preferiblemente libera y/o produce menos de aproximadamente 500 ppm en seco de CPD, incluso más preferiblemente libera y/o produce menos de

25 aproximadamente 250 ppm en seco de CPD, incluso más preferiblemente libera y/o produce menos de aproximadamente 200 ppm en seco de CPD, incluso más preferiblemente libera y/o produce menos de aproximadamente 150 ppm en seco de CPD, incluso más preferiblemente libera y/o produce menos de aproximadamente 100 ppm en seco de CPD, incluso más preferiblemente libera y/o produce menos de

30 aproximadamente 75 ppm en seco de CPD, incluso más preferiblemente libera y/o produce menos de aproximadamente 50 ppm en seco de CPD, incluso más preferiblemente libera y/o produce menos de aproximadamente 25 ppm en seco de CPD, incluso más preferiblemente libera y/o produce menos de aproximadamente 15 ppm en seco de CPD, incluso más preferiblemente libera y/o produce menos de

35 aproximadamente 5 ppm en seco de CPD, incluso más preferiblemente libera y/o produce menos de aproximadamente 3 ppm en seco de CPD, e incluso más preferiblemente libera y/o produce menos de aproximadamente 1 ppm en seco de CPD.

Para la realización de la invención en la que el tratamiento enzimático es simultáneo, previo o posterior a un tratamiento adicional para reducir al menos una de las epihalohidrininas, subproductos de epihalohidrina y halógeno orgánico unido a la cadena polimérica principal, este tratamiento adicional puede ser, pero no está limitado a, poner en contacto la resina formadora de CPD con al menos un microorganismo, o al menos una enzima aislada de al

40 menos un microorganismo, en una cantidad y a un pH y temperatura efectivos para deshalogenar cantidades residuales de halógeno unido orgánicamente, cuando se almacena a pH 1 durante 24 horas a 50°C y, medido a las 24 h, contiene menos de aproximadamente 1000 ppm en seco de CPD, imás preferiblemente contiene menos de aproximadamente 750 ppm en seco de CPD, incluso más preferiblemente contiene menos de aproximadamente 500 ppm en seco de CPD, incluso más preferiblemente contiene menos de aproximadamente 250 ppm en seco de CPD,

45 incluso más preferiblemente contiene menos de aproximadamente 200 ppm en seco de CPD, incluso más preferiblemente contiene menos de aproximadamente 150 ppm en seco de CPD, incluso más preferiblemente contiene menos de aproximadamente 100 ppm en seco de CPD, incluso más preferiblemente contiene menos de aproximadamente 75 ppm en seco de CPD, incluso más preferiblemente contiene menos de aproximadamente 50 ppm en seco de CPD, incluso más preferiblemente contiene menos de aproximadamente 25 ppm en seco de CPD,

50 incluso más preferiblemente contiene menos de aproximadamente 15 ppm en seco de CPD, incluso más preferiblemente contiene menos de aproximadamente 5 ppm en seco de CPD, e incluso más preferiblemente contiene menos de aproximadamente 3 ppm en seco de CPD, e incluso más preferiblemente contiene menos de aproximadamente 1 ppm en seco de CPD.

Procedimiento GC e instrumentación: GC se usó para determinar epi y los subproductos epi en las resinas tratadas y sin tratar, usando el método siguiente. La muestra de resina se absorbió sobre una columna Extrelut (disponible de EM Science, Extrelut, QE, Parte nº 901003-1) y se extrajo pasando acetato de etilo a través de la columna. Una parte de la solución de acetato de etilo se cromatografió sobre una columna capilar de diámetro interior ancho. Si se usaba un detector de ionización de llama (FID), los componentes se cuantificaban usando *n*-octanol como patrón interno. Si se usaba un detector de conductividad electrolítica (ELCD) o el detector específico de halógeno (XSD), se empleó un método externo estándar que usaba una cuantificación máxima correspondiente. El sistema de datos era un Millennium 2010 y HP ChemStation. El detector de FID se adquirió de Hewlett-Packard (HP), como parte de un modelo 5890 GC. El detector de ELCD, modelo 5220, se adquirió de OI Analytical. El detector de XSD se adquirió de

OI Analytical, modelo 5360 XSD. El instrumento GC usado fue un modelo HP 5890 serie II. La columna era DB-WAX (Megabore, J&W Scientific, Inc.) 30 m x 0,53 mm, con un grosor de película de 1,5 micrones. Para el FID y ELCD, el gas transportador era helio, con una velocidad de flujo de 10 ml/min. El programa del horno fue de 35°C durante 7 minutos, seguido de una elevación a 8°C/min hasta 200°C y mantenimiento a 200°C durante 5 minutos. El FID usó hidrógeno a 30 ml/min y aire a 400 ml/min a 250°C. El ELCD usó *n*-propanol como electrolito, con un ajuste de la velocidad de flujo de electrolito al 50% con una temperatura de 900°C. El reactor XSD se hizo funcionar en modo oxidativo a 1100°C con velocidad de flujo de aire de elevada pureza a 25 ml/min.

Adicionalmente, los productos de papel que contienen resinas según la presente invención, son capaces de almacenarse sin formación indebida de CPD. Por tanto, los productos de papel según la presente invención pueden tener concentraciones de CPD iniciales bajas, y pueden mantener concentraciones de CPD bajas durante un período de tiempo prolongado. Más específicamente, los productos de papel según la presente invención, fabricados con una concentración adicional de un 1% en peso de resina, que contiene menos de aproximadamente 250 partes por billón (ppb) de CPD, más preferiblemente menos de aproximadamente 100 partes por billón (ppb) de CPD, más preferiblemente menos de aproximadamente 50 partes por billón (ppb) de CPD, más preferiblemente menos de aproximadamente 10 partes por billón (ppb) de CPD, e incluso más preferiblemente menos de aproximadamente 1 parte por billón (ppb) de CPD, cuando se almacena durante períodos de hasta 2 semanas de duración, preferiblemente de hasta 6 meses de duración, e incluso más preferiblemente de hasta 2 semanas de duración, preferiblemente de hasta 6 meses de duración, e incluso más preferiblemente hasta un año de duración. Adicionalmente, los productos según la invención, fabricados con una concentración añadida de 1% en peso de resina, tendrán un incremento en el contenido de CPD de menos de aproximadamente 250 ppb, más preferiblemente menos de aproximadamente 100 ppb de CPD, incluso más preferiblemente menos de aproximadamente 50 ppb de CPD, e incluso más preferiblemente menos de aproximadamente 10 ppb de CPD, e incluso más preferiblemente menos de aproximadamente 1ppb de CPD cuando se almacena durante períodos de hasta 2 semanas de duración, más preferiblemente al menos 6 meses de duración, e incluso más preferiblemente hasta un año de duración. En otras palabras, los productos de papel según la presente invención tienen estabilidad al almacenamiento y no producirán un contenido excesivo de CPD en productos de papel, cuando los productos de papel se almacenan durante períodos tan cortos como un día y durante períodos de tiempo superiores a un año. Por tanto, las resinas según la presente invención producen una formación mínima de CPD en productos de papel, particularmente aquellas expuestas a medios acuosos, especialmente medios acuosos calientes, p.ej., bolsitas de te, filtros de café, etc. Ejemplos adicionales de productos de papel incluyen cartón para embalajes y para tísus y toallitas.

El papel se puede fabricar añadiendo la resina a concentraciones de adición distintas de aproximadamente 1% en peso; sin embargo, el contenido de CPD se debería de corregir para la concentración de adición. Por ejemplo, para un producto de papel fabricado añadiendo la resina a una concentración de adición de 0,5% en peso, con un contenido medido de CPD de 50 ppb, el CPD corregido sobre una base de concentración de adición de 1% en peso será de 100 ppb (50 ppb/0,5 por ciento de concentración de adición).

Para medir el CPD en productos de papel, el producto de papel se extrae con agua, según el método descrito en el estándar europeo EN 647, de octubre de 1993. A continuación se disuelven 5,80 gramos de cloruro sódico en 20 ml de extracto acuoso. El extracto acuoso salado se transfiere a una columna Extrelut de 20 gramos de capacidad, y se deja saturar la columna durante 15 minutos. Tras tres lavados con 3 ml de acetato de etilo y saturación de la columna, la columna Extrelut se eluye hasta que se recobran 300 ml de eluyente en aproximadamente 1 hora. Los 300 ml de extracto de acetato de etilo se concentran hasta aproximadamente 5 ml, usando un aparato concentrador Kuderna-Danish de 500 ml (si es necesario, se realiza concentración adicional usando un aparato micro Kuderna-Danish). El extracto concentrado se analiza mediante GC, usando el procedimiento e instrumentación descritos anteriormente. Típicamente, se usa un detector de conductividad electrolítico (ELCD), o un detector específico de halógeno (XSD). Se pueden usar otros detectores sensibles, p.ej., detectores de captura de electrones. Alternativamente, se puede medir CPD en productos de papel usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 4.

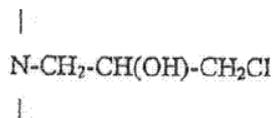
Las resinas que se pueden tratar con la sustancia enzimática según la presente invención pueden comprender cualquier resina de poliamina-epihalohidrina. La invención se refiere así mismo a la preparación, uso y tratamiento de resinas de poliamina-epihalohidrina, como resinas de poliaminopoliamida-epiclorohidrina, obtenidas haciendo reaccionar epihalohidrina, como epiclorohidrina, con un precursor polimérico (así mismo denominado aquí indistintamente polímero), como un precursor polimérico de poliaminoamida. En el caso de resinas de poliaminopoliamina, hay que destacar que el precursor polimérico de poliaminoamida se denomina también poliamidoamina, poliaminopoliamida, poliamidopoliamina, poliamidapoliamina, poliamida, poliamida básica, poliamida catiónica, aminopoliamida, amidopoliamina o poliaminamida.

Un grupo de polímeros preferido para uso en la presente invención incluye polímeros catiónicos, solos o junto con otros polímeros. Los polímeros catiónicos particularmente preferidos incluyen aquellos usados para el propósito de proporcionar resistencia en húmedo al papel como sustancias de acresponado. En Paper Chemistry, ISBN 0-216-92909-1, páginas 78-96, publicado en EE.UU. por Chapman Hall, New York. se describe una lista de muchos polímeros útiles en formulaciones de pasta de papel. El Capítulo 6 de este libro se titula "Wet strength chemistry", y se incorpora aquí en su totalidad, mediante referencia. El Capítulo 6 describe diversas clases de polímeros, que se utilizan para proporcionar resistencia en húmedo al papel, incluyendo: resina de poliaminoamida-epiclorohidrina,

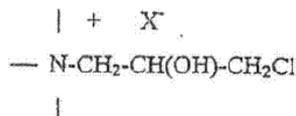
resina de urea-formaldehído, resina de melamina-formaldehído, resina de poliamida epoxidada, resina de poliacrilamida glioxalada, resina de polietilenoimina, almidón de dialdehído, adhesivo proteínáceo tratado con formaldehído, xantato de celulosa (viscosa), látex sintético, goma vegetal y glioxal. La resina de poliaminoamida-epiclorohidrina puede ser una resina de poliaminoamida-epiclorohidrina de la marca Kymene®, como Kymene® 557LX, Kymene® SLX2, o Kymene® 617, o una resina de poliaminoamida-epiclorohidrina como Kymene® 2064, resinas de Kymene® 367 y Kymene® 736 o resinas de poliamida-poliurilen-epihalohidrina, como Kymene® 450.

La invención se refiere a polímeros catiónicos como resinas de poliamina-epiclorohidrina, que se pueden usar solos o en combinación con otros polímeros usados para reforzar en húmedo papel y sustancias de acresponado. Estas resinas incluyen resinas de epiclorohidrina y polímeros catiónicos que contienen nitrógeno, ambos derivados de reactivos de epiclorohidrina. Resinas preferidas para los fines de esta invención incluyen resinas de refuerzo en húmedo de poliaminoamida-epiclorohidrina, según se describen en las patentes de EE.UU. N^{os} 2.926.154; 3.332.901; 3.891.589; 3.197.427; 4.240.935, 4.857.586; publicación de Patente Europea 0,349.935, y patente de Gran Bretaña 865.727, y solicitudes de patente de EE.UU. N^{os} 09/629.629, 09/592.681, 09/363.224 y 09/330.200. Además, las resinas incluyen Crepetrol® 80E o Crepetrol® A3025, Crepetrol® A6115, Crepetrol® A8225, Crepetrol® 870, SPC 003, y sustancias de acresponado Rezosol® 8289, que están disponibles de Hercules Incorporated, Wilmington, Delaware. Hay que destacar que estas resinas se denominan aquí generalmente como resinas de poliamina-epihalohidrina, y tales resinas incluyen, pero no están limitadas a, resinas de poliaminopoliamida-epihalohidrina (que se conocen también como resinas de polaiminoamida-epihalohidrina, resinas de poliamidapoliamina-epihalohidrina, resinas de poliaminopoliamida-epihalohidrina, resinas de aminopoliamida-epihalohidrina, resinas de poliamida-epihalohidrina); polialquileno de poliamina-epihalohidrina; y resinas de poliaminourileno-epihalohidrina, resinas de copoliamida-poliurilen-epihalohidrina, resinas de poliamida-poliurileno-epihalohidrina, siendo la epihalohidrina preferiblemente epiclorohidrina en cada caso. Los procedimientos para fabricar estas resinas conocidas se describen en esos documentos, que se incorporan aquí en su totalidad, mediante referencia a los mismos.

Resinas de epiclorohidrina ejemplares en estas patentes se caracterizan por la presencia de grupos N-clorohidrina de fórmula:

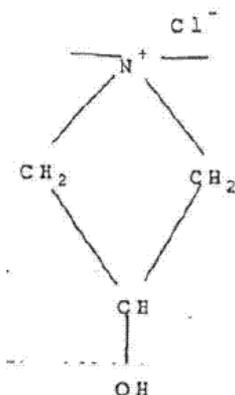


y grupos cuaternarios de N-clorohidrina de fórmula:

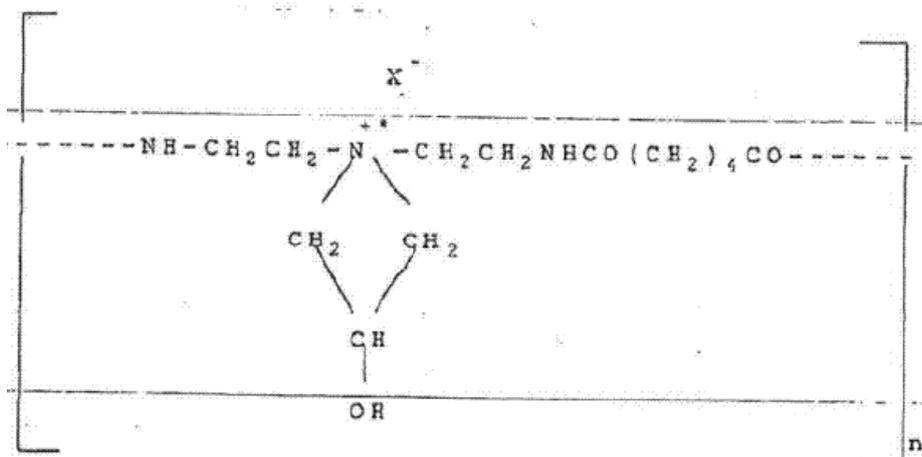


En la que el átomo de nitrógeno tetrasustituido está cargado positivamente (un nitrógeno cuaternario) y es, por tanto, catiónico;

y grupos de cloruro de 3-hidroxiazetidinio de fórmula:



Un polímero catiónico preferido, usado en la presente invención, es un polímero que tiene la siguiente fórmula:



En la que el átomo de nitrógeno tetrasustituido que lleva el asterisco está cargado positivamente (un nitrógeno cuaternario) y es, por tanto, catiónico. El átomo de nitrógeno está en un anillo de 4 miembros (es decir, un grupo 3-hidroxiazetidinio). Otras unidades poliméricas sin cargar coexisten también junto con cadenas poliméricas de este tipo de resina. Incluso aunque pueden estar presentes unos pocos grupos cargados negativamente (es decir, aniónicos) en el polímero, la carga neta a lo largo de la cadena polimérica es positiva. X⁻ es un anión simple, que no está unido covalentemente a la cadena polimérica. Generalmente, el anión es un ión cloruro, y n es un entero de aproximadamente 5 hasta varios miles, preferiblemente de 5 a 3000.

Las sustancias de acresponado incluyen, sin limitación, Crepetrol® 80E o Crepetrol® A3025, Crepetrol® A6115, Crepetrol® A8225, Crepetrol® 870, SPC 003 y sustancias de acresponado Rezsol®.

Para sustancias de resistencia en húmedo, aunque se pueden utilizar proporciones mayores de 1, se prefiere que la resina comprenda una resina formada en una reacción de poliamida-epihalohidrina con una proporción molar de epihalohidrina a grupo amina secundario inferior a 1, más preferiblemente, la proporción molar de epihalohidrina a grupo amina secundario es inferior a aproximadamente 0,975, siendo un intervalo preferido de la proporción molar de epihalohidrina a grupo amina secundario de aproximadamente 0,5 a 0,975, más preferiblemente siendo un intervalo preferido de la proporción molar de epihalohidrina a grupo amina secundario de aproximadamente 0,6 a 0,975, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,8 a 0,975. Para sustancias de acresponado, se prefiere que la resina comprenda una resina formada en una reacción de poliamida-epihalohidrina, con una proporción molar de epihalohidrina a grupo amina secundario inferior a aproximadamente 0,50, más preferiblemente inferior a aproximadamente 0,25, y puede incluso ser inferior a 0,1, con un límite inferior preferido de aproximadamente 0,05.

Además, las sustancias de acresponado según la presente invención no necesitan tantas funcionalidades de reticulación como las sustancias de resistencia en húmedo y pueden, por tanto, tener una concentración de azetidinio inferior que las sustancias de resistencia en húmedo. Por tanto, preferiblemente la concentración de azetidinio de las sustancias de acresponado es inferior a aproximadamente 10% molar, con un intervalo preferido de aproximadamente 5 a 10% molar, y preferiblemente la concentración de azetidinio de las sustancias de resistencia en húmedo es superior a 30% molar, con un intervalo preferido de aproximadamente 30 a 70% molar. El % molar de azetidinio y el % molar de otras especies, se puede determinar mediante el siguiente procedimiento NMR.

Procedimiento NMR:

Los espectros ¹³C NMR se adquirieron usando espectrómetros BRUKER AMX, equipados con una sonda de 10 mm de amplitud de banda. Una frecuencia de funcionamiento de ¹³C NMR de 100 MHz (AMX400) o 125 MHz (AMX500), es suficiente para la recogida de datos. En cualquier caso, los espectros se adquieren con desacoplamiento de ¹H continuo. La integración electrónica de las señales apropiadas proporciona concentraciones molares de los siguientes componentes de alquilación: ACH, EPX, GLY y AZE,

donde: ACH = aminoclorohidrinás poliméricas, EPX = epóxidos poliméricos, GLY = glicoles poliméricos, AZE = iones azetidinio.

A fin de calcular las concentraciones de cada una de estas especies, los valores integrales se tienen que colocar sobre una base de carbono (1). Por ejemplo, la región del espectro entre 20-42 ppm representa seis (6) carbonos de la cadena principal de adipato de dietilentriamina, por tanto, el valor integral se divide por seis. Este valor se usa como denominador común del polímero (PCD) para el cálculo de las especies de alquilación. Las desviaciones químicas de estas especies se proporcionan debajo (usando una referencia de campo de acetonitrilo de 1,3 ppm). El valor integral correspondiente de cada producto de alquilación se usa en el numerador para cálculo, referido a los ejemplos más abajo:

- señal de ACH a 68-69 ppm representa un carbono;
integral de ACH+PCD = fracción molar de ACH
- señal de GLY a 69-70 ppm representa un carbono;
integral de GLY + PCD = fracción molar de GLY
- 5 - Carbono EPX a 51-52 ppm representa un carbono;
integral de EPX + PCD = fracción molar de EPX
- La señal de AZE a 73-74 ppm representa dos carbonos, por tanto se requiere un factor de división de dos;
integral de AZE/2 + PCD = fracción molar de AZE

10 Los siguientes parámetros espectrales son condiciones experimentales estándar para ¹³C NMR análisis de resinas de Kymene o sustancias de acresponado en el Bruker AMX400.

	Temperatura	25°C
	Frecuencia de resonancia	100 MHz
	Nº de puntos de datos	64 K
	Tiempo de toma de muestras	20 microsegundos
15	Tiempo de adquisición	1,3 segundos
	Amplitud de barrido	25000 Hz
	Número de escaneos	1K
	Retraso de relajación	3 segundos
	Pulso del ángulo de punta	70 grados
20	Programa de pulso	zgde
	Tamaño espectral procesado	64K
	Función de apodización	exponencial
	Ampliación de línea	3 Hz

25 Adicionalmente, según la presente invención, para sustancias de acresponado derivadas de precursores poliméricos que contienen una funcionalidad amina terciaria, la sustancia de acresponado tendrá preferiblemente un contenido de una aminohalohidrina cuaternaria, p.ej., aminoclorohidrina, inferior a 30% en moles, mientras que las sustancias de resistencia en húmedo según la presente invención tendrán preferiblemente un contenido de aminohalohidrina cuaternaria, p.ej., aminoclorohidrina, superior a 30% en moles. Adicionalmente, sin ceñirnos a ninguna teoría, se cree que los compuestos de amina secundaria, como dietilentriamina, forman grupos azetidinio, mientras que los compuestos de tipo amina terciaria, como metil-bis(3-aminopropil)amina, formar grupos aminoclorohidrina cuaternarios. Ejemplos de compuestos de tipo amina terciaria incluyen, pero no están limitados a, el producto de reacción del ácido adípico y una metil-bis(3-aminopropil)amina, produciendo un precursor polimérico de amina terciaria. Este precursor polimérico se usa para producir una resina basada en amina terciaria, que contiene grupos de aminohalohidrina cuaternaria.

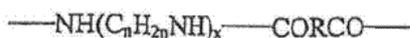
35 Las poliaminas preferidas para esta invención se producen haciendo reaccionar un ácido dicarboxílico o derivado del mismo, con metil-bis(3-aminopropil)amina o con una polialquilen-poliamina que contiene de dos a cuatro grupos alquilenos con dos a cuatro carbonos, dos grupos amina primarios, y de uno a tres grupos amina secundarios. Los derivados de ácido dicarboxílico adecuados para preparar las poliaminoamidas, incluyen ésteres, anhídridos y haluros de ácido.

40 Los procedimientos para preparar poliamino-amidas a partir de polialquilen-poliaminas se describen en la patente de EE.UU Nº 2.926.154 de Keim, que se incorpora aquí en su totalidad mediante referencia. Los procedimientos que utilizan metil-bis(3-aminopropil)amina para la preparación de poliamino-amidas se describen en la patente de EE.UU Nº 5.338.807 de Espy et al. y la patente de EE.UU Nº 5.994.449.

45 Ampliando lo anterior, las resinas de poliamino-poliamida-epiclorohidrina comprenden el producto de reacción polimérica hidrosoluble de epiclorohidrina y poliámida, derivado de polialquilen-poliamina y ácido carboxílico dibásico

alifático saturado que contiene de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 átomos de carbono. Se ha descubierto que las resinas de este tipo proporcionan resistencia en húmedo al papel, bien se fabriquen en condiciones ácidas, alcalinas o neutras. Adicionalmente, tales resinas son sustantivas para fibras celulósicas, de forma que se pueden aplicar económicamente a las mismas mientras que las fibras están en suspensiones acuosas de la consistencia usada en fábricas de papel.

En la preparación de las resinas catiónicas consideradas para el uso en la invención, el ácido carboxílico dibásico se hace reaccionar primeramente con la polialquilen-poliamina, en condiciones tales que produzca una poliamida hidrosoluble que contiene los siguientes grupos recurrentes:



donde n y x son cada uno 2 o más y R es el radical hidrocarbonado divalente del ácido carboxílico dibásico. Esta poliamida hidrosoluble se hace reaccionar a continuación con una epihalohidrina para formar las resinas catiónicas hidrosolubles. Los ácidos dicarboxílicos considerados para el uso en la preparación de las resinas de la invención son ácidos carboxílicos dibásicos alifáticos saturados que contienen de 2 a 10 átomos de carbono, como el ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido adípico, ácido azelaico y similares.

Se prefieren los ácidos dibásicos saturados que tienen de 4 a 8 átomos de carbono en la molécula, como los ácidos adípico y glutárico. También se pueden usar en la presente invención derivados de ácidos carboxílicos dibásicos, como ésteres, hemiésteres y anhídridos, como adipato de dimetilo, adipato de dietilo, glutarato de dimetilo, grutarato de dietilo, succinato de dimetilo y succinato de dietilo. También se pueden usar mezclas de dos o más derivados de ácidos carboxílicos dibásicos, así como mezclas de uno o más derivados de ácidos carboxílicos dibásicos con ácidos carboxílicos dibásicos.

Se pueden emplear diversas polialquilen-poliaminas, incluyendo polietilen-poliaminas, polipropilen-poliaminas, polibutilen-poliaminas, polipentilen-poliaminas, polihexilen-poliaminas y sucesivamente, y sus mezclas, entre las cuales la clase preferida económicamente son las polietilen-poliaminas. Más específicamente, las polialquilen-poliaminas consideradas para el uso, se pueden representar como poliaminas en las cuales los átomos de nitrógeno están unidos entre sí mediante grupos de fórmula $\text{-C}_n\text{H}_{2n-}$, en la que n es un entero pequeño, mayor que la unidad y el número de tales grupos en la molécula varía de dos hasta ocho. Los átomos de nitrógeno pueden estar unidos a los átomos de carbono adyacentes en el grupo $\text{-C}_n\text{H}_{2n-}$ o a dos átomos de carbono adicionales aparte, pero no al mismo átomo de carbono. Esta invención considera no sólo el uso de tales poliaminas como dietilen-triamina, trietilen-tetramina, tetraetilen-pentamina y dipropilen-triamina, que se pueden obtener en forma razonablemente pura, sino también mezclas de diversos materiales de poliamina brutos. Por ejemplo, la mezcla de polietilen-poliaminas obtenidas mediante la reacción de amoníaco y dicloruro de etileno, refinado sólo hasta el punto de eliminación de los cloruros, agua, exceso de amoníaco y etilen-diamina, es un material de partida satisfactorio. El término "polialquilen-poliamina" empleado en las reivindicaciones se refiere, por tanto, e incluye cualquiera de las polialquilen-poliaminas a las que se hace referencia anteriormente, o a una mezcla de tales polialquilen-poliaminas y sus derivados. Poliaminas adicionales que son adecuadas para la presente invención incluyen: bis-hexametilen-triamina (BHMT), metil-bis-aminopropilamina (MBAPA), otras polialquilen-poliaminas (p.ej., espermina, espermidina). Preferiblemente, las poliaminas son dietilen-triamina, trietilen-tetramina, tetraetilen-pentamina y dipropilen-triamina.

Es deseable, en algunos casos, incrementar el espaciado de los grupos amino secundarios en la molécula de poliamida, a fin de cambiar la reactividad del complejo poliamida-epiclorohidrina. Esto se puede lograr sustituyendo una diamina como etilen-diamina, propilen-diamina, hexametilen-diamina y similares, por una parte de la polialquilen-poliamina. Para este fin, hasta aproximadamente 80% de la polialquilen-poliamina se puede reemplazar mediante una cantidad molecularmente equivalente de la diamina. Normalmente, un reemplazo de aproximadamente 50% o menos servirá para tal fin.

Ácidos aminocarboxílicos apropiados que contengan al menos tres átomos de carbono o sus lactamas son también adecuados para usar a fin de incrementar el espaciado en la presente invención. Por ejemplo, ácido 6-amino-hexanoico y caprolactama.

Resinas de poliaminoureilen-epihalohidrina, particularmente resinas de poliaminoureilen-epiclorohidrina, también se consideran en la presente invención, como se describe en las patentes de EE.UU. N^{os} 4.487.884 y 3.311.594, que se incorporan aquí en su totalidad mediante referencia, como resinas de tipo Kymene@450 (Hercules Incorporated, Wilmington, Delaware). Las resinas de poliaminoureileno consideradas para preparación y uso en la invención, se preparan haciendo reaccionar epiclorohidrina con poliaminoureileno que contienen grupos amino libres. Estos poliaminoureileno son materiales hidrosolubles que contienen grupos amina terciarios y/o mezclas de grupos amina terciarios con grupos amino primarios y/o secundarios y/o grupos amonio cuaternarios. Sin embargo, los grupos amino terciarios deben constituir al menos 70% de los grupos de nitrógeno básicos presentes en el poliaminoureileno. Estos poliaminoureileno se pueden preparar haciendo reaccionar urea o tiourea con una poliamina que cotenga al menos tres grupos amino, al menos uno de los cuales sea un grupo amino terciario. La reacción se puede realizar, si se desea, en un disolvente adecuado como xileno.

El reactivo de poliamina debería tener preferiblemente al menos tres grupos amino, al menos uno de los cuales sea un grupo amino terciario. El reactivo de poliamina puede tener también grupos amino secundarios en cantidades limitadas. Las poliaminas típicas de este tipo, adecuadas para uso según se describió anteriormente son metil-bis(3-aminopropil)amina (MBAPA), metil-bis(2-aminoetil)amina, N-(2-aminoetil)piperazina, 4,7-dimetil-trietil-tetramina y así sucesivamente, que se pueden obtener en forma razonablemente pura, pero también mezclas de diversos materiales de poliamina brutos.

Para preparar el precursor polimérico de diácido y polialquilen-poliamina, una mezcla de los reactivos se calienta preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 125-200°C durante preferiblemente aproximadamente 0,5 a 4 horas, a presión atmosférica. Cuando se emplea una presión reducida, se pueden utilizar temperaturas inferiores, como 75°C a 150°C. Esta reacción de policondensación produce agua como subproducto, que se elimina mediante destilación. Al final de esta reacción, el producto resultante se disuelve en agua, a una concentración de aproximadamente 50% en peso de sólidos poliméricos totales.

Cuando se usa diéster en vez de diácido, la prepolimerización se puede realizar a una temperatura inferior, preferiblemente aproximadamente 100-175°C a temperatura atmosférica. En este caso, el subproducto será un alcohol, dependiendo del tipo de alcohol de la identidad del diéster. Por ejemplo, cuando se emplea un éster dimetilico, el subproducto de alcohol será metanol, mientras que el etanol será el subproducto obtenido a partir de un éster dietílico. Cuando se emplea una presión reducida, se pueden utilizar temperaturas más reducidas, como 75°C a 150°C.

Al convertir la poliamida, formada según se describió anteriormente, en una resina catiónica, se hace reaccionar con epíclorohidrina a una temperatura por encima de 0°C, más preferiblemente aproximadamente 25°C, hasta aproximadamente 100°C, y preferiblemente entre aproximadamente 35°C y aproximadamente 70°C, hasta que la viscosidad de una solución de sólidos al 20% a 25°C ha alcanzado aproximadamente C o superior en la escala de Gardner Holdt. Esta reacción se realiza preferiblemente en solución acuosa, para moderar la reacción. Aunque no es necesario, se puede realizar el ajuste de pH para incrementar o reducir la proporción de reticulación.

Cuando se alcanza la viscosidad deseada, se puede añadir suficiente agua para ajustar el contenido de sólidos de la solución de resina hasta la cantidad deseada, es decir, aproximadamente 15% en peso más o menos, el producto se puede enfriar hasta aproximadamente 25°C y se puede estabilizar luego para permitir el almacenamiento, mejorando la estabilidad de gelificación mediante la adición de suficiente ácido para reducir el pH hasta menos de aproximadamente 6, preferiblemente menos de aproximadamente 5, y con la máxima preferencia menos de aproximadamente 4. Cualquier ácido inorgánico u orgánico adecuado, como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido metanosulfónico, ácido nítrico, ácido fórmico, ácido fosfórico y ácido acético, se puede usar para estabilizar el producto. Se prefieren ácidos que no contengan halógeno, como ácido sulfúrico.

Las bandas fibrosas se acresponan usando las composiciones de esta invención mediante: (1) aplicación de la composición descrita anteriormente a una superficie secante para la banda o a la banda; (2) presionando la banda fibrosa contra la superficie secante para efectuar la adhesión de la banda a la superficie secante; y (3) disgregando la banda de las superficies secantes con un dispositivo de acresponado como una cuchilla limpiadora para acresponar la banda fibrosa. Preferiblemente, en la etapa (1) la composición se aplica a la superficie secante para la banda. La banda fibrosa preferida es una banda celulósica.

Preferiblemente, el adhesivo de acresponado se aplica en solución acuosa que contiene de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 por ciento en peso de la composición de resina. Más preferiblemente, la composición de resina está en solución, a la concentración de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 5 por ciento en peso, y con la máxima preferencia de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2 por ciento en peso. Para sustancias de acresponado basadas en peso seco, se usa una cantidad mínima de aproximadamente 0,001 por ciento en peso, basado en el peso seco de la pulpa o papel. Una cantidad mínima más preferida es aproximadamente 0,005 por ciento en peso, y la cantidad mínima más preferida es aproximadamente 0,01 por ciento en peso. La cantidad máxima preferida de composición de resina es aproximadamente 2 por ciento en peso. Un máximo más preferible es aproximadamente 1 por ciento en peso, y el máximo más preferido es aproximadamente 0,5 por ciento en peso. La superficie secante usada más habitualmente en operaciones comerciales es una secadora Yankee, y la solución acuosa de adhesivo se aplicará más a menudo al cilindro de acresponado o tambor mediante pulverización. Alternativamente, sin embargo, se puede añadir mediante aplicación a la banda fibrosa, preferiblemente mediante pulverización. En el caso de bandas fibrosas, es decir papel, el adhesivo de acresponado se puede añadir en el extremo húmedo de la máquina de papel mediante aplicación a la banda húmeda. En algunas situaciones, puede ser posible añadir el adhesivo de acresponado a la pulpa antes de la formación de la lámina.

Se pueden usar otros ingredientes, en particular sustancias que modificarán la adhesión de la banda a la superficie de secado, conjuntamente con los adhesivos de acresponado de esta invención.

Tales sustancias, conocidas también como sustancias de liberación o plastificantes, incluyen polioles, glicoles, polietilenglicoles, azúcares, oligosacáridos y aceites hidrocarbonados hidrosolubles.

El procedimiento para fabricar papel utilizando las composiciones de resina de esta invención comprende: (a)

proporcionar una suspensión de pasta acuosa; (b) añadir a la suspensión de pasta acuosa la resina y (c) laminar y secar la suspensión de pasta acuosa producida en (b) para obtener papel.

La suspensión acuosa de pasta de la etapa (a) del procedimiento, se obtiene mediante métodos bien conocidos en la técnica, como procedimientos de fabricación de pasta de papel mecánicos, químicos y semiquímicos, etc..
 5 Normalmente, tras la trituración mecánica y/o la etapa de fabricación de pasta de papel química, la pasta se lava para eliminar los productos químicos residuales de la fabricación de la pasta de papel y los componentes de madera solubilizados. Se puede utilizar fibra de pasta de papel blanqueada o sin blanquear en el procedimiento de esta invención. Las fibras de pasta reciclada también son adecuadas para el uso.

10 En la etapa (b), la resina de esta invención se añade preferiblemente a la suspensión acuosa de pasta en una cantidad mínima de aproximadamente 0,1 por ciento en peso, basada en el peso seco de la pasta. Una cantidad mínima más preferible es aproximadamente 0,2 por ciento en peso. La cantidad máxima preferible de la composición de resina es aproximadamente 5 por ciento en peso. Un máximo más preferible es aproximadamente 3 por ciento en peso y el máximo más preferible es aproximadamente 1,5 por ciento en peso. La composición de resina se añade generalmente en forma de una solución acuosa. Además de la resina, se pueden añadir también otros materiales
 15 usados normalmente en papel. Estos incluyen, por ejemplo, sustancias de apresto, pigmentos, alumbre, sustancias avivadoras, colorantes y sustancias de resistencia en seco, añadidos en cantidades bien conocidas en la técnica.

La etapa (c) se realiza según procedimientos bien conocidos para los expertos en la técnica de la fabricación de papel.

20 Según se describió anteriormente, las resinas que tienen al menos concentraciones reducidas de formación de CPD, pueden ser resinas según se producen en un procedimiento de síntesis de resinas sin tratamiento adicional. Adicionalmente, las resinas se pueden tratar mediante varios procedimientos, previamente a la reducción y/o eliminación de especies formadoras de CPD. Aún adicionalmente, después del tratamiento para reducir y/o eliminar las especies formadoras de CPD, y la resina se puede tratar también mediante varios procedimientos tras el tratamiento para reducir y/o eliminar las especies formadoras de CPD. por ejemplo, la resina se puede tratar
 25 mediante varios procedimientos, como procedimientos para eliminar la epihalohidrina y subproductos de epihalohidrina, de bajo peso molecular, por ejemplo, CPD, en la solución de resina. Sin limitar los tratamientos o resinas que se pueden utilizar, hay que destacar que resinas tales como Kymene®XSLX2, Kymene®617 y Kymene®557LX (disponibles de Hercules Incorporated, Wilmington, Delaware), Crepetrol® 80E o Crepetrol® A3025, Crepetrol® A6115, Crepetrol® A8225, Crepetrol® 870, SPC 003, and sustancias de acresonado Rezsol® 829, se podrían tratar previamente y/o subsecuentemente a la reducción o eliminación de las especies formadoras de CPD, con una columna de intercambio iónico de base, según se describe en la patente de EE.UU. N° 5.516.885 y WO 92/22601; con adsorción de carbono, según se describe en WO 93/21384; separación de membrana, p.ej., ultrafiltración, extracción, p.ej., acetato de etilo, según se describe en el registro obligatorio de invención H1613; o biodeshalogenación, según se describe en la patente de EE.UU. N° 5.972.691. WO 96/40967 y las patentes de
 30 EE.UU. N°s 5.470.742, 5.843.763 y 5.871.616, así como la solicitud de patente de EE.UU. N° 09/629.629. Adicionalmente, se puede utilizar cualquier combinación de reducción o eliminación de especies formadoras de CPD, según se describe en las solicitudes de patente de EE.UU mencionadas anteriormente, N°s 09/592.681, 09/363.224 y 09/330.200, con el tratamiento enzimático para reducción o eliminación de especies formadoras de CPD.

40 Aún adicionalmente, según la presente invención, según la presente invención, hay que destacar también que el tratamiento enzimático para eliminar o reducir las especies formadoras de CPD se puede realizar de forma solapada con la biodeshalogenación, o se puede realizar simultáneamente con la biodeshalogenación. Por tanto, la presente invención también se refiere a un procedimiento combinado en el que se inicia la liberación de 3-CPD de resinas y, simultáneamente, se produce la reducción de compuestos organohalogenados exentos de nitrógeno.

45 Hay que destacar también que, además del tratamiento enzimático seguido por el tratamiento de biodeshalogenación, los dos tratamientos se pueden realizar simultáneamente (tratamiento combinado aka). "Simultáneamente" significa que el segundo tratamiento (biodeshalogenación o enzimático) puede empezar antes de que haya finalizado el primer tratamiento (biodeshalogenación o enzimático). Para la presente invención, se obtiene la viscosidad deseada equilibrando las condiciones de tiempo, temperatura, pH, concentración enzimática,
 50 viscosidad de partida, y contenido de sólidos. Por ejemplo, el tratamiento combinado se puede iniciar a pH 6,8-7,8 durante las primeras 4-24 horas, y luego reducirse hasta pH 5,5-7,0, o el pH se puede dejar desviar hasta 6,5-7,2 durante las últimas 8-48 horas del tratamiento combinado. Las condiciones preferidas del tratamiento combinado incluyen, pero no están limitadas a, pH 6,5 a 8,0, más preferiblemente pH 6,8 a 7,6; intervalo de temperatura preferido de 20°C a 35°C, más preferiblemente de 25°C a 33°C. Las concentraciones enzimáticas para condiciones de tratamiento combinadas, dependerán de su actividad. Por ejemplo, en el caso de Alcalasa, la enzima puede estar presente en una cantidad desde aproximadamente 1g de Alcalasa 2,5L tipo DX (tal como se recibió) frente a 1600 g de resina de poliamina-epiclorohidrina (en seco) hasta 1 g de Alcalasa 2,5L tipo DX (tal como se recibió) frente a 1,5 g de resina de poliamina-epiclorohidrina (en seco), así mismo, la enzima puede estar presente en una cantidad desde aproximadamente 1g de Alcalasa 2,5L tipo DX (tal como se recibió) frente a 160 g de resina de poliamina-epiclorohidrina (en seco) hasta 1 g de Alcalasa 2,5L tipo DX (tal como se recibió) frente a 4 g de resina de poliamina-epiclorohidrina (en seco). Se prefiere que el tratamiento combinado se complete en 48 horas o menos. Con mayor
 60

preferencia el tratamiento combinado se completa en 24 horas o menos. Para adyuvantes de acresponado, la concentración de sólidos cuando se usan las condiciones de tratamiento combinadas puede ser inferior a 15 por ciento en peso, típicamente 4-14,5 por ciento en peso y preferiblemente de aproximadamente 8% en peso hasta aproximadamente 14,5% en peso. El tratamiento combinado para adyuvantes de acresponado se puede realizar también a una concentración de sólidos de 15% en peso y superior. Las concentraciones totales de sólidos preferidas son de 15 a 40 por ciento en peso, preferiblemente 18-35 por ciento en peso, e incluso más preferiblemente 18-28 por ciento en peso. Un intervalo adicional que se puede usar en la presente invención es 15-30 por ciento en peso.

La concentración total de sólidos total preferida cuando se usan condiciones de tratamiento combinadas para resinas de resistencia en húmedo con 15 por ciento en peso o superior, es 15-40 por ciento en peso, preferiblemente 16-35 por ciento en peso, e incluso más preferiblemente 18-28 por ciento en peso. Cuando se realiza un tratamiento combinado de resinas de resistencia en húmedo con menos de 15 por ciento en peso, los intervalos preferidos son de aproximadamente 4% en peso hasta aproximadamente 14,5% en peso, y de aproximadamente 8% en peso hasta aproximadamente 14,5% en peso.

Aún adicionalmente, la presente invención permite la biodeshalogenación a un contenido total de sólidos elevado, así como un tratamiento enzimático combinado para eliminar o reducir las especies formadoras de CPD y biodeshalogenación a un contenido total de sólidos elevado, con la posibilidad de reducir el ciclo de procesamiento, y al mismo tiempo crear un uso del volumen de reactor optimizado, cuando se lleva a cabo el procedimiento en lotes o en modo de alimentación de lotes (repetido).

La biodeshalogenación se puede lograr de diversas maneras, como se describe en una cualquiera de las patentes de EE.UU. N^{os} 5.470.742; 5,843.763 y 5,871.616, y la solicitud de patente de EE.UU. N^o 09/629.629 o tratamientobásico previo y biodeshalogenación, según se describe en la patente de EE.UU. N^o 5.972.691 y WO 96/40967, con o sin un tratamiento de base inorgánico previo, en las que la composición de resina se puede hacer reaccionar con un microorganismo o enzima en cantidades adecuadas para procesar hidrolizados de epihalohidrina hasta concentraciones muy bajas. Los microorganismos usan enzimas deshalogenasa para liberar ion haluro de la epihalohidrina y haloalcohol, y luego usan enzimas adicionales para romper los productos de reacción finalmente hasta dióxido de carbono y agua.

Aunque sin querer ceñirse a ninguna teoría, hay que destacar que, cuando las especies formadoras de CPD se eliminan o reducen, se libera CPD del componente oligomérico y/o polimérico de la resina y, por tanto, el CPD es un componente de la solución de resina. Teniendo en cuenta esto, la resina se somete preferiblemente a tratamiento para eliminar o reducir las especies formadoras de CPD, y luego la resina se biodeshalogenada. De esta manera, se pueden eliminar la epihalohidrina e hidrolizados de epihalohidrina (también denominados subproductos de hidrólisis), incluyendo el CPD liberado, por ejemplo mediante deshalogenación. Sin embargo, la resina se puede tratar inicialmente, por ejemplo mediante biodeshalogenación, y luego someterse a tratamiento para eliminar, inhibir y/o reducir las especies formadoras de CPD. En particular, cualquier CPD que se liberaría mediante el tratamiento debería de ser fácilmente soluble y puede, por tanto, eliminarse de la resina, al menos parcialmente, mediante lavado. Por ejemplo, cuando la resina con CPD liberado se incluye en un producto de papel, el CPD se puede eliminar por lavado del producto de papel, al menos parcialmente y, debido al tratamiento, la resina en el producto de papel no producirá CPD o no producirá cantidades indeseables de CPD. Adicionalmente, según se describió anteriormente, el tratamiento enzimático para eliminar o reducir las especies formadoras de CPD se puede realizar de forma simultánea/solapada con la biodeshalogenación.

El biocatalizador se puede proporcionar en forma, bien de células vivas, o como un extracto exento de células sin refinar, inmovilizado o de deshalogenasa refinada. El término "biodeshalogenación" se refiere a la deshalogenación de un compuesto organohalogenado exento de nitrógeno, usando un biocatalizador.

Como biocatalizador susceptible de biodeshalogenación, se puede utilizar cualquier microorganismo que sea capaz de deshalogenar compuestos organohalogenados exentos de nitrógeno, preferiblemente CPD y DCP, dejando sin embargo sustancialmente intactos los polímeros catiónicos que contienen nitrógeno, durante la deshalogenación de los compuestos organohalogenados exentos de nitrógeno. Preferiblemente, los microorganismos utilizados son *Agrobacterium radiobacter* (HK7) o *Arthrobacter histidinovorans* (HK1), y preferiblemente se utiliza una mezcla de dos componentes de *Agrobacterium radiobacter* (HK7) y *Arthrobacter histidinovorans* (HK1). Cuando sólo está presente CPD, se prefiere el uso de un solo microorganismo, HK1. Cuando sólo está presente DCP, se prefiere el uso de un solo microorganismo, HK7. Aunque no se ha realizado la identificación precisa de las enzimas que hacen operativo el método, se cree que las enzimas que efectúan el método pertenecen a la clase de enzimas denominadas "deshalogenasa tipo liasa de haluro de hidrógeno".

En particular, se describen diversas cepas bacterianas en las patentes de EE.UU. N^{os} 5.470.742, 5.843.763, 5.871.616 y 5.972.691, y la solicitud de patente de EE.UU. N^o 09/629.629. Estas cepas bacterianas incluyen microorganismos que contienen enzimas deshalogenantes capaces de deshalogenar hidroalcoholes y epihalohidrina depositados bajo los N^{os} de acceso del NCIMB 40271, 40272, 40273, 40274, 40313 y 40383. NCIMB son las siglas de "National Collection of Industrial and Marine Bacteria". El NCIMB, situado en 23 St. Marchar Drive, Aberdeen AB2 1RY, Escocia, Reino Unido, es una organización en el Reino Unido, responsable de documentar y mantener

muestras de bacterias proporcionadas para propósitos de solicitud de patentes. en materia de patentes, el NCIMB suministrará a las partes interesadas que así lo requieran, muestras auténticas de las bacterias reivindicadas en la literatura patente. NCIMB 40271 (*Arthrobacter species*), 40272 (*Agrobacterium radiobacter* HK7), 40273 (*Burkholderia cepacia*, anteriormente conocida como *Pseudomonas cepacia*), y 40274 (*Arthrobacter histidinolorans* HK1), se depositaron el 2 de abril de 1990. NCIMB 40383 (*Rhodococcus species*) se depositó el 11 de marzo de 1991, y NCIMB 40313 (*Burkholderia cepacia*, anteriormente conocida como *Pseudomonas cepacia*) se depositó el 30 de agosto de 1009. Por tanto, los microorganismos se han presentado en un depósito según las provisiones del Tratado de Budapest, y las cepas quedarán disponibles al público irrevocablemente y sin restricción tras la concesión de una patente.

Adicionalmente, hay que destacar que se usan preferiblemente dos cepas bacterianas, que se aislaron de muestras del suelo y el consorcio designado HKC, es decir, *Arthrobacter histidinolorans* (HK1), que se depositó en el Centraalbureau voor Schimmelcultures en Oosterstraat 1, P.O. Box 273, 3740 AG BAARN, Países Bajos, como número de acceso CBS 108919, el 10 de julio de 2000, y *Agrobacterium radiobacter* (HK7), que se depositó en el Centraalbureau voor Schimmelcultures en Oosterstraat 1, P.O. Box 273, 3740 AG BAARN, Países Bajos, como número de acceso CBS 108920 el 10 de julio de 2000. En materia de patentes, el Centraalbureau voor Schimmelcultures, que es un depósito de acuerdo con el Tratado de Budapest, suministrará a las partes interesadas que así lo requieran, muestras auténticas de las bacterias reivindicadas en la literatura patente. Por tanto, los microorganismos se han presentado en un depósito según las provisiones del Tratado de Budapest, y las cepas quedarán disponibles al público irrevocablemente y sin restricción tras la concesión de una patente. Hay que destacar que NCIMB 40272 y CBS 108920 se cree que son microorganismos idénticos, y que NCIMB 40274 y CBS 108919 se cree que son microorganismos idénticos.

Cada uno de estos microorganismos es capaz de degradar tanto 1,3-DCP como 3-CDP. Adicionalmente, *Agrobacterium radiobacter* (HK7) es capaz de reducir las concentraciones de 1,3-DCP más rápido que *Arthrobacter histidinolorans* HK1, mientras que *Arthrobacter histidinolorans* (HK1) mostraba una predilección por la degradación de 3-CPD. Por tanto, según se describe en la solicitud de patente de EE.UU. N° 09/629.629, se estima que el mejor rendimiento de biodeshalogenación se obtiene cuando ambas bacterias están presentes. Para asegurar que ambas bacterias están presentes en el procedimiento de biodeshalogenación, se prefiere iniciar el procedimiento con *Agrobacterium radiobacter* (HK7), y añadir posteriormente al *Arthrobacter histidinolorans* (HK1). Esto sería especialmente la situación para comenzar el procedimiento de biodeshalogenación continuo.

Los microorganismos que contienen enzimas adecuadas se usan para deshalogenar los hidrolizados de epihalohidrina contenidos en la composición de resina, con o sin un tratamiento inicial con una base inorgánica. Las enzimas y microorganismos se mantienen en una concentración adecuada para metabolizar sustancialmente los hidrolizados hasta ion cloruro y, por último, dióxido de carbono y agua. Por tanto, la concentración de hidrolizados en la composición de resina de la presente invención, después del tratamiento de biodeshalogenación, es preferiblemente inferior a aproximadamente 100 ppm (partes por millón en peso, en relación con el peso total de la solución acuosa que contiene las resinas tras la etapa de biorreacción), más preferiblemente inferior a aproximadamente 50 ppm (partes por millón en peso, en relación con el peso total de la solución acuosa que contiene las resinas tras la etapa de biorreacción), más preferiblemente inferior a aproximadamente 10 ppm (partes por millón en peso, en relación con el peso total de la solución acuosa que contiene las resinas tras la etapa de biorreacción), más preferiblemente inferior a aproximadamente 5 ppm (partes por millón en peso, en relación con el peso total de la solución acuosa que contiene las resinas tras la etapa de biorreacción), e incluso más preferiblemente inferior a aproximadamente 1 ppm (partes por millón en peso, en relación con el peso total de la solución acuosa que contiene las resinas tras la etapa de biorreacción).

Para lograr esto, la concentración de microorganismos debería ser al menos aproximadamente 5×10^7 células/ml, preferiblemente al menos aproximadamente 10^8 células/ml y con la máxima preferencia, al menos aproximadamente 10^9 células/ml. Para mantener un contenido activo óptimo de células en el reactor, la reacción se realiza mejor a aproximadamente 30°C +/- 5°C, en presencia de oxígeno (p.ej., desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 100% DOT) y nutrientes, en un reactor de tanque agitado. Según se usa aquí, el término "DOT" se refiere a "tensión de oxígeno disuelto" y es la cantidad de oxígeno, expresada como porcentaje, disuelta en un volumen determinado de agua, relativa a agua saturada con oxígeno, a la misma temperatura y presión. En un procedimiento continuo, el tiempo de residencia se controla mediante la velocidad de flujo y se controla para asegurar la reacción completa. Por tanto, en un estado estacionario, la concentración de hidrolizados de epihalohidrina en el reactor será de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 1000 ppm. En un modo de lotes o semidiscontinuo, que se puede repetir preferiblemente, la reacción completa se puede asegurar mediante control, por ejemplo mediante análisis GC, para lograr la concentración reducida deseada de hidrolizados de epihalohidrina.

El método de biodeshalogenación según la presente invención, se realiza poniendo en contacto un microorganismo o extracto enzimático, exento de células, con la composición acuosa que contiene los contaminantes organohalogenados no deseados. Tal contacto se logra típicamente formando una suspensión acuosa o suspensión del microorganismo o extracto exento de células con la composición acuosa, con agitación suficiente.

El método de biodeshalogenación según la presente invención, se realiza poniendo en contacto un microorganismo o extracto enzimático exento de células, con la composición acuosa que contiene los contaminantes

organohlogenados no deseados. Tal contacto se logra típicamente formando una suspensión acuosa o suspensión del microorganismo o extracto exento de células en la composición acuosa, con agitación suficiente.

Si se desea, el microorganismo o enzimas se pueden eliminar de la corriente de producto mediante filtración, sedimentación, centrifugación u otros medios conocidos para los expertos en la técnica. Alternativamente, los microorganismos o enzimas pueden permanecer en el producto final y desactivarse opcionalmente mediante esterilización térmica (p.ej., mediante tratamiento a 140°C durante 20 segundos) o mediante la adición de una concentración adecuada de una sustancia biocida adecuada. Sustancias biocidas adecuadas se pueden seleccionar fácilmente por los técnicos medios en la materia. Así, la desactivación del microorganismo se puede realizar reduciendo el pH de la mezcla acuosa hasta 2,8, luego añadiendo un biocida de especialidad farmacéutica (p.ej. biocida Proxell® BD, que comprende 1,2-benzisotiazolin-3-ona) en cantidad suficiente, normalmente 0,02% a 0,1%, basado en el peso de la composición acuosa. El biocida se puede añadir junto con sorbato potásico.

La eliminación del microorganismo se puede realizar mediante una o más de las etapas de filtración, centrifugación, sedimentación o cualquier otra técnica conocida para eliminar microbios de una mezcla. Los microorganismos mineralizan los compuestos organohalogenados exentos de nitrógeno, produciendo CO₂, agua y biomasa, sin que quede glicerol en la resina. Cuando el biocatalizador es una deshalogenasa inmovilizada, el producto de la reacción es glicidol, que se puede hidrolizar a glicerol con una hidrolasa inmovilizada.

Un problema asociado con la eliminación de microbios de la mezcla es que los métodos intensivos de separación, como la microfiltración, no sólo eliminan los microbios, sino también partículas de polímero catiónico, con el resultado de que las propiedades de resistencia en húmedo se reducen, lo cual es indeseable. Por tanto, es preferible dejar el microorganismo desactivado en la mezcla para evitar el problema de reducir las propiedades de resistencia en húmedo.

Se ha determinado inesperadamente que las composiciones de resina que tienen concentraciones de sólidos elevadas, es decir, superiores a 15% en peso, más preferiblemente superiores a 20% en peso, preferiblemente superiores a 25% en peso, se pueden biodeshalogenar usando microorganismos y/o enzimas, donde la resina comprende resinas basadas en amina terciaria, como Kymene® 450, Crepetrol® A3025 o Crepetrol® 80E. En el pasado, las resinas basadas en amina secundaria, como Kymene® 557H, Kymene® 557LX, Kymene® SLX, Kymene® Plus no se biodeshalogenan eficientemente a concentraciones de sólidos de 15% en peso o superiores. En la presente invención, las resinas basadas en amina secundaria se pueden biodeshalogenar eficientemente a 15% en peso o más. Además, se ha descubierto que las resinas de Daniel se pueden biodeshalogenar a 15% en peso o superior.

Con respecto a las resinas de Daniel, hay que destacar que las resinas hidrosolubles catiónicas, derivadas de la reacción de epihalohidrinatas, como epiclorohidrina y polialquilen-poliaminas, como etilen-diamina (EDA), bis-hexametilen-triamina (BHMT) y hexametilen-diamina (HMDA), se conocen desde hace tiempo. Estas resinas de polialquilen-poliamina-epihalohidrina, se describen en patentes como la patente de EE.UU. 3.655.506 de J.M. Baggett et al, y otras como la patente de EE.UU. 3.248.353 y la patente de EE.UU. 2.595.935 de Daniel et al., a partir de la cual surge la descripción genérica como "resinas de Daniel". Las memorias de estas patentes se incorporan aquí mediante referencia en su totalidad.

La polialquilen-poliamina empleada en la presente invención se puede seleccionar preferiblemente del grupo que consiste en polialquilen-poliaminas de fórmula:



en la que: $n = 1-7$, $x = 1-6$, $R = \text{H}$ o CH_2Y , $Z = \text{H}$ o CH_3 , y

$\text{Y} = \text{CH}_2\text{Z}$, H , NH_2 , o CH_3 ,

polialquilen-poliaminas de fórmula:



en la que: $m = 1-6$, $n = 1-6$, y $m+n = 2-7$, $R = \text{H}$ o CH_2Y , $Z = \text{H}$ o CH_3 ,

e $\text{Y} = \text{CH}_2\text{Z}$, H , NH_2 o CH_3 , y sus mezclas.

Las resinas de polialquilen-poliamina-epihalohidrina comprenden la reacción polimérica hidrosoluble de epihalohidrina y polialquilen-poliamina. Al fabricar las resinas de Daniel, la polialquilen-poliamina se añade a una mezcla acuosa de la epihalohidrina, de forma que durante la adición, la temperatura de la mezcla no exceda de 60°C. Temperaturas inferiores conducen a mejoras adicionales, aunque una temperatura muy baja puede producir una reactividad latente peligrosa en el sistema. Las temperaturas preferidas se sitúan dentro del intervalo de aproximadamente 25°C hasta aproximadamente 60°C. Se prefiere un intervalo de aproximadamente 30°C hasta aproximadamente 45°C.

La alquilación de la poliamina se produce rápidamente procediendo a formar aminas secundarias y terciarias,

dependiendo de las cantidades relativas de epihalohidrina y poliamina. Las concentraciones de epihalohidrina y poliamina son tales que entre aproximadamente 50% y 100% de los sitios de nitrógeno de amina disponibles se alquilan hasta aminas terciarias. Las concentraciones preferibles están entre aproximadamente 50% y aproximadamente 80% de alquilación de los sitios de nitrógeno de amina. La epihalohidrina en exceso, más allá de la requerida para alquilar totalmente todos los sitios amina a sitios amina terciarios se prefiere menos, debido a que esto origina una producción incrementada de subproductos de epihalohidrina.

A continuación de la adición completa de la poliamina, la temperatura de la mezcla se deja incrementar y/o la mezcla se calienta para efectuar la reticulación y la formación de azetidinio. La velocidad de reticulación es una función de la concentración, temperatura, agitación, y las condiciones de adición de la poliamina, todo lo cual se puede determinar fácilmente por los expertos en la técnica. La velocidad de reticulación se puede acelerar mediante la adición de pequeñas inyecciones de la poliamina u otras poliaminas de la presente invención, o la adición de varios álcalis a la temperatura de reticulación o a una temperatura próxima.

La resina se puede estabilizar frente a reticulación adicional hasta la gelificación, mediante adición de ácido, dilución con agua, o una combinación de ambas. Una acidificación hasta pH 5,0 o inferior es generalmente adecuada.

Las poliaminas preferidas son bis-hexametilen-triamina, hexametilen-diamina y sus mezclas.

Aunque no queriendo ceñirse a ninguna teoría, hay que destacar que las resinas como Kymene®, a una concentración de sólidos elevada, presentan dificultad y se biodeshalogenan menos fácilmente a una concentración de sólidos elevada, como superior al 15 por ciento de sólidos totales, debido al incremento de viscosidad y a la gelificación de la resina, produciendo un crecimiento reducido de las bacterias y una pérdida de funcionalidad del producto debido a reticulación (= pérdida de grupos funcionales). Controlando las condiciones, incluyendo pH, tiempo, temperatura, concentración de microorganismo o enzima, se puede lograr la biodeshalogenación para las resinas de Daniel y se pueden conseguir resinas basadas en aminas terciarias, con un contenido total de sólidos superior. Las condiciones preferidas para las resinas de Daniel, por ejemplo Kymene® 736, son: concentración total de sólidos de 15 a 40 por ciento en peso, preferiblemente 18-30 por ciento en peso, incluso más preferiblemente 18-22 por ciento en peso. Las condiciones preferidas para resinas basadas en aminas terciarias son: concentración total d sólidos de 15 a 40 por ciento en peso, preferiblemente 18-35 por ciento en peso, e incluso más preferiblemente 18-28 por ciento en peso, Los intervalos de pH preferidos, tanto para las resinas de Daniel como para las resinas basadas en aminas terciarias son: pH de 5,0 a 8,0, más preferiblemente intervalos de pH de 5,5 a 7,5. Los intervalos de temperatura preferidos, tanto para las resinas de Daniel como para las resinas basadas en aminas terciarias son: de 20 a 40 grados C, más preferiblemente 25 a 35 grados C. Se prefiere que la etapa de biodeshalogenación, comenzando por inoculación, se complete en 48 horas o menos. Con mayor preferencia, la etapa de biodeshalogenación se completa en 24 horas o menos, a partir del inicio de la inoculación.

No se esperaba que la biodeshalogenación se pudiese lograr a concentraciones de sólidos elevadas, debido a la falta de agua para los micoorganismos, mayor presión osmótica para mayor contenido de sólidos, y problemas indefinidos, como la concentración de especies de bajo peso molecular. Adicionalmente, se esperaría que fuese preciso un pretratamiento para eliminar los residuos más pesados, como mediante dilución o filtración. Adicionalmente, no se esperaría que la biodeshalogenación se pudiese lograr en un período de tiempo razonable, como en 48 horas. Aún adicionalmente, se esperaría una inestabilidad al almacenamiento a concentraciones de sólidos elevadas; sin embargo, las composiciones de resina según la presente invención son estables al almacenamiento, y no son susceptibles de gelificación. Las ventajas de la presente invención se obtienen para un contenido de sólidos elevado, bien se trate o no la composición de resina para eliminar o reducir las especies formadoras de CPD.

Aún adicionalmente, en la presente invención, resinas con alto contenido de sólidos, resistentes en húmedo, se pueden biodeshalogenar. Adicionalmente, el tratamiento enzimático se puede realizar simultáneamente con el tratamiento de biodeshalogenación. Aunque las resinas basadas en precursores poliméricos sin tratamiento de protección terminal, como Kymene E7219®, se pueden biodeshalogenar o tratar enzimáticamente durante la biodeshalogenación, se prefiere que estas resinas resistentes en húmedo sean resinas protegidas terminalmente, como se describe en WO 99/09252 y la patente de EE.UU. N° 6.222.006, que se incorporan aquí mediante referencia en su totalidad. Aunque no deseando ceñirse a ninguna teoría, hay que destacar que el protector terminal preferiblemente no es un inhibidor de biodeshalogenación. Por ejemplo, el ácido hexanoico residual procedente de la producción de un precursor polimérico protegido terminalmente, inhibe la biodeshalogenación microbiana, mientras que el ácido acético residual no inhibe la biodeshalogenación microbiana. La concentración de sólidos preferida para las resinas de resistencia en húmedo es de 15 a 40 por ciento en peso, preferiblemente 16-35 por ciento en peso, e incluso más preferiblemente 18-28 por ciento en peso. Un intervalo adicional que se puede usar en la presente invención es 15-30 por ciento en peso.

A fin de describir más claramente la presente invención, se proporcionan los siguientes ejemplos no limitativos para el propósito de representación, y no se conciben como limitativos del alcance de la invención. Todas las partes y porcentajes en los ejemplos son en peso, a menos que se indique otra cosa. Adicionalmente, ND en los Ejemplos indica "No detectado".

EJEMPLOS

A menos que se indique otra cosa, la viscosidad de Brookfield se determinó con un viscosímetro programable LVDV-II de Brookfield a 25°C. El procedimiento usado se basó en las instrucciones de funcionamiento, manual nº M/97-164. Este viscosímetro determinará la viscosidad sólo si se usa el husillo y rpm correctos para la viscosidad de la muestra. A menos que se indique otra cosa, todas las mediciones de CPD y DCP se realizan basándose en peso húmedo.

Ejemplo 1. Síntesis de una resina de poliaminopoliamida de elevado contenido en sólidos.

Se equipó un matraz de 3 l de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un embudo de adición y un agitador mecánico. Se añadieron al calentador 775,0 g de poli(ácido adípico-co-dietileno-triamina) al 49,6% en peso (disponible de Hercules Incorporated) y 505,3 g de agua. La solución se calentó hasta 25°C y luego se añadieron 162,5 g de epíclorohidrina (Aldrich, 99%) durante aproximadamente 2 minutos. La temperatura se dejó incrementar hasta 40°C y se mantuvo a esta temperatura. 2,45 horas después de la adición de la epíclorohidrina, se añadieron 1046,5 g de agua y se calentó la mezcla de reacción. Después de que la mezcla de reacción alcanzase 50°C (20 minutos), se añadieron 7,54 g de ácido sulfúrico al 96%. La temperatura se incrementó hasta 70°C y se controló la viscosidad de Gardner-Holdt a 25°C. Una vez que la viscosidad de Gardner-Holdt alcanzó G, la reacción se enfrió bruscamente mediante la adición de 187,5 g de agua que contenía 12,90 g de ácido sulfúrico al 96%. La mezcla de reacción se dejó enfriar hasta 25°C. El pH se ajustó hasta 3,5 con 3,00 gramos adicionales de ácido sulfúrico al 96%. La resina tenía 21,08% de sólidos totales y una viscosidad de Brookfield de 153 cps.

Ejemplo 2. Tratamiento enzimático de una resina de poliamino-amida-epi (Ejemplo 1).

Se equipó un matraz de 250 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un embudo de adición y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 200,0 g del Ejemplo 1. El pH se incrementó hasta 7,58 con 4,88 g de hidróxido sódico acuoso al 30%. Se eliminó una alícuota de 5 g, el pH se redujo hasta aproximadamente 3 con ácido sulfúrico al 96% y se analizó mediante GC. Luego se añadieron 5,18 g de Alcalasa 2,5 L tipo DX (disponible de Novozimas, usada tal como se recibió). La temperatura se incrementó desde 21°C hasta 30°C en 15 minutos, y se controló la viscosidad de Gardner-Holdt a 25°C. Se eliminaron alícuotas de cinco gramos de la mezcla de reacción y el pH se redujo hasta aproximadamente 3 con ácido sulfúrico al 96% a 1, 2, 4, 6 y 8 horas tras la adición de Alcalasa, y se analizó mediante GC. El pH se ajustó hasta 7,5 a 2 horas con 0,27 g de hidróxido sódico acuoso al 30% y a 4 horas con 0,18 g de hidróxido sódico acuoso al 30%. Después de 8 horas, el pH se redujo hasta 3,4 mediante adición de 2,22 g de ácido sulfúrico al 96%. La resina tenía una viscosidad de Brookfield de 95 cps (a 25°C).

Ejemplo 3. Biodeshalogenación de Ejemplo 2

Se equipó un matraz de 250 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un tubo de aspersión de aire y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 100,0 g de Ejemplo 2 y 55,56 g de agua. El pH se incrementó hasta 5,9 con 2,24 g de hidróxido sódico acuoso al 30% y luego 17,28 g de una mezcla de microorganismos que comprendía un inóculo de una resina de poliaminopoliamida-epíclorohidrina biodeshalogenada. Esto representa un valor de partida de concentración de células de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^6 células/ml. Este valor de partida corresponde a una concentración final de aproximadamente 10^9 células/ml a medida que el procedimiento se produce. El inóculo se añadió junto con 1,36 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrógeno fosfato potásico, 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato magnésico y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). Los microorganismos usados fueron: *Arthrobacter histidinolovorans* (HK1) y *Agrobacterium radiobacter* (HK7). Se inició la aspersión de aire, la temperatura se mantuvo a 30°C y el pH se mantuvo a 5,8 mediante la adición periódica de hidróxido sódico acuoso al 30%. Después de 48 horas, la mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y el pH se ajustó hasta 3,0 con 0,97 g de ácido sulfúrico al 96% y se añadieron 2,05 g de solución de biocida. [La solución de biocida consistían en Proxel® BD activo al 10% (de Zeneca Biocides) y sorbato potásico al 1,67% en agua desionizada]. La resina tenía un contenido total de sólidos de 14,5% en peso y una viscosidad de Brookfield de 62 cps (a 25°C).

Ensayo ácido

La cantidad de especies productoras de CPD de este ensayo se estimó usando el siguiente ensayo ácido. Se cargó una porción de resina a ensayar en una botella que contenía un agitador magnético. El pH se ajustó hasta 1,0 con ácido sulfúrico al 96%. La botella se remató terminalmente y se colocó en un baño de agua a 50°C y se mantuvo a 50°C con agitación. Periódicamente, se eliminaron alícuotas de la botella y se sometieron a análisis GC. El CPD producido tras 24 horas se usó para estimar la cantidad de especies productoras de CPD. Véase la Tabla 1 para resultados.

Tabla 1

Información de resina	Temp. (°C)	Tiempo (horas)	Viscosidad de Gardner-Holdt	Epi (ppm)	1,3-DCP (ppm)	2,3-DCP (ppm)	3-CPD (ppm)
Ejemplo 2a	21	0	N	15	1746	1,3	276
Ejemplo 2b	30	1	F-G	20	2004	1,6	478
Ejemplo 2c	30	2	E-F	22	1720	1,7	508
Ejemplo 2d	30	4	D-E	24	1802	1,4	680
Ejemplo 2e	30	6	D-E	26	1753	1,5	664
Ejemplo 2f	30	8	E-F	-----	-----	-----	-----
Ejemplo 3	----	-----	-----	0,1	ND	0,8	ND
Ensayo Ácido	50	24	-----	ND	ND	0,10	0,66

Ejemplo Comp. 4. Tratamiento enzimático de una resina de poliaminopoliamida-epi.

5 Tratamiento enzimático: Una porción del Ejemplo 1 se diluyó hasta un 13,5% de sólidos totales. Se equipó un matraz de 1l de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un tubo de aspersión de aire y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 900,0 g del Ejemplo 1 al 13,5%. El pH se incrementó hasta 7,54 con 13,85 g de hidróxido sódico acuoso al 30%. Se extrajo una alícuota de 5 g, el pH se redujo hasta aproximadamente 3 con ácido sulfúrico al 96% y se analizó mediante GC. Luego se añadieron 15,0 g de Alcalasa 2,5 L tipo DX (disponible de Novozymes, usada según se recibió). La temperatura se incrementó desde 22°C hasta 35°C en 15 minutos, y se controló la viscosidad de Gardner-Holdt a 25°C. Se eliminaron alícuotas de cinco gramos de la mezcla de reacción y el pH se redujo hasta aproximadamente 3 con ácido sulfúrico al 96% a 1, 2, 4, 6 y 8 horas tras la adición de la Alcalasa, y se analizó mediante GC. El pH se ajustó hasta 7,5 a las 2 horas con 0,80 g de hidróxido sódico acuoso al 30%, a las 4 horas con 0,48 g de hidróxido sódico acuoso al 30% y a las 6 horas con 0,78 g de hidróxido sódico acuoso al 30%. A las 6 horas, la temperatura se incrementó hasta 38°C. Tras 8 horas, el pH se redujo hasta 3,5 mediante adición de 6,54 g de ácido sulfúrico al 96%. La resina tenía una viscosidad de Brookfield de 32 cps (a 25°C).

15 Biodeshalogenación: Se equipó un matraz de 1l de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un tubo de aspersión de aire y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 700,0 g de la resina producida anteriormente. El pH se incrementó hasta 5,9 con 8,21 g de hidróxido sódico acuoso al 30% y luego con 77,8 g de una mezcla de microorganismos que comprendía un inóculo de una resina de poliaminopoliamida-epiclorohidrina biodeshalogenada. Esto representa un valor de partida de concentración de células de aproximadamente 10^5 hasta aproximadamente 10^6 células/ml. Este valor de partida corresponde a una concentración de tratamiento final de aproximadamente 10^9 células/ml, a medida que el procedimiento avanza. El inóculo se añadió conjuntamente con 6,12 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrogeno fosfato sódico, 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato de magnesio y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). Los microorganismos usados fueron: *Arthrobacter histidinovorans* (HK1) y *Agrobacterium radiobacter* (HK7). Se inició la pulverización de aire, la temperatura se mantuvo a 30°C y el pH se mantuvo a 5,8 mediante la adición periódica de hidróxido sódico al 30%. Tras 48 horas, la mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente, y el pH se ajustó hasta 3,0 con 4,02 g de ácido sulfúrico al 96% y se añadieron 8,42 g de solución biocida. [La solución biocida consistía en Proxel® BD activo al 10% (de Zeneca Biocides) y sorbato potásico al 1,67% en agua desionizada]. La resina tenía un contenido total de sólidos de 14,77% en peso y una viscosidad de Brookfield de 61 cps (a 25°C).

Ejemplo 5. Hoja de ensayo de evaluación de Ejemplo 3 y Ejemplo comp. 4.

35 Se prepararon hojas de laboratorio en una máquina de hojas de ensayo de Noble y Wood a pH 7,5 con 50:50 kraft blanqueado Rayonier: hojas plegadas de pulpa seca de craft de madera blanqueado Crown Vantage, refinado hasta 500 ml de estándar de refinado Canadiense. Se produjeron láminas que tenían 18,14 kg/278,71 m² de base. que contenían 0,5-1,0% de resina tratada (basada en los sólidos de la resina sin tratar). Las hojas de laboratorio se

5 prensaron en húmedo hasta un contenido de sólidos del 33% en una secadora de tambor a 230°C durante 55 segundos, para proporcionar 3-5% de humedad. El papel se acondicionó según el método TAPPI T-402 y se ensayó. Se determinó la resistencia a la tracción en seco, usando el método TAPPI T-494. Se determinó la resistencia a la tracción en húmedo usando el método TAPPI T-456 con un tiempo de inmersión de dos horas. Los productos de papel de CPD se determinaron mediante el siguiente procedimiento:

CPD en procedimiento de productos de papel

Extracción de papel el agua fría

La muestra se corta y extrae con agua a 23°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) durante 24 horas, mezclando ocasionalmente. Tras el período de extracción, el extracto se filtra si es necesario.

10 Nota: Asegurarse de que el papel está inmerso en el agua.

Procedimiento

1. Usando guantes de protección, cortar la muestra en pequeños trozos (aproximadamente 1 cm x 1 cm), y recoger en una bolsa de plástico. Mezclar bien los trozos.
2. Pesar 10 gramos de muestra, lo más cercanos a 0,0001 g, y colocar en un matraz cónico.
- 15 3. Añadir 200 ml de agua de tipo reactivo y tapar el matraz.
4. Colocar el matraz en un baño de agua durante 24 horas a 23°C ($\pm 2^\circ\text{C}$).
5. Decantar la solución en un matraz volumétrico de 250 ml. Si es necesario, filtrar la preparación usando un embudo de filtro de vidrio fritado con matraz de filtro. Aclarar los trozos dos veces con agua de tipo reactivo adicional y rellenar hasta la marca.

20 APARATOS

1. Matraz cónico, cuello ancho con tapón de vidrio esmerilado.
2. Matraz volumétrico, 200 ml.
3. Embudo de filtro de vidrio fritado (disponible de Lab Glass, cat. nº 1G-7080-170), con matraz de filtro, 500 ml.
4. Baño de agua, para mantener temperatura constante de 23°C ($\pm 2^\circ\text{C}$).
- 25 5. Cuter de papel o tijeras.
6. Balanza analítica, capaz de pesar lo más próximo a 0,0001 g.

REACTIVOS

1. Agua, disponible de Burdick&Jackson, cat. nº 365-4.

MÉTODO ECD- ELUCIÓN DE ÉTER Y DERIVATIZACIÓN

30 La separación de los analitos a partir del extracto acuoso tiene lugar a través de una columna de extracción líquido-líquido. DCP y 3-DCP se derivatizan con heptafluoro-butilimidazol (HFBI) y se analizan mediante cromatografía gaseosa, usando un detector de captura de μ -electrones (μ -ECD).

PROCEDIMIENTO

1. Pipeta de 20 ml de la solución de agua extraída en un vial de 35 ml.
- 35 2. Añadir 2,34 g de NaCl al vial. Tapar y agitar bien hasta que el NaCl se disuelva.
3. Verter la solución sobre una columna extrelut y dejar reposar durante 15 minutos.
4. Tras el período de espera, eluir con 250 ml de solución de eluyente (éter dietílico al 95%/isooctano. (Recoger el eluyente en un matraz volumétrico.
5. Verter el eluyente en un matraz de fondo redondo de 500 ml.
- 40 6. El disolvente se elimina usando un evaporador rotativo (Nota: el vacío no ha de exceder 200 mm de Hg), hasta que queden aproximadamente 15 ml.
7. Pipetear 1 ml de solución estándar Interna en el iso-octano restante.

8. Se tiene que correr un método en blanco de agua de tipo reactivo preparada según las etapas 2 a 7 para interferencia.

DERIVATIZACIÓN

- 5 1. Usando una jeringa o micropipeta, añadir 200 µl de HFBI al matraz. Tapar el matraz y agitar la solución con movimientos circulares para mezclar bien.
2. Dejar reposar el matraz durante 15 minutos a temperatura ambiente.
3. Transferir cuantitativamente la solución a un cilindro mezclador de 25 ml y rellenar hasta la marca con iso-octano.
4. Añadir ~1,5 ml de agua de tipo reactivo al matraz volumétrico, tapar y agitar para mezclar bien. Se habrá formado un precipitado, pero desaparecerá cuando esté bien mezclado con el agua.
- 10 5. Tras la separación de fases, eliminar aproximadamente 20 ml de la fase orgánica y poner en un vial de vidrio de 30 ml, que contenga 2 ml de agua de tipo reactivo. Agitar vigorosamente durante 1 minuto.
6. Tras la separación de fases, eliminar la capa de agua y desechar. La fase orgánica se analizará mediante cromatografía gaseosa, usando un detector de captura de μ -electrones (ECD).

REACTIVOS

- 15 1. Éter dietílico, disponible de FLUKA, apdo. de correos 355, Milwaukee, WI, nº de cat. 31690.
- **Hay que usar calidad a.p.; el éter no se puede secar ni estabilizar con etanol.
2. Agua, disponible de Burdick&Jackson, nº de cat. 365-4.
3. Cloruro sódico.
4. 1,3-DCP, disponible de TCI Americas, nº de cat. D0402.
- 20 5. 3-CPD; disponible de Aldrich, nº de cat. 10227-1.
6. Acetonitrilo, Nanograde; disponible de Fisher, nº de cat. 2442.
7. Iso-octano, EM Science, nº de cat. TX1389.
8. Eluyente: 95 ml de éter dietílico/5 ml de iso-octano.
9. Heptafluoro-butiril-imidazol (HFBI), disponible de Pierce, nº de cat. 44211.
- 25 10. 3-Metoxi-1,2-propanodiol (estándar interno).
11. Columna de extracción de fase sólida, Supelco, Supelco Park, Bellefonte, PA 16823-0048, preparada según la Sección XXX, nº de cat. 57022.
12. Varian Hydromatrix; disponible de Varian, Inc. nº de cat. 00198003.

APARATOS

- 30 1. Cromatógrafo de gases, Hewlett Packard Modelo 5890, o equivalente, susceptible de programación de temperatura de columna lineal, y equipado con un detector de captura de μ -electrones (μ -ECD).
2. Sistema de procesado de datos, Hewlett Packard ChemStation o equivalente.
3. Columna cromatográfica DB-SMS, 60 metros X 0,25 mm I.D.- disponible de J & W Scientific Inc., 91 Blur Ravin Road, Folsom, CA 95630, nº de cat. 122-5562.
- 35 4. Matraces, volumétrico, con tapón de vidrio, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml.
5. Viales, vidrio con tapones de rosca revestidos de teflón, 17 ml, 30 ml, 0,12 l.
6. Pipetas, de transferencia, 0,5, 1, 2, 3, 5, 10, 20 ml. Clase A.
7. Cuentagotas de medicinas, vidrio – Fisher, nº de cat. 13-701.
8. Balanza analítica, capaz de pesar lo más cercano a 0,0001 g.
- 40 9. Columna de extracción de fase sólida, Supelco, Supelco Park, Bellefonte, PA 16823-0048, preparada según la sección XXX. nº de cat. 57022.

10. Lana de vidrio.

11. Matraz de 500 ml de fondo redondo con tapón, disponible de Lab Glass, nº de cat. 013 y nº de cat. 114.

12. Evaporador rotativo de vacío que funciona a 35-40°C/800 mbar.

13. Jeringa de 500 µl o micropipetas desechables.

5 14. Cilindros mezcladores de tipo A, 25 ml; disponibles de Fisher, nº de cat. 08-563-1F.

SOLUCIÓN PATRÓN INTERNA (CONCENTRACIÓN BAJA)

1. Pesar 50 mg de 3-metoxi-1,2-propanodiol en un matraz volumétrico de 50 ml y registrar el peso hasta lo más próximo a 0,0001 g.

2. Diluir hasta la marca con acetonitrilo.

10 3. Pipetear 0,25 ml de solución en la etapa 2 en un matraz volumétrico de 100 ml y diluir hasta el volumen con éter dietílico.

4. Pipetear 10,0 ml de solución de la etapa 3 en un matraz volumétrico de 100 ml y diluir hasta el volumen con éter dietílico.

SOLUCIÓN DE CALIBRADO DE 1,3-DCP, 3-CPD (baja concentración)

15 1. Pesar 50 mg de 1,3-dicloro-2-propanol en un matraz volumétrico de 50 ml y registrar el peso hasta lo más próximo a 0,0001 g.

2. Diluir hasta la marca con acetonitrilo.

3. Pipetear 0,5 ml de solución en la etapa 2 en un matraz volumétrico de 10 ml y diluir hasta el volumen con éter dietílico.

20 4. Pesar 50 mg de 1,3-dicloro-2-propanodiol en un matraz volumétrico de 50 ml y registrar el peso hasta lo más próximo a 0,0001 g.

5. Diluir hasta la marca con acetonitrilo.

6. Pipetear 0,5 ml de solución en la etapa 5 en un matraz volumétrico de 10 ml y diluir hasta el volumen con éter dietílico.

25 7. Combinar las soluciones de las etapas 3 y 6 en un vial de 30 ml y mezclar bien.

8. Pipetear 0,5 ml de solución en la etapa 7 en un matraz volumétrico de 100 ml y diluir hasta el volumen con éter dietílico.

9. Pipetear 10,0 ml de solución en la etapa 8 en un matraz volumétrico de 100 ml y diluir hasta el volumen con éter dietílico. Esta es la Solución madre de calibrado.

30 **CURVAS DE CALIBRADO (baja concentración)**

1. Pipetear 0,1 ml de la solución madre de calibrado en un matraz volumétrico de 25 ml que contenga 1,0 ml de la solución patrón interna. Usando una pipeta, añadir 5,9 ml de éter dietílico al matraz. Esto será la concentración de calibrado nº 1.

35 2. Pipetear 0,2 ml de la solución madre de calibrado en un matraz volumétrico de 25 ml que contenga 1,0 ml de la solución patrón interna. Usando una pipeta, añadir 5,8 ml de éter dietílico al matraz. Esto será la concentración de calibrado nº 2.

3. Pipetear 0,5 ml de la solución madre de calibrado en un matraz volumétrico de 25 ml que contenga 1,0 ml de la solución patrón interna. Usando una pipeta, añadir 5,5 ml de éter dietílico al matraz. Esto será la concentración de calibrado nº 3.

40 4. Pipetear 0,1 ml de la solución madre de calibrado en un matraz volumétrico de 25 ml que contenga 1,0 ml de la solución patrón interna. Usando una pipeta, añadir 5,0 ml de éter dietílico al matraz. Esto será la concentración de calibrado nº 4.

45 5. Pipetear 2,0 ml de la solución madre de calibrado en un matraz volumétrico de 25 ml que contenga 1,0 ml de la solución patrón interna. Usando una pipeta, añadir 4,0 ml de éter dietílico al matraz. Esto será la concentración de calibrado nº 5.

6. Añadir 15 ml de iso-octano a cada uno de los matraces volumétricos de las etapas 1 a 6.
7. Usando una jeringa, añadir 200 µl de HFBI a cada uno de los matraces volumétricos de la etapa 7, luego tapar y dejar reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos con agitación ocasional.
8. Diluir cada matraz hasta un volumen final de 25 ml con iso-octano.
- 5 9. Añadir ~1,5 ml de agua de tipo reactivo a cada matraz volumétrico, tapar y agitar hasta mezclar bien. Se habrá formado un precipitado, pero desaparecerá cuando esté bien mezclado con el agua.
10. Tras la separación de fases, transferir aproximadamente 20 ml de la fase orgánica hasta unos viales de vidrio de 30 ml, en los que cada uno contiene 2 ml de agua de tipo reactivo. Agitar vigorosamente durante 1 minuto.
- 10 11. Tras la separación de fases, eliminar la capa de agua y desechar. Las fases orgánicas se analizarán mediante cromatografía de fases, usando un detector de captura de µ-electrones (µ-ECD), para determinar la curva de calibrado.

CONDICIONES DE FUNCIONAMIENTO DE GC

Temperaturas

	Columna	
15	Inicial	50°C
	Tiempo de retención inicial	2 min
	Velocidad inicial	1,5°C/min
	2ª Temperatura	100°C
	2ª Retención	5 min
20	2ª Velocidad	25°C/min
	Final	300°C
	Tiempo final de retención	10 min
	Entrada	250°C
	Temperatura del detector	320°C

25 Velocidades de flujo

Helio (gas portador)	1,5 ml/min a 20 psi (presión en la zona superior de la columna a 35°C).
Argón/metano	60 ml/min.

SECCIÓN XXX

PREPARACIÓN DE LAS COLUMNAS EXTRELUT QE

- 30 1. Usando un contenedor de extracción de fase sólida, presionar aproximadamente 0,5 g de lana de vidrio hasta el fondo.
2. Pesarse 18 g de Varian Hydromatriz y verter en el contenedor. Usando una sonda de vidrio, envasar el Extrelut apretadamente.
3. Colocar aproximadamente 0,5 g de lana de vidrio en la parte superior del contenedor.
- 35 Los resultados se describen en la Tabla 2. Los datos muestran que el tratamiento enzimático con un contenido del 21% de sólidos proporcionaba esencialmente los mismos resultados que el tratamiento con un 13,5% de sólidos. Estos resultados permiten un tratamiento enzimático más económico.

Tabla 2. Resultados de papel envejecido natural

Papel envejecido natural						
Ejemplo	% de resina Añadida	Peso básico normalizado				CPD en papel (ppb)
		Resistencia a la tracción en seco (kg/m)	Resistencia a la tracción en húmedo (kg/m)	% Húmedo/seco	% de comp. Ex XX	
Blanco	-----	20,22	0,61	3	-----	<3
Ej. comp. 4a	0,25	28,19	4,48	16	-----	<3
Ej. comp. 4b	0,50	28,35	5,6	20	-----	<3
Ej. comp. 4c	1,00	28,39	0,66	23	-----	10
Ejemplo 3a	0,25	26,01	4,15	16	93	<3
Ejemplo 3b	0,50	27,51	5,33	19	95	<3
Ejemplo 3c	1,00	28,48	6,20	22	94	7

Ejemplo 6-17. Procedimiento general para tratamiento enzimático de resinas de poliaminopoliamida-epi.

Se equipó un matraz de 500 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 400,0 g de Kymene® E7219 (disponible de Hercules Incorporated, Wilmington, DE; 25,51% de sólidos, viscosidad de Brookfield 267 cps a 25°C). El pH se incrementó con hidróxido sódico al 30%. Se eliminó una alícuota de 5 g, el pH se redujo hasta aproximadamente 3 con ácido sulfúrico al 96% y se analizó mediante GC. Se añadió Alcalasa 2,5 L tipo DX (disponible de Novozymes, usada según se recibió) (cantidad indicada en Tabla 3). La temperatura se incrementó durante 15 minutos hasta la temperatura de tratamiento deseada, y se controló la viscosidad de Gardner-Holdt a 25°C. Se eliminaron alícuotas de cinco gramos de la mezcla de reacción y el pH se redujo hasta aproximadamente 3 con ácido sulfúrico al 96% a 1, 2, 4, 6 y 8 horas tras la adición de la Alcalasa y se analizó mediante GC. El pH se vigiló cada hora y se ajustó con hidróxido sódico al 30% si el pH viraba en más de 0,10. Tras 8 horas, el pH se redujo hasta 3,5 mediante adición de ácido sulfúrico al 96%. Si la lectura de la viscosidad de Gardner-Holdt estaba entre dos letras, ambas letras se registraron en la Tabla. Si la viscosidad se incrementaba más de lo deseado, los ajustes de pH con hidróxido sódico acuoso al 30% se discontinuaban. Si la viscosidad se incrementaba hasta el punto de arriesgar la gelificación, el pH se reducía hasta 3,5 mediante adición de ácido sulfúrico al 96%. BV (cps) es la viscosidad de Brookfield (medida a 25°C) de la resina final. La proporción Alcalasa: sólidos activos se define como la cantidad de Alcalasa 2,5 L tipo DX, usada tal como se recibió, comparada con la cantidad de sólidos activos en la resina. Véase Tabla 3 para detalles.

Ejemplo 18-19. Procedimiento general para tratamiento enzimático de resinas poliaminopoliamida-epi.

Se equipó un matraz de 250 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 200,0 g de la sustancia del Ejemplo 1. El pH se incrementó con hidróxido sódico acuoso al 30%. Se eliminó una alícuota de 4 g, el pH se redujo hasta aproximadamente 3 con ácido sulfúrico al 96% y se analizó mediante GC. Se añadió Alcalasa 2,5 L tipo DX (disponible de Novozymes, usada según se recibió) (cantidad indicada en Tabla 3). La temperatura se incrementó en 15 minutos hasta la temperatura deseada y se controló la viscosidad de Gardner-Holdt a 25°C. Se eliminaron alícuotas de cuatro gramos de la mezcla de reacción y el pH se redujo hasta aproximadamente 3 con ácido sulfúrico al 96% a 1, 2, 4, 6 y 8 horas (si no estaba gelificado) tras la adición de Alcalasa, y se analizó mediante GC. El pH se controló a cada hora y se ajustó con hidróxido sódico al 30% si el pH viraba en más de 0,10. Tras 8 horas, el pH se redujo hasta 3,5 mediante adición de ácido sulfúrico al 96%. Si la lectura de la viscosidad de Gardner-Holdt estaba entre dos letras, ambas letras se registraron en la Tabla. Si la viscosidad se incrementaba más de lo deseado, los ajustes de pH con hidróxido sódico acuoso al 30% se discontinuaban. Con ambas reacciones, se permitió que la viscosidad se incrementara hasta el punto de gelificación. BV (cps) es la viscosidad de Brookfield (medida a 25°C) de la resina final. La proporción Alcalasa: sólidos activos se define como la cantidad de Alcalasa 2,5 L tipo DX, usada tal como se recibió, comparada con la cantidad de sólidos activos en la resina. Véase Tabla 3 para detalles.

35

Tabla 3

Ejemplo de resina	Acalasa:sólidos activos	pH	Temp (°C)	Tiempo (horas)	Viscosidad de Gardner-Holdt	BV (cps)
Ejemplo 6a	1,0:8,3	7,2	21	0	I-J	
Ejemplo 6b	1,0:8,3	7,2	30	1	E-F	
Ejemplo 6c	1,0:8,3	7,2	30	2	D-E	
Ejemplo 6d	1,0:8,3	7,2	30	4	D	
Ejemplo 6e	1,0:8,3	7,2	30	6	D	
Ejemplo 6f	1,0:8,3	7,2	30	8	D	84
Ejemplo 7a	1,0:8,3	7,8	21	0	I-J	
Ejemplo 7b	1,0:8,3	7,8	30	1	E-F	
Ejemplo 7c	1,0:8,3	7,8	30	2	E-F	
Ejemplo 7d	1,0:8,3	7,8	30	4	E-F	
Ejemplo 7e	1,0:8,3	7,8	30	6	F-G	
Ejemplo 7f	1,0:8,3	7,8	30	8	H-I	255
Ejemplo 8a	1,0:16,6	7,2	22	0	I-J	
Ejemplo 8b	1,0:16,6	7,2	25	1	G-H	
Ejemplo 8c	1,0:16,6	7,2	25	2	G	
Ejemplo 8d	1,0:16,6	7,2	25	4	F	
Ejemplo 8e	1,0:16,6	7,2	25	6	E-F	
Ejemplo 8f	1,0:16,6	7,8	25	8	E-F	105
Ejemplo 9a	1,0:16,6	7,8	22	0	I-J	
Ejemplo 9b	1,0:16,6	7,8	25	1	G-H	
Ejemplo 9c	1,0:16,6	7,8	25	2	G-H	
Ejemplo 9d	1,0:16,6	7,8	25	4	I	
Ejemplo 9e	1,0:16,6	7,8	25	6	J-K	
Ejemplo 9f	1,0:11,1	7,2	25	7	L-M	379
Ejemplo 10a	1,0:11,1	7,2	23	0	I-J	

ES 2 391 552 T3

Ejemplo de resina	Acalasa:sólidos activos	pH	Temp (°C)	Tiempo (horas)	Viscosidad de Gardner-Holdt	BV (cps)
Ejemplo 10b	1,0:11,1	7,2	25	1	F-G	
Ejemplo 10c	1,0:11,1	7,2	25	2	F	
Ejemplo 10d	1,0:11,1	7,2	25	4	E	
Ejemplo 10e	1,0:11,1	7,2	25	6	D-E	
Ejemplo 10f	1,0:11,1	7,8	25	8	D	77
Ejemplo 11a	1,0:11,1	7,8	23	0	I-J	
Ejemplo 11b	1,0:11,1	7,8	25	1	F-G	
Ejemplo 11c	1,0:11,1	7,8	25	2	F	
Ejemplo 11d	1,0:11,1	7,8	25	4	E-F	
Ejemplo 11e	1,0:11,1	7,8	25	6	F	
Ejemplo 11f	1,0:8,3	7,2	25	8	F	149
Ejemplo 12a	1,0:8,3	7,2	22	0	H-I	
Ejemplo 12b	1,0:8,3	7,2	25	1	F-G	
Ejemplo 12c	1,0:8,3	7,2	25	2	E-F	
Ejemplo 12d	1,0:8,3	7,2	25	4	D-E	
Ejemplo 12e	1,0:8,3	7,2	25	6	C	
Ejemplo 12f	1,0:8,3	7,8	25	8	B-C	60
Ejemplo 13a	1,0:8,3	7,8	22	0	H-I	
Ejemplo 13b	1,0:8,3	7,8	25	1	F-G	
Ejemplo 13c	1,0:8,3	7,8	25	2	E-F	
Ejemplo 13d	1,0:8,3	7,8	25	4	D-E	
Ejemplo 13e	1,0:8,3	7,8	25	6	C	
Ejemplo 13f	1,0:8,3	7,2	25	8	C-D	85
Ejemplo 14a	1,0:8,3	7,2	22	0	H-I	
Ejemplo 14b	1,0:8,3	7,2	35	1	F-G	
Ejemplo 14c	1,0:8,3	7,0	35	2	E-F	

ES 2 391 552 T3

Ejemplo de resina	Acalasa:sólidos activos	pH	Temp (°C)	Tiempo (horas)	Viscosidad de Gardner-Holdt	BV (cps)
Ejemplo 14d	1,0:8,3	6,9	35	4	F	
Ejemplo 14e	1,0:8,3	6,8	35	6	F-G	
Ejemplo 14f	1,0:8,3	7,5	35	8	G-H	175
Ejemplo 15a	1,0:8,3	7,5	22	0	H-I	
Ejemplo 15b	1,0:8,3	7,5	35	1	F-G	
Ejemplo 15c	1,0:8,3	7,3	35	2	F	
Ejemplo 15d	1,0:8,3	7,3	35	4	J-K	
Ejemplo 15e	1,0:16,6	7,5	35	4,5	N	434
Ejemplo 16a	1,0:16,6	7,5	22	0	H-I	
Ejemplo 16b	1,0:16,6	7,5	25	1	G	
Ejemplo 16c	1,0:16,6	7,5	25	2	G	
Ejemplo 16d	1,0:16,6	7,5	25	4	F-G	
Ejemplo 16e	1,0:16,6	7,5	25	6	E-F	
Ejemplo 16f	1,0:11,1	7,5	25	8	E-F	138
Ejemplo 17a	1,0:11,1	7,5	22	0	H-I	
Ejemplo 17b	1,0:11,1	7,5	25	1	F-G	
Ejemplo 17c	1,0:11,1	7,5	25	2	E-F	
Ejemplo 17d	1,0:11,1	7,5	25	4	D-E	
Ejemplo 17e	1,0:11,1	7,5	25	6	D	
Ejemplo 17f	1,0:16,3	7,5	25	8	D	80
Ejemplo 18a	1,0:16,3	7,5	22	0	H	
Ejemplo 18b	1,0:16,3	7,5	33	1	I	
Ejemplo 18c	1,0:16,3	7,5	33	2	K	
Ejemplo 18d	1,0:16,3	7,5	33	3	V	
Ejemplo 18e	1,0:8,1	7,5	33	4	W-X	
Ejemplo 19a	1,0:8,1	7,5	22	0	H	

Ejemplo de resina	Acalasa:sólidos activos	pH	Temp (°C)	Tiempo (horas)	Viscosidad de Gardner-Holdt	BV (cps)
Ejemplo 19b	1,0:8,1	7,5	33	1	F	
Ejemplo 19c	1,0:8,1	7,5	33	2	E-F	
Ejemplo 19d	1,0:8,1	7,5	33	4	F	
Ejemplo 19e	1,0:8,1	7,5	33	6	H	
Ejemplo 19f	1,0:8,1	7,5	33	7	L	
Ejemplo 19g	1,0:8,1	7,5	33	8	Gel	

Ejemplo 20. Tratamiento enzimático combinado y biodeshalogenación de una resina de poliaminopoliamida-epi. (Ejemplo de referencia).

Aumento 1 (Preparación de partida):

5 Se diluyó una porción de Kymene® E7219 (disponible de Hercules Incorporated, Wilmington, DE; 21,51% de sólidos, 267 cps de viscosidad de Brookfield a 25°C) hasta 13,5% de sólidos totales. Se equipó un matraz de 400 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un tubo de aspersión de aire y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 400 g de Kymene® E7219 al 13,5%. El pH se incrementó hasta 7,54 con 7,42 g de hidróxido sódico acuoso al 30%. Se eliminó una alícuota de 5 g, el pH se redujo hasta aproximadamente 3 con ácido sulfúrico al 96% y se analizó mediante GC. Luego se añadieron 3,33 g de 10 Alcalasa 2,5 L tipo DX (disponible de Novozymes, usada según se recibió) y luego 44,4 g de una mezcla de microorganismos que comprendía un inóculo de una resina de poliaminopoliamida-epiclorohidrina biodeshalogenada. Esto representa un valor de concentración de células de partida de aproximadamente 10^5 hasta aproximadamente 10^6 células/ml. Este valor de partida corresponde a una concentración de tratamiento final de aproximadamente 10^9 células/ml, a medida que el procedimiento avanza. El inóculo se añadió, conjuntamente con 15 3,50 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrogeno-fosfato de potasio; 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato de magnesio y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). Los microorganismos usados fueron: *Arthrobacter histidinovorans* (HK1) y *Agrobacterium radiobacter* (HK7). La aspersión de aire comenzó, la temperatura se mantuvo a 30°C. El tratamiento se controló mediante la viscosidad de Gardner-Holdt y se controló el crecimiento bacteriano mediante densidad óptica (DO_{600}). La DO_{600} se determinó 20 midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. Periódicamente, se eliminó una alícuota de 5 g, el pH se redujo hasta aproximadamente 3 con ácido sulfúrico al 96% y se analizó mediante GC. El pH del tratamiento se mantuvo durante las primeras 30 horas a 7,1-7,5 mediante adición periódica de hidróxido sódico acuoso. Tras 30 horas, el pH era inferior a 5,8 mediante 25 adición de ácido sulfúrico al 96%. Tras 48 horas, la mezcla resultante se usó como inóculo para el aumento 2, más adelante.

Aumento 2:

30 Se diluyó una porción de Kymene® E7219 (disponible de Hercules Incorporated, Wilmington, DE; 21,51% de sólidos, 267 cps de viscosidad de Brookfield a 25°C) hasta 13,5% de sólidos totales. Se equipó un matraz de 2 l de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un tubo de aspersión de aire y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 1600 g de Kymene® E7219 al 13,5%. El pH se incrementó hasta 7,52 con 30,38 g de hidróxido sódico acuoso al 30%. Se eliminó una alícuota de 5 g, el pH se redujo hasta aproximadamente 3 con ácido sulfúrico al 96% y se analizó mediante GC. Luego se añadieron 13,32 g de 35 Alcalasa 2,5 L tipo DX (disponible de Novozymes, usada según se recibió) y luego 177,8 del inóculo del aumento 1, junto con 14,0 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrogeno-fosfato de potasio; 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato de magnesio y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). La aspersión de aire comenzó, la temperatura se mantuvo a 30°C. El tratamiento se controló mediante la viscosidad de Gardner-Holdt y se controló el crecimiento bacteriano mediante densidad óptica (DO_{600}). La DO_{600} se determinó midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. Periódicamente, se eliminó una alícuota de 5 g, el pH se redujo hasta aproximadamente 3 con 40 ácido sulfúrico al 96% y se analizó mediante GC. El pH del tratamiento se mantuvo durante las primeras 8,5 horas a 7,2-7,5 mediante adición periódica de hidróxido sódico acuoso al 30%. Durante el tiempo de tratamiento restante, el

ES 2 391 552 T3

pH se mantuvo a 6,8-7,2 mediante la adición periódica de hidróxido sódico acuoso al 30%. Tras 48 horas, la mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y el pH se ajustó hasta 2,8 con 12,80 g de ácido sulfúrico al 96% y se añadieron 19,26 g de solución de biocida. [La solución de biocida consistía en Proxel® BD activo (de Zeneca Biocides) y sorbato potásico al 1,67% en agua desionizada]. Véase Tabla 4 para los resultados del control del tratamiento.

5

Tabla 4

Alícuota	Tiempo	pH (30C)	Viscosidad de Gardner	DO ₆₀₀ (abs.)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
-1	"0"	7,49 (21 C)	D/E	0,058	679	204
-78A	0	Tiempo "0" es justo tras la adición de NaOH Tiempo "0" es justo tras la adición de Alcalasa				
----	0,25	7,43	----	----	----	----
-2	1	7,39	B/C	----	589	242
-3	2	7,32	B/C	0,062	585	268
-4	4	7,32	B/C	0,067	586	309
-5	6	7,25	B	0,064	584	322
----	7	7,20 a 7,52	----	----	----	----
-6	8	7,50	B	0,061	554	331
-7	10	7,40	B	0,064	540	363
-8	14	7,26 a 7,45	B	0,064	519	399
-9	24	7,20	D	0,109	476	384
----	28	7,09	E/F	0,165	----	----
-10	30	7,05 a 5,79	G/H	0,201	422	296
----	32	5,83	H	0,260	----	----
----	34	5,84	----	0,300	----	----
-11	37	5,81	H/I	0,328	360	317
-12	48	5,60	I/J	0,473	ND	198
Alícuota	Tiempo	pH (30C)	Viscosidad de Gardner	DO ₆₀₀ (abs.)	DCP (ppm)	CPD (ppm)

-1	"0"	7,48 (26 C)	D/E	0,071	745	256
-82A&84B	0	Tiempo "0" es justo tras la adición de NaOH Tiempo "0" es justo tras la adición de Alcalasa				
----	0,25	7,46	----	----	----	----
-2	1	7,39	C/D	----	639	394
-3	2	7,32	C/D	0,086	614	427
-4	4	7,20 hasta 7,40	C	0,108	579	531
-5	6	7,31	C	0,138	537	540
-6	8,5	7,16	C	0,198	391	629
-7	12,5	7,02	B/C	0,271	66	796
-8	22	6,81	D	0,481	ND	144
----	24	6,78 hasta 7,12	----	----		
Resina es de color amarillo negruzco claro						
----	28	7,02	D/E	0,560		
-9	30	6,99	D/E	0,578	0,3	7,8
-10	48	6,95	D/E	0,611	0,3	0,5
Ensayo ácido	----	----	----	----	ND	1,1

Ejemplo 21. Tratamiento combinado enzimático y de biodeshalogenación de una resina de poliaminopoliamida-epi (Usando dos veces la Alcalasa, como en el Ejemplo 20) (Ejemplo de referencia)

Aumento 1 (Preparación de partida):

- 5 Se diluyó una porción de Kymene® E7219 (disponible de Hercules Incorporated, Wilmington, DE; 21,51% de sólidos, 267 cps de viscosidad de Brookfield a 25°C) hasta 13,5% de sólidos totales. Se equipó un matraz de 400 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un tubo de aspersión de aire y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 400 g de Kymene® E7219 al 13,5%. El pH se incrementó hasta 7,52 con 7,38 g de hidróxido sódico acuoso al 30%. Se eliminó una alícuota de 5 g, el pH se redujo hasta aproximadamente 3 con ácido sulfúrico al 96% y se analizó mediante GC. Luego se añadieron 6,66 g de
- 10 Alcalasa 2,5 L tipo DX (disponible de Novozymes, usada según se recibió) y luego 44,4 g de una mezcla de microorganismos que comprendía un inóculo de una resina de poliaminopoliamida-epiclorohidrina biodeshalogenada. Esto representa un valor de partida de concentración de células de aproximadamente 10^5 hasta aproximadamente 10^6 células/ml. Este valor de partida corresponde a una concentración de tratamiento final de aproximadamente 10^9 células/ml, a medida que el procedimiento avanza. El inóculo se añadió, junto con 3,50 g de
- 15 una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrogeno-fosfato de potasio; 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato de magnesio y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). Los microorganismos usados fueron: *Arthrobacter histidinovorans* (HK1) y *Agrobacter radiobacter* (HK7). La aspersión de aire comenzó, la temperatura se mantuvo a 30°C. El tratamiento se controló mediante la viscosidad de Gardner-Holdt y se controló el crecimiento bacteriano mediante densidad óptica (DO_{600}). La DO_{600} se determinó midiendo la
- 20 densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis

(Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. Periódicamente, se eliminó una alícuota de 5 g, el pH se redujo hasta aproximadamente 3 con ácido sulfúrico al 96% y se analizó mediante GC. El pH del tratamiento se mantuvo durante las primeras 8,5 horas a 7,2-7,5 mediante adición periódica de hidróxido sódico acuoso al 30%. Después de 24 horas, el pH se dejó virar hasta pH 6,71 en el curso de 24 horas. Tras 48 horas, la mezcla resultante tenía una viscosidad de Brookfield de 71 cps (medida a 25°C). Esta mezcla se usó para el aumento 2, a continuación.

Aumento 2:

Se diluyó una porción de Kymene® E7219 (disponible de Hercules Incorporated, Wilmington, DE; 21,51% de sólidos, 267 cps de viscosidad de Brookfield a 25°C) hasta 13,5% de sólidos totales. Se equipó un matraz de 2 l de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un tubo de aspersión de aire y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 1600 g de Kymene® E7219 al 13,5%. El pH se incrementó hasta 7,55 con 29,99 g de hidróxido sódico acuoso al 30%. Se eliminó una alícuota de 5 g, el pH se redujo hasta aproximadamente 3 con ácido sulfúrico al 96% y se analizó mediante GC. Luego se añadieron 26,64 g de Alcalasa 2,5 L tipo DX (disponible de Novozymes, usada según se recibió) y luego 177,8 del inóculo del aumento 1, junto con 14,0 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrogenofosfato de potasio; 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato de magnesio y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). La aspersión de aire comenzó, la temperatura se mantuvo a 30°C. El tratamiento se controló mediante la viscosidad de Gardner-Holdt y se controló el crecimiento bacteriano mediante densidad óptica (DO₆₀₀). La DO₆₀₀ se determinó midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. Periódicamente, se eliminó una alícuota de 5 g, el pH se redujo hasta aproximadamente 3 con ácido sulfúrico al 96% y se analizó mediante GC. El pH del tratamiento se mantuvo durante las primeras 8,5 horas a 7,1-7,5 mediante adición periódica de hidróxido sódico acuoso al 30%. Durante el tiempo restante, el pH se mantuvo a pH 6,8-7,2, mediante adición periódica de hidróxido sódico acuoso al 30%. Después de 48 horas, la mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y el pH se ajustó hasta 2,8 con 12,85 g de ácido sulfúrico al 96% y se añadieron 19,26 g de solución de biocida. (La solución de biocida consistía en Proxel® BD activo (de Zeneca Biocides) al 10% y sorbato potásico al 1,67% en agua desionizada). La resina tenía una viscosidad de Brookfield de 30 cps (medida a 25°C). Véase Tabla 5 para los resultados de controlar el tratamiento.

Tabla 5

Muestra	Tiempo	pH (30C)	Viscosidad G/H	DO ₆₀₀ (abs.)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
-1	"0"	7,50 (21 C)	D/E	0,060	770	269
-80B	0	Tiempo "0" es justo tras la adición de NaOH Tiempo "0" es justo tras la adición de Alcalasa				
----	0,25	7,44	----	----	----	----
-2	1	7,37	B	----	657	412
-3	2	7,34	B	0,058	645	477
-4	4	7,30	A/B	0,063	677	526
-5	6	7,25	A/B	0,062	623	508
----	7	7,20 hasta 7,52	----	----	----	----
-6	8	7,50	A	0,059	599	504
-7	10	7,40	A/A-1	0,062	615	559
-8	14	7,26 hasta 7,47	A/A-1	0,065	592	569
-9	24	7,22	A/B	0,139	516	560
----	28	7,12	A/B	0,259	----	----

ES 2 391 552 T3

-10	30	7,11	B	0,295	387	508
----	32	7,07	B	0,336	----	----
----	34	7,03	----	0,391	----	----
-11	37	6,93	B	0,475	ND	497
-12	48	6,71	C	0,716	ND	ND
Aumento 2						
Alícuota	Tiempo	pH (30C)	Viscosidad de Gardner	DO ₆₀₀ (abs.)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
-1	"0"	7,48 (26 C)	D/E	0,101	778	237
-84B	0	Tiempo "0" es justo tras la adición de NaOH Tiempo "0" es justo tras la adición de Alcalasa				
----	0,25	7,46	----	----	----	----
-2	1	7,39	C	----	641	384
-3	2	7,31	B/C	0,129	583	433
-4	4	7,10 hasta 7,40	B	0,199	507	531
-5	6	7,34	B	0,270	371	562
-6	8,5	----	A/B	0,422	96	653
Recalibración del pHmetro						
-7	12,5	6,75 hasta 7,14	A	0,618	ND	303
-8	22	6,85	A/B	0,877	ND	0,5
----	24	6,85 hasta 7,09	----	----		
Resina es de color naranja oscuro, marrón-negruzco						
----	28	7,01 hasta 7,10	A/B	0,932		
-9	30	7,08	A/B	0,959	ND	ND
-10	48	6,84	B	1,080	ND	ND
Ensayo ácido	----	----	----	----	ND	0,1

Los Ejemplos 20 y 21 muestran claramente que el tratamiento enzimático y el tratamiento de biodeshalogenación se pueden combinar de manera efectiva. Cuando se usó el doble de Alcalasa, un equilibrio preferido de condiciones permitía obtener una viscosidad preferida.

5 **Ejemplo 22. Alcalasa-biodeshalogenación de Kymene® E7219 (véase Tabla 6 para datos y detalles) (Ejemplo de referencia).**

Se diluyó una porción de Kymene® E7219 (disponible de Hercules Incorporated, Wilmington, DE; Zwijsrecht, planta de los Países Bajos) hasta 13,5% de sólidos totales y tenía una viscosidad de Brookfield de 76 cps.

Pasteurización: Se equipó un matraz de 3 l de fondo redondo con un condensador, un baño circulante de

temperatura controlada y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 2800 g de la resina. El pH se ajustó de 3,4 a 3,0 con ácido sulfúrico concentrado y se calentó durante 15 min. desde 25°C hasta 80°C. La resina se mantuvo a 80°C durante 15 minutos, se enfrió hasta 75°C en 10 minutos y luego se enfrió hasta 30°C. La resina pasteurizada tenía una viscosidad de Brookfield de 48 cps y se almacenó en recipientes estériles.

5 Esterilización de Kymene® E7219:

Se diluyó una porción de 500 g de Kymene® E7219 hasta el 8%, se colocó en una botella susceptible de esterilización en autoclave y se calentó en un autoclave a 121°C durante 20 minutos. La resina se dejó enfriar y se usó para iniciar la preparación del aumento 1 de inóculo de resina. Nota: el Kymene® E7219 pasteurizado (usando las condiciones descritas anteriormente) también se ha usado con éxito para iniciar la preparación del aumento 1 del inóculo de resina.

10 Biodeshalogenación: Preparación de inóculo de resina [Aumento 1 (SU1)]: Se equipó un matraz de 250 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un tubo de aspersión de aire y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 200 g de Kymene® E7279 esterilizado y el pH se incrementó hasta 7,2 con 3,28 g de hidróxido sódico acuoso al 30% y luego se añadieron 400 microlitros de cultivo iniciador concentrado de HK7 (1:500, HK7 frente a resina) [véase Ejemplo 24 para preparación de cultivo iniciador concentrado] y se añadieron 1,75 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrógeno fosfato de potasio, 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato de magnesio y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). Se inició la pulverización de aire, la temperatura se mantuvo a 30°C. El crecimiento bacteriano se controló mediante densidad óptica (DO_{600}) y se controló la biodeshalogenación mediante GC. La DO_{600} se determinó midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. El pH del tratamiento se mantuvo mediante adición periódica de hidróxido sódico acuoso al 30%. Después de 34 horas, se añadieron 68 microlitros de cultivo iniciador concentrado de HK1 (1:3000, HK1 frente a resina). [Véase Ejemplo 24 para preparación de cultivo iniciador concentrado]. Después de 48 horas, la resina resultante se usó como inóculo para SU2.

Aumento 2 (SU2):

Se equipó un matraz de 500 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un tubo de aspersión de aire y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 350 g de resina pasteurizada. El pH se incrementó hasta 7,5 con 7,40 g de hidróxido sódico acuoso al 30% y luego se añadieron 5,03 g de Alcalasa 2,5L tipo DX (disponible de Novozymes), 87,5 g del inóculo de resina SU1 (proporción de inoculación 20%) y se añadieron 3,06 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrógeno fosfato de potasio, 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato de magnesio y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). Se inició la pulverización de aire, la temperatura se mantuvo a 30°C. El crecimiento bacteriano se controló mediante densidad óptica (DO_{600}) y se controló la biodeshalogenación mediante GC. La DO_{600} se determinó midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. El pH del tratamiento se mantuvo mediante adición periódica de hidróxido sódico acuoso al 30%. Después de 23 horas, la resina resultante se usó como inóculo para SU3. Para incrementar el peso molecular de la resina (según se indica mediante la viscosidad de Gardner-Holdt o viscosidad de Brookfield), se incrementó una porción de 200 g de la resina restante (viscosidad de Brookfield de 10 cps) hasta pH 8,5 con 1,17 g de hidróxido acuoso al 30%, y la temperatura se incrementó hasta 40°C. Después de 3 horas, la resina tenía una viscosidad deseable y la reacción se enfrió bruscamente mediante la adición de ácido sulfúrico concentrado hasta pH 2,7. La resina resultante tenía una viscosidad de Brookfield de 25 cps.

Aumento 3 (SU3) y procedimiento general para el modo de lotes repetido:

45 Se equipó un matraz de 250 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un tubo de aspersión de aire y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 350 g de resina pasteurizada. El pH se incrementó hasta 7,6 con 8,59 g de hidróxido sódico acuoso al 30% y luego se añadieron 4,38 g de Alcalasa 2,5L tipo DX (disponible de Novozymes), 87,5 g del inóculo de resina SU2 (proporción de inoculación 20%) y se añadieron 3,06 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrógeno fosfato de potasio, 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato de magnesio y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). Se inició la pulverización de aire, la temperatura se mantuvo a 30°C. El crecimiento bacteriano se controló mediante densidad óptica (DO_{600}) y se controló la biodeshalogenación mediante GC. La DO_{600} se determinó midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. El pH del tratamiento se mantuvo mediante adición periódica de hidróxido sódico acuoso al 30%. Después de 23 horas, la resina resultante se usó como inóculo para SU4. El pH de la resina restante se ajustó hasta 2,8 con ácido sulfúrico concentrado y se añadieron 300 ppm de sorbato potásico en forma de solución acuosa al 10%. Esta resina tenía una viscosidad de Brookfield de 49 cps.

Lote de aumento 4 (SU4): El procedimiento fue similar a SU3, véase Tabla 6 para datos y detalles.

ES 2 391 552 T3

Lotes de aumento 5-10: El procedimiento fue similar a SU3, excepto porque se usó el Kymene E7219 al 13,40% sin pasteurización (véase Tabla 6 para datos y detalles).

Una serie similar de experimentos con una proporción de inoculación de 10% para los lotes SU3-SU8, produjo biodeshalogenaciones por lotes eficientes, con éxito.

5

Tabla 6

Aumento 1: 200 g de E7219 al 8% (esterilizado en autoclave), sin Alcalasa, 400 microlitros de HK7, 1,75 g de solución de nutrientes							
Muestra	Tiempo (horas)	pH (30C)	Viscosidad de Gardner	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CDP (ppm)
----	0	7,25	----	----	3,28	----	----
X33031-15-1	1	7,24	----	0,174	----	445	183
X33031-15-2	4	7,22	----	0,154	----	402	211
X33031-15-3	20	7,15	----	0,138	----	259	309
X33031-15-4	24	7,12	----	0,152	----	222	333
X33031-15-5	28	7,07-7,27	----	0,177	0,12	140	375
----	32	7,17	----	0,211	----	----	----
----	34	7,13	----	0,249	Añadidos 68 microlitros de inóculo de HK1		
----	----	7,13	----	0,272	----	----	----
X33031-15-6	43	6,84	----	0,657	----	ND	0,36
Aumento 2: 350 g de E7219 al 13,5% (pasteurizado), 5,03 g de Alcalasa, 87,5 g de -15, 3,06 g de solución de nutrientes							
Muestra	Tiempo (horas)	(pH 7,50) pH (30C)	Viscosidad de Gardner	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CDP (ppm)
----	0	7,49	----	----	7,40	----	----
X33031-18-1	1	7,39-7,64	A-B	0,128	0,65	434	485
X33031-18-2	4	7,41-7,64	A	0,170	0,49	10	814
X33031-18-3	7	7,50-7,6	A	0,257	0,26	ND	720
X33031-18-4	10	7,44-7,64	A	0,372	0,29	ND	380
X33031-18-5	13	7,47-7,59	A	0,543	0,22	ND	0,56

ES 2 391 552 T3

X33031-18-6	23	7,56	A-1/A	0,678	----	ND	0,38
El inóculo se eliminó para el siguiente lote, el resto se dejó aparte para reticulación. La viscosidad de Brookfield fue de 10 cps (a pH 7,50), la reticulación de 200 g de -18 se inició 8 horas más tarde;							
		7,20 (24C)		----			
		7,11 (31C)		----			
	0	8,50 (31C)		----	1,17		
	0,5	8,23 (40C)					
	1	8,01					
	1,5	7,93	A-1/A				
	2	7,82					
	2,5	7,74	A-B				
X33047-27-1	3	7,68 2,65	Reacción de inactivación con ácido sulfúrico				

La resina final tenía una viscosidad de Brookfield de 25 cps.

Aumento 3: 350 g de E7219 al 13,5% (pasteurizado), 4,38 g de Alcalasa, 87,5 g de -15, 87,5 g de -18, 3,06 g de solución de nutrientes

Muestra	Tiempo (horas)	(pH 7,60) pH (30C)	Viscosidad de Gardner	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CDP (ppm)
----	0	7,63	----	----	8,59	----	----
X33031-20-1	1	7,51-7,79	A-B	0,148	0,70	476	430
X33031-20-2	4	7,54-7,73	A	0,209	0,40	186	616
X33031-20-3	7	7,49-7,74	A	0,307	0,56	ND	715
X33031-20-4	10	7,52-7,71	A	0,436	0,37	ND	437
X33031-20-5	13	7,49-7,70	A	0,594	0,37	ND	152

ES 2 391 552 T3

X33031-20-6	23	7,48	B-C	0,726	----	ND	0,29
La resina final tenía una viscosidad de Brookfield de 49 cps.							
Aumento 4: 350 g de E7219 al 13,5% (pasteurizado), 4,38 g de Alcalasa, 87,5 g de -20, 3,06 g de solución de nutrientes							
Muestra	Tiempo (horas)	(pH 7,50) pH (30C)	Viscosidad de Gardner	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CDP (ppm)
----	0	7,60	----	----	7,51	----	----
X33031-18-1	1	7,53-7,62	A-B	0,176	0,24	588	360
X33031-23-2	4	7,40-7,61	A-B	0,211	0,48	516	470
X33031-23-3	7	7,46-7,63	A	0,258	0,38	227	736
X33031-23-4	10	7,47-7,62	A	0,312	0,29	ND	811
X33031-23-5	12,5	7,52-7,42	A	0,344	0,24	ND	747
X33031-23-6	25	7,12	C	0,642	----	ND	0,06
La resina final tenía una viscosidad de Brookfield de 116 cps.							
Aumento 5: 350 g de E7219 al 13,5% (no pasteurizado), 4,38 g de Alcalasa, 87,5 g de -23, 3,06 g de solución de nutrientes							
Muestra	Tiempo (horas)	(pH 7,50) pH (30C)	Viscosidad de Gardner	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CDP (ppm)
----	0	7,63	----	----	6,88	----	----
X33031-25-1	1	7,37-7,64	B	0,175	0,67	499	426
X33031-25-2	3	7,47-7,64	B	0,248	0,39	384	527
X33031-25-3	7	7,35-7,65	B	0,378	0,71	48	631
X33031-25-4	24	7,12	F-G	0,743	----	ND	0,06
La resina final fue un gel blando (dispersable).							
Aumento 6: 350 g de E7219 al 13,5% (no pasteurizado), 4,38 g de Alcalasa, 87,5 g de -20, 118 g de -25, 3,06 g de solución de nutrientes							
Muestra	Tiempo (horas)	(pH 7,3) pH (30C)	Viscosidad de Gardner	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CDP (ppm)
----	0	7,41	----	----	6,60	----	----
X33031-27-1	1	7,34-7,51	B-C	0,234	0,43	466	438

ES 2 391 552 T3

X33031-27-2	7	7,13-7,33	B-C	0,342	0,42	ND	766
X33031-27-3	19	6,91	B-C	0,542	----	ND	7,1

La resina final tenía una viscosidad de Brookfield de 87 cps.

Aumento 7: 350 g de E7219 al 13,5% (**no** pasteurizado), 4,38 g de Alcalasa, 87,5 g de -27, 3,06 g de solución de nutrientes

Muestra	Tiempo (horas)	(pH 7,35) pH (30C)	Viscosidad de Gardner	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CDP (ppm)
----	0	7,44	----	----	7,27	----	----
X33031-29-1	1	7,35-7,54	B-C	0,146	0,52	676	548
X33031-29-2	4	7,30-7,55	B	0,213	0,70	319	959
X33031-29-3	8	7,37	A-B	0,301	0,00	ND	1074
X33031-29-4	11	7,29-7,42	A	0,354	0,26	ND	774
X33031-29-5	14	7,27-7,43	----	0,402	0,30	ND	442
	15	7,33	B	----			
X33031-29-6	23	7,13	C	0,645		ND	0,13
					Ensayo ácido	<0,10	2,4

La resina final tenía una viscosidad de Brookfield de 77 cps.

Aumento 8: 350 g de E7219 al 13,5% (**no** pasteurizado), 4,38 g de Alcalasa, 87,5 g de -29, 3,06 g de solución de nutrientes

Muestra	Tiempo (horas)	(pH 7,30) pH (30C)	Viscosidad de Gardner	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CDP (ppm)
----	0	7,44	----	----	7,17	----	----
X33031-31-1	1	7,37-7,46	B-C	0,173	0,27	652	504
X33031-31-2	4	7,23-7,34	B	0,264	0,28	351	754
X33031-31-3	7	7,16-7,38	A-B	0,361	0,46	ND	921
X33031-31-4	10	7,20-7,42	B	0,456	0,47	ND	486
X33031-31-5	13	7,20-7,39	B	0,628	0,43	ND	4,6
X33031-31-6	23	7,23	B-C	0,726			0,14

ES 2 391 552 T3

La resina final tenía una viscosidad de Brookfield de 65 cps.							
Aumento 9: 700 g de E7219 al 13,5% (no pasteurizado), 8,76 g de Alcalasa, 175 g de -31, 6,12 g de solución de nutrientes							
Muestra	Tiempo (horas)	(pH 7,25) pH (30C)	Viscosidad de Gardner	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CDP (ppm)
----	0	7,27	----	----	12,86	----	----
X33031-33-1	1	7,18-7,39	B-C	0,191	1,02	527	402
X33031-33-2	4	7,15-7,38	B	0,271	0,99	283	672
X33031-33-3	7	7,18-7,40	A-B	0,337	1,05	ND	859
X33031-33-4	10	7,24-7,38	A-B	0,397	0,68	ND	619
X33031-33-5	13	7,27-7,39	B	0,474	0,53	ND	361
X33031-33-6	23	7,11	B-C	0,697		ND	0,12
Ensayo ácido						<0,10	2,9
La resina final tenía una viscosidad de Brookfield de 40 cps.							
Aumento 10: 350 g de E7219 al 13,5% (no pasteurizado), 4,38 g de Alcalasa, 87,5 g de -33, 3,06 g de solución de nutrientes							
Muestra	Tiempo (horas)	(pH 7,20) pH (30C)	Viscosidad de Gardner	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CDP (ppm)
----	0	7,17	----	----	7,20	----	----
X33031-35-1	1	7,15-7,34	B-C	0,188	0,48	582	462
X33031-35-2	4	7,17-7,32	B	0,293	0,43	299	624
X33031-35-3	7	7,17-7,31	A-B	0,380	0,45	ND	812
X33031-35-4	10	7,16-7,28	A-B	0,487	0,29	ND	487
X33031-35-5	13	7,12-7,30	B	0,647	0,32	ND	150
X33031-35-6	23	7,12	A-B	0,820		ND	0,22
Ensayo ácido						<0,10	2,7
La resina final tenía una viscosidad de Brookfield de 34 cps.							

Ejemplos:

Para los siguientes ejemplos TS significa sólidos totales.

Agua demi significa agua desmineralizada.

DO significa oxígeno disuelto

5 **Ejemplo 23:** Demuestra la viabilidad de la aplicación de la tecnología de biodeshalogenación para Crepetrol® como adyuvante de acresponado, con %TS incrementado para reducir los niveles de 1,3-DCP y/o 3-CPD hasta concentraciones inferiores a 1 ppm.

Se obtuvo la resina adyuvante de acresponado Crepetrol® 80E (=A3025), una resina basada en amina terciaria disponible de Hercules Incorporated (Wilmington, DE), de la planta de Voreppe, Francia.

Se cargaron tres matraces Erlenmeyer de 250 ml con lotes de 50 ml de resina con %TS creciente (Tabla 7). Se realizaron diluciones de la resina con agua desmineralizada esterilizada.

10 **Tabla 7: Residuos de EPI y sólidos totales de Crepetrol® 80E**

Muestra	Crepetrol® 80E (ml)	Agua demi (ml)	EPI (ppm)	1,3-DCP (ppm)	2,3-DCP (ppm)	3-CPD (ppm)	TS (%)
26,6% (según se recibió)	50	0	nd	35	nd	100	26,58
20%	37,6	12,4	nd	26	nd	75	20,0
15%	28,2	21,8	nd	20	nd	56	15,0

15 Previamente a la inoculación, cada 50 ml de resina diluida se complementaron con 0,5 ml de solución de nutrientes y el pH de la solución se ajustó hasta pH 5,8 usando una solución de NaOH al 33%. Esta solución de nutrientes contenía los siguientes componentes por l de agua desmineralizada esterilizada: 33 g de urea, 5 g KH₂PO₄, 5 g de MgSO₄ · 7H₂O y 1 g de CaCl₂ · 2H₂O. Se extrajo 1 ml de cultivo de iniciación concentrado de *Arthrobacter histidinolovorans* (HK1) y *Agrobacterium radiobacter* (HK7) del congelador a -80°C, y se descongeló en un baño de agua durante 1-2 min. a 30°C. Se usaron una alícuota de 50 µl de la suspensión de *A. histidinolovorans* (HK1) y una alícuota de 200 µl de *A. radiobacter* (HK7), para inocular un matraz de agitación Erlenmeyer estéril de 250 ml que contenía las diluciones descritas de Crepetrol® 80E complementado. Tras la inoculación, los cultivos se incubaron durante 48 horas a 30°C en una incubadora de agitación rotativa (250 rpm; modelo G25; New Brunswick Scientific Co. Inc. New Jersey, EE.UU.). Se siguió el crecimiento bacteriano en el tiempo y se determinó midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Ultrospec 1000 UV/Vis (Pharmacia Biotech, Suecia) y una cubeta desechable de 3 ml de 1 cm de recorrido (Tabla 8). Se ajustó el pH de las muestras hasta pH 3,5 usando ácido sulfúrico concentrado y se añadió Proxel® BD al 0,1% (disponible de Zeneca Biocides). Las muestras se ensayaron para residuos de EPI (1,3-DCP y 3-CPD), análisis mediante GC (Tabla 8).

25 **Tabla 8: Crecimiento bacteriano en Crepetrol® 80E con %TS creciente.**

Tiempo (h)	Valor de DO ₆₀₀		
	C80E15%TS	C80E 20%TS	C80E 26,6%TS
0	0,296	0,256	0,246
16,5	0,558	0,525	0,440
19,5	0,570	0,530	0,460
25	0,575	0,545	0,475
41	0,643	0,590	0,490
48	0,735	0,600	0,505

1,3-DCP (ppm) tras 42 h	<1	<1	<1
3-CPD (ppm) tras 42 h	<1	<1	<1

Ejemplo 24: Procedimiento secuencial enzimático y biológico con elevada %TS: demuestra la eficiencia del procedimiento iniciado con liberación de 3-CPD a través de tratamiento con Alcalasa de Crepetrol® 80E, seguido de biodeshalogenación. Ensayo el producto biodeshalogenado para 3-CPD unido al polímero residual, usando el ensayo ácido.

5 A. Tratamiento de 2,5 l de Crepetrol® 80E.

Un biorreactor de 2,5 l, limpio y estéril ((BioFlo3000 bioreactor, controlado a través del software AFS-BioCommand; New Brunswick Scientific Co., Inc. New Jersey, EE.UU.), se cargó con 2,5 kg de resina de Crepetrol® 80E (26,6% TS) obtenido de Hercules Voreppe plant, Francia. El pH del Crepetrol® 80E se ajustó hasta pH 7,5 usando una solución de NaOH y el controlador pH-PID (pantalla integral proporcional), del bioreactor instalado. El tratamiento enzimático se inició mediante la adición de 12,5 g de Alcalasa® 2,5L DX (Novozymes). La resina se trató con enzimas durante un período de tiempo de 6 h, usando las siguientes condiciones de incubación:

- pH 7,5
- Temperatura controlada a 25°C
- Agitación controlada a 600 rpm

15 Las muestras (25 ml) se tomaron en el momento después de 2, 4 y 6 horas para controlar los residuos de EPI (Tabla 9). El pH de las muestras recogidas se ajustó hasta pH 3,5 con ácido sulfúrico concentrado y se almacenaron a 4°C para un análisis posterior. Los residuos de EPI (3-CPD y 1,3-DCP) se analizaron mediante GC.

Tabla 9: liberación de 3-CPD en el tiempo de Crepetrol® 80E tratado a 26,6% de TS.

Muestra	Tiempo de incubación	3-CPD (ppm)	1,3-DCP (ppm)
Crepetrol® 80E 26,6%	0	100	35
C80E-Alc1 A	2	129	37
C80E-Alc1 B	4	170	39
C80E-Alc1 C	6	168	39

B. Preparación de precultivos de HK1 y HK7 para iniciar el procedimiento de biodeshalogenación.

20 Se usaron una sola colonia de *A. histidinovorans* (HK1) y una única colonia de *A. radiobacter* (HK7) (ambas cultivadas por separado en medio de sales mínimo que contenía DCP/CPD) para inocular cada una separadamente un matraz de agitación Erlenmeyer estéril (250 ml) que contenía 50 ml de medio "Brain Heart Infusion" estéril (BHI; Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra; medio preparado, n° de cat. CM225). Ambos precultivos se incubaron por separado durante 24 h a 30°C en una incubadora de agitación rotativa de temperatura controlada (250 rpm; modelo G25; New Brunswick Scientific Co., Inc. New Jersey, USA). La densidad óptica del cultivo HK1 y HK7 en lotes se determinó usando un espectrofotómetro Ultrospecl000 UV/Vis (Pharmacia Biotech, Suecia), a una longitud de onda de 600 nm y usando una cubeta desechable de 3 ml con un recorrido de 1 cm. El crecimiento se determinó midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando una muestra de cultivo diluida 20 veces (agua) (Tabla 10). Estos precultivos se usaron para iniciar el procedimiento de biodeshalogenación del Crepetrol® 80E tratado enzimáticamente.

Tabla 10: Densidad óptica de cultivo en lotes de HK1 y HK7 cultivado en BHI durante 24 h

Cultivo	DO _{600 nm} (dilución 20*)
<i>A. histidinovorans</i> HK1	0,386
<i>A. radiobacter</i> HK7	0,455

Para fabricar cultivos de iniciación concentrados, los precultivos se concentraron mediante centrifugación (10.000 rpm durante 10 min. a 4°C) y se complementaron con glicerol al 10% y luego se almacenaron a -80°C.

C. Biodeshalogenación de Crepetrol® 80E tratado.

Tras 6 h de tratamiento enzimático, (sección A), el pH de la resina del biorreactor se ajustó hasta pH 5,8 con ácido sulfúrico concentrado. El contenido del reactor se complementó con 25 ml de solución de nutrientes y PPG2000 al 0,04% (antiespumante) (polipropileno-glicol P2000 (Fluka Chemie AG, Alemania)). Esta solución de nutrientes contenía los siguientes componentes por l de agua desmineralizada esterilizada: 33 g de urea, 5 g de KH₂PO₄, 5 g de MgSO₄·7H₂O y 1 g de CaCl₂·2H₂O. Se usaron precultivos de *A. histidinovorans* (HK1) y *A. radiobacter* (HK7) (50 ml de cada; sección B) para iniciar el procedimiento de biodeshalogenación de la resina tratada enzimáticamente. Ambos cultivos se usaron simultáneamente para inocular una fermentación por lotes en el biorreactor de 2,5 l. Los ajustes de parámetros de la unidad de control del biorreactor, que funcionaba en modo de lotes, fueron los siguientes:

pH	controlado a pH 5,8 (adición controlada de solución de NaOH al 25% a PID)
Temperatura	controlada a 30°C
15 Velocidad del agitador	600 rpm (velocidad máxima de 800 rpm; controlada a través del valor de DO)
Aireación	fijada a 1,0 vvm (2,5 l/min; aire comprimido), valor de DO mínimo fijado a una saturación de aire del 5%.

La eliminación completa de los residuos de EPI del contenido del biorreactor se controló estrechamente en el tiempo, a través de análisis por cromatografía de gases (GC-XSD; *Tabla 11*). Tras un tiempo de incubación total de 51 horas, finalizó el cultivo por lotes. El pH de la resina tratada enzimáticamente y biodeshalogenada se ajustó hasta pH 3,5, usando ácido sulfúrico concentrado, y el producto se usó en un ensayo ácido para determinar la fracción de 3-CPD unida al polímero. El pH de esta muestra (25 ml) se ajustó hasta pH 1,0 con ácido sulfúrico concentrado, posteriormente, la muestra se incubó durante 24 horas a 50°C. Tras la incubación, el pH se reajustó hasta pH 3,5 con una solución de NaOH al 33%. Los residuos de EPI se determinaron a través de medición GC-XSD (*Tabla 11*).

25 *Tabla 11: Residuos de EPI tras tratamiento enzimático secuencial, biotratamiento y ensayo ácido.*

Tratamiento	Tiempo de proceso (h)	1,3-DCP (ppm)	3-CPD (ppm)
Crepetrol® 80E 26,6%	0	35	100
1º fase de tratamiento	2	37	129
	4	39	170
	6	39	168
2º fase de biodeshalogenación	7	39	168
	29,5	nd	<1
	50	nd	<1
Ensayo ácido de alimentación con C80E (control)		38	188
Ensayo ácido del producto		nd	29

Ejemplo 25: Procedimiento combinado enzimático-bioprociamiento con elevado %TS: Demuestra la eficiencia del procedimiento con liberación de 3-CPD iniciada simultáneamente a través del tratamiento de Crepetrol® 80E y, al mismo tiempo, biodeshalogenación del 3-CPD libre. Ensayo el producto biodeshalogenado para el 3-CPD unido al polímero residual, usando el ensayo ácido.

30 Un biorreactor de 2,5 l, limpio y estéril ((BioFlo3000 bioreactor, controlado a través del software AFS-BioCommand; New Brunswick Scientific Co., Inc. New Jersey, EE.UU.), se cargó con 2,5 kg de resina de Crepetrol® 80E (26,6% TS) obtenido de Hercules Voreppe plant, Francia. El pH de la resina se ajustó hasta pH 7,5 usando una solución de NaOH concentrada (33%), complementada con 25 ml de solución de nutrientes y PPG2000 al 0,04% (antiespumante). La solución de nutrientes contenía los siguientes componentes por l de agua desmineralizada esterilizada: 33 g de urea, 5 g de KH₂PO₄, 5 g de MgSO₄·7H₂O y 1 g de CaCl₂·2H₂O. Se extrajeron precultivos de *A.*

35

histidinolovorans (HK1) y *A. radiobacter* (HK7) del congelador a -80°C, y se descongelaron en un baño de agua durante 1-2 min. a 30°C. Para iniciar simultáneamente el procedimiento enzimático y de biodeshalogenación, se añadieron las siguientes cantidades de enzimas/bacterias, a la resina complementada:

- 12,5 g de Alcalasa® 2,5L DX (Novozymes)

5 - 0,83 ml de cultivo iniciador de *A. histidinolovorans* (HK1).

- 4,17 ml de cultivo iniciador de *A. radiobacter* (HK7).

Las asignaciones de los parámetros para la unidad de control del biorreactor, utilizado en modo de lotes, se fijaron inicialmente para la "fase de tratamiento enzimático" como sigue:

pH controlado a pH 7,5 (adición controlada de solución de NaOH al 25% a PID)

10 Temperatura controlada a 25°C

Velocidad del agitador 600 rpm (velocidad máxima de 800 rpm; controlada vía valor de DO)

Aireación fijada a 1,0 vvm (2,5 l/min; aire comprimido), valor mínimo de DO fijado a una saturación del aire del 5%

15 Las muestras (25 ml) se tomaron en el momento después de 2, 4 y 6 horas para controlar los residuos de EPI (Tabla 12). Los residuos de EPI se analizaron mediante GC. El pH de estas muestras (25 ml) se ajustó hasta pH 3,5 con ácido sulfúrico concentrado y se almacenaron a 4°C para un análisis posterior.

Después de 6 h de incubación, el pH del lote se redujo hasta 5,8 con ácido sulfúrico concentrado y la temperatura de incubación se incrementó hasta 30°C. La asignación de parámetros para la unidad de control del biorreactor, utilizado en modo de lotes durante la "fase de tratamiento de biodeshalogenación", se fijó como sigue:

20 pH controlado a pH 5,8 (adición controlada de solución de NaOH al 25% a PID)

Temperatura controlada a 30°C

Velocidad del agitador 600 rpm (velocidad máxima de 800 rpm; controlada vía valor de DO)

Aireación fijada a 1,0 vvm (2,5 l/min; aire comprimido), valor mínimo de DO fijado a una saturación del aire del 5%

25 La eliminación completa de los residuos de EPI del contenido del biorreactor se controló estrechamente en el tiempo, a través de análisis mediante cromatografía gaseosa (GC-XSD; Tabla 12). Tras un tiempo total de incubación de 52 horas, finalizó el cultivo por lotes. El pH de la resina tratada simultáneamente con enzimas y biodeshalogenada se ajustó hasta pH 3,5 usando ácido sulfúrico concentrado y el producto se complementó con sorbato potásico al 0,2% y Proxel BD al 0,12%. Se usó una muestra del producto acabado en un ensayo ácido para determinar la fracción de 3-CPD unida al polímero. El pH de esta muestra (25 ml) se ajustó hasta pH 1,0 con ácido sulfúrico concentrado, posteriormente la muestra se incubó durante 24 horas a 50°C. Tras la incubación, el pH se reajustó hasta pH 3,5 con una solución de NaOH al 33%. Los residuos de EPI se determinaron a través de medición GC-XSD (Tabla 12).

Tabla 12: Residuos de EPI durante tratamiento enzimático y biotratamiento simultáneos y tras ensayo ácido.

Tratamiento	Tiempo de proceso (h)	1,3-DCP (ppm)	3-CPD (ppm)
Crepetrol® 80E 26,6% TS	0	35	100
Condiciones de proceso "enzimático"	2	nd	141
	4	nd	135
	6	nd	132
Condiciones de proceso de "biodeshalogenación"	24	<1	2
	31	nd	<1
	48	nd	<1
Ensayo ácido de alimentación con C80E		38	188

(control)			
Ensayo ácido del producto		nd	18

Ejemplo 26: Biodeshalogenación de la sustancia de acresponado Crepetrol® 80E (también conocida como Crepetrol® A3025).

Fabricación y problemas de preparación

- 5 (1) Preparar un total de 3225 l de Crepetrol A3025 sin conservante (disponible de Hercules Incorporated, Wilmington, DE).
- (2) Limpieza de reactores SU2:
- Llenar completamente con agua caliente (90°C), aireación y agitación. Añadir cáustica hasta pH 11.
 - Mantener a 90°C durante 30 min.
 - Drenar el contenido caliente/cáustico del reactor en el recipiente SU1.
- 10 (3) Limpieza de recipiente SU1:
- Rellenar completamente con agua cáustica caliente (90°C) del reactor SU2.
 - Accionar la aireación y agitación en el recipiente SU1 durante la limpieza/calentamiento.
 - Drenar el contenido tras 60 min.
 - Rellenar completamente con agua caliente (90°C) y drenar (2º aclarado) el contenido del recipiente.
- 15 • Tratar los orificios de salida del recipiente con calor (vapor), conectores y todos los tubos usadas para el drenaje libre.
- (4) Pasteurización de Crepetrol A3025:
- Rellenar el reactor SU2 con 3225 l de Crepetrol A3025 (26% TS) y calentar la materia prima hasta 80°C.
- 20 • Encender la aireación y agitación en el reactor SU2 durante el procedimiento de pasteurización.
- Mantener la materia prima durante 15 min. a 80°C.
 - Drenar 175 l de A3025 (caliente) en recipiente SU1 pasteurizado.
 - Drenar 2000 l A3025 (caliente) en recipiente(s) de almacenamiento pasteurizados.
- 25 • Mantener los 1050 l restantes de A3025 pasteurizado en el reactor SU2 hasta su uso posterior en SU2.
- **Apagar** la aireación y la agitación.
- (5) Usar sólo agua pasteurizada (15 min. 90°C) para la etapa de dilución en SU1.
- (6) Añadir cantidades apropiadas de nutrientes K4 en forma seca (véase más abajo para cantidades de nutrientes).
- (7) Preparar 0,5 l de solución de glicerol estéril (161 gramos de glicerol/500 ml; esterilizada 15 min. a 121°C).
- 30 **Aumento 1 (SU1): Preparación de inóculo de resina**
- (1) Limpiar y pasteurizar el recipiente SU1 (véase más arriba).
- (2) Usar una materia prima pasteurizada y diluida al 50% en el recipiente SU1:
- Cargar el recipiente SU1 con 175 l de Crepetrol A3025 (26% TS) y 175 l de agua pasteurizada (15 min. 90°C).
- (3) Iniciar la agitación.
- 35 (4) Ajustar el pH en SU1 hasta pH 5,8±0,2 con hidróxido sódico al 30%
- (5) Poner en marcha el reactor de aireación (0,5 vvm)

ES 2 391 552 T3

(6) Ajustar y mantener la temperatura en SU1 a $30\pm 1^\circ\text{C}$.

(7) Añadir nutriente K4 en forma seca (a través de un recipiente limpio):

• Componente	Concentración (g/l)	Volumen 350 l
Urea	0,33	115,5 gramos
KH_2PO_4	0,10	35,0 gramos

(8) Añadir 0,5 l (161 g/500 ml) de solución de glicerol estéril (= 460 ppm de conc. final).

5 (9) Inocular SU1 con **ambos iniciadores HK1 y HK7** (densidad de inoculación aplicada para HK1 1:3500 y para HK7 1:700, proporción inóculo:resina). [Véase Ejemplo 24 para preparación del cultivo iniciador concentrado].

(10) Muestras para medición:

- DO_{600} cada 2 h.
- Valores de DCP/CPD al final de SU1.

(11) Incubar durante 16-24 h a $30\pm 1^\circ\text{C}$ y pH $5,8\pm 0,2$ (Cuando sea necesario corregir para incrementos de pH).

10 (12) Transferir a SU2 cuando:

- $\text{DO}_{600} > 0,5$ o valores de DO_{600} iniciados hasta la meseta.

Aumento 2

(1) Limpiar y pasteurizar reactor SU2 (véase arriba).

(2) Usar 1050 l de materia prima de Crepetrol A3025 pasteurizado.

15 (3) Iniciar la agitación.

(4) Ajustar el pH en SU2 hasta pH $5,8\pm 0,2$ con hidróxido sódico al 30%.

(5) Encender el reactor de aireación (0,5 vvm).

(6) Ajustar y mantener la temperatura en SU2 a $30\pm 1^\circ\text{C}$.

(7) Añadir nutriente K4 en forma seca (a través de un recipiente limpio):

• Componente	Concentración (g/l)	Volumen 1050 l
Urea	0,33	346,5 gramos
KH_2PO_4	0,10	105,0 gramos

20 (8) Inocular SU2 con 350 l de cultivo de SU1 (densidad de inoculación 25%) mediante gravedad, usando un conector/tubos limpios y pasteurizados (véase arriba).

(9) Muestras para medición:

- DO_{600} cada 2 h
- Valores de DCP/CPD al final de SU2.

25 (10) Incubar durante 16-24 h a $30\pm 1^\circ\text{C}$ y pH $5,8\pm 0,2$ (Cuando sea necesario corregir para incrementos de pH).

(11) Iniciar SU3 cuando:

- Valores de DCP/CPD < 5 ppm o cuando la concentración de oxígeno disuelto se incremente.
- Tiempo de incubación > 24 h.

Aumento 3

30 (1) "Materia prima pasteurizada" en recipiente(s) de almacenamiento:

ES 2 391 552 T3

- Tratamiento térmico (con vapor) de todo el equipamiento usado para mezclar la materia prima.
- Ajustar el pH hasta $\text{pH } 5,8 \pm 0,2$ con hidróxido sódico al 30%.

(2) Drenar el recipiente(s) de almacenamiento mediante gravedad en el reactor SU2 (a través de conector/tubos pasteurizados/limpios (véase arriba).

5 (3) Incrementar el volumen de aireación de acuerdo con el volumen incrementado (0,5 vvm)

(4) Controlar la agitación y temperatura ($30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) a valores prefijados.

(5) Añadir nutriente K4 en forma seca (a través de un recipiente limpio) para un incremento de volumen de 2000 l:

Componente	Concentración (g/l)	Volumen 2000 l
Urea	0,33	660 gramos
KH_2PO_4	0,10	200 gramos

(6) Muestras para medición:

- DO_{600} cada 2 h.

10 - Valores DCP/CPD cada 4 h

- Muestra para ensayo ácido al final de SU3.

(7) Incubar durante 16-24 h a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH } 5,8 \pm 0,2$ (Cuando sea necesario, corregir para incrementos de pH).

(8) Procedimiento de biodeshalogenación en SU3 completado cuando:

- Concentración total de $[\text{DCP}] + [\text{CDP}] < 5$ ppm

15 (9) Acabado del producto:

- Ajustar el pH con ácido sulfúrico concentrado hasta $\text{pH } 3,0 \pm 0,2$
- Añadir 2000 ppm de sorbato potásico (0,2%)

Drenar el producto acabado a través de un filtro de 50-100 μm en cajas-palet.

Resultados: ANÁLISIS DE RESIDUOS DE EPI

20 Tabla 13: Resultados de la determinación de EPI residual mediante GC-FID.

Muestra	EPI [ppm]	1,2-DCP [ppm]	2,3-DCP [ppm]	3-CPD [ppm]
Materia prima de Crepetrol 80E	ND	42	ND	131
Este ejemplo	ND	ND	ND	ND
Crepetrol 80E tras ensayo ácido	ND	38	ND	227
Este ejemplo después del ensayo ácido	ND	ND	ND	56

ND = no detectado

Límites de detección:	EPI [ppm]:	10
	1,3-DCP [ppm]:	10,
	2,3-DCP [ppm]:	10,
	3-CPD [ppm]:	10.

Ejemplo 27: Biodeshalogenación de Kymene® SLX2 con %TS creciente

Se cargó un matraz de 500 ml limpio y estéril con 380 g de Kymene® SLX2 (25,3% TS), obtenido de Hercules planta de Zwiindrecht, Países Bajos. El pH de la resina se ajustó hasta pH 5,8 mediante adición gradual (simultáneamente con mezcla vigorosa) de 8,3 g de solución de NaOH al 33%. Se cargó una serie de matraces esterilizados de 250 ml con lotes de 50 ml de resina con %TS creciente. Las diluciones de resina se realizaron usando agua desmineralizada esterilizada (Tabla 14).

Tabla 14: Intervalo de dilución de Kymene® SLX2

Muestra (%TS)	Kymene® SLX2 (ml)	Agua desmineralizada (ml)
8	15,8	34,2
10	19,8	30,2
12	23,7	26,3
14	27,7	22,3
16	31,6	18,4
18	35,6	14,4
20	39,5	10,5
25,3	50	0

Antes de la inoculación, cada muestra de resina diluida se complementó con 0,5 ml de solución de nutrientes esterilizada por filtro. La solución de nutrientes contenía los siguientes componentes por l de agua desmineralizada esterilizada: 33 g de urea, 5 g de KH₂PO₄, 5 g de MgSO₄·7H₂O y 1 g de CaCl₂·2H₂O. Se extrajo una muestra de 1 ml de cultivos iniciadores concentrados de *A. histidinolovorans* (HK1) y *A. radiobacter* (HK7) del congelador a -80°C, y se descongelaron en un baño de agua durante 1-2 min. a 30°C. Se usaron una alícuota de 20 µl de la suspensión de *A. histidinolovorans* (HK1) y una alícuota de 100 µl de *A. radiobacter* (HK7), para inocular las diluciones de 50 ml descritas de Kymene® SLX2 complementado. Tras la inoculación, los cultivos se incubaron durante 22 horas a 30°C en una incubadora de agitación rotativa (250 rpm; modelo G25; New Brunswick Scientific Co., Inc., New Jersey, EE.UU.). Se controló el crecimiento bacteriano a lo largo del tiempo y se determinó midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Ultrospec 1000 UV/Vis (Pharmacia Biotech, Suecia) y una cubeta desechable de 3 ml, con un recorrido de 1 cm (Tabla 8). Se ajustó el pH de las muestras hasta pH 2,8, usando ácido sulfúrico concentrado y se añadió Proxel BD al 0,1%. Las muestras se midieron para análisis de residuos de EPI (3-CPD y 1,3-DCP) mediante GC (Tabla 15).

Tabla 15: Crecimiento bacteriano en Kymene® SLX2 con %TS creciente.

Muestra (%TS)	DO _{600 nm}			t = 22 h de incubación		Apariencia de la "Viscosidad"
	0 h	17 h	22 h	3-CPD (ppm)	1,3-DCP (ppm)	
8	0,141	0,655	0,654	<10	<10	-

10	0,126	0,742	0,717	<10	<10	-
12	0,122	0,797	0,762	<10	<10	-
14	0,114	0,705	0,769	<10	32	-
16	0,107	0,609	0,623	<10	294	+
18	0,094	0,556	0,560	<10	407	++
20	0,096	0,486	0,541	<10	492	++
25,3	0,095	0,139	0,130	gelificado	gelificado	+++

-: no viscoso, similar a la materia prima
 +: viscoso, viscosidad incrementada comparada con la materia prima.
 ++: muy viscoso, viscosidad fuertemente incrementada en comparación con la materia prima.
 +++: resina gelificada.

Límite de detección: 10 ppm 1,3-DCP,
 10 ppm 3-CPD.

Ejemplo 28: Biodeshalogenación de Kymene® E7220 (material tratado con ácido) con %TS creciente.

Se cargó un matraz de 500 ml limpio y estéril con 300 g de Kymene® E7220 (22,5% TS), obtenido de Hercules planta de Voreppe, Francia. El pH de la resina se ajustó hasta pH 7,0 mediante adición gradual (simultáneamente con mezcla vigorosa) de 15,3 g de solución de NaOH al 33%. Se cargó una serie de matraces esterilizados de 250 ml con lotes de 50 ml de resina con %TS creciente. Las diluciones de resina se realizaron usando agua desmineralizada esterilizada (Tabla 16).

Tabla 16: Intervalo de dilución de Kymene® E7220

Muestra (%TS)	Kymene® E7220 (ml)	Agua desmineralizada (ml)
8	17,8	32,2
10	22,2	27,8
12	26,7	23,3
14	31,1	18,9
16	35,6	14,4
18	40,0	10,0
20	44,4	5,6
22,5	50	0

Antes de la inoculación, cada muestra de resina diluida se complementó con 0,5 ml de solución de nutrientes esterilizada por filtro. La solución de nutrientes contenía los siguientes componentes por l de agua desmineralizada esterilizada: 33 g de urea, 5 g de KH₂PO₄, 5 g de MgSO₄·7H₂O y 1 g de CaCl₂·2H₂O. Se extrajo una muestra de 1 ml de cultivos iniciadores concentrados de *A. histidinovorans* (HK1) y *A. radiobacter* (HK7) del congelador a -80°C, y se descongelaron en un baño de agua durante 1-2 min. a 30°C. Se usaron una alícuota de 20 µl de la suspensión de *A. histidinovorans* (HK1) y una alícuota de 100 µl de *A. radiobacter* (HK7), para inocular las diluciones de 50 ml descritas de Kymene® E7220 complementado. Tras la inoculación (inicio DO₆₀₀ = 0,208), los cultivos se incubaron

5 durante 91 horas a 30°C en una incubadora de agitación rotativa (250 rpm; modelo G25; New Brunswick Scientific Co., Inc., New Jersey, EE.UU.). Se controló el crecimiento bacteriano a lo largo del tiempo y se determinó midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Ultrospec 1000 UV/Vis (Pharmacia Biotech, Suecia) y una cubeta desechable de 3 ml, con un recorrido de 1 cm (*Tabla 17*). Se ajustó el pH de las muestras hasta pH 2,8, usando ácido sulfúrico concentrado y se añadió Proxel BD al 0,1%. Las muestras se midieron para análisis de residuos de EPI (3-CPD y 1,3-DCP) mediante GC (*Tabla 17*).

Tabla 17: Crecimiento bacteriano en Kymene® E7220 con %TS creciente

Muestra (%TS)	DO _{600 nm}			t = 91 h de incubación		Apariencia de la "Viscosidad"
	19 h	27 h	91 h	3-CPD (ppm)	1,3-DCP (ppm)	
8	1,103	1,073	nd	<10	<10	-
10	1,190	1,168	nd	<10	<10	-
12	1,145	1,205	nd	<10	<10	-
14	0,870	1,237	nd	<10	<10	-
16	0,500	1,197	1,025	<10	<10	-
18	0,276	0,647	1,095	<10	<10	-
20	0,195	0,290	1,176	<10	<10	-
25,3	0,139	0,140	1,067	<10	49	-

nd: no determinado
 -: no viscoso, similar a la materia prima
 +: viscoso, viscosidad incrementada comparada con la materia prima.
 ++: muy viscoso, viscosidad fuertemente incrementada en comparación con la materia prima.
 +++: resina gelificada.
 Límite de detección: 10 ppm 1,3-DCP,
 10 ppm 3-CPD.

Ejemplo 29: Biodeshalogenación de Kymene® 736 (resina basada en poliamina/azetidinio) a 15-20%TS en lotes de 50 ml.

10 La resina adyuvante del acresponado Kymene® 736 (Crepetrol® 73) (39,6% TS, tal como se recibió), una resina basada en poliamina/azetidinio, disponible de Hercules Incorporated (Wilmington, DE), se obtuvo de la planta de Voreppe, Francia. Se cargó un matraz de 250 ml limpio y estéril con 100 g de Kymene® 736 (39,6% TS), y el pH de la resina se ajustó hasta pH 7,0 mediante adición gradual (simultáneamente con mezcla vigorosa) de una solución de NaOH al 33%. Se cargaron dos matraces esterilizados de 250 ml con lotes de 50 ml de resina diluida, bien hasta el 15% o el 20%TS. Las diluciones de resina se realizaron usando agua desmineralizada esterilizada (*Tabla 18*).

15

Tabla 18: Intervalo de dilución de Kymene® 736

Muestra (%TS)	Kymene® 736 (ml)	Agua desmineralizada (ml)
15	19,0	31,0
20	25,2	24,8

5 Antes de la inoculación, cada muestra de resina diluida se complementó con 0,5 ml de solución de nutrientes esterilizada por filtro. La solución de nutrientes contenía los siguientes componentes por l de agua desmineralizada esterilizada: 33 g de urea, 5 g de KH₂PO₄, 5 g de MgSO₄, 7H₂O y 1 g de CaCl₂·2H₂O. Se extrajo una muestra de 1 ml de cultivos iniciadores concentrados de *A. histidinovorans* (HK1) y *A. radiobacter* (HK7) del congelador a -80°C, y se descongelaron en un baño de agua durante 1-2 min. a 30°C. Se usaron una alícuota de 20 µl de la suspensión de *A. histidinovorans* (HK1) y una alícuota de 100 µl de *A. radiobacter* (HK7), para inocular las diluciones de 50 ml descritas de Kymene® E736 complementado. Tras la inoculación (inicio DO₆₀₀ = 0,208), los cultivos se incubaron durante 43 horas a 30°C en una incubadora de agitación rotativa (250 rpm; modelo G25; New Brunswick Scientific Co., Inc., New Jersey, EE.UU.). Se controló el crecimiento bacteriano a lo largo del tiempo y se determinó midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Ultrospec 1000 UV/Vis (Pharmacia Biotech, Suecia) y una cubeta desechable de 3 ml, con un recorrido de 1 cm (Tabla 19). Se ajustó el pH de las muestras hasta pH 2,8, usando ácido sulfúrico concentrado y se añadió Proxel BD al 0,1%.

Tabla 19: Crecimiento bacteriano en Kymene® 736 con %TS incrementado.

Tiempo (h)	15% TS	20% TS
0	0,441	0,378
20	0,935	0,419
23	1,081	0,430
41	0,997	0,910
43	nd	0,899
nd: no determinado		

15 **Ejemplo 30:** Biodeshalogenación de Kymene® 736 a 20%TS en lotes de 2l.

La resina adyuvante del acresponado Kymene® 736 (Crepetrol® 73) (39,6% TS, tal como se recibió), una resina basada en poliamina/azetidinio, disponible de Hercules Incorporated (Wilmington, DE), se obtuvo de la planta de Voreppe, Francia. Se cargó un matraz de 2,5 l limpio y estéril con 1010 ml de resina Kymene® 736 (39,6% TS), y 900 ml de agua desmineralizada estéril. El pH de la resina diluida (20% TS) se ajustó hasta pH 7,0 mediante adición gradual de una solución de NaOH al 33%, complementada con 20 ml de solución de nutrientes y PPG2000 al 0,0025% (antiespumante). Se cargaron dos matraces esterilizados de 250 ml con lotes de 50 ml de resina diluida, bien hasta el 15% o el 20%TS. Las diluciones de resina se realizaron usando agua desmineralizada esterilizada (Tabla 18). La solución de nutrientes contenía los siguientes componentes por l de agua desmineralizada esterilizada: 33 g de urea, 5 g de KH₂PO₄, 5 g de MgSO₄, 7H₂O y 1 g de CaCl₂·2H₂O. Se extrajo una muestra de 1 ml de cultivos iniciadores concentrados de *A. histidinovorans* (HK1) y *A. radiobacter* (HK7) del congelador a -80°C, y se descongelaron en un baño de agua durante 1-2 min. a 30°C. Se usó una muestra de 8 ml de la suspensión de *A. radiobacter* (HK7), para inocular simultáneamente el contenido del biorreactor de 2,5 l. Las asignaciones de parámetros de la unidad de control del bioreactor, utilizado en modo de lotes, fueron como sigue:

- pH controlado a pH 7,0 (adición controlada de solución de PID al 25% a PID)
- 30 Temperatura controlada a 30°C
- Velocidad del agitador 600 rpm (velocidad máxima de 800 rpm; controlada vía valor de DO)
- Aireación fijada a 1,0 vvm (2,0 l/min; aire comprimido), valor mínimo de DO fijado a una saturación del aire del 5%

La eliminación completa de los residuos de EPI del contenido del biorreactor se controló estrechamente en el tiempo, a través de análisis por cromatografía de gases (GC-XSD; *Tabla 20*). Tras un tiempo de incubación total de 48 horas, finalizó el cultivo por lotes. El pH de la resina tratada enzimáticamente y biodeshalogenada se ajustó hasta pH 2,8, usando ácido sulfúrico concentrado, y la resina se complementó con sorbato potásico al 0,02% y Proxel BD al 0,12%.

Tabla 20: Residuos de EPI y crecimiento bacteriano en Kymene® 736 a 20%TS.

Tiempo (h)	DO _{600 nm}	1,3-DCP (ppm)	3-CPD (ppm)
0	0,412	-	-
5	0,422	-	-
22	0,572	-	-
27	0,697	-	-
30	0,818	<1	18
46	0,840	<1	<1
-: no determinado			

EJEMPLO 31 – Tratamiento con Alcalasa® de resina basada en amina terciaria

El siguiente procedimiento se ha usado para promover la formación de 3-MCPD a través de la hidrólisis de especies de clorohidrina unidas a polímero en Crepetrol® A3025 (Hercules Incorporated, Wilmington, DE).

10 Se colocó una muestra de 191,88 g de Crepetrol® A3025, que no contenía conservantes añadidos, en un matraz de vidrio de 250 ml, provisto con un tapón de plástico, sellado a rosca. El peso de la muestra se midió mediante una escala digital de laboratorio Mettler, con una precisión de $\pm 0,005$ g.

15 Se determinó la concentración de sólidos totales del Crepetrol® A3025 en un experimento separado, midiendo la pérdida de peso tras 15 min. a 150°C. Se determinó que la concentración de sólidos totales de la muestra era 26,9%.

El pH se ajustó cuidadosamente hasta 7,00 con una solución de NaOH al 10% p/p (total 12,52 g), agitando con un agitador magnético, controlando el pH con un pHmetro Mettler (MP 220), equipado con un electrodo InLab (electrodo de combinación, ref. interna ARGENTHAL con una trampa de iones Ag). El pHmetro se calibró para el intervalo de pH 7,00-10,00, antes del ajuste del pH.

20 La muestra se colocó en un baño con hielo fundente (0°C).

Se añadieron 0,9 g de Alcalasa® 2,5 L DX (obtenida de Novozymes), a la muestra de Crepetrol® A3025. El matraz se colocó entonces en un baño termostático de agitación (200 strokes/min), y se dejó en agitación durante 14 h.

Tras 14 h la muestra se extrajo y el pH se ajustó con H₂SO₄ concentrado hasta 3,5.

25 Se analizaron una muestra del material original (Crepetrol® A3025) y una muestra del material tras el tratamiento anterior, usando una técnica de cromatografía gaseosa para medir su contenido de 3-monocloropropanodiol.

La cantidad de 3-monocloropropanodiol producida durante el tratamiento se calculó como la diferencia de concentración de 3-monocloropropanodiol de la muestra tras el tratamiento y de la muestra original de Crepetrol® A3025.

30 La viscosidad reducida de la muestra final se midió también usando un capilar de Ubbelohde a 25°C. Se preparó una solución al 2% en cloruro amónico 1N y se midió el tiempo de flujo a través del capilar. Se midió también el tiempo de flujo de la solución de cloruro amónico. La viscosidad reducida se calculó según la ecuación:

ES 2 391 552 T3

$$\text{RSV [dl/g]} = \{(\text{tiempo}_{\text{muestra [s]}}/\text{tiempo}_{\text{disolvente [s]}}) - 1\} \text{Conc}_{\text{muestra [g/100 ml]}}$$

Los resultados para la liberación de CPD fueron los siguientes:

$$\text{3-MCPD liberado [ppm]} = \text{Conc}_{\text{tras tratamiento [ppm]}} - \text{Conc}_{\text{inicial [ppm]}} = 182 - 101,9 = 80,1 \text{ ppm}$$

5 En la siguiente página se presenta una tabla que muestra los resultados de una serie de experimentos realizados con este procedimiento, cambiando las condiciones de dosificación de enzima, pH, sólidos totales, temperatura y duración del tratamiento.

El ejemplo proporcionado arriba corresponde al número 31-4 de la tabla 21.

TABLA 21

Nº std (marcado de la muestra)	g de enzima	% en p de enzima Alcalasa	TS%	TS real calc.	Tem p °C	pH	tiempo h	proporción de liberación de 3-MCPD	visc. delta %	visc. delta en cP	RSV	delta RSV abs.
31-2	0,9	0,45	15	15,0	25	7	6	0,548	-5,8	-1,6	0,265	-0,001
31-3	0,45	0,225	26	26,0	25	7	6	0,360	-1,6	-1,2	0,265	-0,001
31-9	0,47	0,235	15	15,0	25	8	6	0,486	-11,1	-3,1	0,266	0
31-12	0,9	0,45	26	26,0	25	8	6	0,964	9,2	6,6	0,274	0,008
31-21	0,675	0,3375	20,5	20,5	25	7,5	10	0,729	-16,8	-7,6	0,261	0,005
31-1	0,45	0,225	15	15,0	25	7	14	0,568	3,9	1,1	0,265	-0,001
31-11	0,45	0,2116	26	24,4	25	8	14	0,852	49,4	31,4	0,354	0,088
31-4	0,9	0,4384	26	25,3	25	7	14	0,974	-0,5	-0,4	0,266	0
31-10	0,9	0,45	15	15,0	25	8	14	0,938	-4,7	-1,3	0,27	0,004
31-25	0,675	0,3372	20,5	20,5	32,5	7,5	2	0,325	-5,4	-2,4	0,264	-0,002
31-27	0,73	0,365	20,5	20,5	32,5	7,5	10	0,639	-7,5	-3,4	0,265	-0,001
31-29	0,675	0,3375	20,5	20,5	32,5	7,5	10	0,519	-16,8	-7,6	0,267	0,001
31-23	0,675	0,329	20,5	20,5	32,5	6,5	10	0,218	-14,8	-6,7	0,267	0,001
31-20	0,675	0,329	26	25,3	32,5	7,5	10	0,645	-1,6	-1,1	0,28	0,014
31-24	0,675	0,3374	20,5	20,5	32,5	8,5	10	0,579	81,0	36,5	0,453	0,187
31-30	0,675	0,3374	20,5	20,5	32,5	7,5	10	0,639	-8,8	-4,0	0,266	0
31-28	0,675	0,3375	20,5	20,5	32,5	7,5	10	0,444	-9,5	-4,3	0,27	0,004
31-19	0,675	0,3375	9,5	9,5	32,5	7,5	10	0,544	-58,6	-10,2	0,27	0,004*
31-18	1,13	0,5649	20,5	20,5	32,5	7,5	10	0,910	-6,2	-2,8	0,262	-0,004
31-17	0,21	0,105	20,5	20,5	32,5	7,5	10	0,203	13,8	6,2	0,272	0,006

ES 2 391 552 T3

31-26	0,675	0,3375	20,5	20,5	32,5	7,5	18	0,789	-5,5	-2,5	0,27	0,004
31-15	0,45	0,225	26	26,0	40	8	6	0,017	440,8	319,8	0,685	0,419
31-5	0,45	0,225	15	15,0	40	7	6	0,383	-14,3	-4,0	0,255	-0,011
31-8	0,9	0,45	26	26,0	40	7	6	0,609	4,2	3,0	0,277	0,011
31-14	0,9	0,45	15	15,0	40	8	6	0,814	14,2	4,0	0,319	0,053
31-6	0,9	0,45	15	15,0	40	7	14	0,938	-12,2	-3,4	0,268	0,002
31-7	0,45	0,225	26	26,0	40	7	14	0,680	24,0	17,4	0,31	0,044
31-13	0,45	0,225	15	15,0	40	8	14	0,650	93,8	26,3	0,53	0,264
31-16	0,9	0,45	26	26,0	40	8	14	na	gelificado	gelificado	1	0,734
31-22	0,675	0,3375	20,5	20,5	47,5	7,5	10	0,189	12,5	5,6	0,306	0,04
* Muestra de referencia, no según la invención.												

Según el resultado descrito, se calcula estadísticamente que las mejores condiciones para el tratamiento enzimático de esta resina son:

5	Conc. de enzima, [%W]:	0,45
	TS de polímero [%]:	22,17
	Temp. [°C]:	25:
	pH	7,94
	Duración [h]:	10,43

10 Este tratamiento producirá una elevada liberación de 3-MCPD (cerca de 95%) y ningún incremento en la viscosidad final. (Una viscosidad final mayor es un problema para la estabilidad del producto, especialmente si se requiere un tratamiento adicional de la resina).

Según el modelo estadístico elaborado, se pueden elegir condiciones alternativas cuando se requiera, produciendo una eficiencia final similar. Las siguientes condiciones, por ejemplo, en las que se usa una cantidad incluso inferior de enzima, y se espera una liberación final de cerca de 90% de 3-MCPD, sin incremento significativo de la viscosidad.

15	Conc. de enzima, [%W]:	0,25
	TS de polímero [%]:	22,4
	Temp. [°C]:	25:
	pH	8,00
	Duración [h]:	14,00

20 **Ejemplo 32:** Resultados de mediciones de adhesión

En el siguiente gráfico se presentan los resultados de la medición de la adhesión de un número seleccionado de muestras tratadas con enzima (extraídas de la serie descrita en la tabla anterior). Una hidrólisis significativa (y una caída consecuente en el MW promedio) del polímero puede producir una pérdida significativa de resistencia al descascarillado, por tanto se quería controlar si era detectable una reducción importante de la adhesión.

25 El ensayo de descascarillado se midió sumergiendo una tira de tejido en una solución de sólidos al 2% del

adyuvante de acresponado, y luego curando la tira durante 7,5 minutos a 92°C en contacto con una placa metálica estándar (acero débil). Se midió la fuerza promedio para eliminar la tira por descascarillado desde la placa usando una máquina de ensayo universal Zwick005.

5 Los resultados se representan frente a la variación de viscosidad observada tras el tratamiento enzimático. Es claramente visible que la adhesión de la muestra se distribuye aleatoriamente (con una oscilación debida a la variación experimental), independientemente del cambio observado en la viscosidad.

Adicionalmente, los valores están todos distribuidos alrededor de un valor típico para el material sin tratar (0,75-0,8 N/cm).

10 Estos resultados indican que los tratamientos enzimáticos no produjeron ninguna reducción medible en la resistencia de adhesión del polímero.

Tabla 22

Nº std.	Resistencia al descascarillado N/cm	Delta RSV
31-4	0,7	0
31-10	0,65	0,004
31-11	0,71	0,088
31-12	0,75	0,008
31-21	0,72	-0,005
31-18	0,81	-0,004
31-24	0,82	0,187
29	0,74	0,001
5	0,76	-0,011
6	0,93	0,002
13	0,69	0,264
14	0,77	0,053
15	0,74	0,419

EJEMPLO 33: Biodeshalogenación de Crepetrol® 870 (véase Tabla 23 para datos y detalles)

15 Se diluyó una porción de Crepetrol® 870 sin biocida (disponible de Hercules Incorporated, Wilmington, DE; Voreppe, planta de Francia) hasta un 18,9% de sólidos totales con agua desionizada. Esta resina diluida tiene una viscosidad de Brookfield de 53 cps.

20 Pasteurización: Se equipó un matraz de 2 l de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 1780 g de la resina al 18,9%. La resina tenía un pH de 4,6 y se calentó durante una hora desde 25°C hasta 85°C. La resina se mantuvo a 85°C durante 20 minutos y luego se enfrió hasta 25°C en 45 minutos. La resina pasteurizada se almacenó en un recipiente estéril.

Biodeshalogenación: Preparación de inóculo de resina [Aumento 1 (SU1)]: Se equipó un matraz de 250 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un tubo de aspersión de aire y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 350 g de resina pasteurizada. Una porción de la resina pasteurizada se diluyó hasta el 10% con agua desionizada estéril. Se añadieron al matraz 198 g de esta

resina al 10% y 2,0 g de glicerol estéril 5 mM en solución acuosa. El pH se incrementó hasta 5,8 con 3,18 g de hidróxido sódico acuoso al 30% y luego se añadieron 68 microlitros de cultivo iniciador concentrado HK1 (1:3000, HK1 frente a resina) [véase Ejemplo 24 para preparación del cultivo iniciador concentrado] y se añadieron 1,75 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrógeno fosfato potásico, 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato magnésico y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). Se inició la pulverización de aire, la temperatura se mantuvo a 30°C. El crecimiento bacteriano se controló mediante densidad óptica (DO₆₀₀) y la biodeshalogenación se controló mediante GC. La DO₆₀₀ se determinó mediante medición de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. Tras 17 horas, la resina resultante se usó como inóculo para SU2.

Aumento 2 (SU2):

Se equipó un matraz de 250 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un tubo de aspersion de aire y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 150 g de resina pasteurizada al 18,9%. El pH se incrementó hasta 5,8 con 4,52 g de hidróxido sódico acuoso al 30% y luego se añadieron 50,0 g del inóculo de resina SU1 (proporción de inoculación 25%) y se añadieron 1,31 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrógeno fosfato potásico, 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato magnésico y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). Se inició la pulverización de aire, la temperatura se mantuvo a 30°C. El crecimiento bacteriano se controló mediante densidad óptica (DO₆₀₀) y la biodeshalogenación se controló mediante GC. La DO₆₀₀ se determinó mediante medición de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. Tras 8 horas, la resina resultante se usó como inóculo para SU3.

Aumento 3 (SU3):

Se equipó un matraz de 250 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un tubo de aspersion de aire y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 150 g de resina pasteurizada al 18,9%. El pH se incrementó hasta 5,8 con 4,45 g de hidróxido sódico acuoso al 30% y luego se añadieron 50,0 g del inóculo de resina SU2 (proporción de inoculación 25%) y se añadieron 1,31 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrógeno fosfato potásico, 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato magnésico y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). Se inició la pulverización de aire, la temperatura se mantuvo a 30°C. El crecimiento bacteriano se controló mediante densidad óptica (DO₆₀₀) y la biodeshalogenación se controló mediante GC. La DO₆₀₀ se determinó mediante medición de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. Tras 14,5 horas, la resina resultante se usó como inóculo para SU4. La resina restante no usada para el inóculo se desechó, pero se podría haber usado para proporcionar el producto final.

Aumento 4 (SU4):

Se equipó un matraz de 250 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un tubo de aspersion de aire y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 300 g de resina pasteurizada al 18,9%. El pH se incrementó hasta 5,8 con 8,94 g de hidróxido sódico acuoso al 30% y luego se añadieron 100,0 g del inóculo de resina SU3 (proporción de inoculación 25%) y se añadieron 2,62 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrógeno fosfato potásico, 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato magnésico y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). Se inició la pulverización de aire, la temperatura se mantuvo a 30°C. El crecimiento bacteriano se controló mediante densidad óptica (DO₆₀₀) y la biodeshalogenación se controló mediante GC. La DO₆₀₀ se determinó mediante medición de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. Tras 8 horas, la resina resultante se usó como inóculo para SU5. La resina restante no usada para el inóculo se desechó, pero se podría haber usado para proporcionar el producto final.

Aumento 5 (SU5):

Se equipó un matraz de 500 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un tubo de aspersion de aire y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 300 g de resina pasteurizada al 18,9%. El pH se incrementó hasta 5,8 con 8,96 g de hidróxido sódico acuoso al 30% y luego se añadieron 100,0 g del inóculo de resina SU3 (proporción de inoculación 25%) y se añadieron 2,62 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrógeno fosfato potásico, 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato magnésico y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). Se inició la pulverización de aire, la temperatura se mantuvo a 30°C. El crecimiento bacteriano se controló mediante densidad óptica (DO₆₀₀) y la biodeshalogenación se controló mediante GC. La DO₆₀₀ se determinó mediante medición de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. Tras 15,5

horas, la resina resultante se usó como inóculo para SU5. La resina restante no usada para el inóculo se convirtió en el producto final reduciendo el pH hasta 4,7 con ácido fosfórico al 85% y añadiendo 2000 ppm de sorbato potásico como biocida.

Aumento 6 (SU6):

- 5 Se equipó un matraz de 500 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un tubo de aspersion de aire y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 300 g de resina pasteurizada al 18,9%. El pH se incrementó hasta 5,8 con 8,84 g de hidróxido sódico acuoso al 30% y luego se añadieron 100,0 g del inóculo de resina SU5 (proporción de inoculación 25%) y se añadieron 2,62 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrógeno fosfato potásico, 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato magnésico y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). Se inició la pulverización de aire, la temperatura se mantuvo a 30°C. El crecimiento bacteriano se controló mediante densidad óptica (DO₆₀₀) y la biodeshalogenación se controló mediante GC. La DO₆₀₀ se determinó mediante medición de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. Tras 8
- 10 horas, la resina resultante se usó como inóculo para SU5. La resina restante no usada para el inóculo se convirtió en el producto final reduciendo el pH hasta 4,7 con 7,20 g de ácido fosfórico al 85% y añadiendo 2000 ppm de sorbato potásico (7,11 ml de sorbato potásico acuoso al 10% en peso) como biocida.
- 15

Véase la Tabla 23 para los resultados del control del tratamiento.

Tabla 23:

Ensayos ácidos sobre muestra de Crepetrol 870					DCP (ppm)	CPD (ppm)
X33047-19A		Voreppe antes de pasteurización			ND	47
X33047-19A		Tras ensayo ácido			ND	71
X33047-39		Voreppe tras la pasteurización			ND	43
X33047-39		Tras ensayo ácido			ND	69
Aumento 1: 198 g de Crepetrol 870 al 10%, 2 g de glicerol 0,5 M, 68 microlitros de HK1, 1,75 de solución de nutrientes.						
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	0	5,81	----	3,18	ND	23
X33047-41-1	1	5,81	0,020	----	ND	24
X33047-41-2	17	5,82	0,473	----	0,26	0,08
Aumento 2: 150 g de Crepetrol 870 al 18,87%, 2 g de glicerol 0,5 M, 50,0 g -41, 1,31 de solución de nutrientes.						
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	0	5,82	----	4,52	ND	32
X33047-43-1	1	5,82	0,126	----	ND	28

ES 2 391 552 T3

X33047-43-2	4	5,83	0,159	----	1,0	1,12
X33047-43-3	8	5,82	0,168	----	0,57	0,50
Aumento 3: 150 g de Crepetrol 870 al 18,87%, 2 g de glicerol 0,5 M, 50,0 g-43, 1,31 de solución de nutrientes.						
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	0	5,81	----	4,45	ND	32
X33047-45-1	0,117	5,81	0,048	----	ND	29
X33047-45-2	14,5	5,81	0,093	----	0,56	0,49
Aumento 4: 300 g de Crepetrol 870 al 18,87%, 2 g de glicerol 0,5 M, 100,0 g -45, 2,62 g de solución de nutrientes.						
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	0	5,82	----	8,94	ND	32
X33047-47-1	0,25	5,82	0,029	----	ND	30
X33047-47-2	4,25	5,82	0,067	----	0,58	0,30
X33047-47-3	8	5,81	0,065	----	0,59	0,72
Aumento 5: 300 g de Crepetrol 870 al 18,87%, 2 g de glicerol 0,5 M, 100,0 g -47, 2,62 de solución de nutrientes.						
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	0	5,81	----	8,94	ND	32
X33047-49-1	0,083	5,81	0,053	----	ND	33
X33047-49-2	15,5	5,80	0,049	----	0,6	0,12
X33047-49	Ensayo ácido				ND	29
Aumento 6: 300 g de Crepetrol 870 al 18,87%, 2 g de glicerol 0,5 M, 100,0 g -49, 2,62 de solución de nutrientes.						
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)

----	0	5,80	----	8,84	ND	32
X33047-51-1	0,083	5,80	0,023	----	ND	32
X33047-51-2	4	5,80	0,039	----	ND	8,7
X33047-51-3	8	5,80	0,050	----	0,59	1,0
X33047-51	Ensayo ácido				ND	30

Ejemplo 34: Ensayo de adhesión para sustancias de acresponado

Se ha construido un dispositivo para evaluar las propiedades adhesivas de adhesivos de acresponado potenciales. Este aparato consiste en un bloque de hierro fundido calentado que está montado sobre el actuador de un instrumento de ensayo MTS. Este plato se calienta hasta 120°C. Una muestra de papel se une al plato superior de la célula de carga del instrumento de ensayo con cinta de doble cara. Para realizar el ensayo, se pulveriza una cantidad conocida de una solución acuosa de adhesivo de acresponado con una concentración conocida sobre el bloque caliente. Esto se consigue usando un aerógrafo que se ha dispuesto con una botella de pulverización volumétrica. La botella de pulverización volumétrica permite medir con precisión el volumen de solución que se va a aplicar al plato de ensayo. Nuestras condiciones de ensayo estándar usan un volumen de 1,2 ml de una solución acuosa de sólidos al 4,0%. El pH de la solución puede ser ambiente o se puede ajustar hasta 7,0 antes del ensayo. Una vez que la solución de resina se pulveriza sobre el bloque caliente, el actuador se eleva hasta contactar el bloque caliente con la muestra de papel, con una fuerza de 10 kg. A continuación, el actuador se baja y la fuerza y también la fuerza para separarlo del papel que había contactado. Esta fuerza medida es el valor de adhesión de la resina particular que se está ensayando. Debido a que la fuerza aplicada no es siempre exactamente 10 kg, el valor de adhesión se normaliza para compensar ligeras variaciones en la fuerza aplicada. Esto se consigue multiplicando el valor de adhesión medido por [10/(fuerza aplicada en kg)]. El papel usado para el ensayo es una lámina de peso básico de 18,14 kg, preparada a partir de una capa fibrosa de pasta de papel blanqueada de madera blanda/madera dura.

La siguiente tabla contiene los datos del ensayo de adhesión y la viscosidad de Brookfield:

Tabla 24

Designación		Viscosidad (cps)	Ensayo (Kg) (pH ambiente)	Ensayo (Kg) (pH 7,0)
X33047-19A	Comp. Ex.	53	23,4	21,7
X33047-39	Comp. Ex.	54	23,4	23,2
X33047-47	Ejemplo	45	----	----
X33047-49	Ejemplo	46	21,6	22,1
X33047-51	Ejemplo	49	23,7	22,2

Los datos en esta tabla indican que la presente invención tiene ensayos de viscosidad y adhesión comparables a las resinas sin tratar, indicando que el funcionamiento de las resinas biodeshalogenadas es comparable al de las resinas que no estaban biodeshalogenadas.

Ejemplo 35: Alcalasa-biodeshalogenación de Crepetrol® 870 (véase Tabla 25 para datos y detalles).

Se diluyó una porción de Crepetrol® 870 sin biocida (disponible de Hercules Incorporated Wilmington, DE; Voreppe, planta de Francia) hasta un 18,7% de sólidos totales con agua desionizada. Esta resina diluida tenía una viscosidad de Brookfield de 53 cps.

Pasteurización: Se equipó un matraz de 2 l de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 2942 g de la resina al 18,7%. La resina tenía un pH de 4,6 y se calentó durante 1,5 horas desde 25°C hasta 85°C. La resina se mantuvo a 85°C durante 20 minutos y luego se enfrió hasta 25°C en 30 minutos. La resina pasteurizada se almacenó en un recipiente

estéril.

Biodeshalogenación: Preparación de inóculo de resina [Aumento 1 (SU1)]: Se equipó un matraz de 250 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un tubo de pulverización de aire y un agitador mecánico. Una parte de la resina pasteurizada se diluyó hasta 10% con agua desionizada, estéril. Se añadieron al matraz 198 g de esta resina al 10% y 2,0 g de glicerol estéril 5 mM en solución de agua. El pH se incrementó hasta 7,2 con 8,31 g de hidróxido sódico acuoso al 30% y luego se añadieron 68 microlitros de cultivo iniciador concentrado de HK1 (1:3000, HK1 frente a resina) (véase ejemplo 24 para preparación del cultivo iniciador concentrado) y 1,75 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrogeno-fosfato de potasio; 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato de magnesio y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). La aspersión de aire comenzó, la temperatura se mantuvo a 30°C. El crecimiento bacteriano se controló mediante densidad óptica (DO₆₀₀) y la biodeshalogenación se controló mediante GC. La DO₆₀₀ se determinó midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. Tras 16 horas, la resina resultante se usó como inóculo para SU2.

Aumento 2 (SU2): Se equipó un matraz de 250 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un tubo de aspersión de aire y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 150 g de la resina pasteurizada al 18,7%. El pH se incrementó hasta 7,2 con 10,97 g de hidróxido sódico acuoso al 30%. y luego se añadieron 1,02 g de Alcalasa 2,5 L tipo DX (disponible de Novozymes), 50,0 g de inóculo de resina de SU1 (proporción de inoculación 25%) 1,31 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrogeno-fosfato de potasio; 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato de magnesio y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). La aspersión de aire comenzó, la temperatura se mantuvo a 30°C. El crecimiento bacteriano se controló mediante densidad óptica (DO₆₀₀) y la biodeshalogenación se controló mediante GC. La DO₆₀₀ se determinó midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. Tras 8 horas, la resina resultante se usó como inóculo para SU3.

Aumento 3 (SU3):

Se equipó un matraz de 250 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un tubo de aspersión de aire y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 150 g de la resina pasteurizada al 18,7%. El pH se incrementó hasta 7,2 con 11,42 g de hidróxido sódico acuoso al 30%. y luego se añadieron 0,87 g de Alcalasa 2,5 L tipo DX (disponible de Novozymes), 50,0 g de inóculo de resina de SU2 (proporción de inoculación 25%) 1,31 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrogeno-fosfato de potasio; 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato de magnesio y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). La aspersión de aire comenzó, la temperatura se mantuvo a 30°C. El crecimiento bacteriano se controló mediante densidad óptica (DO₆₀₀) y la biodeshalogenación se controló mediante GC. La DO₆₀₀ se determinó midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. Tras 14 horas, la resina resultante se usó como inóculo para SU4. La resina restante no usada para inóculo se desechó, pero se podría haber usado para proporcionar el producto acabado.

Aumento 4 (SU4): Se equipó un matraz de 500 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un tubo de aspersión de aire y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 300 g de la resina pasteurizada al 18,7%. El pH se incrementó hasta 7,2 con 22,17 g de hidróxido sódico acuoso al 30%. y luego se añadieron 1,73 g de Alcalasa 2,5 L tipo DX (disponible de Novozymes), 100,0 g de inóculo de resina de SU3 (proporción de inoculación 25%) 2,62 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrogeno-fosfato de potasio; 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato de magnesio y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). La aspersión de aire comenzó, la temperatura se mantuvo a 30°C. El crecimiento bacteriano se controló mediante densidad óptica (DO₆₀₀) y la biodeshalogenación se controló mediante GC. La DO₆₀₀ se determinó midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. Tras 8 horas, la resina resultante se usó como inóculo para SU5. La resina restante no usada para inóculo, se convirtió en producto final bajando el pH hasta 4,7 con ácido fosfórico al 85% y añadiendo 2000 ppm de sorbato potásico como biocida.

Aumento 5 (SU5):

Se equipó un matraz de 500 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un tubo de aspersión de aire y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 300 g de la resina pasteurizada al 18,7%. El pH se incrementó hasta 7,2 con 22,77 g de hidróxido sódico acuoso al 30%. y luego se añadieron 1,02 g de Alcalasa 2,5 L tipo DX (disponible de Novozymes), 100,0 g de inóculo de resina de SU4 (proporción de inoculación 25%) 2,62 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrogeno-fosfato de potasio; 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato de magnesio y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). La aspersión de aire comenzó, la temperatura se mantuvo a 30°C. El crecimiento

ES 2 391 552 T3

bacteriano se controló mediante densidad óptica (DO₆₀₀) y la biodeshalogenación se controló mediante GC. La DO₆₀₀ se determinó midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. Tras 14,5 horas, la resina resultante se usó como inóculo para SU6. La resina restante no usada para inóculo, se convirtió en producto final bajando el pH hasta 4,7 con ácido fosfórico al 85% y añadiendo 2000 ppm de sorbato potásico como biocida.

Aumento 6 (SU6):

Se equipó un matraz de 500 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un tubo de aspersión de aire y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 300 g de la resina pasteurizada al 18,7%. El pH se incrementó hasta 7,2 con 23,02 g de hidróxido sódico acuoso al 30%. y luego se añadieron 1,73 g de Alcalasa 2,5 L tipo DX (disponible de Novozymes), 100,0 g de inóculo de resina de SU5 (proporción de inoculación 25%) 2,62 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrogeno-fosfato de potasio; 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato de magnesio y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). La aspersión de aire comenzó, la temperatura se mantuvo a 30°C. El crecimiento bacteriano se controló mediante densidad óptica (DO₆₀₀) y la biodeshalogenación se controló mediante GC. La DO₆₀₀ se determinó midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. Tras 8 horas, la resina resultante se convirtió en producto final bajando el pH hasta 4,7 con 22,5 g de ácido fosfórico al 85% y añadiendo 2000 ppm de sorbato potásico (7,69 ml de sorbato potásico acuoso al 10% en peso) como biocida. Véase Tabla 25 para los resultados del control del tratamiento. Hay que destacar que usando esta proporción de inoculación, el lote SU6 no se biodeshalogenó completamente en un tiempo de reacción de 8 horas. Un experimento paralelo, con los mismos tiempos de reacción, usando una proporción de inoculación del 33% en el lote SU4 y una proporción de inoculación del 50% en los lotes SU5 y SU6, proporciona una biodeshalogenación completa en el lote SU6 (véase Tabla 26).

Tabla 25:

Aumento 1: 198 g de Crepetrol 870 al 10%, 2 g de glicerol 0,5 M, 68 microlitros de HK1, 1,75 g de solución de nutrientes.						
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	0	7,20	----	8,31	ND	23
X33047-62-1	0,5	7,20	0,066	----	ND	23
X33047-62-2	15,67	7,21	0,180	----	ND	3,3
Aumento 2: 150 g de Crepetrol 870 al 18,73%, 50,0 g -62, 1,02 g de Alcalasa, 1,31 g de solución de nutrientes.						
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	0	7,18	----	10,97	ND	32
X33047-64-1	1	7,16	0,180	----	ND	34
X33047-64-2	4	7,19	0,199	----	ND	11
X33047-64-3	8	7,18	0,253	----	0,41	0,48
Aumento 3: 150 g de Crepetrol 870 al 18,73%, 50,0 g -62, 50,0 g -64, 0,87 g de Alcalasa, 1,31 g de solución de						

ES 2 391 552 T3

nutrientes.						
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	0	7,21	----	11,24	ND	32
X33047-66-1	0,083	7,21	0,207	----	ND	33
X33047-66-2	13,75	7,17	0,299	----	0,42	0,25
Aumento 4: 300 g de Crepetrol 870 al 18,73%, 100,0 g -66, 1,73 g de Alcalasa, 2,62 g de solución de nutrientes.						
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	0	7,23	----	22,17	ND	32
X33047-68-1	1	7,21	0,196	----	ND	34
X33047-68-2	4	7,20	0,228	----	ND	19
X33047-68-3	8	7,20	0,260	----	0,47	0,46
X33047-68	Tras ensayo ácido				0,37	5,9
Aumento 5: 300 g de Crepetrol 870 al 18,73%, 100,0 g -68, 1,73 g de Alcalasa, 2,62 g de solución de nutrientes.						
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	0	7,23	----	22,77	ND	32
X33047-70-1	0,083	7,21	0,165	----	ND	34
X33047-70-2	14,5	7,19	0,247	----	0,43	0,2
X33047-70	Tras ensayo ácido				0,35	2,9
Aumento 6: 300 g de Crepetrol 870 al 18,73%, 100,0 g -70, 1,73 g de Alcalasa, 2,62 g de solución de nutrientes.						
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	0	7,24	----	23,02	ND	32

ES 2 391 552 T3

X33047-72-1	1	7,23	0,195	----	ND	33
X33047-72-2	4	7,22	0,208	----	ND	35
X33047-72-3	8	7,22	0,233	----	ND	25

Tabla 26:

Aumento 2: 198 g de Crepetrol 870 al 10%, 2 g de glicerol 0,5 M, 68 microlitros de HK1 , 1,75 g de solución de nutrientes.						
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	0	7,20	----	8,20	ND	23
X33047-63-1	0,5	7,19	0,073	----	ND	23
X33047-63-2	15,67	7,17	0,185	----	ND	2,5
Aumento 2: 150 g de Crepetrol 870 al 18,73%, 50,0 g -63, 1,02 g de Alcalasa, 1,31 g de solución de nutrientes.						
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	0	7,18	----	11,13	ND	32
X33047-65-1	1	7,17	0,181	----	ND	32
X33047-65-2	4	7,17-7,19	0,207	0,13	ND	10
X33047-65-3	8	7,18	0,261	----	0,45	0,42
Aumento 3: 150 g de Crepetrol 870 al 18,73%, 50,0 g -65, 0,87 g de Alcalasa, 1,31 g de solución de nutrientes.						
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	0	7,21	----	11,26	ND	32
X33047-67-1	0,083	7,21	0,193	----	ND	31
X33047-67-2	13,75	7,17	0,288	----	0,39	0,22

ES 2 391 552 T3

Aumento 4: 266,7 g de Crepetrol 870 al 18,73%, 133,3 g -67, 1,54 g de Alcalasa, 2,33 g de solución de nutrientes.						
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	0	7,22	----	20,28	ND	29
X33047-69-1	1	7,20	0,194	----	ND	24
X33047-69-2	4	7,20	0,234	----	0,45	2,7
X33047-69-3	8	7,19	0,258	----	0,41	0,35
Aumento 5: 200 g de Crepetrol 870 al 18,73%, 200 g -69, 1,16 g de Alcalasa, 1,75 g de solución de nutrientes.						
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	0	7,22	----	15,08	ND	22
X33047-71-1	0,083	7,22	0,199	----	ND	20
X33047-71-2	14,5	7,20	0,278	----	0,38	0,13
X33047-71	Tras ensayo ácido				0,30	1,5
Aumento 6: 200 g de Crepetrol 870 al 18,73%, 200 g -71, 1,16 g de Alcalasa, 1,75 g de solución de nutrientes.						
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	0	7,24	----	15,37	ND	22
X33047-73-1	1	7,22	0,224	----	ND	16
X33047-73-2	4	7,21	0,261	----	0,42	0,43
X33047-73-3	8	7,21	0,271	----	0,41	0,21
X33047-73	Tras ensayo ácido				0,32	3,3

Ejemplo 36: Biodeshalogenación de Crepetrol® A6115 (véase Tabla BP4 para datos y detalles)

Una porción de sustancia de acresponado Crepetrol® A6115 sin biocida (disponible de Hercules Incorporated, Wilmington, DE; Milwaukee, planta de Wisconsin), se filtró a través de una malla de trama 100. La resina tenía 15,73% de sólidos totales, un pH de 5,1 y una viscosidad de Brookfield de 86 cps.

Pasteurización: Se equipó un matraz de 3 l de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 2770 g de la resina. La resina se calentó durante 1,5 horas desde 25°C hasta 85°C. La resina se mantuvo a 85°C durante 20 minutos y luego se enfrió hasta 25°C en 30 minutos. La resina pasteurizada se almacenó en un recipiente estéril.

- 5 Biodeshalogenación: Preparación del inóculo de resina (Aumento 1 (SU1)): Se equipó un matraz de 250 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un tubo de aspersión de aire y un agitador mecánico. Una porción de la resina pasteurizada se diluyó hasta 10% con agua desionizada, estéril. Se añadieron al matraz 198 g de esta resina al 10% y 2,0 g de glicerol estéril 5 mM en solución acuosa. El pH se incrementó hasta 6,0 con 1,04 g de hidróxido sódico acuoso al 30% y luego se añadieron 133 microlitros de cultivo iniciador concentrado de HK1 (1:1500, HK1 frente a resina) [Véase Ejemplo 24 para preparación del cultivo iniciador concentrado] y se añadieron 1,75 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrógeno fosfato potásico, 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato magnésico y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). Se inició la pulverización de aire, la temperatura se mantuvo a 30°C. El crecimiento bacteriano se controló mediante densidad óptica (DO_{600}) y la biodeshalogenación se controló mediante GC. La DO_{600} se determinó mediante medición de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. Tras 16 horas, la resina resultante se usó como inóculo para SU2.

Aumento 2 (SU2):

- 20 Se equipó un matraz de 250 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 150 g de la resina pasteurizada. el pH se incrementó hasta 5,8 con 0,96 g de hidróxido sódico acuoso al 30% y luego se añadieron 50,0 g del inóculo de resina SU1 (proporción de inoculación 25%) y 1,31 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrógeno fosfato potásico, 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato magnésico y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). Se inició la pulverización de aire, la temperatura se mantuvo a 30°C. El crecimiento bacteriano se controló mediante densidad óptica (DO_{600}) y la biodeshalogenación se controló mediante GC. La DO_{600} se determinó mediante medición de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. Tras 8 horas, la resina resultante se usó como inóculo para SU3.

Aumento 3 (SU3):

- 35 Se equipó un matraz de 250 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 150 g de la resina pasteurizada. el pH se incrementó hasta 5,8 con 0,96 g de hidróxido sódico acuoso al 30% y luego se añadieron 50,0 g del inóculo de resina SU2 (proporción de inoculación 25%) y 1,31 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrógeno fosfato potásico, 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato magnésico y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). Se inició la pulverización de aire, la temperatura se mantuvo a 30°C. El crecimiento bacteriano se controló mediante densidad óptica (DO_{600}) y la biodeshalogenación se controló mediante GC. La DO_{600} se determinó mediante medición de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. Tras 14,5 horas, la resina resultante se usó como inóculo para SU4. La resina restante no usada para el inóculo se desechó, pero se podría haber usado para proporcionar el producto final.

Aumento 4 (SU4):

- 45 Se equipó un matraz de 250 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 300 g de la resina pasteurizada. el pH se incrementó hasta 5,8 con 1,40 g de hidróxido sódico acuoso al 30% y luego se añadieron 100,0 g del inóculo de resina SU3 (proporción de inoculación 25%) y 2,62 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrógeno fosfato potásico, 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato magnésico y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). Se inició la pulverización de aire, la temperatura se mantuvo a 30°C. El crecimiento bacteriano se controló mediante densidad óptica (DO_{600}) y la biodeshalogenación se controló mediante GC. La DO_{600} se determinó mediante medición de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. Tras 8 horas, la resina resultante se usó como inóculo para SU3. La resina restante no usada para el inóculo se desechó, pero se podría haber usado para proporcionar el producto final.

Aumento 5 (SU5):

Se equipó un matraz de 500 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 300 g de la resina pasteurizada. el pH se incrementó hasta 5,8 con 1,69 g de hidróxido sódico acuoso al 30% y luego se añadieron 100,0 g del inóculo de resina SU4 (proporción de inoculación 25%) y 2,62 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrógeno fosfato potásico, 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato magnésico y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). Se inició la pulverización de aire, la temperatura se mantuvo a 30°C. El crecimiento bacteriano se controló mediante densidad óptica (DO₆₀₀) y la biodeshalogenación se controló mediante GC. La DO₆₀₀ se determinó mediante medición de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. Tras 15 horas, la resina resultante se usó como inóculo para SU6. La resina restante no usada para el inóculo se convirtió en producto acabado reduciendo el pH hasta 5,3 con ácido sulfúrico concentrado (96%) y añadiendo 2000 ppm de sorbato potásico como biocida.

Aumento 6 (SU6):

Se equipó un matraz de 500 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 300 g de la resina pasteurizada. el pH se incrementó hasta 5,8 con 1,82 g de hidróxido sódico acuoso al 30% y luego se añadieron 100,0 g del inóculo de resina SU4 (proporción de inoculación 25%) y 2,62 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrógeno fosfato potásico, 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato magnésico y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). Se inició la pulverización de aire, la temperatura se mantuvo a 30°C. El crecimiento bacteriano se controló mediante densidad óptica (DO₆₀₀) y la biodeshalogenación se controló mediante GC. La DO₆₀₀ se determinó mediante medición de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. Tras 8 horas, la resina resultante se convirtió en producto acabado reduciendo el pH hasta 5,3 con 0,73 g de ácido sulfúrico concentrado (96%) y añadiendo 2000 ppm de sorbato potásico (7,6 ml de sorbato potásico al 10% en peso como biocida).

Véase Tabla 27 para los resultados del control del tratamiento.

Tabla 27:

Aumento 1: 198 g de Crepetrol A6115 al 10%, 2 g de glicerol 0,5 M, 133 microlitros de HK1 (1:1500, resina:inóculo), 1,75 g de solución de nutrientes.							
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	Viscosidad de Gardner	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	0	5,96	----	----	1,04	1,7	30
X32989-58-1	0,25	5,95		0,059	----	ND	30
X32989-58-2	16	5,95		0,355	----	1,2	0,28
Aumento 2: 150 g de Crepetrol A6115 al 15,7% (pasteurizado), 50,0 g -58, 1,31 g de solución de nutrientes.							
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	Viscosidad de Gardner	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	0	5,81	----	----	0,96	2,0	35
X32989-60-1	1	5,81	----	0,134	----	2,0	0,50
X32989-60-2	4	5,82	----	0,130	----	1,9	0,42

ES 2 391 552 T3

X32989-60-3	8	5,83	----	0,124	----	1,9	0,58
Aumento 3: 150 g de Crepetrol A6115 al 15,7% (pasteurizado), 50,0 g -60, 1,31 g de solución de nutrientes.							
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	Viscosidad de Gardner	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	0	5,81	----	----	0,96	2,0	35
X32989-62-1	0,083	5,81	----	0,080	----	ND	28
X32989-62-2	14,5	5,81	----	0,078	----	2,8	0,59
Aumento 4: 300 g de Crepetrol A6115 al 15,7% (pasteurizado), 100,0 g -62, 2,62 g de solución de nutrientes.							
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	Viscosidad de Gardner	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	0	5,78	----	----	1,40	2,0	35
X32989-64-1	1	5,77	----	0,064	----	ND	24
X32989-64-2	4	5,76	----	0,050	----	2,3	0,39
X32989-64-3	8	5,77	----	0,055	----	2,3	0,49
Aumento 5: 300 g de Crepetrol A6115 al 15,7% (pasteurizado), 100,0 g -64, 2,62 g de solución de nutrientes.							
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	Viscosidad de Gardner	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	0	5,80	----	----	1,69	2,0	35
X32989-66-1	0,083	5,76	E	0,054	----	ND	33
X32989-66-2	15	5,76	E	0,042	----	2,3	0,55
Aumento 6: 300 g de Crepetrol A6115 al 15,7% (pasteurizado), 100,0 g -66, 2,62 g de solución de nutrientes.							
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	Viscosidad de Gardner	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)

----	0	5,77	----	----	1,82	2,0	35
X32989-68-1	1	5,76	E	0,036	----	ND	24
X32989-68-2	4	5,75	----	0,054	----	2,1	1,7
X32989-68-3	8	5,75	E	0,039	----	2,2	0,41

Ejemplo 37: Biodeshalogenación con Alcalasa de la sustancia de acresponado Crepetrol A6115 (véase Tabla BP5 para datos y detalles).

Se filtró una porción de la sustancia de acresponado Crepetrol A6115 sin biocida (disponible de Hercules Incorporated, Wilmington, DE; Milwaukee, planta de Wisconsin), a través de un tamiz de malla 100. La resina tenía 15,73% de sólidos totales, un pH de 5,1 y una viscosidad de Brookfield de 86 cps.

Pasteurización: Se equipó un matraz de 3 l de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 2770 g de la resina. La resina se calentó durante 1,5 horas desde 25°C hasta 85°C. La resina se mantuvo a 85°C durante 20 minutos y luego se enfrió hasta 25°C en 30 minutos. La resina pasteurizada se almacenó en un recipiente estéril.

Biodeshalogenación: Preparación del inóculo de resina (Aumento 1 (SU1)): Se equipó un matraz de 250 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un tubo de aspersion de aire y un agitador mecánico. Una porción de la resina pasteurizada se diluyó hasta 10% con agua desionizada, estéril. Se añadieron al matraz 198 g de esta resina al 10% y 2,0 g de glicerol estéril 5 mM en solución acuosa. El pH se incrementó hasta 7,2 con 2,65 g de hidróxido sódico acuoso al 30% y luego se añadieron 0,62 g de Alcalasa 2,5L tipo DX (disponible de Novozymes) y se añadieron 133 microlitros de cultivo iniciador concentrado de HK1 (1:1500, HK1 frente a resina) [véase Ejemplo 24 para preparación del cultivo iniciador concentrado] y se añadieron 1,75 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrógeno fosfato potásico, 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato magnésico y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). Se inició la pulverización de aire, la temperatura se mantuvo a 30°C. El crecimiento bacteriano se controló mediante densidad óptica (DO₆₀₀) y la biodeshalogenación se controló mediante GC. La DO₆₀₀ se determinó mediante medición de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. Tras 16 horas, la resina resultante se usó como inóculo para SU2.

Aumento 2 (SU2):

Se equipó un matraz de 250 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un tubo de aspersion de aire y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 150 g de la resina pasteurizada. El pH se incrementó hasta 7,2 con 3,37 g de hidróxido sódico acuoso al 30% y luego se añadieron 0,73 g de Alcalasa 2,5L tipo DX (disponible de Novozymes), 50,0 g de inóculo de resina SU1 (proporción de inoculación 25%) y se añadieron 1,31 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrógeno fosfato potásico, 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato magnésico y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). Se inició la pulverización de aire, la temperatura se mantuvo a 30°C. El crecimiento bacteriano se controló mediante densidad óptica (DO₆₀₀) y la biodeshalogenación se controló mediante GC. La DO₆₀₀ se determinó mediante medición de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. Tras 8 horas, la resina resultante se usó como inóculo para SU3.

Aumento 3 (SU3):

Se equipó un matraz de 250 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un tubo de aspersion de aire y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 150 g de la resina pasteurizada. El pH se incrementó hasta 7,2 con 3,02 g de hidróxido sódico acuoso al 30% y luego se añadieron 0,73 g de Alcalasa 2,5L tipo DX (disponible de Novozymes) 50,0 g del inóculo de resina SU2 y se añadieron 1,31 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrógeno fosfato potásico, 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato magnésico y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). Se inició la pulverización de aire, la temperatura se mantuvo a 30°C. El crecimiento bacteriano se controló mediante densidad óptica (DO₆₀₀) y la biodeshalogenación se controló mediante GC. La DO₆₀₀ se determinó mediante medición de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. Tras 14,5 horas, la resina resultante se usó como inóculo para SU4. La resina restante no usada como inóculo se desechó, pero se podría haber usado para proporcionar el producto final.

Aumento 4 (SU4):

Se equipó un matraz de 500 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un tubo de aspersion de aire y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 300g de la resina pasteurizada al 10%. El pH se incrementó hasta 7,2 con 6,03 g de hidróxido sódico acuoso al 30% y luego se añadieron 1,46 g de Alcalasa 2,5L tipo DX (disponible de Novozymes), 100,0 g del inóculo de resina SU2 y se añadieron 2,62 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrógeno fosfato potásico, 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato magnésico y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). Se inició la pulverización de aire, la temperatura se mantuvo a 30°C. El crecimiento bacteriano se controló mediante densidad óptica (DO₆₀₀) y la biodeshalogenación se controló mediante GC. La DO₆₀₀ se determinó mediante medición de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. Tras 8 horas, la resina resultante se usó como inóculo para SU5. La resina restante no usada como inóculo se desechó, pero se podría haber usado para proporcionar el producto final.

Aumento 5 (SU5):

Se equipó un matraz de 500 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un tubo de aspersion de aire y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 300 g de la resina pasteurizada al 10%. El pH se incrementó hasta 7,2 con 6,26 g de hidróxido sódico acuoso al 30% y luego se añadieron 1,46 g de Alcalasa 2,5L tipo DX (disponible de Novozymes), 100,0 g del inóculo de resina SU4 y se añadieron 2,62 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrógeno fosfato potásico, 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato magnésico y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). Se inició la pulverización de aire, la temperatura se mantuvo a 30°C. El crecimiento bacteriano se controló mediante densidad óptica (DO₆₀₀) y la biodeshalogenación se controló mediante GC. La DO₆₀₀ se determinó mediante medición de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. Tras 15 horas, la resina resultante se usó como inóculo para SU6. La resina restante no usada como inóculo se convirtió en el producto acabado reduciendo el pH hasta 5,3 con ácido sulfúrico concentrado (96%) y añadiendo 2000 ppm de sorbato potásico como biocida.

Aumento 6 (SU6):

Se equipó un matraz de 500 ml de fondo redondo con un condensador, un medidor de pH, un baño circulante de temperatura controlada, un tubo de aspersion de aire y un agitador mecánico. Se añadieron al matraz 300 g de la resina pasteurizada. El pH se incrementó hasta 7,2 con 6,02 g de hidróxido sódico acuoso al 30% y luego se añadieron 1,46 g de Alcalasa 2,5L tipo DX (disponible de Novozymes), 100,0 g del inóculo de resina SU5 y se añadieron 2,62 g de una solución de nutrientes. (La solución de nutrientes consistía en 8026 ppm de dihidrógeno fosfato potásico, 27480 ppm de urea, 4160 ppm de sulfato magnésico y 840 ppm de cloruro cálcico en agua del grifo). Se inició la pulverización de aire, la temperatura se mantuvo a 30°C. El crecimiento bacteriano se controló mediante densidad óptica (DO₆₀₀) y la biodeshalogenación se controló mediante GC. La DO₆₀₀ se determinó mediante medición de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ UV/Vis (Spectronic Instruments, Incorporated, Rochester, New York, USA) y una cubeta desechable con un recorrido de 1 cm. Tras 8 horas, la resina resultante se usó como inóculo para SU6. La resina restante no usada como inóculo se convirtió en el producto acabado reduciendo el pH hasta 5,3 con ácido sulfúrico concentrado (96%) y añadiendo 2000 ppm de sorbato potásico (7,6 ml de sorbato potásico acuoso al 10% en peso) como biocida.

Véase Tabla 28 para los resultados del control del tratamiento.

Tabla 28:

Aumento 1: 198 g de Crepetrol A6115 al 10% (pasteurizado), 2 g de glicerol 0,5 M, 0,62 g de Alcalasa, 133 microlitros de HK1 (1:1500, resina:inóculo), 1,75 g de solución de nutrientes.							
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	Viscosidad de Gardner	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	0	7,17	----	----	2,65	1,7	30
X32989-59-1	0,25	7,16	----	0,058	----	ND	32
X32989-59-2	16	7,17	----	0,450	----	0,57	0,12

ES 2 391 552 T3

Aumento 2: 150 g de Crepetrol A6115 al 15,7%, 0,73 g de Alcalasa, 50,0 g -59, 1,31 g de solución de nutrientes.							
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	Viscosidad de Gardner	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	0	7,19	----	----	3,37	2,0	35
X32989-61-1	1	7,18	----	0,167	----	1,7	3,6
X32989-61-2	4	7,19	----	0,180	----	1,5	0,27
X32989-61-3	8	7,18	----	0,183	----	1,4	0,24
Aumento 3: 150 g de Crepetrol A6115 al 15,7%, 0,73 g de Alcalasa, 50,0 g -61, 1,31 g de solución de nutrientes.							
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	Viscosidad de Gardner	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	0	7,17	----	----	3,02	2,0	35
X32989-63-1	0,083	7,16	----	0,087	----	ND	33
X32989-63-2	14,5	7,16	----	0,130	----	1,5	0,22
Aumento 4: 300 g de Crepetrol A6115 al 15,7%, 1,46 g de Alcalasa, 100,0 g -63, 2,62 g de solución de nutrientes.							
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	Viscosidad de Gardner	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	0	7,15	----	----	6,03	2,0	35
X32989-65-1	1	7,13	----	0,079	----	ND	31
X32989-65-2	4	7,12	----	0,095	----	1,9	0,59
X32989-65-3	8	7,11	----	0,110	----	1,9	0,37
Aumento 5: 300 g de Crepetrol A6115 al 15,7%, 1,46 g de Alcalasa, 100,0 g -65, 2,62 g de solución de nutrientes.							
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	Viscosidad de Gardner	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	0	7,20	----	----	6,26	2,0	35

X32989-67-1	0,083	7,17	C	0,050	----	ND	35
X32989-67-2	15	7,17	C	0,107	----	1,7	0,19
Aumento 6: 300 g de Crepetrol A6115 al 15,7%, 1,46 g de Alcalasa, 100,0 g -63, 2,62 g de solución de nutrientes.							
Muestra	Tiempo (h)	pH (30C)	Viscosidad de Gardner	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	0	7,16	----	----	6,02	2,0	35
X32989-69-1	1	7,14	C	0,061	----	2,5	32
X32989-69-2	4	7,13	----	0,099	----	1,9	1,1
X32989-69-3	8	7,13	C	0,107	----	1,8	0,23

Ejemplo 38: Tratamiento simultáneo enzimático-biodeshalogenación, con elevada proporción de sólidos.

Procedimiento general:

5 Se prepararon terpolímeros de bajo peso molecular de ácido adípico, dietilentriamina y ácido acético, condensando estos reactivos a 170°C durante tres horas en una proporción molar de 1:0,9:0,2. Los productos de reacción se diluyeron hasta 50% de sólidos.

Estos polímeros se hicieron reaccionar con epiclorohidrina a una proporción de epiclorohidrina:dietilentriamina de 0,82 durante 3,5 horas a 40°C, y se añadió agua de tal forma que el contenido total de sólidos del reactor fue del 40%.

10 En una etapa siguiente, las mezclas de reacción se diluyeron hasta un contenido de sólidos total de 31% y se calentaron hasta 68°C para funcionalización y reticulación. Las reacciones se detuvieron cuando la viscosidad de Gardner-Holdt "I/J" después de dos horas y 10 minutos a esta temperatura mediante la adición de ácido sulfúrico al 30%, de tal forma que el pH tras la adición de ácido sulfúrico era 4,5. Los productos de reacción se enfriaron hasta temperatura ambiente, se añadió ácido fosfórico al 1,75% y el pH se ajustó tras la adición de ácido fosfórico usando ácido sulfúrico hasta pH 2,7. El propósito de añadir ácido fosfórico y sulfúrico a este pH es obtener resinas viscoméricamente estables.

15 Las resinas se analizaron para su concentración de organocloro residual y se encontró que las concentraciones de 1,3-DCP eran 816 ppm para el material que contenía ácido acético. Estas resinas se ensayaron en un ensayo de papel y se encontró que eran tan efectivas como Kymene® SLX2 en proporcionar resistencia en húmedo al papel. Las resinas se almacenaron durante 6 semanas a 32°C y durante este período no se produjo gelificación de las resinas.

20 Biodeshalogenación (véase Tabla 29 para datos y detalles): Se preparó un inóculo con una resina no protegida terminalmente (Kymene E7219) (véase aumento 1 y aumento 2 en la Tabla 29). La resina protegida terminalmente preparada más arriba se diluyó hasta 13,5% de sólidos, el pH se incrementó hasta pH 7,2 con hidróxido sódico acuoso al 30%, se añadieron el catalizador (Alcalasa, Novozymes) para hidrolizar las especies formadoras de CPD, el inóculo del aumento 2, y la solución de nutrientes. Sin pretender ceñirse a ninguna teoría, se cree que esta etapa intermedia de contenido reducido de sólidos es útil para mejorar la adaptación de la población microbiana a la nueva resina. Una vez se completó la biodeshalogenación, se inició el siguiente lote (aumento 4). La resina protegida terminalmente preparada anteriormente se diluyó hasta 20% de sólidos, el pH se incrementó hasta pH 7,2 con hidróxido sódico acuoso al 30%, se añadieron el catalizador (Alcalasa, Novozymes) para hidrolizar las especies formadoras de CPD, el inóculo del aumento 3, y la solución de nutrientes. El crecimiento microbiano fue rápido, como indicaba la densidad óptica (DO₆₀₀) (véase aumento 4 en Tabla 29). La biodeshalogenación también fue rápida, según indicaba la pérdida rápida de DCP y CPD.

Tabla 29. Alcalasa-biodeshalogenación de una resina resistente en húmedo, de elevado contenido de sólidos.

Aumento 1: 200 g de E7219 al 8% (pasteurizada), sin Alcalasa, 400 microlitros de HK7, 1,75 g de solución de nutrientes.								
Muestra	Hora	Tiempo (h)	pH (30C)	Viscosidad de Gardner	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	6:56	0	7,15	----	----	2,54	----	----
X32966-3-1	7:58	1	7,14	----	0,171	----	213	143
X32966-3-2	10:57	4	7,13	----	0,162	----	144	181
X32966-3-3	13:58	7	7,08-7,25	----	0,162	0,11	62	235
X32966-3-4	17:00	10	7,21	----	0,184	----	ND	274
X32966-3-5	20:10	13	7,17	----	0,204	----	ND	228
X32966-3-6	5:55	23	7,03	----	0,509	----	ND	2,6
Aumento 2: 350 g de E7219 al 13,5% (pasteurizada), 5,03 g de Alcalasa, 87,5 g de -3, 3,06 g de solución de nutrientes.								
Muestra	Hora	Tiempo (h)	pH (30C)	Viscosidad de Gardner	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	6:40	0	7,23	----	----	7,31	----	----
X32966-5-1	7:40	1	7,20	----	0,113	----	80	391
X32966-5-2	10:41	4	7,04-7,21	----	0,149	0,33	ND	415
X32966-5-3	13:30	7	7,19	----	0,248	----	ND	313
X32966-5-4	16:50	10	7,11-7,27	----	0,383	0,31	ND	98
X32966-5-5	20:40	14	7,28	----	0,475	----	ND	38
X32966-5-6	5:59	23	7,17	----	0,573	----	ND	0,43
La resina final tenía una viscosidad de Brookfield de 38 cps								
Aumento 3: 200 g de resina protegida terminalmente al 13,5%, 2,50 g de Alcalasa, 22,22 g de -5, 1,75 g de solución de nutrientes.								
Muestra	Hora	Tiempo	pH (30C)	Viscosidad de Gardner	DO ₆₀₀	NaOH al 30% (g)	DCP	CPD

ES 2 391 552 T3

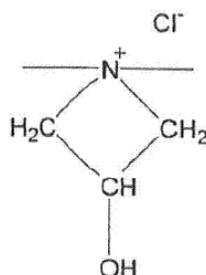
		(h)			(abs.)		(ppm)	(ppm)
----	7:00	0	7,22	----	----	5,71	----	----
X32966-11-1	8:01	1	7,18	----	0,059	----	270	343
X32966-11-2	11:02	4	7,05-7,23	----	0,092	0,28	ND	621
X32966-11-3	14:01	7	7,17	----	0,165	----	ND	660
X32966-11-4	17:00	10	7,15-7,31	----	0,277	0,15	ND	627
X32966-11-5	5:50	23	7,11	----	0,772	----	ND	0,4

Aumento 4: 160 g de resina protegida terminalmente al 20%, 3,00 g de Alcalasa, 40,0 g de -11, 1,40 g de solución de nutrientes.

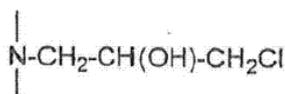
Muestra	Hora	Tiempo (h)	pH (30C)	Viscosidad de Gardner	DO ₆₀₀ (abs.)	NaOH al 30% (g)	DCP (ppm)	CPD (ppm)
----	6:56	0	7,25	----	----	6,09	----	----
X32966-15-1	8:00	1	7,21	A-B	0,148	----	406	393
X32966-15-2	12:15	5,3	7,06-7,23	A-A-1	0,346	0,27	283	586
X32966-15-3	17:45	10,6	7,03-7,16	A-A-1	0,728	0,23	86	14
X32966-15-4	9:30	26,5	7,06	A-A-1	0,962	----	ND	0,68
X32966-15-5	8:30	49,5	6,91	A-A-1	1,004	----	ND	0,22

REIVINDICACIONES

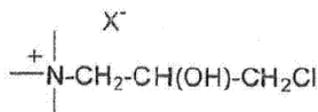
- 1.- Procedimiento para transformar una resina de poliamina-epihalohidrina en estable al almacenamiento, que comprende:
- 5 Tratar una composición que contiene resina de poliamina-epihalohidrina resistente en húmedo o de acresponado, comprendiendo la composición un contenido en sólidos de al menos 15% en peso e incluyendo especies formadoras de CPD (3-cloropropanodiol), con al menos una sustancia enzimática seleccionada de una esterasa, una lipasa, una proteasa o una combinación de las mismas, en condiciones para lograr inhibir y/o reducir y/o eliminar la especie formadora de CPD, para obtener una resina con formación de CPD reducida, estable al almacenamiento en forma gelificada, de forma que la composición que contiene la resina de poliamina-epihalohidrina con formación de CPD
10 reducida, cuando se almacena durante 24 horas a 50°C y a pH 1,0, libera menos de 250 ppm, en seco, de CPD.
- 2.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la composición que contiene la resina con formación de CPD reducida, cuando se almacena durante 24 horas a 50°C y a un pH de 1,0, contiene menos de 50 ppm, en seco, de CPD.
- 3.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que las condiciones de tratamiento comprenden una
15 temperatura de 20°C a 60°C.
- 4.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que las condiciones de tratamiento comprenden una temperatura de 20°C a 40°C.
- 5.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que las condiciones de tratamiento comprenden un tiempo de reacción de 30 minutos a 96 horas.
- 20 6.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que las condiciones de tratamiento comprenden un tiempo de reacción de 2 horas a 12 horas.
- 7.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que las condiciones de tratamiento comprenden un pH de 2,5 a 9.
- 8.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que las condiciones de tratamiento comprenden un pH de 7 a
25 9.
- 9.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que las condiciones de tratamiento comprenden un pH de 6 a 8,5.
- 10.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la proporción de la sustancia o sustancias enzimáticas frente a resina de poliamina-epihalohidrina (en seco) es de 1:1600 a 1:1,5.
- 30 11.- El procedimiento según la reivindicación 10, en el que la proporción de la sustancia o sustancias enzimáticas frente a resina de poliamina-epihalohidrina (en seco) es de 1:160 a 1:4.
- 12.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la proporción de la sustancia o sustancias enzimáticas (enzima activa, en seco) frente a resina de poliamina-epihalohidrina (en seco) es de 0,04:1600 a 0,04:1,5.
- 35 13.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el contenido en sólidos es de 15 a 50% en peso de sólidos activos, las condiciones de tratamiento comprenden una temperatura de 0°C a 35°C, un tiempo de reacción de 4 a 24 horas y un pH de 6,9 a 7,9, y la proporción de la sustancia o sustancias enzimáticas frente a la resina de poliamina-epihalohidrina (en seco) es de 1:20 a 1:8.
- 14.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la sustancia o sustancias enzimáticas son una proteasa en el grupo de subtilisina.
- 40 15.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la sustancia o sustancias enzimáticas tienen actividad esterasa.
- 16.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la sustancia o sustancias enzimáticas son producidas por un microorganismo seleccionado del grupo que consiste en *Bacillus licheniformis* (Nº de acceso de Swiss-Prot: P00780) o *Bacillus amyloliquefaciens* (P00782) y *Bacillus lentus* (P29600).
- 45 17.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que al menos una sustancia enzimática es Alcalasa.
- 18.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la resina se caracteriza por la presencia de la funcionalidad representada por la fórmula:



19.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la resina se caracteriza por la presencia de la funcionalidad representada por la fórmula:



5 20.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la resina se caracteriza por la presencia de la funcionalidad representada por la fórmula:



en la que X⁻ es un anión.

10 21.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que simultánea, previa o posteriormente al tratamiento de una composición que contiene resina de poliamina-epihalohidrina para obtener una resina con formación de CPD reducida, la resina se pone en contacto con al menos un microorganismo, o al menos una enzima aislada de al menos un microorganismo, en una cantidad y a un pH y temperatura efectivos para deshalogenar cantidades residuales de halógeno unido orgánicamente.

15 22.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que, simultáneamente al tratamiento de una composición que contiene resina de poliamina-epihalohidrina para obtener una resina con formación de CPD reducida, la resina se pone en contacto con al menos un microorganismo, o al menos una enzima aislada de al menos un microorganismo, en una cantidad y a un pH y temperatura efectivos para deshalogenar cantidades residuales de halógeno unido orgánicamente.

20 23.- El procedimiento según las reivindicaciones 21 ó 22, en el que la enzima o enzimas aisladas del microorganismo o microorganismos, es una deshalogenasa de tipo liasa de haluro de hidrógeno.

24.- El procedimiento según las reivindicaciones 21 ó 22, en el que el microorganismo o microorganismos comprende al menos uno de *Arthrobacter histidinovorans* (HK1) y *Agrobacterium radiobacter* (HK7).

25 25.- El procedimiento según las reivindicaciones 21 ó 22, en el que el microorganismo o microorganismos comprende una mezcla que comprende al menos uno de *Arthrobacter histidinovorans* (HK1) y *Agrobacterium radiobacter* (HK7).

26.- El procedimiento según las reivindicaciones 21 ó 22, en el que las condiciones de tratamiento comprenden un tiempo de reacción de 48 horas o menos.

27.- El procedimiento según las reivindicaciones 21 ó 22, en el que las condiciones de tratamiento comprenden una temperatura de 20°C a 35°C.

30 28.- El procedimiento según las reivindicaciones 21 ó 22, en el que las condiciones de tratamiento comprenden un pH de 6,5 a 8,0.

29.- El procedimiento según las reivindicaciones 21 ó 22, en el que la proporción de la sustancia o sustancias enzimáticas frente a la resina de poliamina-epihalohidrina (en seco) es de 1:1600 a 1:1,5.

35 30.- El procedimiento según las reivindicaciones 21 ó 22, en el que las condiciones de tratamiento comprenden un tiempo de reacción de 48 horas o menos, una temperatura de 20°C a 35°C y un pH de 6,5 a 8,0, y la proporción de la sustancia o sustancias enzimáticas frente a la resina de poliamina-epihalohidrina (en seco) es de 1:1600 a 1:1,5, y el microorganismo o microorganismos comprende una mezcla que comprende al menos uno de *Agrobacterium radiobacter* (HK7) y *Arthrobacter histidinovorans* (HK1).

- 31.- El procedimiento según la reivindicación 1, en el que, simultánea, previa o posteriormente al tratamiento de una composición que contiene resina de poliamina-epihalohidrina para obtener una resina con formación de CPD reducida, la resina se trata para reducir al menos uno de los siguientes: epihalohidrinas, subproductos de hidrólisis de epihalohidrina y halógeno orgánico unido a la cadena polimérica principal.
- 5 32.- Un procedimiento para preparar un producto de papel, que comprende: tratar una composición que contiene una resina de poliamina-epihalohidrina resistente en húmedo o de acresponado, comprendiendo dicha composición un contenido en sólidos de al menos 15% en peso e incluyendo especies formadoras de CPD, con una sustancia o sustancias enzimáticas seleccionadas de una esterasa, una lipasa, una proteasa o una combinación de las mismas, bajo condiciones para inhibir y/o reducir y/o eliminar las especies formadoras de CPD, para obtener una resina con formación reducida de CPD, estable al almacenamiento en forma gelificada, y formar un producto de papel con la resina de poliamina-epihalohidrina con formación reducida de CPD, de forma que el producto de papel, cuando se corrige para añadir una concentración de adición de 1% en peso de la resina con formación reducida de CPD, contiene menos de 250 ppb de CPD.
- 10
- 33.- El procedimiento según la reivindicación 32, en el que el producto de papel, cuando se corrige para añadir una concentración de adición de 1% en peso de la resina con formación reducida de CPD, contiene menos de 50 ppb de CPD.
- 15
- 34.- El procedimiento según la reivindicación 32, en el que el contenido de sólidos es de 15 a 50% en peso de sólidos activos, la temperatura de la reacción es de 0°C a 35°C, el tiempo de reacción es de 4 a 24 horas, y el pH de la reacción es de 6,9 a 7,9, y la proporción de la sustancia o sustancias enzimáticas frente a la resina de poliamina-epihalohidrina (en seco), es de 1:20 a 1:8.
- 20