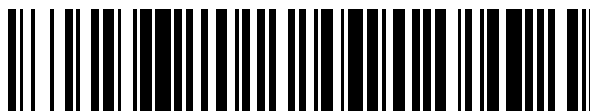


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 191**

51 Int. Cl.:

C11D 3/386 (2006.01)
C11D 3/00 (2006.01)
A61L 2/18 (2006.01)
B65B 5/00 (2006.01)
C11D 7/42 (2006.01)
A61L 12/14 (2006.01)
A61L 2/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2009 E 09290293 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014 EP 2243821**

54 Título: **Producto y procedimiento para la eliminación de biopelículas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.03.2015

73 Titular/es:
REALCO SA (50.0%)
Avenue Albert Einstein 15
1348 Louvain La Neuve, BE y
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (INRA) (50.0%)

72 Inventor/es:
BOELS, GAUTHIER;
BLACKMAN, GORDON;
FAILLE, CHRISTINE;
LEQUETTE, YANNICK y
CLARISSE, MARTINE

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 531 191 T3

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

DESCRIPCIÓN

Producto y procedimiento para la eliminación de biopelículas

Campo técnico

5 La invención se refiere al campo de la eliminación de biopelículas. Más concretamente, la invención se refiere a una composición y a un procedimiento para eliminar biopelículas.

Descripción del estado de la técnica

10 La higiene es de creciente importancia en la industria alimentaria, en los hospitales, y en particular en el ámbito quirúrgico, en instalaciones de potabilización y de desalinización de agua, en el tratamiento de las aguas de proceso, y en particular en las aguas utilizadas en torres de refrigeración y en las necesidades de la vida real, por ejemplo las lentes de contacto. Se observa frecuentemente que durante la circulación de agua sobre un soporte, microorganismos que circulan libremente en el agua pueden adherirse a la superficie. Esos microorganismos pueden entonces desarrollar una matriz extracelular adhesiva compuesta por sustancias poliméricas. Una comunidad de microorganismos adherida a una superficie y englobada en tal matriz se llama una biopelícula. Desgraciadamente se observa que esta matriz es muy resistente, y puede constituir una barrera para los agentes que actuarían contra los microorganismos. Los tratamientos tradicionales a base de sosa y/o con diferentes biocidas no actúan de manera suficientemente eficaz porque no penetran la biopelícula en todo su espesor o son inhibidos por ciertas moléculas que componen esta matriz. El tratamiento es entonces solo parcialmente eficaz en la superficie superior de la biopelícula. Además, ésta última puede también atrapar otros microorganismos, en particular patógenos, diferentes de la instalada inicialmente.

20 Se conoce por el documento WO98/26807 un procedimiento de tratamiento enzimático de una película biológica. En ese procedimiento se pone en contacto la biopelícula con una composición de limpieza que comprende una o varias hidrolasas para eliminar o liberar de la superficie la capa de biopelícula. En una segunda etapa, la biopelícula se pone en contacto con una composición desinfectante bactericida para destruir las células bacterianas presentes en la película. Sin embargo, el uso simultáneo de esas dos composiciones es la fuente de un grado de inactivación de ciertas enzimas en la mezcla final. Por tanto la rapidez y eficacia de la limpieza se pueden mejorar utilizando una composición en la que la inactivación de las enzimas está ausente.

El documento WO92/13807 divulga también una composición para el tratamiento enzimático de biopelículas.

30 Se conoce por el documento US2003/0205247 una utilización de disoluciones acuosas que contienen enzimas para la limpieza de tanques de almacenamiento o de fermentación, que contienen una o varias enzimas elegidas entre las siguientes: lacasas, peroxidases, oxidorreductasas, transferasas, isomerasas, liasas o ligasas. El ámbito de actuación de las disoluciones mencionadas es relativamente estrecho, propio de la cervecería. Esas disoluciones no convienen para la limpieza de una amplia gama de biopelículas.

35 Por tanto existe una necesidad de una composición y de un procedimiento capaces de eliminar biopelículas, que sean eficaces en un tiempo razonable, que actúen sobre una clase amplia de biopelículas producidas por una clase amplia de microorganismos o grupos de microorganismos, que no sean perjudiciales para el soporte de la biopelícula, y que actúen tanto para prevenir el desarrollo de biopelículas como sobre biopelículas constituidas desde mucho tiempo, y después de haber alcanzado un punto de cohesión y de resistencia importantes.

Compendio de la invención

40 La presente invención proporciona una solución a uno, a varios, o a la totalidad de los inconvenientes de las técnicas convencionales y puede ofrecer otras ventajas no consideradas con las composiciones y procedimientos conocidos.

45 La invención se refiere a una composición para la eliminación de las biopelículas presentes sobre un sustrato. Dicha composición se caracteriza por que comprende un componente detergente que contiene un secuestrante y un componente enzimático que contiene al menos una proteasa y al menos una lacasa, caracterizándose dicha composición por que dicho componente detergente contiene además un agente humectante y un dispersante y por que dicho componente enzimático comprende, además, al menos una polisacaridasa.

50 La constitución de una composición que comprende un componente detergente y un componente enzimático según la invención permite, sorprendentemente, mejorar significativamente la rapidez y eficacia de la eliminación de una biopelícula. Esta composición permite eliminar toda o casi toda la biopelícula. Además, la composición puede actuar sobre biopelículas incluso maduras o que tienen un ciclo de desarrollo más precoz y desarrolladas por múltiples especies o microorganismos diferentes. La combinación de un componente detergente y de un componente enzimático según la invención permite, por tanto, actuar eficazmente sobre una biopelícula. El detergente elimina una parte superficial de la biopelícula y moja y/o hincha las estructuras orgánicas de la biopelícula, favoreciendo la accesibilidad del componente enzimático que debilita y degrada la matriz de la biopelícula. Esta acción combinada favorece a la composición la accesibilidad a las capas más profundas, lo que permite una separación óptima de la película mientras se mantiene el sustrato.

Según una realización preferida de la invención, dicha composición puede ser una disolución que tiene un pH comprendido aproximadamente entre 8 y 11, preferiblemente comprendido aproximadamente entre 9,5 y 10,5 y más preferiblemente comprendido aproximadamente entre 9,5 y 10. El valor del pH de dicha composición influye de modo importante en su eficacia frente a la biopelícula. Una disolución de dicha composición cuyo pH está comprendido aproximadamente entre 8 y 11 permite, por tanto, eliminar sorprendentemente toda o casi toda la biopelícula. Alternativamente dicha composición puede estar en forma sólida, disolverse después en un disolvente antes de su utilización con el fin de obtener una disolución cuyo pH está comprendido aproximadamente entre 8 y 11.

Preferiblemente, el componente enzimático comprende una proporción de proteasa comprendida entre 10 y 50%, una proporción de lacasa comprendida entre 5 y 35% y una proporción de polisacaridasa comprendida entre 5 y 20%. Según una realización preferida de la invención, el componente enzimático puede contener entre 1 y 10 proteasas, preferiblemente entre 1 y 5 proteasas, más preferiblemente puede contener 2, 3, 4 ó 5 proteasas.

Ejemplos no limitativos de enzimas proteasas pertenecientes a la clase EC 3.4 y susceptibles de utilizarse en la invención son las aminopeptidasas (EC 3.4.11), dipeptidasas (EC 3.4.13), dipeptidil-peptidasas y tripeptidil-peptidasas (EC 3.4.14), peptidil-dipeptidasas (EC 3.4.15), serina carboxipeptidasas (EC 3.4.16), metalo-carboxipeptidasas (EC 3.4.17), cisteína carboxipeptidasas (EC 3.4.18), omega peptidasas (EC 3.4.19), serina endopeptidasas (EC 3.4.21), cisteína endopeptidasas (EC 3.4.22), aspártico endopeptidasas (EC 3.4.23), metalo-endopeptidasas (EC 3.4.24), treonina endopeptidasas (EC 3.4.25), y endopeptidasas pertenecientes a la clase EC 3.4.99. Preferiblemente, las proteasas pertenecen a la clase EC 3.4.21. Las proteasas están disponibles comercialmente y en formas diferentes incluyen polvos, granulados, suspensiones, disoluciones líquidas. Las lacasas utilizadas en la invención pertenecen a la clase EC 1.10.3.2. Las lacasas son enzimas que contienen cobre y tienen por función oxidar un sustrato en presencia de oxígeno. Más específicamente, las lacasas son oxidorreductasas que funcionan con oxígeno molecular como aceptor de electrones. La mencionada al menos una polisacaridasa utilizada en la invención es una enzima que tiene por función romper enlaces en polisacáridos. Preferiblemente, la mencionada al menos una polisacaridasa puede ser una alfa-amilasa, celulasa, hemi-celulasa, glucosidasa, beta-glucanasa o pectinasa. Más preferiblemente, la mencionada al menos una polisacaridasa puede ser una alfa-amilasa perteneciente a la clase EC 3.2.1.1 que tiene por función romper enlaces (1-4)-alfa-glicosídicos en polisacáridos que contienen tres unidades de alfa-(1-4)-D-glucosa.

Preferiblemente, el componente enzimático puede comprender una proporción de lacasa de aproximadamente 30%, una proporción de proteasa de aproximadamente 30%, una proporción de alfa-amilasa de aproximadamente 10%. Según otra realización preferida, si el componente enzimático comprende 2 proteasas la proporción de lacasa puede ser aproximadamente 30%, la proporción total de proteasas aproximadamente 30%, la proporción de alfa-amilasa aproximadamente 10%. Según otra realización preferida, si el componente enzimático comprende 2 proteasas la proporción de lacasa puede ser 30%, la proporción total de proteasas 30%, la proporción de alfa-amilasa 10%. Por ejemplo, la relación entre proteasas puede estar comprendida entre 1:2 y 2:1, preferiblemente la relación entre proteasas puede ser 1:1. Las enzimas presentes en el componente enzimático tienen una acción complementaria sobre la biopelícula. Por ejemplo, la lacasa presenta una gran eficacia sobre las manchas no atacadas por la alfa-amilasa o las proteasas.

Según una realización preferida de la invención, el componente enzimático puede ser una disolución o forma sólida. Preferiblemente, el componente enzimático es una disolución acuosa cuyo pH puede estar comprendido entre 8 y 10. Preferiblemente, el componente enzimático es una disolución acuosa cuyo pH puede estar comprendido entre 8,5 y 9,5; más preferiblemente el pH puede ser aproximadamente 9,0. Alternativamente, el componente enzimático puede estar en forma sólida tal como por ejemplo un liofilizado, polvos, gránulos o cualquier otra forma que permita la disolución de dicho componente en un disolvente, después se disuelve en un disolvente. El disolvente puede ser agua o una disolución acuosa, ácida, básica o neutra. La disolución acuosa puede contener por ejemplo uno o varios compuestos, tales como por ejemplo detergentes.

El componente detergente comprende un secuestrante, un dispersante y un humectante. Según una realización preferida de la invención, el componente detergente puede ser una disolución o en forma sólida. Preferiblemente, el componente detergente es una disolución acuosa cuyo pH está comprendido entre 11,0 y 14,0, más preferiblemente comprendido entre 12,0 y 14,0, lo más preferiblemente entre 12,8 y 13,8. Preferiblemente, el componente detergente comprende una proporción de secuestrante comprendida entre 1 y 10%, una proporción de dispersante comprendida entre 1 y 10% y una proporción de humectante comprendida entre 1 y 15%. El secuestrante es una sustancia química que tiene la capacidad de formar complejos con iones minerales que fija de forma que impide su precipitación por las reacciones habituales. Como ejemplo, el secuestrante puede ser ácido etilendiaminotetraacético, glucono-delta-lactona, gluconato sódico, gluconato potásico, gluconato cálcico, ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido tartárico, acetato sódico, sorbitol, un compuesto que comprende un átomo de fósforo. Preferiblemente, el secuestrante puede ser un óxido de fósforo tal como fosfonato, fosfinato o fosfato, o una sal de éste, una amina o un óxido de amina que lleva en su estructura al menos un grupo funcional fosfina, óxido de fosfina, fosfinito, fosfonito, fosfito, fosfonato, fosfinato o fosfato, o una sal de éstos. Más preferiblemente, el secuestrante puede ser un fosfonato o una sal de éste, un amina o un óxido de amina que comprende al menos, en su estructura, un grupo funcional fosfina, óxido de fosfina, fosfinito, fosfonito, fosfito, fosfonato, fosfinato o fosfato, o una sal de éstos. Como ejemplo no limitativo, el fosfonato puede ser de fórmula general $R^1(R^2O)(R^3O)P=O$ en la que

R¹, R² y R³ se seleccionan independientemente entre el grupo de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquil-amino sustituido o no, aminoalquilo sustituido o no, arilo o arilo sustituido. Como ejemplo no limitativo, la amina o el óxido de amina pueden comprender uno, dos o tres sustituyente(s) de fórmula general CR⁴R⁵W en la que R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente entre el grupo de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquil-amino sustituido o no, aminoalquilo sustituido o no, arilo o arilo sustituido, y W se selecciona entre el grupo fosfonato, fosfinato o fosfato. El secuestrante puede estar en forma de una sal de sodio, calcio, litio, magnesio o potasio; preferiblemente el secuestrante puede estar en forma de una sal de sodio, calcio, o potasio. El dispersante es una sustancia química que tiene la capacidad de mejorar la separación de las partículas de una suspensión con el fin de prevenir la aglutinación, agregación y/o decantación. El dispersante puede ser un polímero soluble o parcialmente soluble en agua tal como por ejemplo poli(etilenglicol), derivados de la celulosa o un polímero que comprende al menos un motivo de ácido acrílico o éster acrílico. Preferiblemente, el dispersante es un polímero que comprende al menos un motivo de ácido acrílico o éster acrílico de fórmula general -CH₂-CH(COOR)- en la que R puede ser un hidrógeno, un alquilo o un alquilo sustituido, un arilo o un arilo sustituido. En particular, el dispersante es un polímero que tiene una masa molecular Mw comprendida entre 500 y 10000. Más preferiblemente, el dispersante es un homopolímero de ácido acrílico. En particular, el dispersante puede ser un homopolímero de ácido acrílico que tiene una masa molecular comprendida entre 2000 y 6000. El humectante es una sustancia química anfipática, o una composición que comprende dicha sustancia química anfipática, que modifica la tensión superficial entre dos superficies. El humectante tiene por ventaja favorecer el esparcimiento de un líquido sobre un sólido. El humectante puede ser aniónico, catiónico, no iónico o zwitteriónico. Preferiblemente, el humectante puede ser un humectante aniónico o no iónico, es decir, que la parte hidrófila está cargada negativamente o no comprende carga neta alguna, o puede ser una composición que comprende un humectante aniónico. Más concretamente, el humectante puede ser el Tween, un éster de sacarosa o una composición que comprende un alquil-sulfato de sodio y un alcohol.

La invención se refiere a un método de eliminación de biopelículas presentes sobre un sustrato caracterizado por que comprende las etapas siguientes de:

- a) suministro de un componente detergente que contiene un secuestrante, un dispersante y un humectante, y de un componente enzimático que contiene al menos una proteasa, al menos una lacasa, y al menos una polisacaridasa,
- b) disolver o diluir el componente detergente en agua,
- c) disolver el componente enzimático en la disolución formada en la etapa b) para formar la disolución de dicha composición según la invención,
- b') disolver o diluir el componente enzimático en agua,
- c') disolver el componente detergente en la disolución formada en la etapa b') para formar la disolución de dicha composición según la invención,
- d) aplicación de la disolución de dicha composición formada en la etapa c) o c') sobre el sustrato durante un periodo de 15 minutos a 4 horas.

Alternativamente, las etapas b) y c), o b') y c') se pueden realizar de manera simultánea para formar una disolución de dicha composición según la invención.

Preferiblemente, el método comprende las etapas siguientes de:

- a) suministro de un componente detergente que contiene un secuestrante, un dispersante y un humectante; y de un componente enzimático que contiene al menos una proteasa, al menos una lacasa, y al menos una polisacaridasa.
- b) disolver o diluir el componente detergente en agua,
- c) disolver el componente enzimático en la disolución formada en la etapa b) para formar la disolución de dicha composición según la invención,
- d) aplicación de la disolución de dicha composición formada en la etapa c) sobre el sustrato durante un periodo de 15 minutos a 4 horas.

Según una realización preferida de la invención, el pH de la disolución formada durante la etapa a) está comprendido aproximadamente entre 11,0 y 14,0, preferiblemente comprendido aproximadamente entre 12,0 y 14,0, y más preferiblemente comprendido entre 12,8 y 13,8. Preferiblemente, la temperatura de la disolución del componente detergente formada durante la etapa a) puede estar comprendida entre aproximadamente 35°C y 50°C.

Según una realización preferida de la invención, la disolución de dicha composición formada en la etapa c) tiene un pH comprendido aproximadamente entre 8 y 11, preferiblemente comprendido aproximadamente entre 9,5 y 10,5, y más preferiblemente comprendido entre 9,5 y 10.

Según una realización preferida de la invención, la composición según la invención se aplica sobre un sustrato cubierto por una biopelícula durante aproximadamente 30 a 50 minutos.

Preferiblemente, el componente detergente comprende una proporción de secuestrante comprendida entre 1 y 10%, una proporción de dispersante comprendida entre 1 y 10% y una proporción de humectante comprendida entre 1 y 15%. Preferiblemente, el componente enzimático comprende una proporción de proteasa comprendida entre 10 y

50%, una proporción de lacasa comprendida entre 5 y 35% y una proporción de polisacaridasa comprendida entre 5 y 20%. Más preferiblemente, la al menos una polisacaridasa puede ser una alfa-amilasa.

El presente método permite eliminar eficazmente toda o casi toda la biopelícula, dejando entonces sobre el sustrato nada más que células aisladas sin protección de la matriz. La acción posterior de un biocida permite destruir la cepa microbiana. Una fase de desinfección ulterior será, por tanto, mucho más eficaz tras la aplicación de una disolución de la composición según la invención que tras la aplicación de una fase de limpieza que no permite esa eliminación total de la matriz. Por tanto, según una realización preferida de la invención, el método comprende además una etapa ulterior de aplicación de un biocida. Por ejemplo, los biocidas pueden ser, de manera no limitativa, de tipo oxidante tal como ácido peracético, peróxido de hidrógeno, monopersulfato potásico, hipoclorito sódico. Según la invención, la aplicación de un biocida debe ser posterior a la aplicación de la composición según la invención para evitar la desactivación de las enzimas presentes en dicha composición por los biocidas.

La invención comprende también la utilización de la composición según la invención para la eliminación de biopelículas sobre un sustrato. La composición puede utilizarse en instalaciones cerradas o por remojo. Más concretamente, la invención se refiere a la utilización de dicha composición para la limpieza de suelos y superficies, para la limpieza in situ o remojo. La limpieza por remojo se utiliza en particular para limpiar material quirúrgico, lentes de contacto. La composición según la invención se puede utilizar para la limpieza de circuito de agua técnico y de proceso, sistemas de intercambiadores de acondicionamiento de aire o en la industria alimentaria.

Según otro aspecto, la invención se refiere a un estuche destinado a la eliminación de una biopelícula sobre un sustrato, y caracterizado por que comprende al menos una muestra de un componente detergente en disolución o en forma sólida que contiene un secuestrante, un dispersante y un humectante, y al menos una muestra de un componente enzimático en disolución o en forma sólida que contiene al menos una proteasa, al menos una lacasa, y al menos una polisacaridasa. Preferiblemente, la muestra del componente enzimático puede comprender una proporción de proteasa comprendida entre 10 y 50%, una proporción de lacasa comprendida entre 5 y 35% y una proporción de polisacaridasa comprendida entre 5 y 20%. Preferiblemente, dicha al menos una polisacaridasa puede ser una alfa-amilasa. Según una realización preferida de la invención, la muestra del componente enzimático puede contener entre 1 y 10 proteasas, preferiblemente entre 1 y 5 proteasas, más preferiblemente puede contener 1, 2, 3, 4 ó 5 proteasas. Según otra realización preferida, la muestra del componente enzimático contenida en el estuche puede comprender 2 proteasas. Preferiblemente, si la muestra del componente enzimático comprende 2 proteasas, la proporción de lacasa puede ser aproximadamente 30%, la proporción total de proteasas puede ser aproximadamente 30%, la proporción de alfa-amilasa puede ser aproximadamente 10%. Preferiblemente, si la muestra del componente enzimático comprende 2 proteasas, la proporción de lacasa puede ser 30%, la proporción total de proteasas puede ser 30%, la proporción de alfa-amilasa puede ser 10%. Por ejemplo, la relación entre cada proteasa puede estar comprendida entre 1:2 y 2:1, preferiblemente la relación entre cada proteasa puede ser 1:1. Si la muestra del componente enzimático contenido en el estuche es una disolución, el pH de ésta puede estar comprendido entre 8 y 10, preferiblemente el pH puede estar comprendido entre 8,5 y 9,5, más preferiblemente el pH puede ser aproximadamente 9,0. Preferiblemente, la muestra del componente detergente comprende una proporción de secuestrante comprendida aproximadamente entre 1 y 10%, una proporción de dispersante comprendida aproximadamente entre 1 y 10% y una proporción de humectante comprendida aproximadamente entre 1 y 15%. Como ejemplo, el secuestrante puede ser ácido etilendiaminotetraacético, glucono-delta-lactona, gluconato sódico, gluconato potásico, gluconato cálcico, ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido tartárico, acetato sódico, sorbitol, un compuesto que comprende un átomo de fósforo. Preferiblemente, el secuestrante puede ser un óxido de fósforo tal como fosfonato, fosfinato o fosfato, o una sal de éste, una amina o un óxido de amina, o una sal de éstos que llevan al menos, en su estructura, un grupo funcional fosfina, óxido de fosfina, fosfinito, fosfonito, fosfito, fosfonato, fosfinato o fosfato. Más preferiblemente, el secuestrante puede ser un fosfonato o una sal de éste, una amina o un óxido de amina, o una sal de éstos, que comprenden al menos, en su estructura, un grupo funcional fosfina, óxido de fosfina, fosfinito, fosfonito, fosfito, fosfonato, fosfinato o fosfato. Como ejemplo no limitativo, el fosfonato puede ser de fórmula general $R^1(R^2O)(R^3O)P=O$ en la que R^1 , R^2 y R^3 se seleccionan independientemente entre el grupo de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquil-amino sustituido o no, aminoalquilo sustituido o no, arilo o arilo sustituido. Como ejemplo no limitativo, la amina o el óxido de amina pueden comprender uno, dos o tres sustituyente(s) de fórmula general CR^4R^5W en la que R^4 y R^5 se seleccionan independientemente entre el grupo de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquil-amino sustituido o no, aminoalquilo sustituido o no, arilo o arilo sustituido, y W se selecciona entre el grupo fosfonato, fosfinato o fosfato. El secuestrante puede estar en forma de una sal de sodio, calcio, litio, magnesio o potasio; preferiblemente el secuestrante puede estar en forma de una sal de sodio, calcio, o potasio. El dispersante puede ser un polímero soluble o parcialmente soluble en agua tal como por ejemplo poli(etilenglicol), derivados de la celulosa o un polímero que comprende al menos un motivo de ácido acrílico o éster acrílico. Preferiblemente, el dispersante es un polímero que comprende al menos un motivo de ácido acrílico o éster acrílico de fórmula general $-CH_2-CH-COOR-$ en la que R puede ser un hidrógeno, un alquilo o un alquilo sustituido, un arilo o un arilo sustituido. En particular, el dispersante es un polímero que tiene una masa molecular Mw comprendida entre 500 y 10000. Más preferiblemente, el dispersante es un homopolímero de ácido acrílico. En particular, el dispersante puede ser un homopolímero de ácido acrílico que tiene una masa molecular comprendida entre 2000 y 6000. El humectante puede ser aniónico, catiónico, no iónico o zwitteriónico. Preferiblemente, el humectante puede ser un humectante aniónico o no iónico, es decir, que la parte hidrófila está cargada negativamente o no tiene carga neta, o puede ser una composición que comprende un humectante aniónico. Más

concretamente, el humectante puede ser una composición que comprende un alquil-sulfato sódico y un alcohol. Si la muestra del componente detergente es una disolución, el pH de ésta está comprendido entre 11,0 y 14,0, más preferiblemente comprendido entre 12,0 y 14,0, lo más preferiblemente entre 12,8 y 13,8.

Breve descripción de los dibujos

5 La FIG. 1 representa un gráfico que muestra la cantidad de células de una cepa de *Pseudomonas fluorescens* presente sobre un sustrato tras la aplicación de diferentes disoluciones de tratamiento.

La FIG. 2 representa un gráfico que muestra la cantidad de células de una cepa de *Bacillus mycoïdes* presente sobre un sustrato tras la aplicación de diferentes disoluciones de tratamiento.

10 La FIG. 3 representa un gráfico que muestra la cantidad de células de una cepa de *Bacillus cereus* presente sobre un sustrato tras la aplicación de diferentes disoluciones de tratamiento.

La FIG. 4 representa imágenes de la superficie de un sustrato, tomadas por un microscopio de epifluorescencia, tras la aplicación de diferentes disoluciones de tratamiento sobre dicho sustrato recubierto por una biopelícula de la cepa de *Pseudomonas fluorescens*.

15 La FIG. 5 representa imágenes de la superficie de un sustrato, tomadas por un microscopio de epifluorescencia, tras la aplicación de diferentes disoluciones de tratamiento sobre dicho sustrato recubierto por una biopelícula de la cepa de *Bacillus mycoïdes*.

La FIG. 6 representa imágenes de la superficie de un sustrato, tomadas por un microscopio de epifluorescencia, tras la aplicación de diferentes disoluciones de tratamiento sobre dicho sustrato recubierto por una biopelícula de la cepa de *Bacillus cereus*.

20 **Descripción detallada de la invención**

Ejemplo 1

Descripción de la selección de las condiciones de prueba: las pruebas se realizan en el marco de un procedimiento de limpieza in situ (NEP) en una planta piloto industrial. Las biopelículas se desarrollan sobre una cara plana de un cilindro de acero inoxidable perforado en su centro. Ese cilindro, una vez introducido en una canalización de diámetro interior igual al diámetro exterior del cilindro, provoca un estrechamiento brusco de aquélla, forzando al líquido a pasar por la perforación en su centro. Esta tensión provoca perturbaciones del flujo, creando así zonas muertas en la superficie del cilindro. Esas zonas muertas son favorables a la formación de una biopelícula y más desfavorables a su desprendimiento mecánico por el flujo. Por tanto representan típicamente zonas difíciles para la eliminación de una biopelícula. Se utilizan tres cepas distintas: *Pseudomonas fluorescens* (proporcionada por la Universidad de Cornell, Departamento de Ciencia de Alimentos, Ithaca, New York, 14853, USA (Kathryn J. Boor, kjb4@cornell.edu), *Bacillus mycoïdes* (proporcionada por el laboratorio AFSSA en Maison-Alfort, Francia (Brigitte Carpentier, b.carpentier@lerpac.afssa.fr)), *Bacillus cereus* (proporcionada por INRA-UR638, Laboratorio de Ingeniería de Procesos y Tecnologías Alimentarios, Villeneuve d'Asq, Francia (Christine Faille Christine.faille@lille.inra.fr)).

35 Se prepara un medio de cultivo como sigue: se disuelven extractos de carne en polvo (Biokar) en agua destilada al 0,1% y se esterilizan. 20 ml de inóculo de $5 \cdot 10^7$ UFC/ml en una disolución de caldo de soja Trypticase (TSB, Biokar) se depositan sobre la superficie de los cilindros. Esos cilindros se incuban en cámara húmeda a 30°C durante 2 horas para permitir la adherencia de las células. A continuación la disolución de TSB se retira y se reemplaza por 20 ml del medio de cultivo de carne y los cilindros se incuban 24 h a 30°C. El medio de cultivo se reemplaza entonces por medio fresco a base de carne y los cilindros se incuban de nuevo durante 24 h. El procedimiento de limpieza consiste en introducir los cilindros contaminados por la biopelícula en las canalizaciones rectas de una planta piloto industrial limpiada por circulación (procedimiento de limpieza in situ – NEP). Las disoluciones de tratamiento se hacen circular durante 30 minutos a 45°C con un caudal de 300 l/h. Para dos de las cepas se han realizado también ensayos con un caudal de 600 l/h. Cada ensayo se repite tres veces y se establece un promedio. El desarrollo y eliminación de las biopelículas se siguen por observación microscópica y por cuantificación de las células viables presentes sobre los cilindros por recuento sobre medio agar de soja Trypticase tras el desprendimiento de las células.

Descripción del protocolo de preparación de la composición

50 El componente detergente se prepara mezclando en un volumen de agua determinado un fosfonato, un poli(acrilato) y un humectante aniónico. Las proporciones respectivas en el componente detergente son 3%, 4% y 3%. El pH de la disolución se lleva a 13,3 por dilución. Se prepara una disolución del componente enzimático. Esta comprende una proporción de 30% de proteasas (EC 3.4.21), 30% de lacasa (EC 1.10.3.2) y 10% de alfa-amilasa (EC 3.2.1.1). El pH de la disolución del componente enzimático se lleva a 9 por adición progresiva de una disolución de hidróxido potásico. La disolución de la composición según la invención se prepara por adición en agua del componente detergente y del componente enzimático. La disolución de dicha composición según la invención comprende 1% de

componente detergente y 0,05% de componente enzimático. El pH de la disolución de dicha composición según la invención era aproximadamente 10.

Descripción de las pruebas y de sus resultados

Prueba con la cepa de *Pseudomonas fluorescens*

5 El gráfico representado en la FIG. 1 muestra la cantidad de biopelícula presente sobre la pared del cilindro tras la aplicación de disoluciones de tratamientos según las condiciones enunciadas anteriormente. Las superficies del sustrato han sido recubiertas por una biopelícula formada por la cepa de *Pseudomonas fluorescens*. La cantidad inicial de biopelícula presente antes del tratamiento se ha indicado como A1 en la FIG. 1. Se han comparado a continuación tres disoluciones: una disolución que comprende únicamente agua (B1), una disolución de sosa al 0,5% (C1) y una disolución de la composición según la invención (D1). Las disoluciones se han aplicado con un caudal de 300 l/h y una temperatura de 45°C. La disolución (B1) que comprende agua permite evaluar el desprendimiento mecánico de las biopelículas por el flujo. Se observa así que la biopelícula se ha resistido al desprendimiento mecánico, puesto que las cantidades de biopelícula son idénticas (barras A1 y B1). La aplicación de una disolución de la composición según la invención ha permitido una reducción importante de la biopelícula (barra D1, 10³ UFC) con relación a una disolución de sosa (barra C1, 10⁵ UFC). Por tanto la composición según la invención es más eficaz que un tratamiento de referencia (disolución de sosa) sobre una biopelícula resistente al desprendimiento mecánico. La FIG. 4 presenta varias imágenes de la superficie de un sustrato tomadas con un microscopio de epifluorescencia tras la aplicación de las diferentes disoluciones de tratamiento a 300 l/h. La imagen (A4) muestra la superficie del sustrato sometido a una disolución de agua, la imagen (B4) muestra la superficie del sustrato sometido a una disolución de sosa al 0,5% y la imagen (C4) muestra la superficie del sustrato sometido a una disolución de la composición según la invención. Estos datos muestran claramente que la composición según la invención ha eliminado la totalidad de la matriz de las biopelículas (coloración difusa), dejando sobre las superficies nada más que células aisladas o pequeños grupos de células distribuidas sobre una sola capa, no protegidas por una matriz. La disolución de sosa no ha permitido por sí sola la eliminación completa de la matriz (coloración difusa), que protege siempre parcialmente las células residuales. Por tanto una fase de desinfección ulterior será mucho más eficaz tras la aplicación de una disolución de la composición según la invención.

Prueba con la cepa de *Bacillus mycoïdes*

El gráfico representado en la FIG. 2 muestra la cantidad de biopelícula presente sobre la pared del cilindro tras la aplicación de disoluciones de tratamiento según las condiciones enunciadas anteriormente. Las superficies del sustrato han sido recubiertas por una biopelícula formada por la cepa de *Bacillus mycoïdes*. La cantidad de biopelícula presente antes del tratamiento se recoge en la barra (A2). A continuación se han comparado cinco disoluciones: una disolución que comprende únicamente agua (B2), una disolución de sosa al 0,5% (C2), una disolución de la composición según la invención (D2 y F2), y una disolución de sosa al 2% (E2). Las disoluciones A2-D2 se han aplicado con un caudal de 300 l/h, mientras que las disoluciones E2-F2 se han aplicado con un caudal de 600 l/h. La biopelícula de *Bacillus mycoïdes* es relativamente sensible al desprendimiento mecánico, habiendo disminuido su cantidad al 90% por aplicación de la disolución B2. La aplicación de la disolución de la composición según la invención (D2 y F2) ha mostrado resultados equivalentes a la disolución de sosa (C2 y E2) ya sea con caudal de 300 l/h o de 600 l/h. La FIG. 5 representa varias imágenes de la superficie del sustrato tomadas con el microscopio de epifluorescencia tras la aplicación de las diferentes disoluciones de tratamiento a 300 l/h. La imagen (A5) muestra la superficie del sustrato sometido a una disolución de agua, la imagen (B5) muestra la superficie del sustrato sometido a una disolución de sosa al 0,5% y la imagen (C5) muestra la superficie del sustrato sometido a una disolución de la composición según la invención. Estos datos muestran claramente que la composición según la invención ha eliminado casi la totalidad de la matriz de las biopelículas, dejando nada más que células aisladas o pequeños grupos de células distribuidas sobre una sola capa, no protegidas por una matriz. La disolución de sosa no ha permitido una eliminación más eficaz de la biopelícula. La acción posterior de una disolución desinfectante será, por tanto, más eficaz si una disolución de la composición según la invención se ha utilizado anteriormente.

Prueba con la cepa de *Bacillus cereus*

El gráfico representado en la FIG. 3 muestra la cantidad de biopelícula presente sobre la pared del cilindro tras la aplicación de disoluciones de tratamientos según las condiciones enunciadas anteriormente. Las superficies del sustrato han sido recubiertas por una biopelícula formada por la cepa de *Bacillus cereus*. La cantidad de biopelícula presente antes del tratamiento se recoge en la barra A3. Se han comparado cinco disoluciones: una disolución que comprende únicamente agua (B3), una disolución de sosa al 0,5% (C3), una disolución de la composición según la invención (D3 y F3), y una disolución de sosa al 2% (E3). Las disoluciones B3, C3, D3 se han aplicado con un caudal de 300 l/h, mientras que las disoluciones E3 y F3 se han aplicado con un caudal más elevado (600 l/h). Un caudal más elevado influye en el desprendimiento mecánico. La biopelícula de *Bacillus cereus* es resistente totalmente al desprendimiento mecánico (barra A3 y B3). La composición según la invención ha mostrado una mayor eficacia a un caudal de 300 l/h con relación a una disolución de sosa al 0,5% (barra C3) e incluso a un caudal de 600 l/h con relación a una disolución de sosa más concentrada (barra E3). La FIG. 6 representa varias imágenes de la superficie de un sustrato tomadas con microscopio de epifluorescencia tras la aplicación de las diferentes disoluciones de tratamiento. La imagen (A6) muestra la superficie del sustrato sometido a una disolución de agua, la

imagen (B6) muestra la superficie del sustrato sometido a una disolución de sosa al 0,5% y la imagen (C6) muestra la superficie del sustrato sometido a una disolución de la composición según la invención. Estas imágenes muestran de nuevo que la composición según la invención elimina casi la totalidad de la matriz de las biopelículas, dejando nada más que células aisladas o pequeños grupos de células distribuidas sobre una sola capa, no protegidas por una matriz. La disolución de sosa no permite una eliminación eficaz de la biopelícula. La fase de desinfección del sustrato después de la fase de eliminación de la biopelícula será, por tanto, más eficaz tras la aplicación de una disolución de la composición según la invención durante esta fase de eliminación.

Las diferentes pruebas realizadas en este ejemplo demuestran la eficacia de la composición según la invención para la eliminación de una biopelícula sobre un sustrato. La composición según la invención resulta ser más eficaz que una disolución de sosa usada frecuentemente en la técnica anterior. La composición según la invención se muestra también muy eficaz para varios tipos de biopelícula resultantes de bacterias diferentes. Por tanto la composición según la invención proporciona una solución eficaz a los problemas mencionados en la técnica y conocidos por el profesional.

Ejemplo 2

También se han realizado pruebas sobre dos líneas de producción en la industria (industria de producción de mantequilla y margarina). Se colocan retazos de acero inoxidable (8*1 cm) durante 15 días en circuitos de producción que presentan contaminaciones esporádicas. Esos retazos se someten, por tanto, a los ciclos de producción y de limpieza estándar de esas instalaciones. La presencia de biopelícula en la instalación se ha determinado por el desarrollo de una biopelícula sobre los retazos. Se ha aplicado en la instalación un procedimiento de limpieza in situ específico y haciendo intervenir la composición según la invención, en presencia de los retazos contaminados, y cuya eficacia se ha demostrado por la eliminación de las biopelículas formadas sobre los retazos. La presencia y la importancia de las biopelículas sobre los retazos se han determinado en el laboratorio por coloración de los retazos y comparación de la coloración obtenida con una escala visual (método HYDROBIO®, BKG), así como por observación en el microscopio óptico (40x y 100x).

Se han probado dos protocolos de limpieza: el primer protocolo ha servido de referencia y corresponde a la aplicación de disoluciones conocidas en la técnica, el segundo protocolo corresponde a la adición de una etapa de aplicación de una disolución de la composición según la invención.

En particular, el protocolo I comprende las etapas siguientes: limpieza con agua, limpieza alcalina, enjuague, saneamiento (o desinfección) y enjuague final. El protocolo I se ha aplicado cada 32 horas durante una semana. La limpieza con agua se ha aplicado durante 15 minutos a una temperatura comprendida entre 60 y 65°C. La limpieza alcalina permite limpiar las canalizaciones de la materia orgánica presente después de un ciclo de producción. Esta etapa se ha realizado con una disolución de sosa al 3,5% que se ha aplicado durante 2*15 minutos a una temperatura comprendida entre 70-75°C. La etapa de saneamiento permite la eliminación de los gérmenes eventualmente aún presentes, pero no protegidos por la matriz de la biopelícula. Esta etapa comprende la aplicación de una disolución de Deptil OX al 1,5% (HYPRED) durante 2*15 minutos a una temperatura comprendida entre 20 y 25°C. La disolución de Deptil OX contiene una mezcla de ácido peracético y de peróxido de hidrógeno. Las etapas de enjuague se han realizado durante 15 minutos a una temperatura comprendida entre 20 y 25°C.

El protocolo II se diferenciaba del protocolo I en que comprendía una etapa de limpieza específica antes de la etapa de saneamiento (o desinfección). Además, el protocolo II no se ha aplicado más que una sola vez. La etapa de limpieza específica consistía en la aplicación de una disolución de la composición según la invención. Esa mezcla se ha aplicado durante 30 minutos a una temperatura comprendida entre 40 y 45°C. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 1.

Tabla 1

	Cantidad de biopelícula según el protocolo I (g/m ²)	Cantidad de biopelícula según el protocolo II (g/m ²)
Línea de producción 1	25	< 5
Línea de producción 2	25 a 35	< 5

El protocolo I no ha permitido limitar e impedir el crecimiento de una biopelícula a pesar de la etapa de saneamiento (desinfección). Por tanto, la biopelícula que se ha formado sobre los retazos de acero inoxidable en el núcleo de la instalación es muy resistente. La aplicación del protocolo II que incluye una etapa de limpieza específica con una disolución de la composición según la invención ha permitido una eliminación mucho más eficaz de esa biopelícula, (bajo el límite de detección) de esa biopelícula. Ha demostrado así una eficacia superior de la limpieza específica que proporciona por tanto una solución innovadora a los problemas de la técnica anterior.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición para la eliminación de biopelículas presentes sobre un sustrato, comprendiendo dicha composición un componente detergente que contiene un secuestrante y un componente enzimático que contiene al menos una proteasa y al menos una lacasa, caracterizándose dicha composición por que dicho componente detergente contiene además un humectante y un dispersante y por que dicho componente enzimático comprende además al menos una polisacaridasa.
2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada por que la composición es una disolución que tiene un pH comprendido entre aproximadamente 8 y 11.
- 10 3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizada por que el componente enzimático comprende una proporción de proteasa comprendida entre 10 y 50%, una proporción de lacasa comprendida entre 5 y 35% y una proporción de polisacaridasa comprendida entre 5 y 20%.
4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que la al menos una polisacaridasa es una alfa-amilasa.
- 15 5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que el componente detergente comprende una proporción de secuestrante comprendida entre 1 y 10%, una proporción de dispersante comprendida entre 1 y 10% y una proporción de humectante comprendida entre 1 y 15%.
6. Método para la eliminación de biopelículas presentes sobre un sustrato, caracterizado por que comprende las siguientes etapas de:
- 20 a) suministro de un componente detergente que contiene un secuestrante, un dispersante y un humectante; y de un componente enzimático que contiene al menos una proteasa, al menos una lacasa, y al menos una polisacaridasa,
- b) disolver o diluir el componente detergente en agua,
- c) disolver el componente enzimático en la disolución formada en la etapa b) para formar la disolución de dicha composición según las reivindicaciones 1 a 5,
- 25 o b') disolver o diluir el componente enzimático en agua,
- c') disolver el componente detergente en la disolución formada en la etapa b') para formar la disolución de dicha composición según las reivindicaciones 1 a 5,
- d) aplicación de la disolución de dicha composición formada en la etapa c) o c') sobre el sustrato durante un periodo de 15 minutos a 4 horas.
- 30 7. Método según la reivindicación 6, caracterizado por que el método comprende además una etapa ulterior de aplicación de un biocida sobre el sustrato.
8. Método según la reivindicación 6 ó 7, caracterizado por que el pH de la disolución de dicha composición está comprendido entre 8 y 11.
- 35 9. Utilización de una composición según las reivindicaciones 1 a 5 para la eliminación de biopelículas presentes sobre un sustrato.
10. Utilización según la reivindicación 9 de una composición según las reivindicaciones 1 a 5 para la limpieza de suelos y superficies, para la limpieza in situ o remojo.
11. Utilización según la reivindicación 10 en la que dicha limpieza por remojo se utiliza para limpiar material quirúrgico.
- 40 12. Estuche para la eliminación de biopelículas sobre un sustrato, caracterizado por que comprende al menos una muestra de un componente detergente en disolución o en forma sólida que contiene un secuestrante, un dispersante y un humectante, y al menos una muestra de un componente enzimático en disolución o en forma sólida que contiene al menos una proteasa, al menos una lacasa y al menos una polisacaridasa.
- 45 13. Estuche según la reivindicación 12, caracterizado por que la muestra del componente enzimático es una disolución acuosa cuyo pH está comprendido entre 8 y 10.
14. Estuche según la reivindicación 12 ó 13, caracterizado por que la muestra del componente detergente es una disolución acuosa cuyo pH está comprendido entre 12,8 y 13,8.

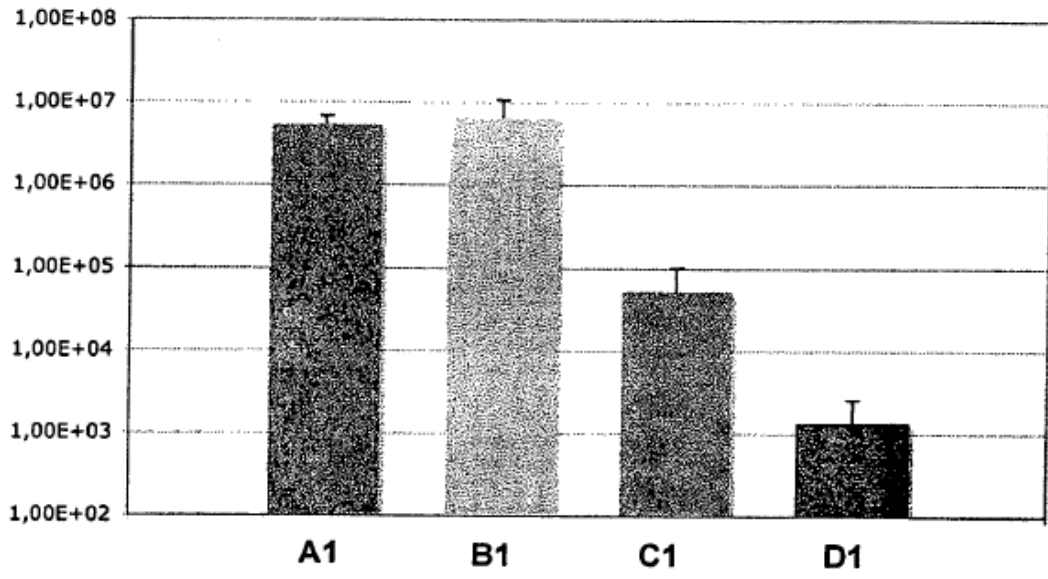


FIG. 1

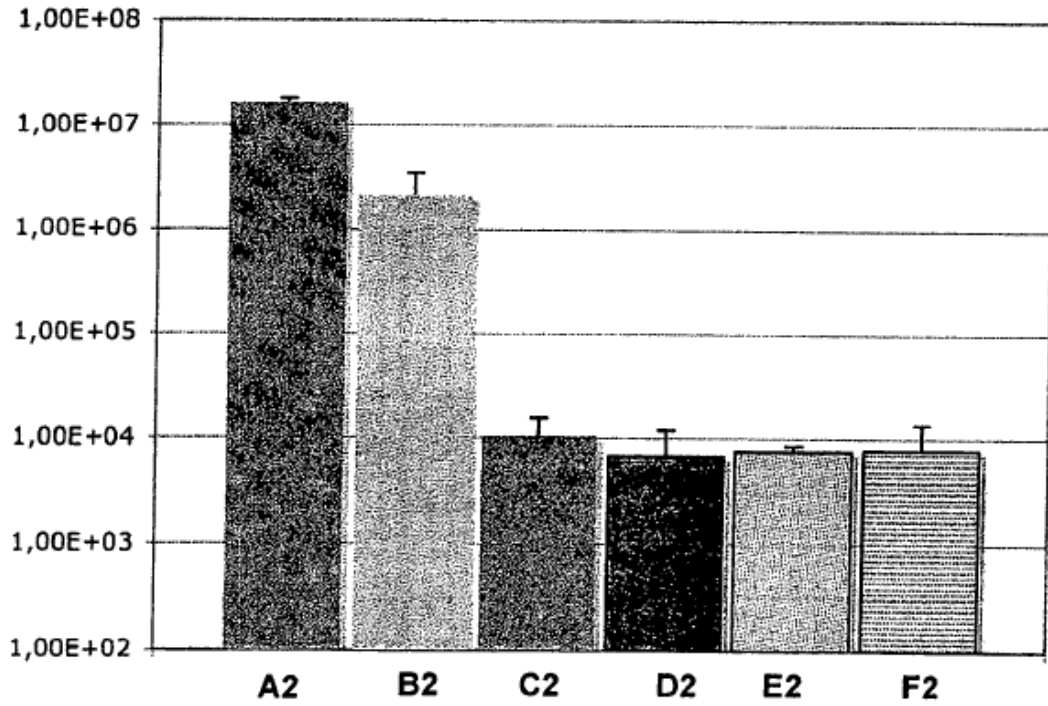


FIG. 2

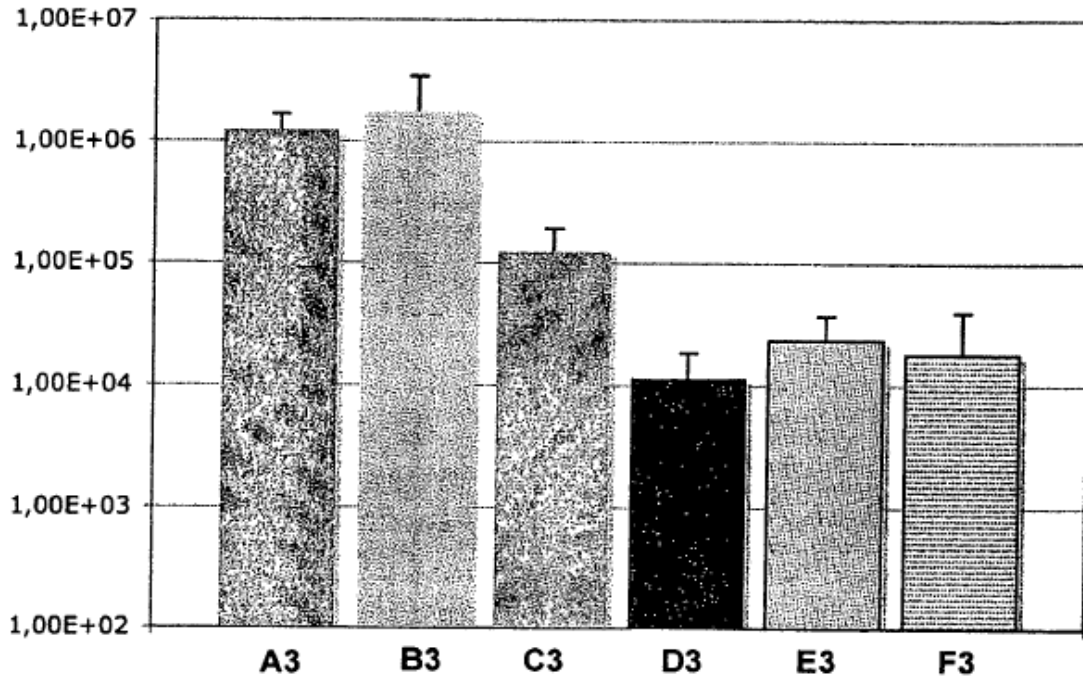


FIG. 3

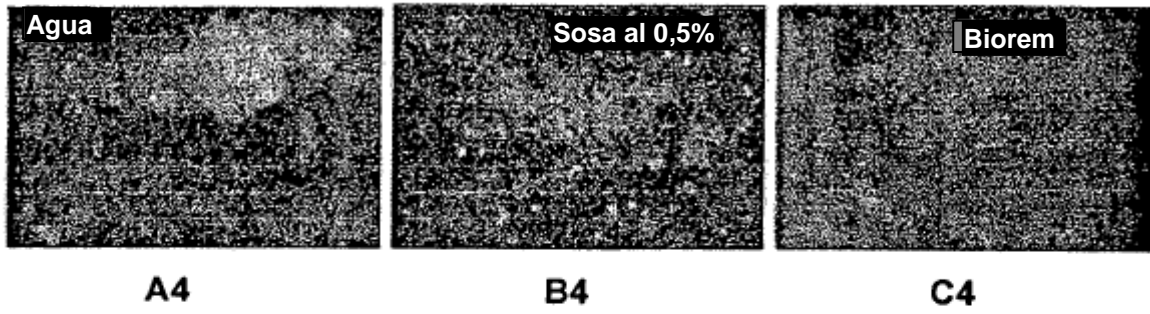


FIG. 4

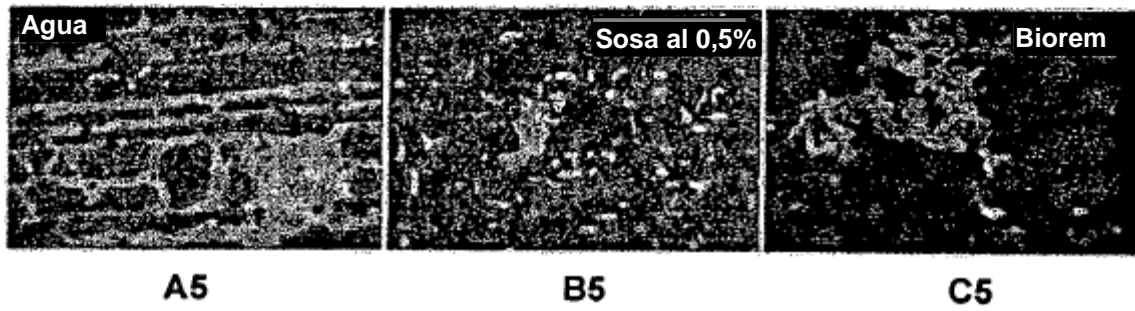


FIG. 5

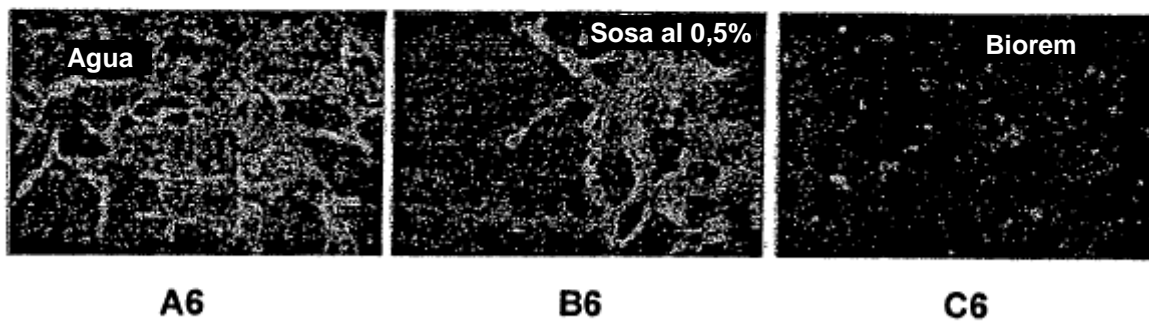


FIG. 6