



## DESCRIPCIÓN

Composición para el control y la eliminación de biofilms.

**Campo de la técnica**

- 5 La presente invención se enmarca en el campo de la higiene de superficies y se refiere a una composición para el control y la eliminación de biofilms presentes en las mismas, que se basa en la combinación de un detergente y una composición enzimática.

**Estado de la técnica anterior**

- 10 Un biofilm es un agregado de microorganismos constituido por una población de células creciendo adheridas entre ellas, ancladas a una superficie, e incrustadas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (o EPS, del inglés *extracellular polymeric substances*) producidas por el propio biofilm. Las EPS pueden contener polisacáridos, proteínas, fosfolípidos, ácidos teicoicos y nucleicos, y otras sustancias poliméricas hidratadas hasta con un 97% de agua.

- 15 Las ventajas que aporta un biofilm para la vida de los microorganismos son numerosas, principalmente el disponer de unas condiciones ambientales más estables, una reserva de nutrientes, un punto de anclaje, y mayor resistencia a la desecación. Así mismo, el biofilm también confiere una mayor resistencia a los microorganismos frente a la acción de desinfectantes.

Por lo tanto, en la práctica, un biofilm representa una barrera entre los microorganismos y los desinfectantes, antibióticos o biocidas, de manera que su presencia constituye un importante obstáculo para los procesos de limpieza y desinfección.

- 20 El biofilm puede estar constituido de monocultivos de microorganismos, o de diversas especies, así como de una mezcla de fenotipos de una especie dada. La formación de biofilms no está restringida a un grupo específico de microorganismos y hoy en día se considera que en las condiciones ambientales adecuadas, todos los microorganismos son capaces de formar biofilms sobre cualquier tipo de superficie.

- 25 A pesar de que la mayoría de las especies bacterianas tienen la capacidad de formar biofilms, algunos géneros lo forman más fácil y rápidamente que otros, como es el caso de *Pseudomonas*, *Listeria*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus* y *Bacillus*. Por otro lado, entre las levaduras más habitualmente implicadas en la formación de biofilm está, por ejemplo, el *Saccharomyces cerevisiae*, presente en la industria vinícola.

- 30 Se ha determinado la presencia de biofilms en ámbitos muy diversos, entre los cuales merece la pena destacarse las instalaciones industriales, donde generan múltiples problemas tanto tecnológicos como higiénicos. Así, por un lado, el biofilm provoca fenómenos de corrosión de las instalaciones, pérdidas de energía, disminución de la eficacia de los procesos, por ejemplo de los sistemas de refrigeración, o la inutilización de las conducciones. Así mismo, los biofilms actúan como focos de contaminación, de manera que su presencia es especialmente indeseable en aquellos sectores en los que la higiene constituye un aspecto fundamental, como por ejemplo, en los procesos de fabricación de alimentos y bebidas, medicamentos y cosméticos, así como en el ámbito hospitalario.

- 35 En los biofilms presentes en el ambiente hospitalario, por ejemplo en las superficies de catéteres, implantes o prótesis, suelen predominar las bacterias Gram-positivas, notablemente del género estafilococos, aunque las infecciones debidas a bacterias Gram-negativas y fúngicas suelen ser más serias. Las infecciones fúngicas más comunes suelen ser causadas por especies patogénicas de *Candida*, particularmente *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*, como se describe en los artículos Hawser *et al.*, *Biofilm formation by Candida species on the surface of catheter materials in vitro*, *Infection Immunity*, 1994, 62 (3), 915-921, y Jabra-Rizk *et al.*, *Fungal biofilms and drug resistance*, *Emerging Infect. Dis.*, 2004, 10 (1), 14-19.

- 40 Las especies más relevantes involucradas en la formación de biofilm en el marco de la producción de alimentos y que comprometen particularmente la seguridad alimentaria son *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Cronobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Campylobacter jejuni* y *Bacillus spp.*, principalmente, tal como se describe en los artículos Mattila-Sandholm *et al.*, *Biofilm in the industry: A review*, *Food Rev. Int.*, 1992, 8 (4), 573-603, Lee Wong *et al.*, *Biofilm in Food Processing Environments*, *J. Dairy Sci.*, 1998, 81 (10), 2765-2770, y Jo *et al.*, *Maturation and survival of Cronobacter biofilms on silicone, polycarbonate, and stainless steel after UV light and ethanol immersion treatments*, *J. Food Protection*, 2010, 73 (5), 952-956.

Así pues, es imprescindible disponer de unos sistemas de higiene eficaces que permitan el control y la eliminación de los biofilms, particularmente en las industrias agroalimentaria, farmacéutica y cosmética, y también a nivel hospitalario, y en especial en las superficies de contacto con los productos, que constituyen una las vías de contaminación más frecuentes.

- 5 Sin embargo, los procedimientos para la eliminación de biofilms a nivel industrial, principalmente basados en la combinación de procesos mecánicos y el uso de desinfectantes y/o detergentes, no resultan totalmente eficaces.

Así pues, se considera que tales procesos de limpieza pueden eliminar hasta un 90% o más de los microorganismos asociados a una superficie, pero no permiten eliminarlos completamente, tal como se describe en el artículo Gibson *et al.*, *Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms*, J. Appl. Microbiol., 1999, 87(1), 41-48. Esto se atribuye en buena parte a la presencia de la matriz polimérica, que constituye una barrera que impide la plena actuación de los desinfectantes. Así pues, un procedimiento de limpieza efectivo debería fragmentar o disolver la matriz del biofilm, para permitir el acceso de los desinfectantes a las células viables, tal como se describe en el artículo Chmielewski *et al.*, *Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities*, Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety, 2003, 2, 22-32.

10

15 Por otro lado, a la hora de diseñar un sistema eficaz de desinfección industrial, deben tenerse en cuenta las características de las diversas superficies susceptibles de ser higienizadas, de modo que en grandes superficies abiertas pueden ser adecuados unos procedimientos que impliquen un aclarado extensivo, mientras que en superficies menos accesibles son preferibles los sistemas de limpieza *in situ*, conocidos como CIP (*cleaning-in-place*), en los que las soluciones de limpieza se hacen circular a través de tanques, tuberías y equipos, sin necesidad de desmontarlos previamente.

20

En el estado de la técnica se han descrito numerosas y diversas aproximaciones para el control y la eliminación de biofilms.

Así por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO-A-96/36569 se refiere a composiciones enzimáticas para eliminar o prevenir el biofilm que contienen al menos una enzima mananasa, opcionalmente combinada con otras enzimas elegidas entre carbohidrasas, proteasas, lipasas o glucoproteasas. Adicionalmente, la composición puede contener estabilizante de enzimas, biodispersante, biocidas y/o tensioactivos.

25

Análogamente, la solicitud de patente internacional WO-A-98/26807 se refiere a un método para la eliminación de biofilm de superficies mediante tratamiento enzimático doble, consistente en el tratamiento con una composición limpiadora que contiene una o más hidrolasas para desprender la capa de biofilm de la superficie, y una composición bactericida que contiene una oxidoreductasa para matar las células bacterianas presentes en el biofilm.

30

Así mismo, en la solicitud de patente internacional WO-A-01/53010 se describe un método para prevenir, desprender y facilitar la eliminación del biofilm adherido a superficies, formado en interfases sólido-líquido o sólido-líquido-aire, mediante la aplicación de al menos una enzima elegida entre carbohidrasas y proteasas, o bien mediante la aplicación de ambas, en este caso de manera secuencial, preferiblemente primero la carbohidrasa y después la proteasa.

35

También la solicitud de patente internacional WO-A-01/98214 se refiere a un método para eliminar y prevenir la formación de biofilms sobre superficies, que se basa en degradar las acilhomoserinalactonas producidas por los microorganismos del biofilm, mediante el uso de una composición que contiene al menos una enzima acilasa.

Por otro lado, la solicitud de patente internacional WO-A-2004/041988 se refiere a un método para la eliminación de biofilm mediante la aplicación simultánea o consecutiva de una solución que contiene pancreatina como mezcla enzimática y una solución detergente de pH alcalino.

40

Adicionalmente, en la solicitud de patente europea EP-A-2243821 se describe una composición para la eliminación de biofilm que también consiste en la combinación de un detergente y una mezcla enzimática. El detergente es una combinación de un agente humectante, un dispersante y un secuestrante; mientras que la mezcla enzimática contiene una proteasa, una lacasa, y una polisacaridasa.

45

A pesar de las diversas propuestas existentes en el estado de la técnica, subsiste la necesidad de disponer de nuevos productos y procedimientos eficaces para la eliminación de biofilms, en particular en ámbitos especialmente exigentes en cuanto a la higiene, como es la industria agroalimentaria, farmacéutica y cosmética, o a nivel hospitalario, que sean capaces de eliminar los biofilms formados y también de prevenir la formación de nuevos, y

que sean aplicables para la limpieza de la mayoría superficies, tanto abiertas como cerradas (por ejemplo, tuberías y circuitos).

### Objeto de la invención

El objeto de la presente invención es una composición para el control y la eliminación de biofilms.

5 Forma parte también del objeto de la invención un kit que comprende dicha composición.

También forma parte del objeto de la invención un procedimiento para el control y la eliminación de biofilms en el que se emplea dicha composición.

Forma parte también del objeto de la invención el uso de dicha composición para el control y la eliminación de biofilms.

### 10 Descripción de las figuras

#### Figura 1:

En la figura 1 se muestra una fotografía de un biofilm formado por *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa* sobre una superficie de acero inoxidable. La fotografía de la izquierda corresponde a un aumento 10x y la de la derecha de 40x.

#### 15 Figura 2:

En la figura 2 se muestra una fotografía de una superficie de acero inoxidable sobre la que previamente se había desarrollado un biofilm formado por *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa*, tras la aplicación de la Composición 1 del Ejemplo 1. La fotografía de la izquierda corresponde a un aumento 10x y la de la derecha de 40x.

#### Figura 3:

20 En la figura 3 se muestra una fotografía de una superficie de acero inoxidable sobre la que previamente se había desarrollado un biofilm formado por *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa*, tras la aplicación de la Composición 2 del Ejemplo 1. La fotografía de la izquierda corresponde a un aumento 10x y la de la derecha de 40x.

#### Figura 4:

25 En la figura 4 se muestra una fotografía de una superficie de acero inoxidable sobre la que previamente se había desarrollado un biofilm formado por *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa*, tras la aplicación de la Composición 1 del Ejemplo 1, y posterior tratamiento con una solución de ácido peracético al 5%, diluida al 1,5%, como desinfectante. La fotografía de la izquierda corresponde a un aumento 10x y la de la derecha de 40x.

#### Figura 5:

30 En la figura 5 se muestra una fotografía de una superficie de acero inoxidable sobre la que previamente se había desarrollado un biofilm formado por *Salmonella typhimurium*, tras la aplicación de una composición desinfectante que consiste en una solución de ácido peracético al 5%, diluida al 1,5%. La fotografía de la izquierda corresponde a un aumento 10x y la de la derecha de 40x.

#### Figura 6:

35 En la figura 6 se muestra una fotografía de una superficie de acero inoxidable sobre la que previamente se había desarrollado un biofilm formado por *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa*, tras la aplicación de una composición desinfectante que consiste en una solución de ácido peracético al 5%, diluida al 1,5%. La fotografía de la izquierda corresponde a un aumento 10x y la de la derecha de 40x.

Figura 7:

5 En la figura 7 se muestran dos gráficos, A y B, en forma de diagrama de barras, donde en ordenadas se representa el recuento de bacterias en unidades logarítmicas del número de Unidades Formadoras de Colonias (Log UFC), por cada pieza de 4 cm<sup>2</sup> de una superficie de acero inoxidable (A) o de polipropileno (B) sobre la que previamente se había desarrollado un biofilm de *Staphylococcus aureus*, tras aplicar un producto antibiofilm durante 30 minutos a 50° C. En abscisas se representan los diferentes productos ensayados: la composición de la invención (Composición 1 del Ejemplo 1, representada en color negro), un producto comercial de referencia (representado en color gris), y un control negativo de agua (representado en color blanco).

Figura 8:

10 En la figura 8 se representa un gráfico análogo al representado en la figura 7, pero referido a un ensayo en el que el biofilm se había desarrollado a partir de bacterias de *Escherichia coli*.

Figura 9:

En la figura 9 se representa un gráfico análogo al representado en la figura 7, pero referido a un ensayo en el que el biofilm se había desarrollado a partir de bacterias de *Listeria innocua*.

15 Figura 10:

En la figura 10 se representa un gráfico análogo al representado en la figura 7, pero referido a un ensayo en el que el biofilm se había desarrollado a partir de bacterias de *Salmonella typhimurium*.

Figura 11:

20 En la figura 11 se representa un gráfico análogo al representado en la figura 7, pero referido a un ensayo en el que el biofilm se había desarrollado a partir de una mezcla de bacterias de *Salmonella typhimurium* + *Pseudomonas aeruginosa*.

Figura 12:

En la figura 12 se representa un gráfico análogo al representado en la figura 7, pero referido a un ensayo en el que el biofilm se había desarrollado a partir de bacterias de *Cronobactersakazakii*.

25 Figura 13:

En la figura 13 se representa un gráfico análogo al representado en la figura 7, pero referido a un ensayo en el que el biofilm se había desarrollado a partir de una mezcla de bacterias de *Cronobactersakazakii* + *Lactobacillus* spp

Figura 14:

30 En la figura 14 se muestran dos gráficos, A y B, en forma de diagrama de barras, donde en ordenadas se representa el recuento de bacterias, en unidades logarítmicas del número de Unidades Formadoras de Colonias (Log UFC), por cada pieza de 4 cm<sup>2</sup> de una superficie de acero inoxidable (A) o de polipropileno (B) sobre la que previamente se había desarrollado un biofilm de *Staphylococcus aureus*, tras aplicar un producto antibiofilm durante 30 minutos a 50° C. En abscisas se representan los diferentes productos ensayados: la composición de la invención (Composición 2 del Ejemplo 1, representada en color negro), un producto comercial de referencia (representado en color gris), y un control negativo de agua (representado en color blanco).

35

Figura 15:

En la figura 15 se representa un gráfico análogo al representado en la figura 14, pero referido a un ensayo en el que el biofilm se había desarrollado a partir de bacterias de *Escherichia coli*.

Figura 16:

En la figura 16 se representa un gráfico análogo al representado en la figura 14, pero referido a un ensayo en el que el biofilm se había desarrollado a partir de bacterias de *Listeria innocua*.

**Descripción detallada de la invención**

- 5 El objeto de la presente invención es una composición para el control y la eliminación de biofilm desarrollado en una superficie que comprende:
- a) un detergente, en el que el componente tensioactivo consiste en:
    - i. un éter de ácido carboxílico,
    - ii. una mezcla de olefina sulfonada y óxido de amina, o
    - 10 iii. un aducto de un poliol con óxido de etileno y óxido de propileno, y
  - b) una combinación de enzimas que consiste en una lipasa, una proteasa y una  $\alpha$ -amilasa.

Los autores de la presente invención han desarrollado una composición basada en la combinación de tres enzimas (lipasa, proteasa y  $\alpha$ -amilasa) y un tensioactivo específico que, sorprendentemente, resulta altamente eficaz en el control y la eliminación de biofilms, tanto los formados en superficies abiertas como en cerradas.

- 15 En el contexto de la invención se entiende por la expresión "control de biofilm" la prevención de la formación de biofilm en una superficie, y por la expresión "eliminación de biofilm" la supresión substancial de biofilm en una superficie.

Detergente

- 20 La composición para el control y la eliminación del biofilm comprende un detergente, en el que el componente tensioactivo consiste en: un éter de ácido carboxílico, una mezcla de olefina sulfonada y óxido de amina, o un aducto de un poliol con óxido de etileno y óxido de propileno.

Según la definición de la Norma Internacional ISO 862-1984: un detergente es un producto formulado para la limpieza mediante un proceso que desarrolle fenómenos de detergencia.

- 25 La detergencia se define como el proceso por el cual las suciedades son separadas del sustrato sobre el que estaban retenidas y puestas en estado de disolución o dispersión.

Un detergente está formado habitualmente por uno o varios tensioactivos, que constituyen la materia activa, y por un conjunto de componentes complementarios, entre los que pueden citarse los coadyuvantes, aditivos y auxiliares de presentación.

- 30 Un coadyuvante es un compuesto que, en lo referente a la acción detergiva, añade sus propiedades particulares a las de los otros componentes de la composición. Entre los coadyuvantes más frecuentes se consideran los agentes secuestrantes como, por ejemplo, citratos, polifosfatos, fosfonatos, o aminocarboxilatos; y los agentes reguladores del pH.

Un aditivo es un componente complementario de un detergente que aporta propiedades ajenas a la acción detergiva y que se incorpora en una cantidad pequeña. Pueden ser, por ejemplo, colorantes, perfumes, o bactericidas.

- 35 Un auxiliar de presentación es un producto que sirve para proporcionar al producto acabado un determinado aspecto y conseguir que la concentración de uso sea la adecuada. Entre los más frecuentes en composiciones líquidas se encuentra el agua.

- 40 En el contexto de la invención, las expresiones en singular, tales como "un éter de ácido carboxílico", se extienden también a la combinación de dos o más tensioactivos de la misma categoría, es decir en este caso a la combinación de dos o más éteres de ácido carboxílico, y del mismo modo las expresiones "olefina sulfonada" "óxido de amina" o

"aducto de un poliol con óxido de etileno y óxido de propileno", se extienden de forma análoga a la combinación de dos o más tensioactivos de dichas categorías.

5 Cuando la composición se aplica para controlar y eliminar biofilms en superficies abiertas el tensioactivo es un éter de ácido carboxílico con propiedades espumantes, o una mezcla de olefina sulfonada y óxido de amina, que permiten la formación de una espuma densa con burbujas pequeñas y que es estable a lo largo del tiempo. Por otro lado, en el caso de superficies cerradas, el tensioactivo es un éter de ácido carboxílico con propiedades no espumantes o un aducto de un poliol con óxido de etileno y óxido de propileno, que permiten un mejor control de la espuma y un aclarado fácil.

10 La composición de la invención está substancialmente exenta de cualquier otro tensioactivo que no pertenezca a los tipos que se han mencionado.

#### *Tensioactivos*

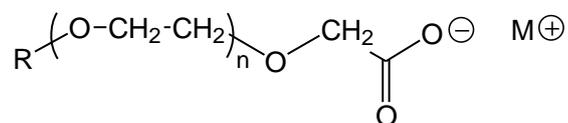
15 En general, como es bien conocido por el experto en la materia, los tensioactivos son sustancias anfifílicas que poseen una parte hidrofóbica y una parte hidrofílica. Esta estructura química particular de los tensioactivos es responsable de sus propiedades, por ejemplo, como humectantes, al reducir la tensión superficial del líquido, con lo que se favorece el mojado de las superficies.

20 Los tensioactivos pueden clasificarse en espumantes y no espumantes, para indicar el mayor o menor grado de formación de espuma de los mismos. La elección de uno u otro tipo de tensioactivos estará en función de su aplicación. Así por ejemplo, dentro del ámbito de la higienización de superficies en el que se enmarca la presente invención, será preferible un tensioactivo espumante, esto es, con propiedades espumantes en el caso de aplicarse a grandes superficies, en sistemas abiertos, donde el proceso de aclarado puede realizarse de forma sencilla, mientras que en la limpieza de superficies de sistemas cerrados, como tuberías y conducciones, será preferible utilizar un tensioactivo no espumante, esto es, con propiedades no espumantes, ya que en este caso dichas superficies no resultan accesibles para realizar un buen aclarado y existiría el riesgo de que quedaran restos de espuma.

25 La determinación del poder espumante de un tensioactivo es una práctica bien conocida por el experto en la materia y los diferentes métodos que se pueden emplear se encuentran descritos, por ejemplo, en el libro de X. Domingo, *A guide to the surfactants world*, Proa, Barcelona, 1995 [ISBN: 84-8256-096-4].

En general, las hojas técnicas de los tensioactivos incluyen información sobre las características espumantes de los mismos, de modo que el experto en la materia puede seleccionar el más apropiado para una aplicación específica.

30 En una realización de la invención, el detergente comprende un éter de ácido carboxílico. Se trata de un tensioactivo aniónico, que responde a la siguiente fórmula:



35 y que es el resultado de funcionalizar un alcohol graso etoxilado con un grupo carboxílico a través de un enlace del tipo éter. Preferiblemente, son sales sódicas (M=Na), aunque también puede tratarse de sales potásicas o de amonio, o de otros iones metálicos o alcanolaminas orgánicas. Dicho tensioactivo se denomina éter carboxilato cuando se encuentra en forma de sal. R es un radical alquilo habitualmente de entre 4 y 20 átomos de carbono, preferiblemente entre 10 y 18, y aún más preferiblemente entre 12 y 14. El número de moles de óxido de etileno (n) es variable, si bien generalmente se encuentra comprendido entre 2 y 10.

40 Los éteres de ácido carboxílico presentan mayoritariamente un comportamiento espumante, si bien algunos de ellos pueden presentar carácter no espumante. Así, los éteres de ácido carboxílico de cadena corta, típicamente donde R tiene menos de 10 átomos de carbono, suelen presentar características no espumantes, siendo más adecuados para composiciones para la limpieza de superficies cerradas, mientras que los de cadena larga, cuya cadena alquílica es típicamente de 10 átomos de carbono o más, suelen presentar características espumantes, siendo más adecuados para composiciones para la limpieza de superficies abiertas. Para cada éter de ácido carboxílico en particular, el experto en la materia sabrá apreciar si tiene características espumantes o no espumantes, y lo incluirá, en consecuencia, en composiciones para el uso más apropiado en cada caso.

45

Este tipo de tensioactivos están disponibles comercialmente, por ejemplo, bajo la denominación Akypo<sup>®</sup> (Kao), o Marlowet<sup>®</sup> (Sasol).

En otra realización de la invención, el componente detergente comprende una mezcla de una olefina sulfonada y un óxido de amina, que tiene un comportamiento espumante.

- 5 Las olefinas sulfonadas son tensioactivos aniónicos que tienen una cadena de entre 12 y 16 átomos de carbono y el grupo sulfonato. Generalmente dicho grupo sulfonato se encuentra en forma de sal alcalina, por ejemplo, sódica o potásica. Comercialmente se pueden encontrar, por ejemplo, bajo la denominación Hostapur<sup>®</sup> (Clariant).

- 10 Los óxidos de amina son tensioactivos que se obtienen por oxidación de aminas terciarias, generalmente alquildimetilaminas, con peróxido de hidrógeno. La cadena alquílica comprende generalmente entre 10 y 18 átomos de carbono, preferiblemente entre 12 y 14. Comercialmente se pueden encontrar, por ejemplo, bajo la denominación Genaminox<sup>®</sup> (Clariant), Chemoxide<sup>®</sup> (Lubrizol), o Standamox (BASF).

- 15 En otra realización de la invención el componente detergente comprende un tensioactivo no iónico de la familia de los aductos de poliol con óxido de etileno y óxido de propileno. El poliol puede ser, por ejemplo, glicerina, poliglicerina, trimetilolpropano, etilenglicol, pentaeritritol, eritritol, o polietilenglicol, entre otros. En una realización preferida, el poliol es glicerina.

Estos aductos permiten preparar composiciones no espumantes, que resultan apropiadas para la aplicación en superficies cerradas como tuberías o circuitos.

- 20 Dichos aductos de poliol se encuentran disponibles de forma comercial. Así, por ejemplo, los aductos de glicerina pueden obtenerse, por ejemplo, bajo la denominación comercial Danox<sup>®</sup> (Kao), Voranol<sup>®</sup> (Dow), Voralux<sup>®</sup> (Dow) o Specflex<sup>®</sup> (Dow).

El contenido de tensioactivo en el detergente está comprendido preferiblemente entre el 20% y el 100%, y más preferiblemente entre el 25% y el 65%, en donde el porcentaje está expresado en peso con respecto al peso de materia activa detergente.

- 25 En el contexto de la invención, la materia activa detergente se refiere al residuo que queda tras eliminar el agua y, eventualmente, los cosolventes presentes en el detergente.

#### *Otros ingredientes del detergente*

Adicionalmente, el detergente puede contener otros agentes auxiliares como, por ejemplo, agentes secuestrantes, agentes reguladores del pH, hidrótrofos, o mezclas de los mismos.

En una realización preferida, el componente detergente comprende además un agente secuestrante.

- 30 Como es bien conocido por el experto en la materia, los agentes secuestrantes, también denominados quelantes, son sustancias capaces de formar complejos solubles con iones metálicos. En concreto, en el marco de la detergencia, su presencia permite mejorar la acción de los tensioactivos, al eliminar los iones metálicos del medio, principalmente calcio y magnesio, disminuyendo la dureza del agua y reduciendo la formación de sales insolubles.

- 35 Algunos de los agentes secuestrantes adecuados para ser utilizados en el marco de la presente invención son, por ejemplo, polifosfatos, especialmente tripolifosfatos y pirofosfatos alcalinos; fosfonatos como, por ejemplo, HEDP (ácido 1-hidroxietano 1,1-difosfónico), DTPMP (ácido dietilenti-amino pentametilenfosfónico), EDTMP (ácido etilendiamino tetrametilenfosfónico), ATMP (ácido amino trimetilenfosfónico), o HDTMP (ácido hexametilendiamino tetrametilenfosfónico), o sus sales alcalinas; hidroxipolicarboxilatos, como ácido cítrico, tartárico o glucónico; aminopolicarboxilatos, como EDTA (ácido etilendiamino tetraacético), DTPA (ácido dietilenti-amino pentaacético), NTA (ácido nitrilo triacético), GLDA (ácido glutámico, N,N-diacético), MGDA (metilglicina diacético), o sus sales sódicas; o mezclas de los mismos.

- 40 Preferiblemente, el agente secuestrante se elige de entre el grupo formado por ácido cítrico, ácido tartárico, ácido glucónico, EDTA, DTPA, NTA, GLDA y MGDA, sus sales sódicas, y mezclas de los mismos.

Cuando el agente secuestrante se encuentra presente en el detergente de la presente invención, está en una cantidad comprendida preferiblemente entre el 0,5% y el 15%, y más preferiblemente entre el 2% y el 5%, en donde el porcentaje está expresado en peso con respecto al peso de materia activa detergente.

5 Opcionalmente, el detergente contiene un agente regulador del pH, por ejemplo, de carácter básico, como hidróxidos alcalinos; amoníaco; mono-, di- o tri-alkilaminas; mono-, di-, o tri-alkanolaminas; o de carácter ácido, tales como ácidos minerales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, o ácidos carboxílicos como, por ejemplo, ácido acético, ácido láctico, ácido tartárico, o ácido cítrico; o sus mezclas. Preferiblemente, el agente regulador del pH comprende una mezcla de una alcanolamina y un ácido carboxílico, más preferiblemente una mezcla de monoetanolamina y ácido cítrico.

10 Cuando el detergente comprende un agente regulador del pH, éste se encuentra en una cantidad comprendida preferiblemente entre el 5% y el 55%, y más preferiblemente entre el 15% y el 45%, en donde el porcentaje está expresado en peso con respecto al peso de materia activa detergente.

Adicionalmente, el detergente puede contener un agente hidrótopo.

15 Los hidrótopos, como es bien conocido por el experto en la materia, son productos que aumentan la solubilidad y miscibilidad de sales orgánicas en agua, y dan mayor homogeneidad a los productos en solución. Algunos hidrótopos adecuados para ser usados en el detergente de la presente invención son, por ejemplo, toluenosulfonatos, xilenosulfonatos, cumenosulfonatos, y metilnaftalensulfonatos, en forma de sus sales de monoetanolamonio, dietanolamonio, y trietanolamonio, o bien como sales alcalinas, preferiblemente, sódicas o potásicas; o bien es un alquilsulfato de cadena corta como, por ejemplo, n-octil sulfato, o sus sales alcalinas, preferiblemente sódicas o potásicas.

20 Cuando el detergente comprende un agente hidrótopo, éste se encuentra en una cantidad comprendida entre el 10% y el 25%, y más preferiblemente entre el 15% y el 22%, en donde el porcentaje está expresado en peso con respecto al peso de materia activa detergente.

En una realización preferida de la invención, el detergente comprende:

- 25
- entre el 40% y el 65% de tensioactivo,
  - entre el 0,5% y el 15% de agente secuestrante, y
  - entre el 5% y el 55% de agente regulador del pH,

en donde los porcentajes están expresados en peso con respecto al peso de materia activa.

En otra realización preferida de la invención, el detergente comprende:

- 30
- entre el 30% y el 55% de tensioactivo,
  - entre el 0,5% y el 15% de agente secuestrante,
  - entre el 5% y el 55% de agente regulador del pH, y
  - entre el 15% y el 25% de hidrótopo,

en donde los porcentajes están expresados en peso con respecto al peso de materia activa.

### 35 Combinación de enzimas

La composición de la presente invención incluye una combinación de enzimas que consiste en una lipasa, una proteasa y una  $\alpha$ -amilasa.

40 En el contexto de la invención, la expresión “una lipasa” se extiende también a la combinación de dos o más lipasas, y del mismo modo las expresiones “una proteasa” y “una  $\alpha$ -amilasa” se extienden a la combinación de dos o más proteasas o amilasas, respectivamente.

*Lipasa*

Las lipasas, o triacilglicerol acilhidrolasas (EC 3.1.1.3) son enzimas que forman parte de la familia de las hidrolasas y que actúan sobre los enlaces de tipo éster de los triglicéridos, hidrolizándolos a diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos y glicerina.

- 5 Las lipasas se pueden obtener a partir de animales, plantas y microorganismos, principalmente bacterias, hongos y levaduras. En el contexto de la presente invención, se puede emplear una lipasa de cualquier origen, un buen número de las cuales se encuentran disponibles comercialmente.

10 Entre las lipasas de origen animal está, por ejemplo, la lipasa pancreática que puede obtenerse a partir del páncreas de cerdo, y está disponible a través de diversos suministradores, por ejemplo, a través de la empresa Biocatalysts Ltd bajo la denominación Lipomod<sup>®</sup> 224P-L224P.

15 Lipasas de origen bacteriano se encuentran disponibles, por ejemplo, a partir de bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Chromobacterium* o *Thermus*, que se comercializan, por ejemplo, bajo los nombres comerciales Lumafast<sup>®</sup>, Lipomax<sup>®</sup>, Lipase ALC, Lipase ALG, Lipase PLC, Lipase PLG, Lipase QLG, Lipase SL, Lipase CV, Lipase PS "Amano", Lipase AK "Amano" o Lipase TL; de origen fúngico como, por ejemplo, a partir de hongos del género *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Thermomyces*, que se comercializan, por ejemplo, bajo los nombres comerciales Lipase A "Amano" 6, Lypolyve AN, Lipase G "Amano" 50, Lipomod<sup>®</sup> 338P-L338P, Lipase M "Amano" 10, Piccnate<sup>®</sup>, Palatase<sup>®</sup>, Lipase F-AP15, Lipase L036P-L036P, Lipase F-DS, Lipomod<sup>®</sup> 627P-L627P, Lipopan<sup>®</sup> F, NovoLime, Greasex, NovoCor AD, Newlase F, Lipozyme<sup>®</sup> TL IM, Lipase UL, Lipolase<sup>®</sup>, Lipolase<sup>®</sup> Ultra, Lipo Prime<sup>®</sup>, Lipex<sup>®</sup>, Lipomod<sup>®</sup> 621P-L621 o Lipomod<sup>®</sup> 187P-L187P; o de levaduras como, por ejemplo, a partir de levaduras del género *Candida*, que se comercializan, por ejemplo, bajo las denominaciones comerciales Novozym<sup>®</sup> 435, Noopazyme<sup>®</sup>, Lipomod<sup>®</sup> 34P-L034P, Lypolyve CC, Lipase MY, Lipase AY "Amano" 30, Resinase<sup>®</sup>, Lipase AYS "Amano" o Lipase II. Preferiblemente se emplea una lipasa de origen fúngico.

*Proteasa*

- 25 Las proteasas, o peptidasas, constituyen un grupo de enzimas capaces de hidrolizar el enlace peptídico de las proteínas. Pertenecen a la subclase EC 3.4.

La proteasas se clasifican en exopeptidasas o endopeptidasas, según su centro de acción, de manera que las exopeptidasas hidrolizan el enlace peptídico del extremo carboxi o amino terminal de la cadena polipeptídica, mientras que las endopeptidasas rompen los enlaces peptídicos internos del polipéptido.

- 30 Las proteasas también se clasifican, en función del grupo funcional presente en su centro activo, en cuatro grupos: serina-proteasas, cisteína-proteasas, aspártico-proteasas, y metalo-proteasas.

Así mismo, en función del pH en el que son activas se clasifican en proteasas ácidas, alcalinas o neutras.

Las proteasas pueden obtenerse a partir de plantas, animales o microorganismos (bacterias, levaduras y hongos).

En el contexto de la presente invención, se puede emplear una proteasa de cualquier origen.

- 35 También se incluyen en el ámbito de la presente invención formas mutantes de las proteasas, bien sea por modificación química o mediante ingeniería genética.

Algunas proteasas obtenidas de plantas son, por ejemplo, papaína, bromelina, y ficina. Entre las proteasas obtenidas de animales se encuentran, por ejemplo, protaminasa, tripsina, quimotripsina, pepsina y renina.

- 40 Las proteasas también pueden obtenerse a partir de bacterias tales como *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus firmus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilis*, *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces rectus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus metagerium* o *Pseudomonas aeruginosa*, entre otras; así como a partir de hongos, tales como *Aspergillus niger*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus*, *Pericularia oryzae*, *Endothia parasitica*, *Mucor miehei*, o *Mucor pusillus*.

En el marco de la invención, puede utilizarse una proteasa elegida entre las disponibles de forma comercial, como por ejemplo, las comercializadas bajo las denominaciones Alcalase<sup>®</sup>, Savinase<sup>®</sup>, Primase<sup>®</sup>, Durazym<sup>®</sup>, Polarzyme<sup>®</sup>, Kannase<sup>®</sup>, Liquanase<sup>®</sup>, Ovozyme<sup>®</sup>, Neutrase<sup>®</sup>, Everlase<sup>®</sup>, Esperase<sup>®</sup>, Maxatase<sup>®</sup>, Maxacal<sup>®</sup>, Maxapem<sup>®</sup>, Polarzyme<sup>®</sup>, Properase<sup>®</sup>, Purafect<sup>®</sup>, Purafect<sup>®</sup> OXP, Properase<sup>®</sup>, Excellase<sup>®</sup> o Opticlean<sup>®</sup>.

- 5 En una realización preferida, la proteasa es una subtilisina. Las subtilisinas (EC 3.4.21.62) pertenecen al grupo de las serina proteasas, y están producidas principalmente por bacterias del género *Bacillus*, como *Bacillus sp.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus clausii*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, o *Bacillus stearothermophilus* entre otros. Entre las subtilisinas pueden mencionarse, por ejemplo, subtilisina A o subtilisina Carlberg, subtilisina BPN<sup>1</sup>, subtilisina DY, subtilisina 309, subtilisina Y, subtilisina 168, o subtilisina PB92.
- 10 Estas proteasas están disponibles en forma comercial como, por ejemplo, las comercializadas bajo las denominaciones Alcalase<sup>®</sup>, Everlase<sup>®</sup>, Savinase<sup>®</sup> o Polarzyme<sup>®</sup> por la empresa Novozymes A/S.

#### $\alpha$ -Amilasa

- 15 Las  $\alpha$ -amilasas (EC 3.2.1.1) son enzimas que hidrolizan los enlaces 1,4- $\alpha$ -D-glicosídicos en polisacáridos que contienen tres o más unidades de glucosa unidos por enlaces 1,4- $\alpha$ . Las  $\alpha$ -amilasas hidrolizan el almidón, así como glicógeno y oligosacáridos. Pueden obtenerse a partir de animales, plantas o microorganismos. Cualquier  $\alpha$ -amilasa de cualquier origen es adecuada para ser usada en el ámbito de la presente invención.

- 20 En una realización preferida, la  $\alpha$ -amilasa es de origen microbiano. Las amilasas pueden obtenerse a partir de bacterias como, por ejemplo, *Acinetobacter spp.*, *Bacillus acidocaldarius* A-2, *Bacillus alcalophilus subsp. Halodurans*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, *Halobacterium halobium*, entre otros; o a partir de hongos como *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor pusillus* o *Trichoderma viride*; o a partir de levaduras, como *Candida tropicalis* var. *japonica*, *Endomycopsis fibuligera*, *Lipomyces starkeyi*, *S. castellii*, *Pichia polymorpha* o *Sachwanniomycetes alluvius*.

- 25 Algunas  $\alpha$ -amilasas disponibles comercialmente son, por ejemplo, Termamyl<sup>®</sup>, Duramyl<sup>®</sup>, Nalase<sup>®</sup>, Fungamyl<sup>®</sup>, Liquozyme<sup>®</sup>, Stainzyme<sup>®</sup>, Bioamylase<sup>®</sup>, Kemzym<sup>®</sup>, o Purastar<sup>®</sup>.

Preferiblemente, la combinación de enzimas tiene la siguiente composición:

- entre el 20% y el 55% de  $\alpha$ -amilasa
- entre el 1% y el 20% de lipasa, y
- entre el 45% y el 80% de proteasa,

- 30 en donde los porcentajes están expresados en peso sobre el peso total de las enzimas.

Las enzimas disponibles de forma comercial, habitualmente se suministran en forma de soluciones acuosas de concentraciones diversas, de manera que se utilizarán en cada caso las cantidades adecuadas de las enzimas comerciales para disponer de los porcentajes adecuados de la combinación de enzimas, así como las concentraciones deseadas en la composición de la invención.

- 35 Así, por ejemplo, se encuentran disponibles soluciones acuosas comerciales de proteasas y amilasas que habitualmente tienen un contenido de enzima comprendido entre el 5% y el 10% expresado en peso, o soluciones acuosas de lipasas con un contenido de aproximadamente del 5% de enzima, expresado en peso. En cada caso, el experto en la materia sabrá calcular la cantidad de producto comercial que debe emplearse para obtener una composición con las proporciones y concentraciones adecuadas según la presente invención.

- 40 Alternativamente, se puede expresar el contenido de materia activa enzimática en función de unidades de actividad, según la información que figura habitualmente en las hojas técnicas correspondientes a los productos enzimáticos.

- 45 Así, por ejemplo, puede medirse la actividad enzimática de las lipasas en unidades denominadas LU (*Lipase Units*), o KLU (1 KLU = 1000 LU) definidos según el ensayo de hidrólisis de la tributirina (tributirato de glicerina), de manera que 1 LU es la cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de ácido butírico por minuto, según unas condiciones estándar especificadas, tal como se describe, por ejemplo, en el artículo Salis *et al.*, *Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis*, J. Mol. Catal. B: Enzym., 2008, 54, 19-26 o en la solicitud de patente internacional WO-A-00/34450.

Para las proteasas, su actividad enzimática puede medirse en unidades denominadas KNPU (*Kilo Novo Protease Units*) definidas en función de la cantidad de proteasa capaz de hidrolizar cierta cantidad de dimetilcaseína a péptidos por minuto, en unas condiciones determinadas, tal como se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO-A-03/018734.

5 Finalmente, para las  $\alpha$ -amilasas su actividad enzimática puede medirse utilizando la unidad KNU (*Kilo Novo alpha-Amylase Units*), definidas como la cantidad de enzima que hidroliza 5,26 g de almidón por hora, según unas condiciones determinadas, según se indica, por ejemplo, en la solicitud de patente norteamericana US-A-2012/0122754.

10 La relación entre proteasa,  $\alpha$ -amilasa y lipasa en la combinación de enzimas, así como su concentración en la composición de la invención pueden variar en función de los diferentes tipos de biofilm, del grado de la problemática, así como de las diferentes superficies a tratar.

15 En una realización de la invención, la composición está particularmente indicada para la eliminación de biofilm en superficies abiertas. Según dicha realización, el tensioactivo es un éter de ácido carboxílico con propiedades espumantes, o una mezcla de olefina sulfonada y óxido de amina, y el contenido de la combinación de enzimas es preferiblemente el siguiente:

- entre el 20% y el 40%, más preferiblemente entre el 25% y el 35% de  $\alpha$ -amilasa,
- entre el 1% y el 20%, mas preferiblemente entre el 2% y el 8% de lipasa, y
- entre el 55% y el 80%, más preferiblemente entre el 60% y el 70% de proteasa,

en donde los porcentajes están expresados en peso respecto al peso total de las enzimas.

20 En otra realización de la invención, la composición está particularmente indicada para el control de biofilm, esto es, para la prevención de la formación de biofilm sobre superficies abiertas mediante una limpieza de mantenimiento de las mismas. Según dicha realización, el tensioactivo es un éter de ácido carboxílico con propiedades espumantes, o una mezcla de olefina sulfonada y óxido de amina, y el contenido de la combinación de enzimas es preferiblemente el siguiente:

25

- entre el 25% y el 45%, más preferiblemente entre el 30% y el 40% de  $\alpha$ -amilasa,
- entre el 1% y el 20%, mas preferiblemente entre el 5% y el 15% de lipasa, y
- entre el 45% y el 70%, más preferiblemente entre el 50% y el 60% de proteasa, y

en donde los porcentajes están expresados en peso respecto al peso total de las enzimas.

30 En otra realización de la invención, la composición está particularmente indicada para el control y la eliminación de biofilm en superficies cerradas, del tipo tuberías o conducciones, según sistemas de limpieza CIP. Según dicha realización, el tensioactivo es un éter de ácido carboxílico no espumante, o bien un aducto de poliol, preferiblemente glicerina, con óxido de etileno y óxido de propileno y el contenido de las enzimas en el componente enzimático es preferiblemente el siguiente:

35

- entre el 25% y el 50%, más preferiblemente entre el 35% y el 45% de  $\alpha$ -amilasa
- entre el 1% y el 20%, más preferiblemente entre el 2% y el 8% de lipasa, y
- entre el 45% y el 70%, más preferiblemente entre el 50% y el 60% de proteasa,

en donde los porcentajes están expresados en peso respecto al peso total de las enzimas.

40 Los autores de la presente invención han observado que el uso del detergente descrito anteriormente juntamente con esta combinación de enzimas, sorprendentemente, resulta altamente eficaz en la eliminación del biofilm sobre diferentes tipos de sustratos, consiguiéndose en particular el propósito de disgregar la matriz polimérica del mismo, lo que proporciona unos niveles de desinfección sensiblemente superiores, como puede constatar en los resultados obtenidos, descritos en los ejemplos.

Composición para la eliminación de biofilm

La composición para la eliminación de biofilm según la presente invención es una solución acuosa que comprende un detergente y una combinación de enzimas, según se han definido anteriormente.

5 Preferiblemente, la composición de la invención tiene una concentración de detergente comprendida entre el 0,005% y el 5%, más preferiblemente comprendida entre 0,01% y 2%, expresada en peso, de materia activa detergente, y una concentración de la combinación de enzimas comprendida entre el 0,0001% y el 1%, más preferiblemente comprendida entre el 0,001% y el 0,1%, expresada en peso, de materia activa enzimática.

10 Las concentraciones del detergente y de la combinación de enzimas se podrán ajustar de forma conveniente en función del tipo de biofilm a tratar, así como del tipo de superficie, por ejemplo, de si se aplica a la limpieza de sistemas abiertos o cerrados.

15 En una realización de la invención, la composición es particularmente adecuada para el control y la eliminación del biofilm de superficies abiertas y contiene preferiblemente entre el 0,1% y el 2%, expresada en peso, de materia activa detergente, y entre el 0,001% y 0,1%, expresada en peso, de materia activa enzimática. Según esta realización, el tensioactivo contenido en el detergente es preferiblemente de tipo espumante, y se elige entre un éter de ácido carboxílico espumante, o una mezcla de olefina sulfonada y un óxido de amina.

20 En una forma particularmente preferida de dicha realización, la composición está destinada a la eliminación de biofilm de sistemas abiertos, y la relación ponderal entre las tres enzimas de la combinación es la que ya se indicó anteriormente como más preferida para esta aplicación, al describir la combinación de enzimas, es decir, contiene entre el 20% y el 40%, más preferiblemente entre el 25% y el 35% de  $\alpha$ -amilasa; entre el 1% y el 20%, mas preferiblemente entre el 2% y el 8% de lipasa; y entre el 55% y el 80%, más preferiblemente entre el 60% y el 70% de proteasa, en donde los porcentajes están expresados en peso respecto al peso total de las enzimas.

25 En otra forma particularmente preferida de dicha realización, la composición está destinada a la prevención de la formación de biofilms en superficies abiertas, y la relación ponderal entre las tres enzimas de la combinación es la que ya se indicó anteriormente como más preferida para esta aplicación, al describir la combinación de enzimas, es decir, contiene entre el 25% y el 45%, más preferiblemente entre el 30% y el 40% de  $\alpha$ -amilasa; entre el 1% y el 20%, mas preferiblemente entre el 5% y el 15% de lipasa; y entre el 45% y el 70%, más preferiblemente entre el 50% y el 60% de proteasa; en donde los porcentajes están expresados en peso respecto al peso total de las enzimas.

30 En otra realización de la invención, la composición es particularmente adecuada para la eliminación del biofilm de superficies cerradas, de difícil acceso, como conducciones y tuberías, para aplicarse según sistemas de limpieza CIP. Según esta realización particular, la composición contiene entre el 0,01% y 0,1%, expresada en peso, de materia activa detergente, y entre el 0,001% y el 0,1% %, expresada en peso, de materia activa enzimática. Según esta realización el tensioactivo contenido en el detergente es preferiblemente de tipo no espumante, y se elige entre un éter de ácido carboxílico no espumante y un aducto de poliol y óxido de etileno y óxido de propileno, preferiblemente donde el poliol es glicerina.

35

40 En forma particularmente preferida de dicha realización, la relación ponderal entre las tres enzimas de la combinación es la que ya se indicó anteriormente como más apropiada para los sistemas cerrados, al describir dicha combinación de enzimas, es decir, contiene entre el 25% y el 50%, más preferiblemente entre el 35% y el 45% de  $\alpha$ -amilasa; entre el 1% y el 20%, más preferiblemente entre el 2% y el 8% de lipasa; y entre el 45% y el 70%, más preferiblemente entre el 50% y el 60% de proteasa , en donde los porcentajes están expresados en peso respecto al peso total de las enzimas.

45 Para preparar la composición de la invención puede partirse, por ejemplo, de una solución concentrada, que contiene simultáneamente el detergente y la combinación de enzimas, que se diluye hasta la concentración adecuada en el momento de su uso. En este contexto, el término solución "concentrada" se refiere a que dicha solución se diluye antes de ser utilizada, y presenta, por tanto, una concentración de materia activa que es superior a la de la composición que se aplica finalmente de forma efectiva sobre el biofilm.

50 Según esta realización, la composición de la invención se presenta en forma de una solución acuosa concentrada que comprende el detergente con una concentración comprendida entre el 10% y el 45%, preferiblemente entre el 20% y el 40%, y más preferiblemente entre el 25% y el 35% expresada en peso, de materia activa detergente; y la combinación de enzimas, con una concentración comprendida entre el 0,1% y el 5%, más preferiblemente entre 0,5% y 1%, expresada en peso, de materia activa enzimática. Preferiblemente el tensioactivo es un éter de ácido

carboxílico con propiedades espumantes, o una mezcla de olefina sulfonada y óxido de amina, y el contenido de la combinación de enzimas es preferiblemente el siguiente:

- entre el 25% y el 45%, más preferiblemente entre el 30% y el 40% de  $\alpha$ -amilasa,
- entre el 1% y el 20%, mas preferiblemente entre el 5% y el 15% de lipasa, y
- 5       – entre el 45% y el 70%, más preferiblemente entre el 50% y el 60% de proteasa, y

en donde los porcentajes están expresados en peso respecto al peso total de las enzimas.

Dicha solución acuosa se diluye adecuadamente con agua antes de su uso, hasta obtener la concentración deseada.

- 10       Opcionalmente dicha solución concentrada puede contener cosolventes. Algunos cosolventes adecuados para ser usados en el marco de la presente invención son, por ejemplo, propilenglicol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, glicerina, y polietilenglicol.

Si la solución concentrada contiene cosolvente, éste se encuentra en un contenido comprendido entre el 1% y el 15%, más preferiblemente entre el 3% y el 10%, expresado en peso sobre el peso total de dicha solución.

- 15       Opcionalmente, dicha solución concentrada comprende además un estabilizante de la materia activa enzimática, que se encuentra preferiblemente en una cantidad comprendida entre el 5% y el 20% en peso sobre el peso de dicha solución.

Algunos estabilizantes adecuados para ser usados en el ámbito de la presente invención son, por ejemplo, glicerina, polietilenglicol o propilenglicol.

- 20       La solución concentrada según dicha realización de la invención contiene, pues, la materia activa del detergente, la materia activa enzimática, el agua y, eventualmente, el cosolvente y/o el estabilizante, y la suma de los porcentajes de estos componentes es igual al 100%.

- 25       Alternativamente, la composición de la invención puede prepararse a partir de una solución concentrada de detergente y de una solución concentrada de la combinación de enzimas, que se disponen por separado y se combinan y se diluyen convenientemente en el momento de su uso, formándose *in situ* la composición de la invención. En este contexto, el término solución "concentrada" se refiere a que la solución se diluye antes de ser utilizada, y presenta, por tanto, una concentración de materia activa detergente o enzimática que es superior a la de la composición que se aplica finalmente de forma efectiva sobre el biofilm.

- 30       Esta última alternativa tiene la ventaja de que permite preparar de forma más versátil la composición de la invención, ya que puede combinarse aquella solución concentrada de detergente y aquella solución concentrada de la combinación de enzimas cuya composición de materia activa sea más adecuada para cada aplicación particular, y así mismo, ambas soluciones pueden combinarse según la proporción que resulte más efectiva para cada caso.

- 35       Así pues, en una realización de la invención, la composición se elabora a partir de los dos componentes por separado. De acuerdo con dicha realización, la composición se caracteriza porque el detergente está en forma de una solución acuosa concentrada que contiene entre el 10% y el 45% de materia activa detergente, preferiblemente entre el 20% y el 40%, y más preferiblemente entre el 25% y el 35%, en donde los porcentajes están expresados en peso.

Dicha solución concentrada de detergente se mezcla con la combinación de enzimas en el momento de su uso, y se diluye hasta la concentración más apropiada.

- 40       Opcionalmente dicha solución acuosa que conforma la solución concentrada de detergente puede contener cosolventes. Algunos cosolventes adecuados para ser usados en el marco de la presente invención son, por ejemplo, propilenglicol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, glicerina, polietilenglicol.

Si la solución concentrada de detergente contiene cosolvente, éste se encuentra en un contenido comprendido entre el 1% y el 15%, más preferiblemente entre el 3% y el 10%, expresado en peso.

La solución concentrada de detergente contiene, pues, la materia activa del detergente, el agua y, eventualmente, el cosolvente, y la suma de los porcentajes de estos componentes es igual al 100%.

5 Así mismo, según dicha realización de la invención en la que la composición se elabora a partir de los componentes por separado, la composición se caracteriza porque la combinación de enzimas se presenta en forma de una solución acuosa concentrada que contiene entre el 1% y el 15% de materia activa enzimática, preferiblemente entre el 2% y el 10%, en donde los porcentajes están expresados en peso.

Dicha solución concentrada de la combinación de enzimas se mezcla con el detergente en el momento de su uso, y se diluye hasta la concentración más apropiada.

10 Generalmente dicha solución acuosa enzimática que conforma la solución concentrada de la combinación de enzimas, comprende además un estabilizante, que se encuentra en una cantidad preferiblemente comprendida entre el 5% y el 20% en peso.

Algunos estabilizantes adecuados para ser usados en el ámbito de la presente invención son, por ejemplo, glicerina, polietilenglicol o propilenglicol.

15 En una realización especialmente preferida, la solución concentrada de la combinación de enzimas se emplea para preparar una composición para el control y la eliminación del biofilm en superficies abiertas, y está en forma de una solución acuosa que contiene entre el 4% y el 8% de materia activa enzimática, expresado en peso sobre el peso total de la solución acuosa. Opcionalmente, contiene además entre el 10% y el 20% de estabilizante, expresado en peso. Aún más preferiblemente, el estabilizante se elige de entre el grupo formado por glicerina y polietilenglicol.

20 En otra realización especialmente preferida, la solución concentrada de la combinación de enzimas se emplea para preparar una composición para el control y la eliminación del biofilm en superficies cerradas, y se presenta en forma de solución acuosa que contiene entre el 2% y el 6% de materia activa enzimática, expresado en peso sobre el peso de la total de la solución acuosa. Opcionalmente, contiene además un agente estabilizante, tal como ya se ha descrito para el caso de las superficies abiertas.

25 Forma también parte de la invención un kit que comprende la solución acuosa concentrada de detergente en un envase separado de la solución acuosa concentrada de la combinación de enzimas, de manera que ambas soluciones se combinan y diluyen en el momento de su uso, para formar *in situ* la composición de la invención.

#### Procedimiento para la eliminación de biofilm

Forma también parte del objeto de la presente invención un procedimiento para el control y la eliminación de biofilm desarrollado sobre una superficie que comprende las siguientes etapas:

30 (i) aplicar la composición de la invención sobre la superficie;

(ii) dejar actuar la composición durante un período comprendido entre 10 min y 180 min, preferiblemente comprendido entre 10 min y 90 min,

(iii) aclarar con agua.

En una realización preferida, el procedimiento comprende además la siguiente etapa:

35 (iv) aplicar un desinfectante.

En la etapa (i), la aplicación de la composición de la invención sobre la superficie se realiza según la manera más apropiada según el tipo de superficie a tratar.

40 Así, si se trata de la limpieza de una superficie abierta, la composición puede aplicarse, por ejemplo, mediante un equipo adecuado para pulverizar la composición a baja presión. Si se trata de la limpieza de superficies cerradas, como los sistemas CIP, la composición de la invención se aplica mediante circulación de la solución en dichos sistemas.

Preferiblemente, la composición de la invención se aplica en dicho procedimiento a una temperatura comprendida entre 45° C y 50° C.

El tiempo de contacto entre la composición y la superficie, según la etapa (ii), puede variar en función de la densidad del biofilm, del tipo de exopolisacáridos presentes en la matriz, que a su vez depende de los microorganismos que conformen el biofilm.

- 5 En general, para la limpieza de superficies abiertas se obtienen buenos resultados con tiempos de contacto más cortos, preferiblemente comprendidos entre 15 y 30 minutos, mientras que para las superficies cerradas (CIP), el tiempo de contacto o de circulación suele ser mayor, preferiblemente comprendido entre 30 y 120 minutos.

Entre los desinfectantes adecuados para ser usados en la etapa (iv) del procedimiento según la presente invención están, por ejemplo, sustancias oxidantes, como peróxido de hidrógeno, ácido peracético, persulfato potásico, o hipoclorito sódico.

- 10 En una realización especialmente preferida del procedimiento de la invención, tras la etapa (ii), y antes de efectuar el aclarado con agua (etapa iii), se aplica sobre la superficie una solución alcalina y se deja actuar durante un período de tiempo comprendido entre 10 min y 90 min.

Los autores de la presente invención han comprobado que la incorporación de esta etapa de alcalinización resulta en un aumento de la efectividad antibiofilm del tratamiento.

- 15 La solución alcalina es una solución acuosa de una base, por ejemplo, hidróxido sódico, hidróxido potásico, o carbonato sódico, que presenta un valor de pH comprendido entre 9 y 10. Dicha solución puede aplicarse sobre la superficie por pulverización.

- 20 El procedimiento de limpieza que forma parte del objeto de la presente invención puede aplicarse a prácticamente a cualquier tipo de superficie sobre la que se haya desarrollado un biofilm, tanto metálicas como, por ejemplo, aluminio, cromo, acero, o acero inoxidable; como superficies de vidrio, cerámica o porcelana; así como superficies de plástico, tales como polímeros termoplásticos o termoestables, por ejemplo, resinas epoxi; entre otros materiales.

Así mismo, dicho procedimiento es aplicable para superficies según cualquier disposición y accesibilidad, siendo adecuado para la limpieza de superficies abiertas como para aplicarse en sistemas de limpieza CIP (*cleaning-in-place*).

- 25 Uso de la composición

También forma parte del objeto de la presente invención el uso de la composición de la invención para el control y la eliminación de biofilm desarrollado sobre una superficie.

- 30 Dicho uso incluye tanto la eliminación activa del biofilm ya depositado sobre la superficie, como la prevención de su formación, de manera que el uso de dicha composición puede emplearse para la limpieza de superficies susceptibles de desarrollar un biofilm sobre las mismas, con una finalidad de mantenimiento, para prevenir su formación.

La composición de la invención es apropiada para el control y la eliminación de cualquier tipo de biofilm, originado a partir de uno o más microorganismos que pueden ser bacterias aeróbicas y anaeróbicas, hongos (incluyendo levaduras y hongos filamentosos), algas y/o protozoos.

- 35 En las figuras 2 y 3 se muestra el resultado del uso de dicha composición para la limpieza de un biofilm sobre una superficie de acero inoxidable. Se observa que el uso de la misma resulta altamente efectivo para reducir notablemente la presencia de biofilm y para la disgregación de su matriz polimérica, lo que permite que en el tratamiento posterior con un desinfectante se consiga la eliminación total de las células bacterianas viables (figura 4). Como se detalla en el Ejemplo 3, se constató además que el uso solamente del desinfectante (figuras 5 y 6) resultó claramente menos efectivo.

- 40 Así mismo, las figuras de 7 a 16 muestran de forma gráfica los resultados de ensayos comparativos de eficacia realizados sobre biofilms de diversa composición bacteriana desarrollados sobre superficies de acero inoxidable (gráfico A de cada par) y polipropileno (gráfico B de cada par), utilizando la composición de la invención y un producto enzimático comercial de referencia para la eliminación de biofilms. Los resultados se explican con detalle en el Ejemplo 4. Puede observarse en dichas figuras como la composición de la invención (barras de color negro) presentó una efectividad comparable a la del producto de referencia (barras de color gris).

En los ejemplos que siguen a continuación se muestran realizaciones particulares de la composición de la invención, así como los resultados del uso de la misma para la eliminación de biofilms.

Ejemplo 1: Composiciones para el control y la eliminación de biofilms

5 Se prepararon composiciones según la presente invención a partir de una solución concentrada de detergente y una solución concentrada de la combinación de enzimas.

Pare ello, se prepararon siete formulaciones (A a G) correspondientes al detergente de la composición utilizando las cantidades detalladas en la Tabla I:

TABLA I

Componente		Fórmulas (% de materia activa)						
Función	Producto	A	B	C	D	E	F	G
Tensioactivo	Éter carboxilato	15,0				13,0		15,0
	Olefina sulfonada				10,0		11,0	
	Oxido de amina				5,0		4,0	
	Aducto de glicerina		12,5	10,0				
Secuestrante	EDTA	1,0	0,86	1,0				
	MGDA				1,0	1,0		
	DTPA						1,0	1,0
Hidrótopo	n-octilsulfato sódico	5,5	6,0	5,0				5,5
	Xilenosulfonato sódico					4,00	5,00	
Regulador pH	Ác. cítrico	5,4	4,7	5,5	4,8	5,40	4,9	5,3
	Monoetanolamina	6,7	4,3	5,00	4,4	6,00	4,5	6,6
Cosolvente	Etanol	5,00	4,30	5,00	4,8	4,50	4,9	4,9
Disolvente	Agua	c.s.p. 100						

10 Las formulaciones detergentes se prepararon por mezcla de los componentes y se ajustaron a un pH comprendido entre 8 y 9.

15 Las formulaciones se ensayaron según la norma ASTM D 1173 para determinar el poder espumante de las mismas. Se observó que las formulaciones A, D a G presentaron una espuma estable, densa y con burbujas pequeñas, mientras que las formulaciones B y C presentaron un nivel de espuma que correspondía al de una composición detergente no espumante. Dichas formulaciones se sometieron a un ensayo de estabilidad a 5° C, 20° C y 40° C durante 8 semanas, y mantuvieron sustancialmente estables el aspecto y el valor de pH.

Por otro lado, se prepararon dos formulaciones correspondientes a una solución concentrada de la combinación enzimática utilizando las proporciones detalladas en la Tabla II:

TABLA II

Componente	Fórmulas			
	(% en peso de producto comercial)		(% en peso de materia activa)	
	I	II	I	II
Lipasa	2,5	4,3	0,13	0,22
Proteasa	30	56,5	2,25	4,24
α-Amilasa	23	26,1	1,73	1,96
Estabilizante	13	13	13	13
Agua	c.s.p. 100			

5 Para la preparación de las composiciones de la Tabla II se empleó una lipasa comercial que contenía el 5% en peso de materia activa, y una proteasa y una α-amilasa comerciales que contenían el 7,5% en peso de materia activa.

Se preparó una composición (Composición 1) para la eliminación de biofilms, preferiblemente para sistemas abiertos, diluyendo en agua la formulación detergente A al 1% en peso juntamente con la formulación enzimática II al 0,2% en peso.

10 Así mismo, se preparó una composición (Composición 2) para la eliminación de biofilms, preferiblemente para sistemas cerrados, diluyendo en agua la formulación detergente B al 0,25% juntamente con la formulación enzimática I al 0,05%.

Ejemplo 2: Composiciones para el control y la eliminación de biofilms

Se prepararon composiciones según la presente invención a partir de una solución concentrada que contenía simultáneamente el detergente y la combinación enzimática, utilizando las proporciones detalladas en la Tabla III:

15

TABLA III

Componente		Fórmulas		
		(% de materia activa)		
Función	Producto	H	I	J
Tensioactivo	Éter carboxilato	15,0	15,00	13,00
Enzimas	Lipasa	0,1	0,05	0,05
	Proteasa	0,4	0,4	0,4

	$\alpha$ -Amilasa	0,3	0,4	0,4
Secuestrante	EDTA	1,0		
	MGDA		0,86	
	DTPA			1,0
Regulador pH	Ác. cítrico	5,0	5,0	5,5
	Monoetanolamina	6,0	4,5	5,00
Cosolvente	Etanol	5,00	4,5	5,00
Estabilizante	Propilenglicol	8	8	
	Polietilenglicol			10
Disolvente	agua	c.s.p.100		

Para la preparación de las composiciones de la Tabla III se empleó una lipasa comercial que contenía el 5% en peso de materia activa, y una proteasa y una  $\alpha$ -amilasa comerciales que contenían el 7,5% en peso de materia activa.

5 Las composiciones H, I y J se prepararon por mezcla de los componentes y se ajustaron a un pH de aproximadamente 8. Dichas formulaciones se sometieron a un ensayo de estabilidad a 5° C, 20° C y 40° C durante 4 semanas, y mantuvieron sustancialmente estables el aspecto y el valor de pH.

10 Las composiciones H, I y J se sometieron así mismo a estudios de estabilidad para comprobar que presentaban actividad enzimática estable después de un período de tiempo prolongado. Para ello, se midió la actividad inicial de las tres enzimas y su actividad pasadas tres semanas a 20° C. Se comprobó que la proteasa prácticamente no experimentaba disminución de actividad, mientras que la amilasa mostraba una cierta pérdida de actividad (alrededor del 40%), y la lipasa una pérdida de actividad entorno al 80%. A pesar de ello, se consideró que dichos valores de estabilidad eran aceptables puesto que resultaban sustancialmente mejores que los de otras combinaciones enzimáticas comerciales de referencia.

15 Se preparó una composición (Composición 3), que era particularmente adecuada para el tratamiento preventivo de superficies, para prevenir la formación de biofilm, preferiblemente en sistemas abiertos, diluyendo en agua la formulación H al 1% en peso.

Ejemplo 3: Ensayos de eficacia de la composición de la invención en la eliminación de biofilms

Para ensayar la eficacia de la composición de la invención, previamente se desarrollaron diferentes biofilms, simples y mixtos, sobre superficies de acero inoxidable y polipropileno, a partir de las siguientes bacterias:

- *Staphylococcus aureus*
- 20 - *Escherichia coli*
- *Listeria innocua*
- *Salmonella typhimurium*
- *Cronobacter sakazakii*
- Mezcla de *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa*

- Mezcla de *Salmonella typhimurium* y *Lactobacillus* spp.
- Mezcla de *Cronobacter sakazakii* y *Pseudomonas aeruginosa*
- Mezcla de *Cronobacter sakazakii* y *Lactobacillus* spp.

5 Para observar la formación del biofilm así como para evaluar la eficacia de las composiciones, se realizaron tinciones con el reactivo con LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen), con posterior lectura con un microscopio de fluorescencia. Los resultados obtenidos según este ensayo se observaron similares para todos los biofilms testados.

10 En la figura 1 se muestra una fotografía del biofilm formado de una mezcla de *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa* durante 48 h a 37° C. La fotografía de la izquierda corresponde a un aumento 10x y la de la derecha de 40x.

Sobre dicho biofilm se pulverizó la Composición 1 preparada en el Ejemplo 1 a 50° C y se dejó actuar durante un tiempo de 30 minutos. A continuación se aclaró con agua.

15 La figura 2 muestra dos fotografías de la superficie después de este tratamiento (fotografía de la izquierda 10x y la de la derecha 40x). Puede observarse la notable disminución de la presencia de biofilm, además de una gran fragmentación del mismo.

Análogamente, sobre el mismo biofilm de *Salmonella typhimurium* con *Pseudomonas aeruginosa* desarrollado en las condiciones arriba indicadas, se pulverizó la Composición 2 preparada en el Ejemplo 1 a 50° C con un tiempo de contacto de 30 minutos. Pasado este tiempo se aclaró con agua.

20 La figura 3 muestra dos fotografías de la superficie después de este tratamiento (fotografía de la izquierda 10x y la de la derecha 40x). Se observa también en este caso una notable disminución y fragmentación en el biofilm.

Por lo tanto, para las dos composiciones ensayadas se observó como el tratamiento disgregó el biofilm, dejando las células dispersas y expuestas para ser eliminadas con mayor facilidad en la fase de desinfección.

25 Sobre el mismo biofilm de *Salmonella typhimurium* con *Pseudomonas aeruginosa* desarrollado en las condiciones arriba indicadas, se pulverizó la Composición 1 preparada en el Ejemplo 1 a 50° C con un tiempo de contacto de 30 minutos. Pasado este tiempo se aclaró con agua. A continuación, se aplicó un tratamiento desinfectante sobre dicha superficie, utilizándose una solución de ácido peracético al 5%, diluida al 2,5%, durante 15 minutos a temperatura ambiente. La figura 4 muestra dos fotografías de la superficie después del tratamiento (fotografía de la izquierda con un aumento de 10x y la de la derecha de 40x). En la fotografía de la derecha se observó que la totalidad de los restos celulares teñidos mostraban color rojo, indicativo de que las todas células restantes estaban lesionadas y/o muertas.

30

35 A efectos comparativos, se ensayó el efecto del tratamiento desinfectante directamente sobre el biofilm, sin el tratamiento previo con la composición de la invención. Para ello se desarrollaron dos biofilms: el primero de *Salmonella typhimurium*, y el segundo compuesto de una mezcla de *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa*, ambos desarrollados en las mismas condiciones arriba especificadas (durante 48 h a 37° C). Sobre ambos biofilms se aplicó un tratamiento desinfectante basado en una solución de ácido peracético al 5%, diluida al 1,5%, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las figuras 5 y 6 muestran el resultado del tratamiento sobre ambos tipos de biofilm (*Salmonella typhimurium* y mezcla de *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente), después de realizar una tinción vital con el reactivo LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit. En ambos casos, la fotografía de la izquierda corresponde a un aumento de 10x aumentos y la de la derecha a 40x.

40 En las figuras 5 y 6 se observa como la eficacia del agente oxidante no fue suficiente para disgregar y eliminar los biofilms, cuando previamente no se aplicó la composición de la invención. En la figura 5, se observó como en la parte central existía todavía una importante proporción de células viables en el interior del biofilm, indicado por la presencia de coloración verde. En la figura 6 se observó disgregación del biofilm, sin embargo, aunque la mayoría de las células se observaban lesionadas, también había presencia de células viables.

45 De los ensayos realizados se desprende que la composición y el procedimiento de la presente invención son sorprendentemente eficaces, consiguiéndose la completa eliminación del biofilm adherido a las superficies, y un resultado claramente superior a la aplicación de un tratamiento desinfectante convencional.

Ejemplo 4: Ensayos comparativos de eficacia de la composición de la invención respecto a un producto de referencia.

5 Se realizaron ensayos para evaluar la eficacia de la composición de la invención en la eliminación de biofilms, comparándola con la de un producto del mercado que está específicamente destinado a la eliminación de biofilms y que se basa en una combinación enzimática.

Para evaluar la eficacia, se desarrollaron biofilms sobre sendas superficies de acero inoxidable y de polipropileno, cada una de ellas de una superficie total de 4 cm<sup>2</sup>, a partir de las siguientes bacterias: a) *Staphylococcus aureus*, b) *Escherichia coli*, c) *Listeria innocua*, d) *Salmonella typhimurium*, e) mezcla de *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa*, f) *Cronobacter sakazakii*, y g) mezcla de *Cronobacter sakazakii* y *Lactobacillus* spp.

10 Los biofilms se desarrollaron mediante incubación de los microorganismos correspondientes a una temperatura comprendida entre 30° C y 37° C durante 48 h.

15 Tras la formación del biofilm, sobre cada superficie se aplicaron por pulverización los productos a ensayar: el compuesto de la invención, el producto de referencia y agua como control negativo, a 50° C, y se dejaron actuar durante 30 minutos. A continuación se aclaró con agua y se efectuó un recuento de bacterias, que se contabilizó en unidades logarítmicas del número de Unidades Formadoras de Colonias (Log UFC), por cada pieza de 4 cm<sup>2</sup> tratada.

20 Para los biofilms de a) a g) se ensayó la Composición 1 preparada en el Ejemplo 1, y los resultados se muestran en las tablas 3 y 4, para las superficies de acero inoxidable y polipropileno, respectivamente. Para los biofilms de a), b) y c) se ensayó también la Composición 2 preparada en el mismo ejemplo, y los resultados se muestran en las tablas 5 y 6, para las superficies de acero inoxidable y polipropileno, respectivamente.

25 Así mismo, dichos resultados se muestran de forma gráfica en las figuras de 7 a 16, en forma de diagrama de barras donde en el eje de ordenadas se representa el recuento de bacterias (Log UFC), mientras que en abscisas se representan los productos ensayados, de manera que la composición de la invención se muestra en color negro, el producto de referencia en color gris, y el control en color blanco. Cada figura muestra una pareja de gráficos que corresponde a un mismo producto ensayado (Composición 1 o Composición 2) para un biofilm de un determinado microorganismo, de manera que el gráfico de la izquierda (A) corresponde al ensayo efectuado sobre una superficie de acero inoxidable, y el de la derecha (B) sobre una superficie de polipropileno.

30 En particular, las figuras de 7 a 13 muestran los resultados de las Tablas 3 y 4, es decir, correspondientes a la Composición 1: *Staphylococcus aureus* (figura 7), *Escherichia coli* (figura 8), *Listeria innocua* (figura 9), *Salmonella typhimurium* (figura 10), *Salmonella typhimurium* + *Pseudomonas aeruginosa* (figura 11), *Cronobacter sakazakii* (figura 12) y *Cronobacter sakazakii* + *Lactobacillus* (figura 13).

Las figuras de 14, 15 y 16 muestran los resultados de las Tablas 5 y 6, es decir, correspondientes a la Composición 2 de la invención, para los biofilms de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Listeria innocua*, respectivamente.

TABLA 3

Tipo de biofilm	Recuento de bacterias (Log UFC/pieza acero inoxidable)		
	Composición 1	Producto Referencia	Control
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,2	2,7	4,6
<i>Escherichia coli</i>	5,1	4,8	6,5
<i>Listeria innocua</i>	4,6	2,0	6,3
<i>Salmonella typhimurium</i>	4,4	6,1	6,7

<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> +	6,8	6,7	6,9
<i>Cronobacter sakazakii</i>	4,7	5,4	5,9
<i>Cronobacter sakazakii</i> <i>Lactobacillus</i> spp. +	3,7	3,0	6,6

TABLA 4

Tipo de biofilm	Recuento de bacterias (Log UFC/pieza polipropileno)		
	Composición 1	Producto Referencia de	Control
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,7	3,9	6,8
<i>Escherichia coli</i>	5,2	5,4	5,9
<i>Listeria innocua</i>	5,8	6,3	6,3
<i>Salmonella typhimurium</i>	3,5	3,4	6,4
<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> +	4,1	4,1	6,5
<i>Cronobacter sakazakii</i>	4,0	3,6	6,3
<i>Cronobacter sakazakii</i> <i>Lactobacillus</i> spp. +	2,6	2,9	4,8

TABLA 5

Tipo de biofilm	Recuento de bacterias (Log UFC/pieza acero inoxidable)		
	Composición 2	Producto Referencia de	Control
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,8	6,8	6,8
<i>Escherichia coli</i>	5,6	5,7	5,9
<i>Listeria innocua</i>	6,3	6,2	6,3

TABLA 6

Tipo de biofilm	Recuento de bacterias (Log UFC/pieza polipropileno)		
	Composición 2	Producto Referencia	de Control
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,1	4,3	4,6
<i>Escherichia coli</i>	6,2	6,1	6,5
<i>Listeria innocua</i>	4,5	4,5	6,3

Como se desprende de los resultados obtenidos, la limpieza con la composición de la invención muestra una eficacia comparable a la del producto de referencia en todos los ensayos efectuados.

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Composición para el control y la eliminación de biofilm desarrollado en una superficie, caracterizada porque comprende:
- 5 a) un detergente, en el que el componente tensioactivo consiste en:
- 5 i. un éter de ácido carboxílico,
- ii. una mezcla de olefina sulfonada y óxido de amina, o
- iii. un aducto de un poliol con óxido de etileno y óxido de propileno, y
- b) una combinación de enzimas que consiste en una lipasa, una proteasa y una  $\alpha$ -amilasa.
- 10 2.- Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque el componente tensioactivo consiste en un éter de ácido carboxílico.
- 3.- Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque el componente tensioactivo consiste en una mezcla de olefina sulfonada y óxido de amina.
- 4.- Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque el componente tensioactivo consiste en un aducto de un poliol con óxido de etileno y óxido de propileno.
- 15 5.- Composición según la reivindicación 4, caracterizada porque el poliol es glicerina.
- 6.- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque el detergente comprende además un agente secuestrante.
- 20 7.- Composición según la reivindicación 6, caracterizada porque el agente secuestrante se elige de entre el grupo formado por ácido cítrico, ácido tartárico, ácido glucónico, EDTA (ácido etilendiamino tetraacético), DTPA (ácido dietilentriamino pentaacético), NTA (ácido nitrilo triacético), GLDA (ácido glutámico, N,N-diacético) y MGDA (metilglicina diacético), sus sales sódicas, y mezclas de los mismos.
- 8.- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada porque el detergente comprende un agente regulador del pH.
- 25 9.- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada porque el detergente comprende un agente hidrótrofo.
- 10.- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada porque el detergente comprende:
- entre el 40% y el 65% tensioactivo,
- entre el 0,5% y el 15% de agente secuestrante, y
- entre el 5% y el 55% agente regulador del pH,
- 30 en donde los porcentajes están expresados en peso con respecto al peso de materia activa.
- 11.- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizada porque el detergente comprende:
- entre el 30% y el 55% de tensioactivo,
- entre el 0,5% y el 15% de agente secuestrante,
- entre el 5% y el 55% de agente regulador del pH, y
- 35 – entre el 15% y el 25% de hidrótrofo,

en donde los porcentajes están expresados en peso con respecto al peso de materia activa.

12.- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizada porque la proteasa es una subtilisina.

5 13.- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizada porque la combinación de enzimas tiene la siguiente composición:

- entre el 20% y el 55% de  $\alpha$ -amilasa,
- entre el 1% y el 20% de lipasa, y
- entre el 45% y el 80% de proteasa,

en donde los porcentajes están expresados en peso sobre el peso total de las enzimas.

10 14.- Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque el tensioactivo es un éter de ácido carboxílico con propiedades espumantes y la combinación de enzimas tiene la siguiente composición:

- entre el 20% y el 40% de  $\alpha$ -amilasa,
- entre el 1% y el 20% de lipasa, y
- entre el 55% y el 80% de proteasa,

15 en donde los porcentajes están expresados en peso sobre el peso total de las enzimas.

15.- Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque el tensioactivo es una mezcla de olefina sulfonada y óxido de amina y la combinación de enzimas tiene la siguiente composición:

- 20
- entre el 20% y el 40% de  $\alpha$ -amilasa,
  - entre el 1% y el 20% de lipasa, y
  - entre el 55% y el 80% de proteasa,

en donde los porcentajes están expresados en peso sobre el peso total de las enzimas.

16.- Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque el tensioactivo es un aducto de poliol con óxido de etileno y óxido de propileno y la combinación de enzimas tiene la siguiente composición:

- 25
- entre el 25% y el 50% de  $\alpha$ -amilasa,
  - entre el 1% y el 10% de lipasa, y
  - entre el 45% y el 70% de proteasa,

en donde los porcentajes están expresados en peso sobre el peso total de las enzimas.

17.- Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque el tensioactivo es un éter de ácido carboxílico con propiedades no espumantes y la combinación de enzimas tiene la siguiente composición:

- 30
- entre el 25% y el 50% de  $\alpha$ -amilasa,
  - entre el 1% y el 10% de lipasa, y
  - entre el 45% y el 70% de proteasa,

en donde los porcentajes están expresados en peso sobre el peso total de las enzimas.

- 18.- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, caracterizada porque tiene una concentración de detergente comprendida entre el 0,005% y el 5%, expresada en peso, de materia activa detergente; y una concentración de la combinación de enzimas comprendida entre el 0,0001% y el 1%, expresada en peso, de materia activa enzimática.
- 5 19.- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, caracterizada porque está en forma de una solución acuosa concentrada que comprende el detergente con una concentración comprendida entre el 10% y el 45% expresada en peso, de materia activa detergente; y la combinación de enzimas con una concentración comprendida entre el 0,1% y el 5% expresada en peso, de materia activa enzimática.
- 10 20.- Composición según la reivindicación 19, caracterizada porque el tensioactivo es un éter de ácido carboxílico con propiedades espumantes, o una mezcla de olefina sulfonada y óxido de amina, y el contenido de la combinación de enzimas es preferiblemente el siguiente:
- entre el 25% y el 45%, más preferiblemente entre el 30% y el 40% de  $\alpha$ -amilasa,
  - entre el 1% y el 20%, más preferiblemente entre el 5% y el 15% de lipasa, y
  - entre el 45% y el 70%, más preferiblemente entre el 50% y el 60% de proteasa, y
- 15 en donde los porcentajes están expresados en peso respecto al peso total de las enzimas.
- 21.- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20, caracterizada porque comprende un cosolvente y/o un estabilizante.
- 22.- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, caracterizada porque el detergente está en forma de una solución acuosa concentrada que contiene entre el 10% y el 45%, expresada en peso, de materia activa detergente.
- 20 23.- Composición según la reivindicación 22, caracterizada porque la solución acuosa del detergente comprende un cosolvente.
- 24.- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 22 o 23, caracterizada porque la combinación de enzimas está en forma de una solución acuosa concentrada que contiene entre el 1% y el 15%, expresado en peso, de materia activa enzimática.
- 25 25.- Composición según la reivindicación 24, caracterizada porque la combinación de enzimas comprende un estabilizante.
- 26.- Kit para el control y la eliminación de biofilm desarrollado en una superficie, caracterizado que comprende la solución acuosa concentrada de detergente de cualquiera de las reivindicaciones 22 ó 23, en un envase separado de la solución acuosa concentrada de la combinación de enzimas de cualquiera de las reivindicaciones 24 ó 25.
- 30 27.- Procedimiento para el control y la eliminación de biofilm desarrollado sobre una superficie caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
- (i) aplicar una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 sobre la superficie;
  - (ii) dejar actuar la composición durante un período comprendido entre 10 min y 180 min;
  - (iii) aclarar con agua.
- 35 28.- Procedimiento según la reivindicación 27, caracterizado porque comprende además la siguiente etapa:
- (iv) aplicar un desinfectante
- 29.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 27 ó 28, caracterizado porque después de la etapa (ii), y antes de la etapa (iii), se aplica sobre la superficie una solución alcalina y se deja actuar durante un período de tiempo comprendido entre 10 min y 90 min.
- 40

30.- Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 para el control y la eliminación de biofilm desarrollado sobre una superficie.

FIGURA 1

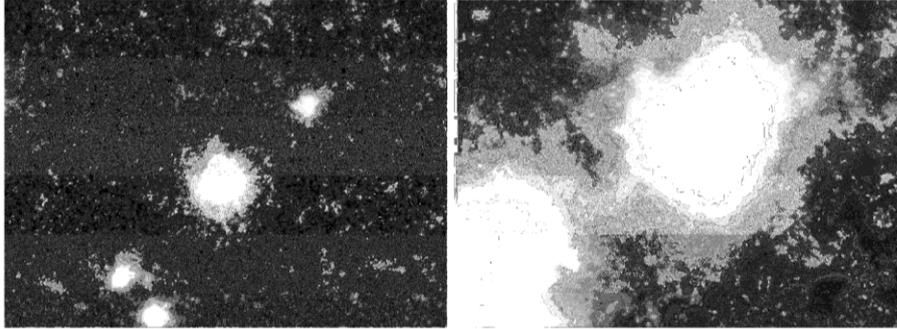


FIGURA 2

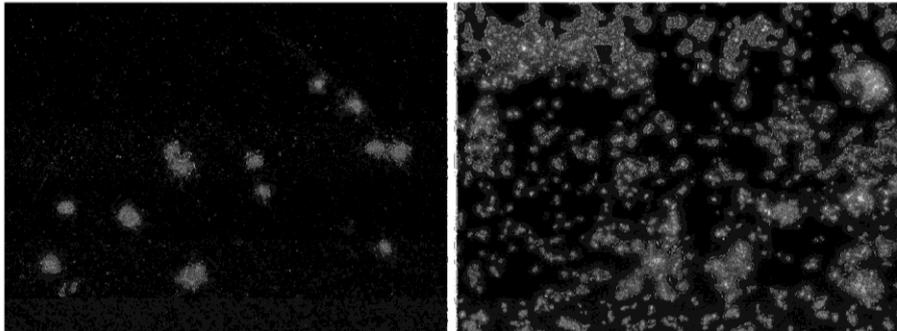


FIGURA 3

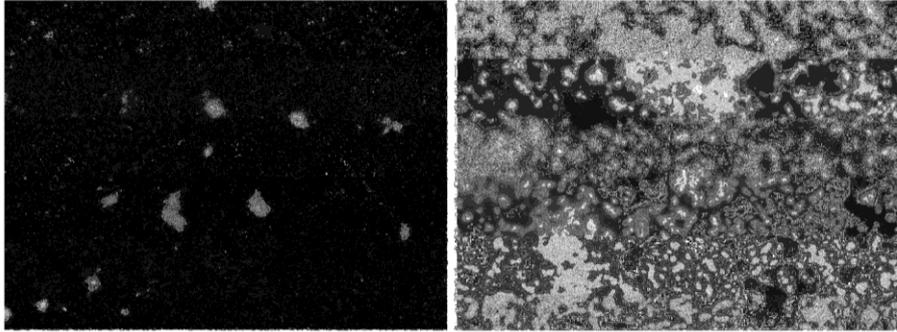


FIGURA 4

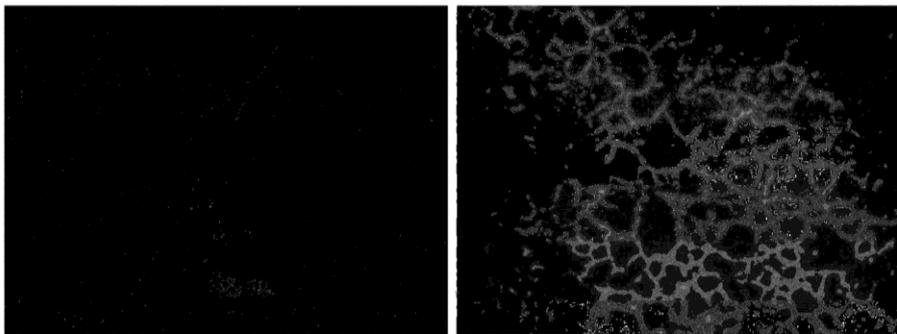


FIGURA 5

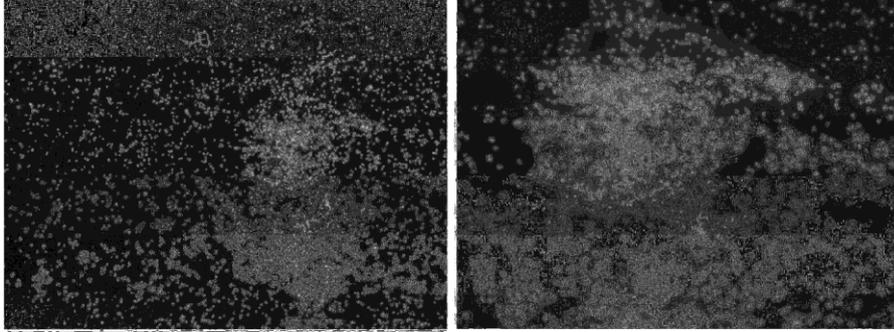


FIGURA 6

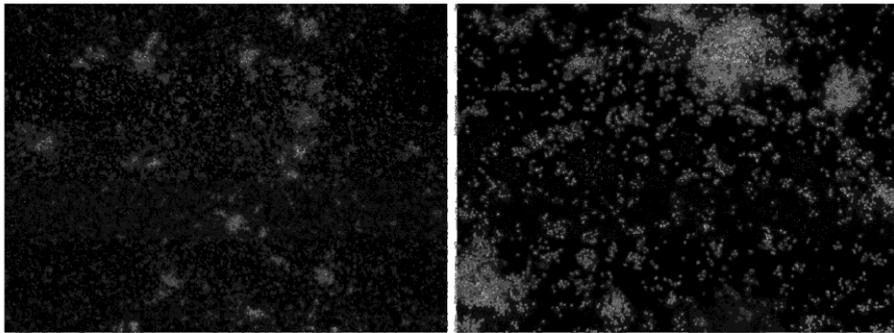


FIGURA 7

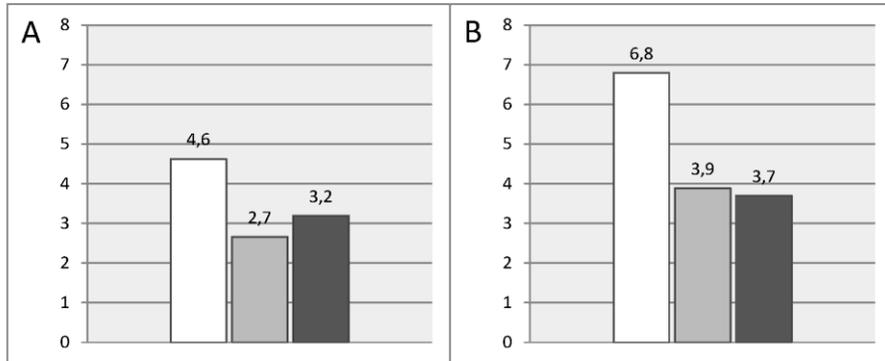


FIGURA 8

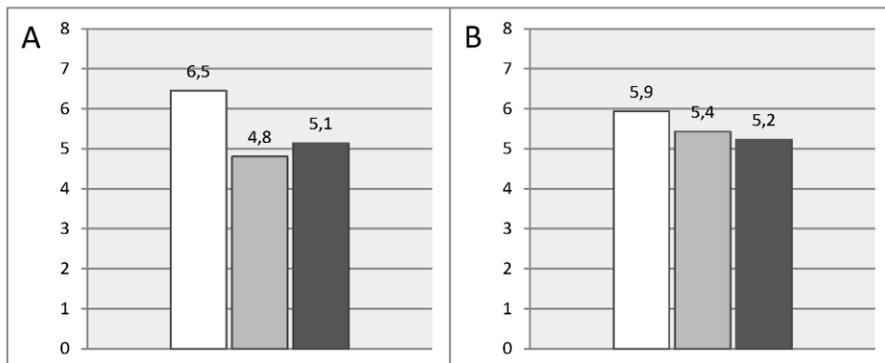


FIGURA 9

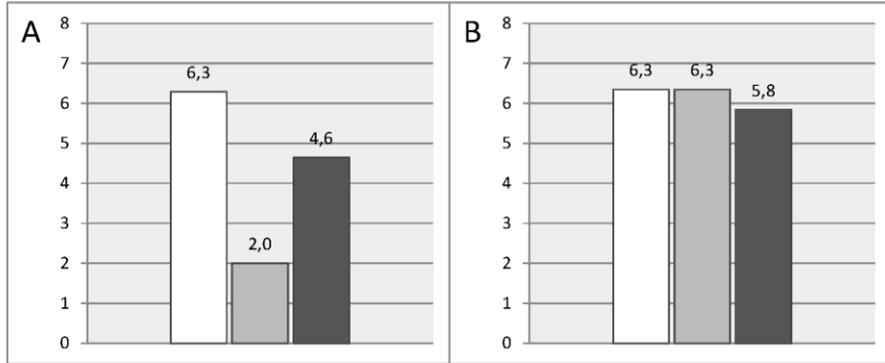


FIGURA 10

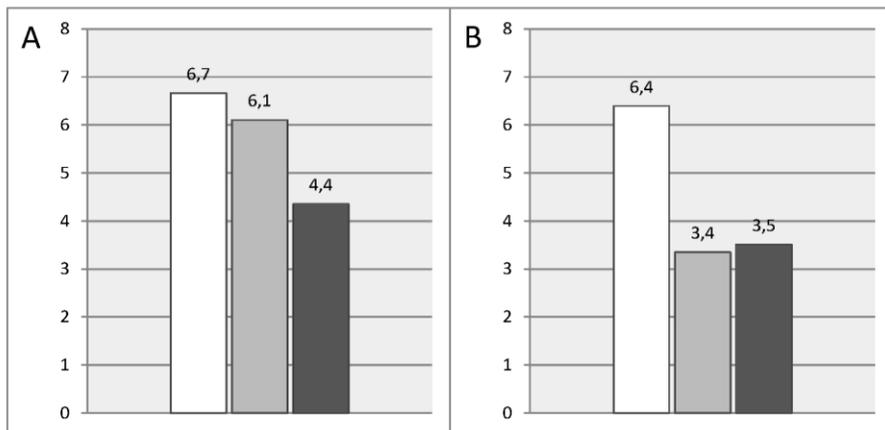


FIGURA 11

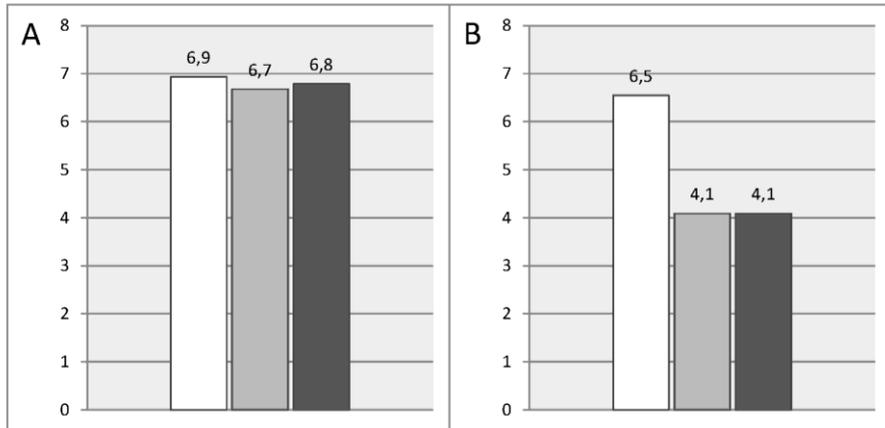


FIGURA 12

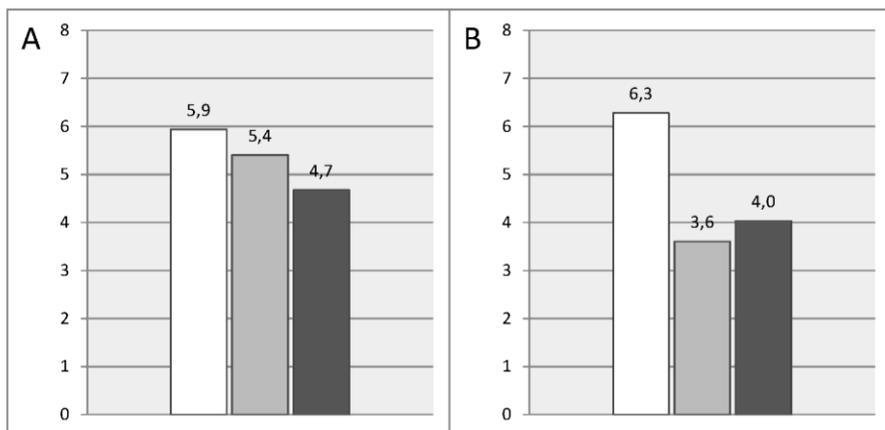


FIGURA 13

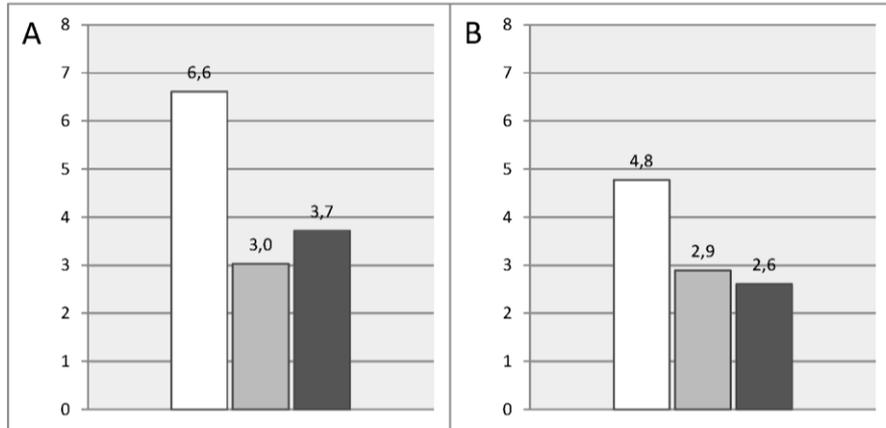


FIGURA 14

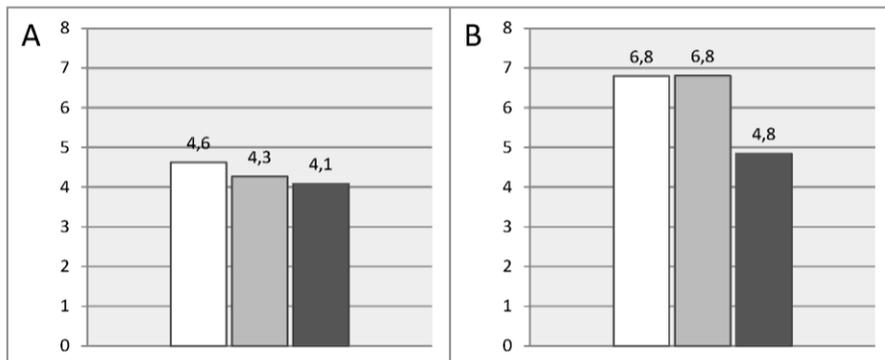


FIGURA 15

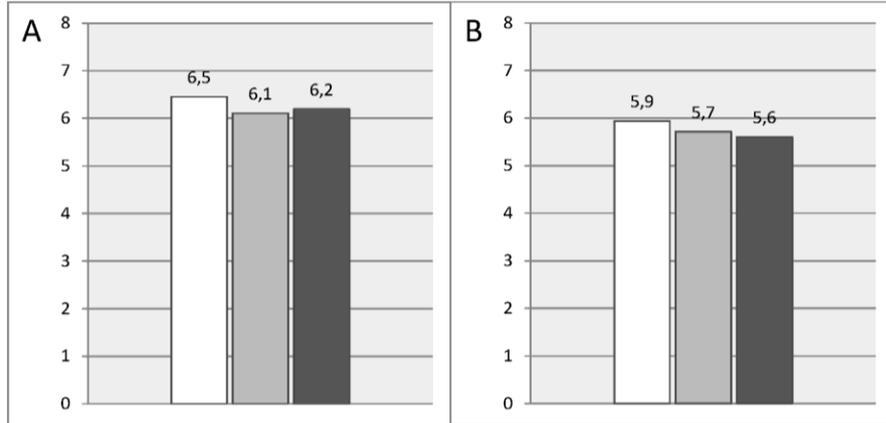
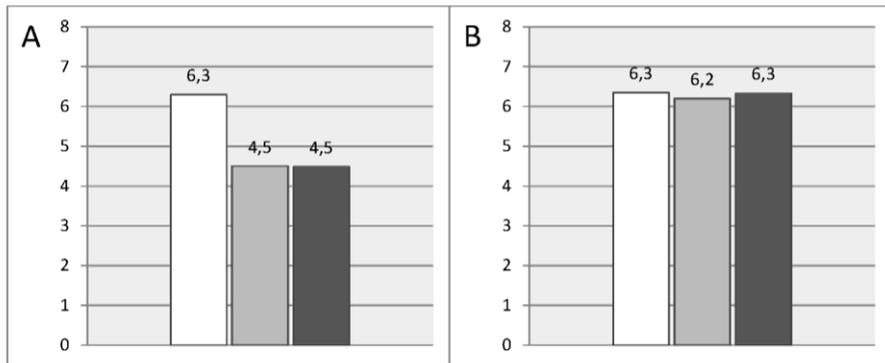


FIGURA 16





OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201231882

②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 03.12.2012

③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: **C12N9/00** (2006.01)  
C11D3/386 (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 9826807 A1 (NOVO NORDISK) 25.06.1998, reivindicaciones 1-12.	1-30
A	EP 0590746 A1 (W.R. GRACE AND CO.-CONN.) 06.04.1994, página 3, línea 19 – página 5, línea 16; reivindicaciones 1-22.	1-30
A	WO 2008013747 A2 (KUMAR, MANOJ) 31.01.2008, reivindicaciones 1-18; ejemplos.	1-30
A	WO 2009085743 A1 (DANISCO US INC., GENENCOR DIVISIONN) 09.07.2009, reivindicaciones 1-19.	1-30

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe  
14.03.2014

Examinador  
M. Ybarra Fernández

Página  
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C11D

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 14.03.2014

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-30	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-30	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 9826807 A1 (NOVO NORDISK)	25.06.1998
D02	EP 0590746 A1 (W.R. GRACE AND CO.-CONN.)	06.04.1994
D03	WO 2008013747 A2 (KUMAR, MANOJ)	31.01.2008
D04	WO 2009085743 A1 (DANISCO US INC., GENENCOR DIVISIONN)	09.07.2009

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El documento D01 reivindica un método para limpiar y desinfectar una superficie al menos parcialmente cubierta por una capa de biopelícula que comprende las etapas de poner en contacto la biopelícula con una composición de limpieza compuesta por una o más hidrolasas, por ejemplo, una enzima hidrolítica producida por una cepa del hongo *Aspergillus aculeatus*, en una cantidad eficaz para ya sea totalmente o en parte, la eliminación o la liberación de la capa de biopelícula de la superficie. Poner en contacto la biopelícula con una composición desinfectante bactericida que comprende una oxidorreductasa tal como una oxidasa, una peroxidasa o una lacasa, en una cantidad eficaz para matar las células bacterianas vivas presentes en la biopelícula.

El documento D02 reivindica un método para inhibir o desprender el biofilm de las superficies que están en contacto con un sistema acuoso que comprende añadir al sistema una composición de enzimas que consiste esencialmente de proteasas, opcionalmente en combinación con otras enzimas y / o agentes tensioactivos, en cantidades eficaces para inhibir o eliminar la biopelícula.

El documento D03 reivindica una composición para la eliminación de la biopelícula de las superficies. La composición es una mezcla de enzimas que tiene al menos tres enzimas seleccionadas entre proteasas, celulasas, esterasa nannasas, gluconasa, fosfolipasas y amilasas y resulta en la eliminación de al menos 40% de biopelícula de la superficie.

El documento D04 reivindica una composición consistente en una mezcla de al menos tres enzimas seleccionadas entre proteasas, gluconasa, fosfolipasas y mannanasas y resulta en la eliminación de al menos el 40% de biopelícula de la superficie. Además reivindica un kit y el procedimiento de utilización de la composición.

Se considera que los documentos anteriormente mencionados constituyen el estado de la técnica. Así, la invención reivindicada en la patente objeto de estudio es nueva y se considera que implica actividad inventiva y aplicación industrial (Artículos 9, 6.1 y 8.1 LP11/86).