

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 167 022**

⑤ Int. Cl.⁷: A61L 2/18

⑫

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧ Número de solicitud europea: **97949991.0**

⑧ Fecha de presentación: **16.12.1997**

⑧ Número de publicación de la solicitud: **0 946 207**

⑧ Fecha de publicación de la solicitud: **06.10.1999**

⑤ Título: **Método para el tratamiento enzimático de biopelículas.**

③ Prioridad: **18.12.1996 DK 1446/96**

④ Fecha de la publicación de la mención BOPI:
01.05.2002

④ Fecha de la publicación del folleto de patente:
01.05.2002

⑦ Titular/es: **Novozymes A/S**
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd, DK

⑦ Inventor/es: **Johansen, Charlotte**

⑦ Agente: **Tomás Gil, Tesifonte-Enrique**

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).

DESCRIPCION

Método para el tratamiento enzimático de biopelículas.

5 La presente invención se refiere a un método para limpiar y desinfectar una superficie cubierta por una capa de biopelículas; y a una composición de limpieza y/o desinfección para su uso en dicho método.

Estado de la técnica

10 En los ecosistemas limitados de nutrientes, las bacterias presentan una tendencia pronunciada a adherirse a las superficies e iniciar la formación de una biopelícula. Una biopelícula es una comunidad de microbios, incrustados en una matriz polimérica orgánica, que se adhiere a una superficie. En los ecosistemas industriales y naturales limitados de nutrientes, las células de la biopelícula predominarán y
15 causarán problemas como, por ejemplo, una resistencia friccional incrementada ante los fluidos en los conductos de agua y en los cascos de los barcos (contaminación), una disminución de la transferencia de calor de los intercambiadores térmicos, una corrosión de los substratos metálicos y contaminación en la industria de los alimentos y de la biotecnología. Las biopelículas también constituyen un grave problema en la ciencia médica y en la industria ya que causan placa dental, contaminación de endoscopios y lentes de contacto, colonización de un dispositivo prostético y formación de biopelículas en implantes médicos.

20 La matriz de la biopelícula es un grupo de microcolonias con canales de agua entre medias y una variedad de células y polímeros extracelulares (polisacáridos, glicoproteínas, proteínas). Los polisacáridos extracelulares bacterianos se componen de homo- y heteropolisacáridos, particularmente, complejos basados en glucosa, fucosa, manosa, galactosa, fructosa, piruvato, ácido manurónico o ácido glucurónico. Los
25 diferentes enlaces entre los sacáridos dan origen a una multitud de polisacáridos diferentes que incluyen levanos, polimananos, dextranas, celulosa, amilopectina, glicógeno y alginato.

Las bacterias que crecen en las biopelículas son más resistentes a los antibióticos y a los desinfectantes que las células planctónicas y la resistencia aumenta con la edad de la biopelícula. La biopelícula bacteriana también muestra una resistencia física incrementada ante la disecación, las temperaturas extremas
30 o la luz. Tal y como se menciona, la formación de biopelículas causa problemas industriales, medioambientales y médicos y dichas dificultades a la hora de limpiar y desinfectar biopelículas bacterianas con productos químicos constituye un asunto de la mayor importancia en muchas industrias. Además, la tendencia hacia unas composiciones de limpieza y desinfección menos fuertes puede crear una mayor
35 insuficiencia en cuanto a la limpieza de superficies cubiertas por biopelículas.

El objeto de la presente invención consiste en proporcionar un método eficaz y que respeta el medio ambiente para eliminar las biopelículas y las células bacterianas vivas presentes en una superficie.

Resumen de la invención

40 Se ha descubierto sorprendentemente que se puede desinfectar y eliminar las biopelículas presentes en una superficie mediante un tratamiento enzimático con al menos dos enzimas diferentes capaces de eliminar/liberar la biopelícula de la superficie y de matar las células microbianas vivas, respectivamente.

45 En consecuencia, la presente invención se refiere a un método para limpiar y desinfectar una superficie cubierta, al menos parcialmente, por una capa de biopelículas, cuyo método comprende los siguientes pasos consecutivos o simultáneos:

- 50 a. poner en contacto la biopelícula con una composición de limpieza que comprenda una o más hidrolasas en una cantidad eficaz para eliminar o liberar completa o parcialmente la capa de biopelículas de la superficie; y
- b. poner en contacto la biopelícula con una composición de desinfección bactericida que comprenda una oxidorreductasa en una cantidad eficaz para matar las células bacterianas vivas presentes en la
55 biopelícula.

En otros aspectos, la invención se refiere a una composición enzimática de limpieza y/o desinfección y al uso de dicha composición para limpiar o desinfectar superficies cubiertas por biopelículas.

60 El método puramente enzimático según la invención resulta ventajoso, puesto que establece una limpieza y desinfección muy eficaces mientras que, al mismo tiempo, no es ni agresiva, ni peligrosa, ni tóxica y, a la vez, respeta el medioambiente.

Descripción detallada de la invención

El término “limpieza”, como se utiliza en la presente, se pretende que haga referencia a la eliminación completa o parcial de los materiales indeseados, p. ej., las biopelículas. Dicha eliminación puede tener lugar debido a la degradación total o parcial de la biopelícula por causa de la acción catalítica de las enzimas.

El término “desinfección”, como se utiliza en la presente, se pretende que haga referencia a la capacidad de matar células microbianas vivas, es decir, células bacterianas, fúngicas o de levaduras.

En el presente contexto, el término “bactericida” se entiende como capaz de matar células bacterianas.

La superficie

El término “superficie” como se utiliza en la presente se refiere a cualquier superficie que pueda estar cubierta por una capa de biopelículas. Algunos ejemplos de superficies pueden ser cualquier superficie dura como, por ejemplo, materiales de metal, plástico, caucho, cartón, cristal, madera, papel, hormigón, roca, mármol, yeso y cerámica que estén cubiertos opcionalmente, p. ej, por una pintura, esmalte, etc.; o cualquier superficie blanda como, por ejemplo, fibras de cualquier tipo (hilo, textiles, fibras vegetales, lana de roca, pelo, etc.); o superficies porosas; piel (humana o animal); materiales queratinosos (uñas, etc.). La superficie dura puede estar presente en un elemento del equipo de procesamiento de una torre de refrigeración, una planta de tratamiento de agua, una lechería, una planta de procesamiento de alimentos, una planta de procesamiento farmacéutico o químico. La superficie porosa puede estar presente en un filtro, p. ej., un filtro de membrana. En consecuencia, la composición y el método según la presente invención también resulta útil en un sistema convencional de limpieza in situ (C-I-P).

La biopelícula

Una biopelícula puede comprender un gran número de microorganismos diferentes o puede incluir un microorganismo específico a modo de microbio predominante.

En una forma de realización preferida de la presente invención, la biopelícula a tratar está dominada o caracterizada por células bacterianas indeseadas, células preferiblemente vivas seleccionadas de los géneros bacterianos *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Aeromonas* o de la familia *Enterobacteriaceae* (incluyendo, p. ej., la *Escherichia coli*).

Las enzimas

En una forma de realización preferida de la presente invención, la(s) hidrolasa(s) a emplear son seleccionada(s) del grupo consistente en glucosidasas, es decir, las celulosas (endoglucanasas, celobiohidrolasas, β -glucosidasas), las hemicelulasas (xilanasas, mananasas, esterasas acetilicas de xilano), las pectinasas (arabinanasas, α -arabino-furanosidasas, galactanasas, pectinliasas, pectin metilesterasas, poligalacturonasas, acetilesterasas de ramnogalacturonano, ramnogalacturonasas), las amilasas; las proteasas y las lipasas.

Las hidrolasas a emplear pueden ser seleccionadas según las propiedades, en caso de que se conozcan, de la biopelícula específica a eliminar o bien se puede emplear una combinación de diferentes hidrolasas que presenten actividades enzimáticas diferentes.

Algunos ejemplos de enzimas específicas capaces de degradar las biopelículas son: manohidrolasa de 1,2-1,3- α -D-manano, xilanhidrolasa de 1,3- β -D-xilano, glucanhidrolasa de 1,3- β -D-glucano, 3-glucanhidrolasa de 1,3(1,3-1,4)- α -D-glucano, 3(4)-glucanhidrolasa de 1,3(1,3-1,4)- β -D-glucano, 4-glucanhidrolasa de 1,3-1,4- α -D-glucano, glucanhidrolasa de 1,4- α -D-glucano, glucohidrolasa de 1,4- α -D-glucano, 4-glucanhidrolasa de 1,4-(1,3:1,4)- β -D-glucano, glucohidrolasa de 1,4- β -D-glucano, xilanhidrolasa de 1,4- β -D-xilano, mananhidrolasa de 1,4- β -D-manano, 1,5- α -L-arabinanhidrolasa de 1,5- α -L-arabinano, maltohidrolasa de 1,4- α -D-glucano, 6-glucanhidrolasa de 1,6- α -D-glucano, fructanhidrolasa de 2,6- β -D-fructano, 6-glucanhidrolasa-Dextrin, galactohidrolasa de α -D-galactosida, glucohidrolasa de α -D-glucosida, manohidrolasa de α -D-manosida, hidrolasa de acilneuraminilo, galactohidrolasa del *Aerobacter*-capsular-polisacárido, fructohidrolasa de β -D-fructofuranosida, fucohidrolasa de β -D-fucosida, fructohidrolasa de β -D-fructano, galactohidrolasa de β -D-galactoside, glucohidrolasa de β -D-glucosida, β -D-glucuronosida, glucuronosohidrolasa, manohidrolasa de β -D-manosida, hidrolasa de N-acetilhexosamino de β -N-acetil-D-hexosaminida, sulfhidrolasa de celulosa-sulfato, co-

lagenasa, 6- α -D-glucanoidrolasa de dextrina, fosfatidohidrolasa de glicoproteína-fosfatidilinositol, 4-glicanohidrolasa de hialuronato, hialuronoglucuronidasa, pectilhidrolasa de pectina, peptidoglicano de N-acetilmuramoilhidrolasa, 2-acilhidrolasa de fosfatidicolina, 1-acilhidrolasa de fosfatidicolina, poli(1,4- α -D-galacturonida), poli(1,4-(N-acetil- β -D-glucosaminida))-glicanohidrolasa, proteasas, α -glucosidasa de sucrosa, acilhidrolasa de triacilglicerol, proteína-acilhidrolasa de triacilglicerol.

Una enzima hidrolítica útil para el método según la presente invención es cualquier enzima que presente actividad proteolítica en condiciones de procesamiento reales. De este modo, la enzima puede ser una enzima proteolítica de origen vegetal, p. ej., la papaina, la bromelaina y la ficina, o de origen animal, p. ej., la tripsina y la quimotripsina, o de origen microbiano, es decir, de origen bacteriano o fúngico o derivado de levaduras. Debe entenderse que se puede aplicar cualquier mezcla de varias enzimas proteolíticas en el proceso según la invención.

En una forma de realización preferida según la invención, la enzima proteolítica es una serina proteasa, una metaloproteasa o una aspartato proteasa. Una serina proteasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces péptidos y en la que hay un residuo de serina esencial en el sitio activo. Se inhiben a través de un diisopropilfluorofosfato pero, a diferencia de las metaloproteasas, son resistentes al ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (aunque se estabilizan a temperaturas elevadas mediante iones de calcio). Estos hidrolizan los ésteres de los terminales simples y son similares en cuanto a su actividad a la quimiotripsina eucariótica, que también es una serina proteasa. Un término más restringido, el de proteasa alcalina, que cubre un subgrupo, refleja el pH óptimo elevado de algunas serina proteasas, de entre pH 9.0 y 11.0. Las serina proteasas normalmente muestran una actividad proteolítica máxima en el margen de un pH alcalino, mientras que las metaloproteasas y las aspartato proteasas normalmente muestran una actividad proteolítica máxima en el margen de un pH ácido y neutro, respectivamente.

Normalmente se hace referencia a un subgrupo de serina proteasas con el nombre de subtilisinas. Una subtilisina es una serina proteasa producida por hongos o bacterias gram-positivas. Se ha determinado la secuencia de aminoácidos de un número de subtilisinas, incluyendo al menos seis subtilisinas de la cepa *Bacillus*, es decir, la subtilisina 168, la subtilisina BPN, la subtilisina Carlsberg, la subtilisina DY, los amilosacáridos de subtilisina y la mesentericopeptidasa de *Thermoactinomyces vulgaris* y una subtilisina fúngica, la proteinasa K de *Tritirachium album*. Más recientemente se ha reconocido otro subgrupo de subtilisinas, las subtilasas. Las subtilasas se describen como subtilisinas altamente alcalinas y comprenden enzimas como la subtilisina PB92 (MAXACAL[®], Gist-Brocades NV), la subtilisina 309 (SAVINASE[®], Novo Nordisk A/S) y la subtilisina 147 (ESPERASE[®], Novo Nordisk A/S).

En el contexto de esta invención, una variante de subtilisina o una proteasa de subtilisina mutada se refiere a una subtilisina producida por un organismo que expresa un gen mutante derivado de un microorganismo padre que poseía un gen original o gen padre que produjo una enzima madre correspondiente, dicho gen padre mutando sólo con el objetivo de producir el gen mutante a partir del que se produce dicha proteasa de subtilisina mutada cuando se expresa en un huésped adecuado. Estas subtilisinas mencionadas y sus variantes derivadas constituyen una clase preferida de proteasas útiles en el método según la invención. Un ejemplo de variante de subtilisina útil es una variante de la subtilisina 309 (SAVINASE[®]) en la que, en la posición 195, se sustituye la glicina por fenilalanina (G195F o de ¹⁹⁵Gly hasta ¹⁹⁵Phe).

Convenientemente, las proteasas comerciales convencionales fermentadas resultan útiles. Algunos ejemplos de este tipo de proteasas comerciales son la Alcalase[®] (producida por fermentación sumergida a partir de una cepa de *Bacillus licheniformis*), la Esperase[®] (producida por fermentación sumergida a partir de una especie alcalofílica de *Bacillus*), la Rennilase[®] (producida por fermentación sumergida a partir de una cepa no patógena de *Mucor miehei*), la Savinase[®] (producida por fermentación sumergida a partir de una cepa genéticamente modificada de *Bacillus*), p. ej., las variantes descritas en la Solicitud de Patente Internacional publicada como WO 92/19729, y la Durazym[®] (una variante modificada por ingeniería proteínica de Savinase[®]). Novo Nordisk A/S, DK-2880 Bagsvaerd, Dinamarca produce y vende todas las proteasas comerciales mencionadas. Otras serina proteasas preferidas son las proteasas de *Nocardopsis*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Bacillus alcalophilus*, *B. cereus*, *N. natto*, *B. vulgatus*, *B. mycoide* y las subtilinas de *Bacillus*, especialmente las proteasas derivadas de las especies *Nocardopsis sp.* y *Nocardopsis Dassionvillei* como las descritas en la Solicitud de Patente Internacional publicada como WO 88103947, especialmente las proteasas de las especies *Nocardopsis sp.*, NRRL, 18262, y *Nocardopsis Dassionvillei*, NRRL 18133. Otras proteasas preferidas son las serina proteasas derivadas de mutantes de *Bacillus subtilins* descritas en la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/DK89/00002 y en la Solicitud de Patente Internacional publicada como WO 91/00345, así como las proteasas descritas en la EP 415 296.

Otra clase preferida de proteasas son las metaloproteasas de origen microbiano. Convenientemente, las proteasas convencionales comerciales fermentadas resultan útiles. Algunos ejemplos de este tipo de proteasas comerciales son la Neutrase[®] (Zn) (producida por fermentación sumergida a partir de una cepa de *Bacillus subtilis*), producida y vendida por Novo Nordisk A/S, DK-2880 Bagsvaerd, Dinamarca.

Otras preparaciones enzimáticas proteásicas comerciales útiles son el Bactosol[®] WO y el Bactosol[®] SI, proporcionadas por Sandoz AG, Basle, Suiza; el Toyozyme[®] proporcionada por Toyo Boseki Co. Ltd., Japón; y la Proteinase K[®] (producida por fermentación sumergida a partir de una cepa de *Bacillus sp.* KSM-K16), proporcionada por Kao Corporation Ltd., Japón.

Otra enzima hidrolítica que puede resultar útil en el método según la presente invención es una lipasa microbiana. En consecuencia, la lipasa puede ser seleccionada de lipasas de levadura, p. ej. *Candida*, de lipasas bacterianas, p. ej., *Pseudomonas* o *Bacillus*; o de lipasas fúngicas, p. ej., *Humicola* o *Rhizomucor*. Más específicamente, las lipasas adecuadas pueden ser la lipasa *Rhizomucor miehei* (p. ej., la preparada en el modo descrito en la EP 238 023), la lipasa *Thermomyces lanuginosa*, p. ej., la preparada en el modo descrito en la EP 305 216 (proporcionada por Novo Nordisk bajo el nombre comercial de LipolaseTm), la lipasa *Humicola insolens*, la lipasa *Pseudomonas stutzeri*, la lipasa *Pseudomonas cepacia*, la lipasa *Candida antarctica* A o B o las lipasas derivadas de rGPL, *Absidia blakesleena*, *Absidia corymbifera*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium crustosum*, *Penicillium expansum*, *Rhodotorula glutinis*, *Tiarosporella phaseolina*, *Rhizopus microsporus*, *Sporobolomyces shibatanus*, *Aureobasidium pullulans*, *Hansenula anomala*, *Geotricum penicillatum*, *Lactobacillus curvatus*, *Brochotrix thermosohata*, *Coprinus cinerius*, *Trichoderma harzanium*, *Trichoderma reesei*, *Rhizopus japonicus* o *Pseudomonas plantari*. Otros ejemplos de lipasas adecuadas pueden ser las variantes de cualquier lipasa anteriormente mencionada, p. ej., como las descritas en la WO 92/05249 o en la WO 93/11254.

Algunos ejemplos de amilasas útiles en el método según la presente invención incluye las amilasas de *Bacillus*, p. ej., la amilasa *Bacillus stearothermophilus*, la amilasa *Bacillus amyloliquefaciens*, la amilasa *Bacillus subtilis* o la amilasa *Bacillus licheniformis* (p. ej., como las proporcionadas por Novo Nordisk bajo el nombre comercial Termamyl[®]) o las amilasas *Aspergillus*, p. ej. la amilasa *Aspergillus niger* o la amilasa *Aspergillus oryzae*. Otros ejemplos de amilasas adecuadas pueden ser las variantes de cualquiera amilasa anteriormente mencionada, p. ej., las descritas en la US 5,093,257, en la EP 252 666, en la WO 91/00353, en la FR 2,676,456, en la EP 285 123, en la EP 525 610 y en la PCT/DK93/00230.

Otra enzima hidrolítica útil es una “celulasa” o “enzima celulolítica” que se refiere a una enzima que cataliza la degradación de celulosa a glucosa, celobiosa, triosa y otros celooligosacáridos. Preferiblemente, la celulasa es una endoglucanasa, aunque se prefiere que sea una endoglucanasa microbiana, especialmente una endoglucanasa bacteriana o fúngica. Algunos ejemplos de endoglucanasas bacterianas son las endoglucanasas derivadas de bacterias o las que se pueden producir a partir de bacterias del grupo de géneros consistentes en *Pseudomonas* o *Bacillus lautus*.

La celulasa o endoglucanasa puede ser una celulasa o una endoglucanasa ácida, neutra o alcalina, es decir, que muestre una actividad celulolítica máxima en el margen ácido, neutro o alcalino, respectivamente. En consecuencia, una celulasa o endoglucanasa útil es una celulasa o endoglucanasa ácida, preferiblemente una celulasa o endoglucanasa fúngica ácida, aunque se prefiere que sea una enzima de celulasa o endoglucanasa fúngica ácida con una actividad celulolítica sustancial a condiciones ácidas que se deriva a partir de hongos o se puede producir a partir de hongos del grupo de géneros consistentes en *Trichoderma*, *Actinomyces*, *Myrothecium*, *Aspergillus* y *Botritis*.

Una celulasa o endoglucanasa ácida útil preferida se deriva de hongos o se puede producir a partir de hongos del grupo de especies consistente en *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Myrothecium verrucaria*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Botritis cinerea*.

Otra celulasa o endoglucanasa útil es una celulasa o endoglucanasa neutra o alcalina, preferiblemente una celulasa o endoglucanasa fúngica neutra o alcalina, aunque se prefiere que sea una celulasa o endoglucanasa fúngica alcalina con una actividad celulolítica sustancial a condiciones alcalinas que se deriva de hongos o se produce a partir de hongos del grupo de géneros consistente en *Aspergillus*, *Penicillium*, *Myceliophthora*, *Humicola*, *Irpea*, *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Scopulariopsis*, *Chaetomium*, *Mycogone*, *Verticillium Myrothecium*, *Papulospora*, *Gliocladium*, *Cephalosporium* y *Acremonium*.

Una celulasa o endoglucanasa alcalina preferida se deriva de hongos o se produce a partir de hongos del grupo de especies consistente en *Humicola insolens*, *Fusarium oxysporum*, *Myceliophthora thermophile* o *Cephalosporium sp.*, preferiblemente del grupo de especies consistente en *Humicola insolens*, DSM 1800,

Fusarium oxysporum, DSM 2672, *Myceliophora thermophila*, CBS 117.65, o *Cephalosporium* sp., RYM-202.

Algunos ejemplos de xilanasas útiles en el método según la presente invención incluyen enzimas que presentan una actividad xilanolítica que se producen o se pueden producir a partir de una cepa seleccionada del grupo de especies consistente en *Humicola insolens* (ver, p. ej., WO 92/17573), *Aspergillus aculeatus* (una enzima que muestra una actividad de xilanasas, cuya enzima es inmunológicamente reactiva ante un anticuerpo creado contra una xilanasas purificada derivada de *Aspergillus aculeatus*, CBS 101.43, ver, p. ej., la WO 94/21785), *Bacillus pumilus* (ver, p. ej., la WO 92/03540), *Bacillus stearothermophilus* (ver, p. ej., la WO 91/18976 y la WO 91/10724), *Bacillus* sp. AC13 (especialmente el NCIMB de la cepa 40482, ver, p. ej., la WO 94/01532), *Trichoderma longibrachiatum* y *Chainia* sp. (ver, p. ej., la EP 0 353 342 A1), *Thermoascus aurantiacus* (ver, p. ej., la Patente US 4,966,850), *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma reesei* (ver, p. ej., la Patente US 4,725,544), *Aureobasidium pullulans* (ver, p. ej., la EP 0 373 107 A2), *Thermomyces lanuginosus* (ver, p. ej., la EP 0 456 033 A2), *Bacillus circulans* (WO 91/18978), *Aspergillus oryzae* (ver, p. ej., la SU 4610007), *Thermomonospora fusca* (ver, p. ej., la EP 0 473 545 A2), *Streptomyces lividans* (ver, p. ej., la WO 93/03155), *Streptomyces viridosporus* (ver, p. ej., la EP 496 671 A1), *Bacillus licheniformis* (ver, p. ej., la JP 9213868) y *Trichoderma longibrachiatum* [ver W.J.J. van den Tweel et al. (Eds.), "Stability of Enzymes", Procedimientos de un Simposio Internacional celebrado en Maastricht, Países Bajos, 22-25 de noviembre de 1992, Fisk, R. S. y Simpson, págs. 323-328]; o del grupo de géneros que consiste en *Thermotoga* (ver, p. ej., la WO 93/19171), *Rhodothermus* (ver, p. ej., la WO 93/08275), *Dictyoglomus* (ver, p. ej., la WO 92/18612) y *Streptomyces* (ver, p. ej., la Patente US 5,116,746). Otros ejemplos de xilanasas adecuadas puede ser variantes (derivadas u homólogas) de cualquiera de las enzimas anteriormente mencionadas que presenten una actividad xilanolítica.

Una pectinasa útil puede ser una enzima que pertenezca a una de las siguientes clases de enzimas: las poligalacturonasas (EC 3.2.1.15), las pectinesterasas (EC 3.2.1.11), las pectinliasas (EC 4.2.2.10) y las hemicelulasas como la endo-1,3-b-xilosidasa (EC 3.2.1.32), la 1,4-b-xilosidasa de xilano (EC 3.2.1.37) y la α -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55). Un organismo original adecuado de pectinasas puede ser el *Aspergillus Niger*.

En una forma de realización preferida, la composición de limpieza comprende una composición enzimática hidrolítica producida por una cepa del hongo *Aspergillus aculeatus*, preferiblemente del *Aspergillus aculeatus*, CBS 101.43. Se sabe que esta cepa produce una composición enzimática que incluye actividades enzimáticas pectolíticas y hemicelulolíticas. La(s) hidrolasa(s) está(n) presentes en la composición de limpieza en una cantidad de aproximadamente entre 0,01 y 5000 μ g proteína/ml de composición, preferiblemente de aproximadamente entre 1 y 500 μ g proteína/ml de composición.

El término "oxidorreductasa", tal como se utiliza en la presente, denota una enzima clasificada como EC 1. según la Nomenclatura de enzimas (1992), es decir, cualquier enzima clasificada como EC 1.1 (que actúa sobre el grupo CH-OH de donadores), EC 1.2 (que actúa sobre el grupo aldehído u oxo de donadores), EC 1.3 (que actúa sobre el grupo CH-CH de donadores), EC 1.4 (que actúa sobre el grupo CH-NH₂ de donadores), EC 1.5 (que actúa sobre el grupo CH-NH de donadores), EC 1.6 (que actúa sobre NADH o NADPH), EC 1.7 (que actúa sobre otros compuestos nitrogenosos a modo de donadores), EC 1.8 (que actúa sobre un grupo sulfuro de donadores), EC 1.9 (que actúa sobre un grupo hem de donadores), EC 1.10 (que actúa sobre difenoles y sustancias relacionadas a modo de donadores), EC 1.11 (que actúa sobre un peróxido a modo de aceptante), EC 1.12 (que actúa sobre el hidrógeno a modo de donador), EC 1.13 (que actúa sobre los donadores simples con una incorporación de oxígeno molecular (oxigenasas)), EC 1.14 (que actúa sobre los donadores emparejados con la incorporación de oxígeno molecular), EC 1.15 (que actúa sobre los radicales de superóxido a modo de aceptante), EC 1.16 (iones metálicos de oxidación), EC 1.17 (que actúa sobre los grupos -CH₂-), EC 1.18 (que actúa sobre la ferredoxina reducida a modo de donador), EC 1.19 (que actúa sobre la flavodoxina reducida a modo de donador) y EC 1.97 (otras oxidorreductasas).

Preferiblemente, la oxidorreductasa a emplear según la invención son seleccionadas del grupo consistente en oxidasas, peroxidadas y lacasas, preferiblemente de las glucosa oxidasas, las aminoácido oxidasas, las aminoácido xantina oxidasas, oxidasas de ácido ascórbico, las lactoperoxidasas, las peroxidadas de alfalfa, las mieloperoxidasas, las lacasas, las peroxidadas coprinus y las haloperoxidasas.

Las lacasas son enzimas que catalizan la oxidación de un sustrato con oxígeno; se sabe que son de origen microbiano, vegetal y animal. Más específicamente, las lacasas (EC 1.10.3.2) son oxidorreductasas que funcionan con oxígeno molecular como aceptante electrónico. El oxígeno molecular procedente de la atmósfera en general se encuentra presente en cantidad suficiente, así que normalmente no es necesario

añadir oxígeno extra al medio de procesamiento. Algunos ejemplos de enzimas lacasa útiles en las composiciones según la presente invención son la lacasa que se puede obtener a partir de la cepa *Coprinus cinereus*, IFO 30116, o una lacasa que tenga propiedades inmunoquímicas idénticas a las de una lacasa derivada de *Cinereus coprinus*, IFO 30116; o que se pueda obtener a partir de una cepa de *Myceliophthora thermophila* como la descrita en la WO 91/05839.

Una peroxidasa útil se puede producir preferiblemente a partir de plantas (p. ej., peroxidasa de alfalfa o de soja) o a partir de microorganismos como los hongos o las bacterias. Algunos hongos preferidos incluyen cepas que pertenecen a la subdivisión Deuteromycotina, clase Hifomicetos, p. ej., *Fusarium*, *Humicola*, *Trichoderma*, *Myrothecium*, *Verticillium*, *Arthromyces*, *Caldariomyces*, *Ulocladium*, *Embellisia*, *Cladosporium* o *Dreschlera*, en particular *Fusarium oxysporum* (DSM 2672), *Humicola insolens*, *Trichoderma reesei*, *Myrothecium verrucaria* (IFO 6113), *Verticillium alboatrum*, *Verticillium dahliae*, *Arthromyces ramosus* (FERM P-7754), *Caldariomyces fumago*, *Ulocladium chartarum*, *Embellisia alli* o *Dreschlera halodes*. Otros hongos preferidos incluyen las cepas pertenecientes a la subdivisión Basidiomycotina, clase Basidiomicetos, p. ej., *Coprinus*, *Phanerochaete*, *Coriolus* o *Trametes*, en particular *Coprinus cinereus f. microsporus* (IFO 8371), *Coprinus macrorhizus*, *Phanerochaete chrysosporium* (p. ej., NA-12) o *Trametes* (que previamente recibía el nombre *Polyporus*), p. ej., *T. versicolor* (p. ej., PR4 28-A). Otros hongos preferidos incluyen cepas pertenecientes a la subdivisión Zygomycotina, clase Mycoraceae, p. ej., *Rhizopus* o *Mucor*, en particular la *Mucor hiemalis*. Algunas bacterias preferidas incluyen las cepas del orden Actinomycetales, p. ej., *Streptomyces spheroides* (ATTC 23965), *Streptomyces thermoviolaceus* (IFO 12382) o *Streptoverticillum verticillium ssp. verticillium*. Otras bacterias preferidas incluyen el *Bacillus pumilus* (ATCC 12905), el *Bacillus stearothermophilus*, el *Rhodobacter sphaeroides*, el *Rhodomonas palustri*, el *Streptococcus lactis*, el *Pseudomonas purrocinia* (ATCC 15958) o el *Pseudomonas fluorescens* (NRRL B-11). Otras bacterias preferidas incluyen cepas pertenecientes a *Myxococcus*, p. ej., *M. virescens*.

En el contexto de esta invención, los compuestos que poseen una actividad peroxidasa comprenden enzimas peroxidadas y fragmentos de peroxidasa activos derivados de citocromos, de hemoglobina o de enzimas peroxidadas, y sus derivados sintéticos o semisintéticos, p. ej., porfirinas de hierro y ftalocianina de hierro y sus derivados.

Generalmente, las enzimas a emplear en el método según la invención puede contar con enzimas de un solo componente (recombinantes), es decir, enzimas esencialmente libres de otras proteínas o proteínas enzimáticas. Una enzima recombinante puede ser clonada y expresada según las técnicas estándares convencionales para los expertos en la materia. Sin embargo, la enzima también se puede utilizar en forma de preparación enzimática opcionalmente enriquecida en una enzima que muestra la actividad enzimática deseada en forma de componente enzimático principal, p. ej., una preparación enzimática de un solo componente.

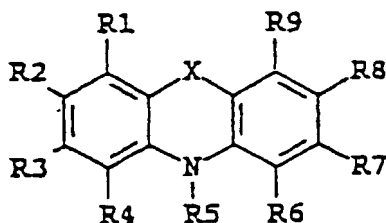
Particularmente, una peroxidasa producida por recombinación es una peroxidasa derivada de *Coprinus sp.*, en particular *C. macrorhizus* o *C. cinereus* según la WO 92/16634, o una variante derivada, p. ej., una variante como la descrita en la WO 94/12621. Sin embargo, la peroxidasa también se puede producir mediante fermentación convencional a partir de una cepa perteneciente al género *Coprinus*, preferiblemente la especie *Coprinus cinereus* o *Coprinus mactorhizus*, aunque se prefiere que sea *Coprinus cinereus*, IFO 8371 o IFO 30114.

En combinación con una peroxidasa, se prefiere emplear un agente de intensificación capaz de actuar como electrón-donador. Algunos ejemplos útiles de este tipo de intensificadores aparecen descritos a continuación.

A. Una fuente de yoduro iónico que se puede convertir enzimáticamente en yodo cuando entra en contacto con una enzima peroxidasa en una solución acuosa durante un período de tiempo y bajo unas condiciones suficientes como para permitir la conversión. En el presente contexto, una fuente preferida de yoduro iónico es una sal yódica hidrosoluble como, por ejemplo, una sal yódica de metal alcalino, p. ej., yoduro de potasio (KI), yoduro de sodio (NaI) o yoduro de litio, yoduro de amonio y yoduro de calcio. Se prefieren el yoduro de sodio y el yoduro de potasio.

B. Otro intensificador preferido es una fuente de ión de tiocianato (SCN^-), p. ej., el tiocianato sódico, el tiocianato potásico, el tiocianato amónico y otras sales de tiocianato, aunque se prefieren el tiocianato sódico y el tiocianato potásico.

C. Otro intensificador útil es el compuesto descrito mediante la siguiente fórmula:



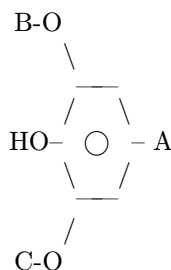
donde la fórmula X representa (-O-) o (-S-) y los grupos sustituyentes R¹-R⁹, que pueden ser idénticos o diferentes, representa independientemente cualquiera de los radicales siguientes: hidrógeno, halógeno, hidroxilo, formilo, carboxi y sus ésteres y sales derivadas, carbamoilo, sulfo y sus ésteres y sales derivadas, sulfamoilo, nitro, amino, fenilo, alquilo C₁-C₁₄, alcoxi C₁-C₅, carbonilo-C₁-C₅-alquilo, arilo-C₁-C₅-alquilo, cuyos grupos carbamoilo, sulfamoilo y amino, además, pueden ser sustituidos o no sustituidos una o dos veces con un grupo sustituyente R¹⁰; y cuyo fenilo, además, puede ser no sustituido o sustituido con uno o más grupos sustituyentes R¹⁰; y cuyos grupos alquilo C₁-C₁₄, alcoxi C₁-C₅, carbonilo-C₁-C₅-alquilo y arilo-C₁-C₅-alquilo pueden ser saturados o insaturados, ramificados o no ramificados y, además, pueden ser no sustituidos o sustituidos con uno o más grupos sustituyentes R¹⁰;

cuyo grupo sustituyente R¹⁰ representa cualquiera de los siguientes radicales: halógeno, hidroxilo, formilo, carboxi y sus ésteres y sales derivadas, carbamoilo, sulfo y sus ésteres y sales derivadas, sulfamoilo, nitro, amino, fenilo, aminoalquilo, piperidino, piperacinoilo, pirrolidin-1-il, alquilo C₁-C₅, alcoxi C₁-C₅; cuyos grupos carbamoilo, sulfamoilo y amino pueden, además, ser no sustituidos o sustituidos una o dos veces con hidroxilo, alquilo C₁-C₅, alcoxi C₁-C₅; y cuyo fenilo puede, además, ser sustituido con uno o más de los siguientes radicales: halógeno, hidroxilo, amino, formilo, carboxi y sus ésteres y sales derivadas, carbamoilo, sulfo y sus ésteres y sales derivadas, y sulfamoilo; y cuyos grupos alquilo C₁-C₅ y alcoxi C₁-C₅ pueden, además, ser saturados o insaturados, ramificados o no ramificados y, además, pueden ser sustituidos una o dos veces con cualquiera de los siguientes radicales: halógeno, hidroxilo, amino, formilo, carboxi y sus ésteres y sales derivadas, carbamoilo, sulfo y sus ésteres y sales derivadas, y sulfamoilo;

o en cuya fórmula general dos de los grupos sustituyentes R¹-R⁹ pueden formar juntos un grupo -B-, donde B representa cualquiera de los siguientes grupos: (-CHR¹⁰-N=N-), (-CH=CH-)_n, (-CH=N-)_n o (-N=CR¹⁰-NR¹¹-), donde los grupos n representan un número entero de entre 1 y 3, R¹⁰ es un grupo sustituyente tal como se ha definido anteriormente y R¹¹ se define como R¹⁰. (Debe entenderse que si la fórmula anteriormente mencionada comprende dos o más grupos sustituidos en R¹⁰, estos grupos sustituidos en R¹⁰ pueden ser iguales o diferentes).

En las formas de realización particulares, el intensificador es 10-metilfenotiazina, ácido fenotiazino-10-propiónico, fenotiazino-10-propionato de n-hidroxisuccinimida, ácido 10-etil-fenotiazino-4-carboxílico, 10-etilfenotiazina, 10-propilfenotiazina, 10-isopropilfenotiazina, fenotiazino-10-propionato metílico, 10-fenilfenotiazina, 10-alilfenotiazina, 10-(3-(4-metilpiperazin-1-il)propil)fenotiazina, 10-(2-pirrolidin-1-il-etil)fenotiazina, 2-metoxi-10-metilfenotiazina, 1-metoxi-10-metilfenotiazina, 3-metoxi-10-metilfenotiazina, 3,10-dimetilfenotiazina, 3,7,10-trimetilfenotiazina, 10-(2-hidroxi-etil)fenotiazina, 10-(3-hidroxipropil)fenotiazina, 3-(2-hidroxi-etil)-10-metilfenotiazina, 3-hidroximetil-10-metilfenotiazina, ácido 3,7-dibromofenotiazino-10-propiónico, fenotiazino-10-propionamida, cloropromazina, 2-cloro-10-metilfenotiazina, 2-acetil-10-metilfenotiazina, 10-metilfenoxazina, 10-etilfenoxazina, ácido fenoxazino-10-propiónico, 10-(2-hidroxi-etil)fenoxazina o ácido 4-carboxifenoxazino-10-propiónico.

D. Otro ejemplo de intensificador útil es un compuesto descrito mediante la siguiente fórmula:



donde la fórmula A es un grupo como, por ejemplo, -D, -CH=CH-D, -CH=CH-CH=CH-D, -CH=N-D,

ES 2 167 022 T3

-N=N-D o -N=CH-D, donde D es seleccionado del grupo consistente en -CO-E, -SO₂-E, -N-XY y -N⁺-XYZ, donde E puede ser -H, -OH, -R o -OR, y X y Z pueden ser iguales o diferentes y seleccionados de -H y -R; R siendo un alquilo C₁-C₁₆, aunque se prefiere que sea un alquilo C₁-C₈, dicho alquilo pudiendo ser saturado o insaturado, ramificado o no ramificado y pudiendo ser sustituido opcionalmente por un grupo carboxi, sulfo o amino; y B y C pueden ser iguales o diferentes y seleccionados de C_mH_{2m+1}; 1 ≤ m ≤ 5.

En una forma de realización preferida, A en la fórmula anteriormente mencionada es -CO-E, en la que E puede ser -H, -OH, -R o -OR; R siendo un alquilo C₁-C₁₆, aunque se prefiere que sea un alquilo C₁-C₈, dicho alquilo pudiendo ser saturado o insaturado, ramificado o no ramificado y pudiéndose sustituir opcionalmente con un grupo carboxi, sulfo o amino; y B y C pueden ser iguales o diferentes y seleccionados de C_mH_{2m+1}; 1 ≤ m ≤ 5.

En la fórmula anteriormente mencionada, A se puede situar en posición meta en relación al grupo hidroxilo en lugar de situarse en la paraposición tal como se muestra.

En las formas de realización particulares, el intensificador es la acetosiringona, el metilsiringato, el etilsiringato, el propilsiringato, el butilsiringato, el hexilsiringato o el octilsiringato,

E. Otro intensificador útil más es un compuesto azino descrito mediante la fórmula general



fórmula en la que los símbolos A y B, que pueden ser iguales o diferentes, representan independientemente cualquiera de los sustituyentes II, III, IV y V, presentados en la Fig. 2;

en cuyos sustituyentes, los símbolos X e Y, que pueden ser iguales o diferentes, representan independientemente carbono, nitrógeno, cuyo nitrógeno puede ser no sustituido o sustituido por un grupo sustituyente R⁵, sulfuro, oxígeno, selenio o telurio, y en cuyos sustituyentes los grupos sustituyentes R¹, R², R³ y RR⁴, que pueden ser iguales o diferentes, representan independientemente un hidrógeno, halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C₁-C₃, un grupo formilo, un grupo carboxi, un grupo sulfo, un grupo nitro, un grupo alquilo C₁-C₅, cuyo grupo alquilo puede además ser saturado o insaturado, lineal o ramificado, o un grupo amino, cuyo grupo amino puede ser además no sustituido o sustituido una o dos veces por un grupo sustituyente R⁵;

cuyo grupo sustituyente R⁵ representa un halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C₁-C₃, un grupo alquilo C₁-C₅ o un grupo amino. El intensificador de la peroxidasa puede presentarse en forma libre o en forma de sal de adición.

En las formas de realización preferidas, los grupos sustituyentes R¹, R², R³ y R⁴, que pueden ser iguales o diferentes, representan independientemente hidrógeno, halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alquilo C₁-C₃ o un grupo sulfo. Preferiblemente, el halógeno es flúor, cloro o bromo. Preferiblemente, el grupo alquilo C₁-C₃ es metilo, etilo, propilo o isopropilo.

En las formas de realización preferidas, el grupo sustituyente R⁵ representa un halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C₁-C₃, un grupo alquilo C₁-C₃ o un grupo amino.

En una forma de realización más preferida, un intensificador de la peroxidasa según la invención es 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfonato). Este compuesto, abreviado con ABTS, es un sustrato cromogénico, así como un agente de ensayo de la fenol-oxidasa y de la peroxidasa común.

Además, también se ha demostrado que el ABTS, al contrario que los intensificadores conocidos y anteriormente descritos, es capaz de actuar como intensificador de la peroxidasa bajo condiciones altamente alcalinas, es decir, con un pH por encima de 9. Esta característica permite que el ABTS se emplee, p. ej., en composiciones detergentes que deban rendir en un margen de pH de entre 7-13, particularmente en un margen de pH de entre 8-12, aunque se prefiere que el margen de pH sea de entre 9-11.

El intensificador puede estar presente en la composición antimicrobiana en concentraciones correspondientes a entre 0,005 y 1000 mmoles por g de sustrato (células microbianas, biomasa), preferentemente entre 0,05 y 500 mmoles por g de sustrato, aunque se prefiere que sea de entre 0,5 y 100 mmoles por g de sustrato.

Sin limitarse a ninguna teoría, actualmente se contempla que haya una correlación positiva entre la

vida media del radical que forma el intensificador en el medio acuoso relevante y su eficiencia, y que dicha vida media sea significativamente más larga que la vida media de cualquier sustancia seleccionada del grupo consistente en ácido p-hidroxicinámico, 2,4-diclorofenol, p-hidroxibencenosulfonato, vainillina y el ácido p-hidroxibenzoico (es decir, los intensificadores descritos en la WO 92/18683).

5

Como la vida media del radical depende, entre otras cosas, del pH, de la temperatura y del tampón del medio acuoso, es muy importante que todos estos factores sean iguales cuando se comparan las vidas medias de los radicales de varios intensificadores.

10

Preferiblemente, la cantidad de oxidorreductasa en la composición de desinfección según la presente invención es entre aproximadamente 0,01 y 1000 μg proteína/ml de composición, aunque se prefiere que sea de entre aproximadamente 10 y 100 μg proteína/ml de composición. En el caso de las oxidasas y las peroxidasas, la cantidad preferida es de aproximadamente entre 0,01 y 100 unidades de oxidasa o peroxidasa (p. ej. GODU o PODU) por ml de composición, aunque se prefiere que sea de aproximadamente

15

Definición de unidades enzimáticas

20

Una unidad de glucosa oxidasa (GODU) es la cantidad de enzima que, bajo condiciones estándares (es decir, un pH 5.6, 30°C, 20 minutos de período de incubación, tampón acetato y glucosa 16,2 g/l, 90 mM, como sustrato) forma 1 mmol de peróxido de hidrógeno por minuto. El expediente AF 266/1 que describe este método analítico se puede obtener tras pedirlo a Novo Nordisk A/S, Dinamarca, cuyo expediente se incorpora a la presente como referencia.

25

Una unidad de peroxidasa (PODU) es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 mmol de peróxido de hidrógeno por minuto en las condiciones analíticas siguientes: 0,88 mM de peróxido de hidrógeno, 1,67 mM de 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfonato), 0,1 M de tampón fosfato, pH 7.0, incubado a 30°C, seguido fotométricamente a 418 nm.

30

Una unidad de pectinasa (PSU) es la cantidad de enzima que reduce la viscosidad de una solución del ácido péctico. La actividad se mide en relación a un estándar conocido de 75000 PSU/g en las condiciones analíticas siguientes: tampón acetato, 40°C, pH 4.0, 1,43 % de ácido péctico y 30 minutos de tiempo de reacción.

35

Una unidad de lactoperoxidasa (LP) formará 1,0 mg de purpurogalina de pirogalol en 20 seg. a pH 6.0 a 20°C. Ensayo estándar de la Sigma Chemical Company.

La composición

40

La composición enzimática según la invención puede ser una composición de limpieza, es decir, una composición que incluye una o más hidrolasas capaces de eliminar o liberar biopelículas de una superficie, una composición de desinfección, es decir, una composición que incluye una oxidorreductasa capaz de matar las células microbianas vivas, preferiblemente las bacterianas, presentes en una biopelícula, o una combinación derivada, es decir, una composición que incluye al menos una hidrolasa y una oxidorreductasa en cantidades eficaces para limpiar y desinfectar una superficie cubierta completa o parcialmente

45

por una biopelícula.

La composición según la invención comprende además un surfactivo convencional.

El proceso

50

El método según la invención se lleva a cabo preferiblemente a un pH o en un margen de pH en el que las enzimas aplicadas son activas, por ejemplo, dentro de un margen de pH en el que las enzimas reales presentan, como mínimo, aproximadamente un 50 % de actividad relativa, aunque se prefiere que sea, como mínimo, de aproximadamente un 80 % de actividad. En consecuencia, se prefiere que el pH de la composición de limpieza y/o desinfección se encuentre en el margen de entre 4.5-11, preferiblemente entre 5-9, aunque se prefiere que sea de entre 5.5-7.5.

55

60

El método según la invención se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura o en un margen de temperatura en el que las enzimas aplicadas son activas, por ejemplo, dentro de un margen de temperatura en el que las enzimas reales presentan, como mínimo, aproximadamente un 50 % de actividad relativa, aunque se prefiere que sea, como mínimo, de aproximadamente un 80 % de actividad. Normal-

ES 2 167 022 T3

mente, el método según la invención se lleva a cabo a una temperatura (de la composición de limpieza y/o desinfección) en el margen de entre 10-60°C, preferiblemente entre 20-50°C, aunque se prefiriere que sea de entre 25-40°C.

5 El ejemplo siguiente ilustra la invención.

Ejemplo 1

10 Las biopelículas crecieron en un sistema modelo usando *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10148, *Pseudomonas fluorescens* cepa AH2 (Gram et al. 1990), *Staphylococcus epidermidis* DMS 20042 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Se empleó caldo de soja de triptano (TSB) de Oxoid CM131 como medio de crecimiento.

15 Se cortó acero inoxidable del tipo AISI 304 con un acabado #4 (tipo de laca 180) en discos de 12*20 mm. Se limpiaron los discos de polipropileno (12*20 mm; Ral. 7032, Dukadan A/S) cepillándolos en un detergente neutro (Triton) y, a continuación, se enjuagaron con agua antes de llevar a cabo la autocodificación, Los discos se limpiaron en agua seguido de cloroformo, metanol y, finalmente, acetona (durante 5 minutos en cada uno) antes de llevar a cabo la esterilización mediante autocodificación a 121°C durante 20 minutos antes de su uso.

20 *Desarrollo de la biopelícula*

Se inmovilizaron los discos de acero estéril o de polipropileno verticalmente en un soporte para tubos de ensayo de acero estéril en un vaso de precipitados. El soporte sostiene hasta 20 discos en una disposición que permite la libre circulación de líquido cuando se sumergen en el medio de cultivo. Se precultivaron las *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* en TSB durante 24 h a 26°C.

30 Se precultivó la *S. epidermidis* en TSB durante 24 h a 30°C. Se inoculó el *Staphylococcus* spp. en TSB y se inoculó el *Pseudomonas* spp. (aproximadamente 10³ cfu/ml) en TSB diluido en una proporción 1:5 con agua estéril. Se vertieron los medios inoculados en el vaso de precipitados de forma que cubrían los discos y se dejó que se desarrollara una biopelícula a ambos lados de los discos a 26°C (*S. epidermidis* a 30°C) durante 4 días removiéndolo ligeramente (200 rpm).

35 Se enjuagaron asépticamente todos los discos durante 1 minuto en tampón fosfato estéril (0,067 M, pH 7) para eliminar las células planctónicas antes de llevar a cabo la incubación con enzimas.

Enzimas antibacterianas

40 Se empleó la glucosa oxidasa (Novo Nordisk AIS) con 3 g/L de D(+) -glucosa (Sigma G-7528) como donador electrónico y oxígeno como aceptante electrónico reducido a peróxido de hidrógeno. Se empleó la lactoperoxidasa (Sigma Chemicals Co.) con peróxido de hidrógeno como aceptante electrónico y 2 mM de tiocianato como donador electrónico.

45 La pectinasa producida por fermentación a partir de una cepa de *Aspergillus aculeatus* (Novo Nordisk) es una preparación enzimática disponible comercialmente de varios componentes conteniendo actividad proteasa y un margen amplio de carbohidrasas incluyendo actividades pectinasa, arabanasa, celulasa, hemicelulasa, β -glucanasa y xilanasa.

Extracción enzimática y exterminación de células de biopelículas

50 Se diluyeron las enzimas en tampón fosfato (pH 7), se esterilizó el filtro y se añadió al tampón que contenía los discos de biopelículas. Se incubaron los discos de acero y polipropileno con enzimas a 20°C durante 15 minutos sin removerlos. Para ambos substratos, se empleó un tampón estéril sin enzimas añadidas a modo de control. Tras el tratamiento enzimático, se enjuagaron ligeramente los substratos una vez en tampón estéril tras los que se clonaron antes de someterlos a microscopia o enumeración por mediciones de conductancia.

60 La actividad bactericida de la glucosa oxidasa y de la lactoperoxidasa también se determinó en células planctónicas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*. Las células planctónicas derivadas del desarrollo de la biopelícula se diluyeron en proporción 1:9 en 0,067 M de tampón fosfato (pH 7.0) y se mezclaron con glucosa oxidasa (0, 5 ó 10 GODU/ml) y lactoperoxidasa (0, 1 ó 5 U/ml) a 20°C durante 15 minutos. La actividad bactericida contra las células planctónicas se calculó inoculando 0,1 ml

de suspensiones celulares en células Malthus.

Cálculo de la biopelícula

5 *Microscopía de fluorescencia:* La sal de tetrazolo cloruro de 5-ciano-2,3-ditililtetrazolio (CTC) (Poly-
sciences, Inc., Warrington, PA) se disolvió en agua esterilizada mediante un filtro y destilada (10 mM).
Se empleó el CTC a modo de indicador de la viabilidad celular, ya que la solución acuosa de CTC es casi
incolora y no fluorescente, mientras que el producto de formazan correspondiente flouerece en el margen
rojo a aproximadamente 620 nm cuando se excita a 420 nm. El fluorocromo que enlaza el ADN DAPI
10 (4',6-diamidino-2-fenilindol, Sigma D-9542) fue empleado como indicador sobre el número total de células
y se colorearon las células de la biopelícula con DAPI tras haberlas coloreado con CTC para permitir la
enumeración de células totales y que respiraban dentro de la misma preparación (30).

Tras el tratamiento enzimático se incubaron los discos con biopelícula en la oscuridad durante 45 mi-
15 nutos (20°C) con 0,5 ml de caldo de fosfato triptosa (TPB) y sal de CTC-tetrazolio (12,5 mM). Durante
los últimos 5 minutos de la coloración con CTC, se añadió DAPI (3 mM). Se examinaron las células
coloreadas en cuanto a su fluorescencia por inmersión de aceite x 100 en un microscopio Olympus modelo
BX50 equipado con un quemador de mercurio 200 W. La combinación de filtros empleada para observar
las células coloreadas con CTC fue un filtro de excitación de 480-550 nm y un filtro barrera de 590 nm
20 (Olympus modelo cubo U-MSWG). Se observaron las células coloreadas DAPI con un filtro de excitación
de 330-385 nm y un filtro barrera de 420 nm (Olympus modelo cubo U-MWU).

Mediciones de conductancia: Se emplearon mediciones indirectas Malthus para enumerar las células
adheridas a los substratos (Johnston & Jones, 1995). Tras la incubación con enzimas, se enjuagaron los
25 discos en el mismo tampón usado para el tratamiento enzimático y se transfirieron a tubos Malthus que
contenían 3 ml de medio de crecimiento en el tubo externo y 0,5 ml de 0,1 M de hidróxido de potasio
en el tubo interno (Dezenclos et al. 1994). Se utilizó TSB como medio de crecimiento para detectar la
P.aeruginosa y la *P. fluorescens*, mientras que el BHI se empleó para detectar la *S. aureus* y la *Strep.*
mutans. Se colocaron los tubos en un Malthus 2000 (Malthus Flexi 2000, Malthus Instrumentar Limited)
30 y se incubó a 37°C, salvo aquellas muestras que tenían *P. fluorescens* que se incubaron a 25°C.

El dióxido de carbono producido por las bacterias será absorbido por el hidróxido de potasio y, de
ese modo, alterará la conductividad. Los cambios en la conducción se trazaron en función al tiempo y se
determinó el tiempo de detección (DT) como tiempo tomado desde el principio de la medición hasta que
35 se detectó un cambio rápido en la conducción con el Malthus. El DT puede relacionarse con el número
de células presentes al comienzo del ensayo al emplear una curva de calibración, construido para cada
organismo al inocular los tubos Malthus con una serie de diluciones de diez veces (Johansen et al. 1995).

Resultados

40 El cálculo del número exacto de células vivas en los substratos se determinó en todos experimentos
a través de las mediciones de conductancia. Aún así, a través del método Malthus no posible distin-
guir entre una actividad bactericida de las enzimas y una extracción enzimática de la biopelícula. En
consecuencia, se ha de comparar el decrecimiento de bacterias vivas en los substratos con la extracción
45 simultánea de biopelículas de los substratos calculada mediante la coloración DAPI/CTC.

La pectinasa reduce el número de células bacterianas en las biopelículas sobre acero inoxidable (Tabla
1). Se observó la actividad pectinasa como una extracción de biopelícula sin ninguna actividad bactericida
significante contra ninguna de las cuatro cepas, determinadas a través de la coloración de DAPI/CTC
50 combinados.

55

60

TABLA 1

Reducción de biopelículas sobre acero inoxidable tras el tratamiento con Pectinex ultra SP durante 15 minutos a 20°C (pH 7)

Pectinasa (PSU/ml)	Reducción de la biopelícula (%)			
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>
0	-	-	-	-
0,18	83	39	0	0
1,8	98	45	92	36
18	98	93	95	50
180	99,1	95	95	82
1800	99,7	97	95	85

5

10

15

20

25

30

Todas las células que se podían colorear mediante DAPI también se colorearon con CTC indicando que todas las células visibles estaban respirando. Tras el tratamiento con la pectinasa, la coloración con DAPI mostró claramente la eliminación de la biopelícula de *P. aeruginosa* de la superficie y la coloración con CTC mostró que el resto de células continuaban respirando, cosa que indica que la pectinasa no muestra ninguna actividad bactericida.

En general, las biopelículas de *S. aureus* y *S. epidermidis* resultaron ser más sensibles ante la extracción enzimática con la pectinasa que las biopelículas con *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* (Tabla 1). La biopelícula con *S. aureus* resultó ser más sensible ante la pectinasa, ya que 0,18 PSU de pectinasa por ml eliminaban el 83 % de la biopelícula. La biopelícula más resistente fue la *P. fluorescens*, ya que fueron necesarias 1800 PSU de pectinasa por ml para eliminar el 85% de la biopelícula. La extracción de la biopelícula en polipropileno mediante la pectinasa fue similar a la extracción de la biopelícula en acero inoxidable.

35

40

La combinación de glucosaoxidasa con lactoperoxidasa disminuyó significativamente los valores de las células que respiraban activamente y redujo el número de células vivas en las cuatro biopelículas sometidas a examen (Tablas 2 y 3). La viabilidad de la biopelícula de *Staphylococcus* se redujo entre 1 y 2 unidades logarítmicas al exponerla a la glucosa oxidasa (10 GODU/ml) y a la lactoperoxidasa (5 U/ml) mientras que la viabilidad de la biopelícula de *Pseudomonas* se redujo más de 3 unidades logarítmicas. Sin embargo, el número de células exterminadas fue más bajo que el obtenido al exponer las suspensiones planctónicas de las células, ya que las células planctónicas de *Pseudomonas spp.* se redujeron aproximadamente unas 5 unidades logarítmicas al exponerlas a la glucosa oxidasa (10 GODU/ml) y a la lactoperoxidasa (5 U/ml) (Tabla 2).

TABLA 2

Actividad bactericida contra las células de Pseudomonas aeruginosa y Pseudomonas fluorescens en una biopelícula sobre acero inoxidable y células planctónicas causadas por la glucosa oxidasa y la lactoperoxidasa tras el tratamiento durante 15 minutos a 20°C. Se da la concentración de células antes del tratamiento enzimático y se muestra la actividad bactericida en relación al número de células de muestras sin tratar

50

55

60

GOD (U/ml)	LP (U/ml)	Actividad bactericida (reducción de Log10)			
		<i>P. aeruginosa</i>		<i>P. fluorescens</i>	
		células de la biopelícula 1,7*10 ⁸ cfu/disco	células planctónicas 2,3*10 ⁸ cfu/ml	células de la biopelícula 1,9*10 ⁸ cfu/disco	células planctónicas 8,0*10 ⁸ cfu/ml
0	0	-	-	-	-
0	1	0,0	0,8	0,1	0,9
0	5	0,0	1,1	0,9	1,1

TABLA 2 (Continuación)

GOD (U/ml)	LP (U/ml)	Actividad bactericida (reducción de Log10)			
		<i>P. aeruginosa</i>		<i>P. fluorescens</i>	
		células de la biopelícula 1,7*10 ⁸ cfu/disco	células planctónicas 2,3*10 ⁸ cfu/ml	células de la biopelícula 1,9*10 ⁸ cfu/disco	células planctónicas 8,0*10 ⁸ cfu/ml
5	0	0,0	0,0	0,8	0,1
5	1	1,5	2,5	2,2	2,7
5	5	1,7	3,4	2,5	4,0
10	0	0,3	0,0	2,4	0,2
10	1	3,0	2,7	3,0	3,0
10	5	3,0	3,5	3,0	4,5

Las células planctónicas de *S. aureus* eran comparables a las células de la biopelícula en cuanto a su sensibilidad a las oxidoreductasas; así, se redujo la *S. aureus* aproximadamente 2-3 unidades logarítmicas al exponerla a la glucosa oxidasa (10 GODU/ml) y a la lactoperoxidasa (5 U/ml) (Tabla 3). Las células planctónicas de *S. epidermidis* eran significativamente más sensibles a las oxidoreductasas que las células de la biopelícula ya que el número de células planctónicas posibles decreció aproximadamente 5 unidades logarítmicas en comparación con la reducción de 1 unidad logarítmica en el número de células de la biopelícula. Sin embargo, la concentración de células posibles en la biopelícula con *S. epidermidis* fue aproximadamente de 10⁷ cfu/disco mientras que la concentración de células planctónicas fue aproximadamente de 10⁶ cfu/ml; en consecuencia, la proporción entre el número de células y concentración de oxidoreductasas fue diferente en el caso de la biopelícula y en el de las células planctónicas de *S. epidermidis*, respectivamente (Tabla 3).

TABLA 3

Actividad bactericida contra las células de *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* en biopelículas sobre acero inoxidable y células planctónicas causadas por la glucosa oxidasa y la lactoperoxidasa tras el tratamiento durante 15 minutos a 20° C. Se da la concentración de células antes del tratamiento enzimático y se muestra la actividad bactericida en relación al número de células de muestras sin tratar

GOD (U/ml)	LP (U/ml)	Actividad bactericida (reducción de Log10)			
		<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>	
		células de la biopelícula 3,1*10 ⁷ cfu/disco	células planctónicas 7,0*10 ⁷ cfu/ml	células de la biopelícula 3,6*10 ⁷ cfu/disco	células planctónicas 2,2*10 ⁶ cfu/ml
0	0	-	-	-	-
0	1	0,0	0,0	0,2	0,0
0	5	0,0	0,0	0,4	0,3
5	0	0,0	0,0	0,3	0,6
5	1	0,5	0,4	0,9	0,8
5	5	0,7	1,0	1,2	2,3
10	0	0,0	0,1	0,2	1,2
10	1	2,0	2,3	1,2	4,0
10	5	2,0	2,7	1,4	5,0

No hubo ninguna diferencia significativa en la actividad bactericida del sistema de oxidorreductasas en relación a la biopelícula en acero inoxidable en comparación con la biopelícula en polipropileno salvo para biopelícula con *P. aeruginosa* en polipropileno donde la glucosa oxidasa (5 GODU/ml) combinada con la lactoperoxidasa (5 U/ml) mató el 99,99% de las células de la biopelícula en comparación con el 98% de la biopelícula con *P. aeruginosa* en acero inoxidable.

La mezcla compleja de enzimas que hidrolizan el polisacárido en el Pectinex ultra fue capaz de eliminar una biopelícula bacteriana modelo sobre acero inoxidable pero no mostró ninguna actividad bactericida significativa. Por contra, las oxidorreductasas fueron bactericidas contra las células de la biopelícula, pero no eliminaron la biopelícula. Además, la combinación de oxidorreductasas y enzimas que hidrolizan los polisacáridos fue bactericida y eliminó la biopelícula.

La combinación de glucosa oxidasa con lactoperoxidasa fue bactericida contra las células de la biopelícula; sin embargo, la actividad bactericida del sistema con oxidorreductasas fue menos severa contra las células de la biopelícula en comparación con su efecto sobre las células planctónicas. Un fenómeno bien conocido radica en el hecho de que las células de la biopelícula son más resistentes que las células planctónicas (Brown et al. 1995, Khardori et al. 1995). La difusión del tiocianato y del peróxido de hidrógeno en la biopelícula hará decrecer la susceptibilidad de las células de la biopelícula en comparación con las células planctónicas cosa que sugiere que las células subyacentes en la biopelícula escaparán a la actividad bactericida de las oxidorreductasas a menos que las células de la biopelícula se liberen de la superficie. Esto puede explicar la pequeña diferencia en la susceptibilidad de la biopelícula con *Staphylococcus* y las células planctónicas, respectivamente, ya que las biopelículas finas de *Staphylococcus spp.* presentarán una protección limitada de las células de la biopelícula en comparación con las biopelículas gruesas de *Pseudomonas spp.* En consecuencia, la actividad bactericida de las oxidorreductasas se puede mejorar al emplear una combinación de biopelículas que degrade las enzimas junto con el sistema de oxidorreductasas.

Referencias

- Brown, M. L., H. C. Aldrich y J. J. Gauthier.** 1995. "Relationship between glycocalyx and providone-iodine resistance in *Pseudomonas aeruginosa*" (ATCC 27853) biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:187-193.
- Dezenclos, T., M. Ascon-Cabrera, D. Ascon, J.-M. Lebeault y A. Paus.** 1994. "Optimisation of the indirect impedancemetry technique; a handy technique for microbial growth measurements". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42:232-238.
- Gram, L., C. Wedell-Nedergaard y H. H. Huss.** 1990. "The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch (*Lates niloticus*)". *Int. J. Food Microbiol.* 10:303-316.
- Johansen, C., T. Gill y L. Gram.** 1995. "Antibacterial effect of protamine assayed by impedimetry". *J. Appl. Bacteriol.* 78:297-303.
- Johnston, M. y M. V. Jones.** 1995. "Disinfection tests with intact biofilms: combined use of the modified Robbins Device with impedance detection". *J. Microbiol. Methods* 21:15-26.
- Khardori, N., M. Yassien y K. Wilson.** 1995. "Tolerance of *Staphylococcus epidermidis* grown from indwelling vascular catheters to antimicrobial agents". *J. Industial Microbiol.* 15:148-151.

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Método para limpiar y desinfectar una superficie cubierta al menos parcialmente por una capa de biopelículas, dicho método comprendiendo los siguientes pasos consecutivos o simultáneos:

- 5 a. poner en contacto la biopelícula con una composición de limpieza que incluya una o más hidrolasas en una cantidad eficaz para eliminar o liberar bien por completo o bien parcialmente la capa de biopelículas de la superficie; y
- 10 b. poner en contacto la biopelícula con una composición de desinfección bactericida que incluya una oxidorreductasa en una cantidad eficaz para matar las células bacterianas vivas presentes en la biopelícula.

2. Método según la reivindicación 1, en el que la hidrolasa son seleccionadas del grupo consistente en celulasas (endoglucanasas, celobiohidrolasas, β -glucosidasas), hemicelulasas (xilanasas, mananasas, ester-
15 rasas acetílicas de xilano), pectinasas (arabinanasas, α -arabino-furanosidasas, galactanasas, pectinliasas, pectin metilesterasas, poligalacturonasas, acetilesterasas de ramnogalacturonano, ramnogalacturonasas), amilasas, proteasas y lipasas.

3. Método según la reivindicación 1, en el que la composición de limpieza comprende una composición
20 enzimática hidrolítica producida mediante una cepa del hongo *Aspergillus aculeatus*, preferiblemente *Aspergillus aculeatus*, CBS101.43.

4. Método según la reivindicación 2 ó 3, en el que la cantidad de hidrolasa en la composición de
25 limpieza es de aproximadamente entre 0,01 y 5000 μ g proteína/ml de composición, aunque se prefiere que sea de aproximadamente entre 1 y 500 μ g proteína/ml de composición.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la oxidorreductasa son seleccionadas
30 del grupo consistente en oxidasas, peroxidasas y lacasas, aunque se prefiere que sean glucosa oxidasas, aminoácido oxidasas, xantina oxidasas, oxidasas de ácido ascórbico, lactoperoxidasas, peroxidasas de alfalfa, mieloperoxidasas y haloperoxidasas.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la oxidorreductasa es una peroxi-
35 dasa producida mediante un hongo o que se puede producir a partir de un hongo perteneciente al género *Coprinus*, preferiblemente a las especies *Coprinus cinereus* o *Coprinus mactorhizus*, aunque se prefiere que sea un *Coprinus cinereus*, IFO 8371 o IFO 30114.

7. Método según las reivindicaciones 5 ó 6, en el que la cantidad de oxidorreductasa en la compo-
40 sición de desinfección es de aproximadamente entre 0,01 y 1000 μ g proteína/ml de composición, aunque se prefiere que sea de aproximadamente entre 10 y 100 μ g proteína/ml de composición.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el pH de la composición de limpieza
y/o desinfección se sitúa en el margen de entre 4.5-11, preferiblemente entre 5-9, aunque se prefiere que sea de entre 5.5-7.5.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la temperatura de la composición
45 de limpieza y/o desinfección se encuentra en el margen de entre 10-60°C, preferiblemente entre 20 -50°C, aunque se prefiere que sea de entre 25-40°C.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la capa de biopelículas comprende
50 células vivas seleccionadas de los géneros bacterianos *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Aeromonas* o de la familia *Enterobacteriaceae*.

55

60

11. Composición de limpieza y/o desinfección que comprende una o más hidrolasas, una peroxidasa, un intensificador y un surfactivo.

5 12. Uso de la composición según la reivindicación 11 para limpiar o desinfectar de superficies cubiertas por biopelículas.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

55

60

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.
