

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 010 557**

51 Int. Cl.:

B01D 65/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.06.2018** **PCT/US2018/040210**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2019** **WO19006252**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2018** **E 18743321 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2024** **EP 3645147**

54 Título: **Solución de limpieza de membranas y método de limpieza acelerada de membranas utilizando la misma**

30 Prioridad:

30.06.2017 US 201762527162 P

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

03.04.2025

73 Titular/es:

**DIVERSEY, INC. (100.00%)
1300 Altura Road, Suite 125
Fort Mill, SC 29708, US**

72 Inventor/es:

**SKOU, FLEMMING;
TE POELE, SANDY y
KANY, HARRY**

74 Agente/Representante:

DÍAZ DE BUSTAMANTE TERMINEL, Isidro

ES 3 010 557 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

Solución de limpieza de membranas y método de limpieza acelerada de membranas utilizando la misma

CAMPO DE INVENCION

- 5 La presente invención se refiere a un método de limpieza de una membrana usando una solución de limpieza.

ANTECEDENTES

- La filtración es la separación de un material de otro. La filtración puede efectuarse mediante el uso de una membrana. El material que queda retenido en la membrana se caracteriza como retenido o concentrado. El líquido que pasa a través de la membrana es el soluto, filtrado o permeado, siendo este último el término más comúnmente usado con respecto a la filtración por membrana. La suciedad que queda en la membrana después de procesar la corriente se caracteriza como ensuciamiento de membrana. Estos filtros de membrana deben ser sometidos posteriormente a una operación de limpieza para la eliminación de cualquier ensuciamiento que se haya producido durante el curso de la operación de tratamiento con el fin de seguir usando dicho sistema de filtración para la producción continua de permeado.
- 10 En las operaciones de productos lácteos, cervecerías y bebidas, y de alimentos procesados, las instalaciones con membranas se usan para fraccionamiento, separación y concentración de componentes del producto deseados. Dichos filtros de membrana deben someterse, a continuación, a una operación de limpieza para la eliminación de cualquier ensuciamiento que se haya producido durante el proceso.
- 15 Convencionalmente se han usado tratamientos hidráulicos y/o químicos para limpiar estas membranas sucias. Sin embargo, estos métodos no han sido del todo eficaces para eliminar de forma eficiente la mayor parte de los materiales depositados. Los procesos que proporcionan una eliminación sustancial de material sucio tienden a consumir mucho tiempo y son costosos en términos de uso de energía y agua debido a la gran cantidad de etapas que se emplean convencionalmente en dichas operaciones y en tratamientos químicos que se requieren convencionalmente para dichas operaciones de limpieza.
- 20 Los agentes de limpieza se han formulado para abordar específicamente la naturaleza y las propiedades fisicoquímicas de los agentes ensuciadores. Estos agentes de limpieza están formulados para intentar romper los enlaces que se forman entre los agentes ensuciadores y el material del que está construida la membrana.
- La limpieza química implica varias etapas que deben llevarse a cabo en un orden específico definido. En primer lugar, se debe enjuagar la membrana para eliminar la suciedad que no se haya depositado fácilmente sobre la membrana. A continuación, la solución de limpieza química se puede introducir en la membrana y mantenerla en su lugar durante un tiempo definido determinado. Dichas etapas de limpieza deben ser seguidas por otra etapa de enjuague. A continuación, convencionalmente, la membrana se somete a otras etapas para eliminar la solución de limpieza de la membrana, incluyendo quizás una etapa de tratamiento ácido y/o una etapa de tratamiento alcalino, siendo cada una de las etapas empleadas seguida por otra etapa de enjuague.
- 30 Cuatro parámetros determinan principalmente la eficacia de un agente de limpieza. Estos parámetros incluyen el tiempo de contacto, la reacción química, la temperatura y la energía mecánica. Estos parámetros están relacionados específicamente con el agente de limpieza químico que se utiliza, así como con la naturaleza de los agentes ensuciadores depositados en la membrana. El objeto de la presente invención es proporcionar un proceso para limpiar una membrana de filtración.
- 35 Los agentes de limpieza también han incluido enzimas para el tratamiento enzimático de la membrana. Se ha usado un tratamiento enzimático en las operaciones de limpieza para dichas membranas para descomponer los materiales depositados en compuestos más pequeños que permitan eliminarlos más fácilmente de la membrana. Una etapa de limpieza enzimática puede reducir o eliminar ventajosamente la suciedad irreversible que probablemente sea causada por suciedad orgánica, por ejemplo, adsorción de proteínas y lípidos en la membrana. Las enzimas proteasas, en particular, catalizan la reacción de hidrólisis de diversos enlaces usando una molécula de agua.
- 40 El documento US2005/184008 divulga métodos para tratar membranas e instalaciones de separación y composiciones de tratamiento de membranas. La instalación de separación incluye una pluralidad de membranas para proporcionar la separación de un producto de alimentación. El método incluye las etapas de proporcionar un flujo de líquido a través de una pluralidad de membranas; tratar la pluralidad de membranas con una composición de tratamiento de múltiples fases que comprende una fase gaseosa y una fase líquida en una proporción volumétrica de la fase gaseosa respecto a la fase líquida de al menos aproximadamente 5:1; y proporcionar un flujo de líquido a través de la pluralidad de membranas.
- 45 El documento WO2016/107855 divulga un método para identificar el tipo de obstrucción en un aparato de filtración por membrana que tiene al menos una entrada de fluido y al menos una salida de fluido, comprendiendo dicho método una primera etapa a) de suministrar y hacer fluir una primera solución enzimática que comprende al menos
- 55

una proteasa a través de dicho aparato de filtración por membrana durante un primer período de tiempo predeterminado, siendo seguida dicha primera etapa a) por una primera medición, realizada en dicha al menos una entrada de fluido y/o dicha al menos una salida de fluido de dicho aparato de filtración por membrana, de al menos un primer valor de parámetro que hace posible caracterizar el fluido que fluye dentro de dicho aparato de filtración por membrana, comparándose dicho al menos un primer valor de parámetro medido con un valor del mismo parámetro medido antes de la etapa a).

El documento US2015/056679 divulga un método para la inactivación de enzimas con una composición que comprende un ácido peroxycarboxílico sulfonado. La composición se pone en contacto con la enzima.

Sigue existiendo una necesidad en la técnica de proporcionar una solución de limpieza basada en enzimas y una operación de limpieza de membrana que reduzca o elimine eficazmente la suciedad irreversible. Si la resistencia de filtración después de la limpieza hidráulica es igual a la resistencia de filtración al inicio del período de filtración anterior, entonces se considera que el ensuciamiento es completamente reversible. Si es necesario aplicar una limpieza química, se considera que la suciedad es irreversible. Existe una necesidad desde hace tiempo de una operación de limpieza que pueda lograrse con una reducción de uno o más de los siguientes aspectos: tiempo total, uso de agua, energía y productos químicos.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método de limpieza basado en enzimas para limpiar membranas. Sin pretender limitarse a la teoría, el método de limpieza de la invención da como resultado una reducción en uno o más de los siguientes aspectos: tiempo de limpieza, uso general de agua, energía y productos químicos en relación con las operaciones de limpieza convencionales.

Un aspecto de la invención proporciona un método de limpieza de una membrana que comprende: enjuagar previamente la membrana; limpiar la membrana usando una solución que comprende una enzima y un agente que tiene un pH compatible con la enzima, teniendo la solución una temperatura compatible con la membrana; impedir que iones divalentes en la solución precipiten; reducir una actividad de la enzima añadiendo un agente aglutinante capaz de desactivar la enzima a la solución, en donde el método es sin enjuagar la solución de la membrana desde el momento en que la solución se pone en contacto con la membrana hasta el momento en que se usa para reducir la actividad de la enzima; y enjuagar posteriormente la membrana para eliminar la solución. En determinadas realizaciones de la invención, la solución comprende adicionalmente un tensioactivo. Además, de conformidad con esta realización de la invención, el tensioactivo puede comprender al menos uno de un tensioactivo aniónico, un tensioactivo no iónico y un tensioactivo anfótero.

El agente aglutinante puede comprender al menos uno de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y cualquier sal del mismo, ácido (hidroxietil)etilendiaminotriacético (HEDTA) y cualquier sal del mismo, tripolifosfato de potasio (KTPP), un ácido fosfónico y cualquier sal del mismo, ácido nitrilotriacético (NTA) y cualquier sal del mismo, ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y cualquier sal del mismo, ácido glucónico (GA) y cualquier sal del mismo, ácido glutámico diacético (GLDA) y cualquier sal del mismo, ácido metilglucindiacético (MGDA) y cualquier sal del mismo, ácido iminodisuccínico (IDS) y cualquier sal del mismo, ácidos aminocarboxílicos y cualquier sal de los mismos, ácido hidroxietano difosfónico (HEDP) y cualquier sal del mismo, ácido aminotris(metilenfosfónico) (ATMP) y cualquier sal del mismo, ácido 2-fosfonobutano-1,2,4-tricarboxílico (PBTC) y cualquier sal del mismo, ácido etilendiaminotetra(metilenfosfónico) (EDTMP) y cualquier sal del mismo, ácido dietilentriaminopenta(metilenfosfónico) (DTPMP) y cualquier sal del mismo, un poliacrilato, un copolímero de ácido acrílico-ácido maleico y cualquier sal del mismo, y gluconato de sodio (gluconato de Na) y cualquier combinación de los mismos. Además, de conformidad con esta realización de la invención, una concentración del agente aglutinante es de aproximadamente el 0,001 % en peso a aproximadamente el 1 % en peso basándose en el peso total de la solución. En una realización de la invención, el agente aglutinante comprende un ácido poliacrílico parcialmente neutralizado que tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 2,5 k a aproximadamente 5 k.

El método de limpieza de la membrana, comprende la etapa de añadir un agente aglutinante para la desactivación de la enzima. El agente aglutinante para la desactivación de la enzima puede comprender uno cualquiera o una combinación de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y cualquier sal del mismo, ácido (hidroxietil)etilendiaminotriacético (HEDTA) y cualquier sal del mismo, tripolifosfato de potasio (KTPP), un ácido fosfónico y cualquier sal del mismo, ácido nitrilotriacético (NTA) y cualquier sal del mismo, ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y cualquier sal del mismo, ácido glutámico diacético (GLDA) y cualquier sal del mismo, ácido metilglucindiacético (MGDA) y cualquier sal del mismo, ácido iminodisuccínico (IDS) y cualquier sal del mismo, ácidos aminocarboxílicos y cualquier sal de los mismos, ácido hidroxietano difosfónico (HEDP) y cualquier sal del mismo, ácido aminotris(metilenfosfónico) (ATMP) y cualquier sal del mismo, ácido 2-fosfonobutano-1,2,4-tricarboxílico (PBTC) y cualquier sal del mismo, ácido etilendiaminotetra(metilenfosfónico) (EDTMP) y cualquier sal del mismo, ácido dietilentriaminopenta(metilenfosfónico) (DTPMP) y cualquier sal del mismo, un poliacrilato, un copolímero de ácido acrílico-ácido maleico y cualquier sal del mismo, y cualquier combinación de los mismos. Además, de conformidad con esta realización de la invención, una concentración del agente aglutinante para la desactivación de la enzima es de aproximadamente el 0,005 % en peso a aproximadamente el 1 % en peso

basándose en el peso total de la solución.

5 En determinadas realizaciones de las invenciones, una proporción en peso del agente aglutinante usado para la desactivación de la enzima o del agente aglutinante de desactivación es al menos aproximadamente 0,2 g de agente aglutinante por gramo de enzima, preferentemente de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 200 g de agente aglutinante por gramo de enzima, o, más preferentemente, de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 80 g de agente aglutinante por gramo de enzima.

En algunas realizaciones de la invención, el método de limpieza de la membrana comprende adicionalmente la etapa de añadir un agente reductor para la desactivación de la enzima.

10 Además, de acuerdo con estas realizaciones, el agente reductor para la desactivación de la enzima comprende ditionito de sodio. Además, de conformidad con esta realización, en donde la concentración de ditionito de sodio es al menos aproximadamente el 0,2 % en peso, preferentemente, de aproximadamente el 0,25 % en peso a aproximadamente el 10 % en peso, o, más preferentemente, de aproximadamente el 0,25 % en peso a aproximadamente el 2,5 % en peso.

15 En determinadas realizaciones de la invención, opcionalmente, se aumenta un pH de la solución y/o se aumenta una temperatura de la solución para reducir la actividad de la enzima. Además, de conformidad con esta realización, el pH puede aumentarse de aproximadamente 11 a aproximadamente 13 dependiendo de la tolerancia de la membrana. Más aún, de conformidad con esta realización, la temperatura puede aumentarse de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 85 °C. Todavía más, de conformidad con esta realización, el pH puede aumentarse de aproximadamente 12,0 a aproximadamente 13,0 mientras que la temperatura puede aumentarse de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C. Todavía más aún, de conformidad con esta realización, el pH puede aumentarse de aproximadamente 11,0 a aproximadamente 12,0 mientras que la temperatura puede aumentarse de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 85 °C.

20 En una realización de la invención, la membrana se ha usado para el tratamiento de proteínas. En particular, de acuerdo con determinadas realizaciones de la invención, la membrana se ha usado para el tratamiento de suero ácido, suero dulce y leche desnatada.

25 En otro aspecto, la invención proporciona un método de limpieza de una membrana que comprende enjuagar previamente con una solución de enjuague previo que comprende agua durante un período de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 30 minutos, limpiar la membrana usando una solución que comprende una enzima y un agente que tiene un pH compatible con la enzima, teniendo la solución una temperatura compatible con la membrana, durante un período de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 45 minutos e impedir que cualesquiera iones divalentes en la solución precipiten, reducir una actividad de la enzima añadiendo un agente aglutinante y opcionalmente un agente reductor, opcionalmente, reducir una actividad de la enzima comprende aumentar al menos uno de un pH de la solución y una temperatura de la solución, en donde el método es sin enjuagar la solución de la membrana desde el momento en que la solución se pone en contacto con la membrana hasta el momento en que se usa para reducir la actividad de la enzima, después de la etapa de adición y aumento opcional continuar lavando la membrana del orden de hasta aproximadamente 40 minutos, y enjuagar posteriormente con una solución de enjuague posterior que comprende agua durante un período de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 30 minutos.

40 Otros aspectos y realizaciones se harán evidentes tras la revisión de la siguiente descripción. La invención, sin embargo, se precisa con particularidad mediante las reivindicaciones incluidas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Habiendo descrito de este modo la invención en términos generales, ahora se hará referencia a los dibujos adjuntos, que no están necesariamente dibujados a escala, y en donde:

45 La figura 1 es un diagrama de flujo que muestra las etapas de un método de limpieza de una membrana de acuerdo con una realización de la invención;

La figura 2 es una representación gráfica de la variación en el grado de hidrólisis para suero dulce en polvo en soluciones de sustrato enzimático dosificadas con un 0,5 % en peso de EDTA como agente aglutinante;

La figura 3 es una representación gráfica de la variación en el grado de hidrólisis para suero dulce en polvo en soluciones de sustrato enzimático dosificadas con un 0,125 % en peso de EDTA como agente aglutinante;

50 La figura 4 es una representación gráfica de la variación en el grado de hidrólisis para suero dulce en polvo en soluciones de sustrato enzimático dosificadas con un 1,0 % en peso de EDTA como agente aglutinante;

La figura 5 es una representación gráfica de la variación en el grado de hidrólisis para suero dulce en polvo en soluciones de sustrato enzimático dosificadas con un 0,001 % en peso de EDTA, un 0,005 % en peso de EDTA y un 0,01 % en peso de EDTA como agente aglutinante;

La figura 6 es una representación gráfica de la variación en el grado de hidrólisis para suero dulce en polvo en soluciones de sustrato enzimático dosificadas con un 0,46 % en peso de MGDA como agente aglutinante;

La figura 7 es una representación gráfica de la variación en el grado de hidrólisis para suero dulce en polvo en soluciones de sustrato enzimático dosificadas con un 0,115 % en peso de MGDA como agente aglutinante;

- 5 La figura 8 es una representación gráfica de la variación en el grado de hidrólisis para suero dulce en polvo en soluciones de sustrato enzimático dosificadas con un 0,33 % en peso de HEDP como agente aglutinante; y

La figura 9 es una representación gráfica de la variación en el grado de hidrólisis para suero dulce en polvo en una solución de sustrato enzimático dosificada con un 1,0 % en peso de poliacrilato como agente aglutinante.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 10 La presente invención se describirá ahora con más detalle en lo sucesivo en el presente documento. Se pueden describir realizaciones preferidas de la invención, pero esta invención, sin embargo, puede implementarse en muchas formas diferentes y no debe interpretarse como limitada a las realizaciones establecidas en el presente documento. Más bien, estas realizaciones se proporcionan para que esta divulgación sea exhaustiva y completa, y transmita plenamente el alcance de la invención a los expertos en la materia. Las realizaciones de la invención no
15 deben interpretarse de ningún modo como limitantes de la invención.

Como se usan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a "una enzima" incluye una pluralidad de dichas enzimas.

- 20 Aunque en el presente documento se emplean términos específicos, se usan únicamente en un sentido genérico y descriptivo y no con fines de limitación. Todos los términos, incluidos los términos técnicos y científicos, como se usan en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la materia a la que pertenece esta invención, a menos que un término se haya definido de otro modo. Se entenderá además que los términos, tales como los definidos en diccionarios de uso común, deben interpretarse como si tuvieran el significado comúnmente entendido por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Se entenderá
25 además que los términos, tales como los definidos en diccionarios de uso común, deben interpretarse como si tuvieran un significado que sea coherente con su significado en el contexto de la técnica relevante y la presente divulgación. Dichos términos de uso común no se interpretarán en un sentido idealizado o excesivamente formal a menos que la divulgación en el presente documento defina expresamente lo contrario.

- 30 Como se usa en el presente documento, un "agente de alcalinidad" se refiere a un compuesto que aumenta el pH de una solución.

Como se usa en el presente documento, el término "tampón" significa un compuesto que mantiene el pH de la solución de limpieza dentro de un intervalo estrecho de límites. Un tampón incluido en la solución de limpieza de la invención mantiene un pH en un intervalo deseado.

- 35 Como se usa en el presente documento, un "agente aglutinante" es una sustancia que se une a iones, preferentemente iones bivalentes que incluyen, pero sin limitarse a, iones de calcio y magnesio. En una realización preferida de la invención, el agente aglutinante comprende un agente aglutinante bivalente. Un agente aglutinante puede incluir, pero no se limita a, quelatos y secuestrantes. Un agente aglutinante incluye un compuesto capaz de aislar o inactivar un ion metálico que pueda estar presente en la solución desarrollando un complejo que impide que el ion metálico participe fácilmente en o catalice reacciones químicas. Los términos "quelante", "agente quelante" o
40 "secuestrante" también pueden usarse indistintamente con el término "agente aglutinante" en la divulgación proporcionada en el presente documento. Un agente aglutinante, quelante, agente quelante o complejo secuestrante puede impedir que determinados iones metálicos precipiten en la superficie de la membrana y bloqueen los poros de la membrana. Por ejemplo, el agua presente en el equipo para fines de limpieza puede incluir cationes de calcio (Ca^{2+}) y cationes de magnesio (Mg^{2+}) que determinan la dureza del agua. Se puede incluir un agente aglutinante que forme complejos con los iones metálicos Ca^{2+} y Mg^{2+} para impedir la precipitación de compuestos como fosfatos, sulfatos o carbonatos. Además de un agente aglutinante que proporciona un mejor control de la dureza del agua, un agente aglutinante puede ayudar a controlar los ácidos grasos libres disueltos a partir de grasas saponificadas al impedir la acumulación de jabones de Ca o Mg. En un ejemplo no limitante, el estearato de sodio es soluble en agua, lo que hará que el estearato permanezca en la solución. Sin embargo, durante la saponificación, puede
45 formarse estearato de calcio, que es en gran parte insoluble en agua y no puede enjuagarse de la solución. De esta forma, un agente aglutinante evita dicha formación de estearato de calcio.

- 50 Como se usa en el presente documento, el término "enzima" puede catalizar la descomposición de materiales proteicos y/o suciedad orgánica que se hayan depositado en la superficie del equipo. No se recomienda usar dichas enzimas a temperaturas más altas, normalmente superiores a 60 °C, ya que las enzimas son susceptibles de descomponerse a estas temperaturas más altas. Es más preferente usar enzimas para la limpieza, incluso más preferentemente, en el intervalo de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C. Las proteasas
55

(descomponen las proteínas), las amilasas (descomponen el almidón) y las lipasas (descomponen las grasas) son los tipos de enzimas más comúnmente usados en los sistemas de limpieza.

Una proteasa (también llamada peptidasa o proteinasa) es cualquier enzima que realiza la proteólisis; catabolismo de proteínas por hidrólisis de enlaces peptídicos. Las proteasas han evolucionado varias veces y diferentes clases de proteasas pueden realizar la misma reacción mediante mecanismos catalíticos completamente diferentes. Las proteasas se pueden encontrar en animales, plantas, hongos, bacterias, arqueas y virus. En general, las proteasas se clasifican en varios grupos amplios según los tipos catalíticos que incluyen, pero sin limitarse a, serina, cisteína, aspártico y metaloproteasas (zinc).

Una clasificación actualizada de las superfamilias evolutivas de proteasas se encuentra en la base de datos MEROPS (véase <http://merops.sanger.ac.uk/>). En esta base de datos, las proteasas se clasifican en primer lugar por "clan" (superfamilia) basándose en la estructura, el mecanismo y el orden de los residuos catalíticos. Actualmente se conocen más de 50 clanes, cada uno de los cuales indica un origen evolutivo independiente de la proteólisis.

La estructura en 3D nativa de las enzimas se estabiliza mediante diversos efectos, por ejemplo, iones mono y divalentes, enlaces disulfuro, enlaces de hidrógeno e interacción hidrófoba. Dependiendo de la estructura en 3D específica y su estabilización, existen varias etapas de inactivación aplicables. Los enlaces de hidrógeno y las interacciones hidrófobas pueden verse influenciadas por un aumento del pH y la temperatura para todas las proteasas, pero la banda aceptable de pH y temperatura puede estar limitada por el material del equipo en la instalación con membranas y, por lo tanto, este método no siempre se puede usar en aplicaciones de limpieza de membranas.

Como se usa en el presente documento, el término "agente reductor" o "agente reductor de enzimas" se refiere a un compuesto o mezcla de compuestos que son capaces de reducir la actividad de la enzima. En un ejemplo no limitante, un agente reductor de enzimas es capaz de desplegar las proteínas descomponiendo su estructura. Por ejemplo, un agente reductor de enzimas puede desactivar una enzima descomponiendo los enlaces disulfuro. Dichos agentes incluyen, pero sin limitarse a, sulfuro de sodio, borohidruro de sodio, ditionito de sodio, ditioneol y glutatión.

La aplicación de agentes reductores está limitada a proteasas estabilizadas por enlaces disulfuro. Muchos agentes reductores son compuestos organosulfurados e incluso derrames muy pequeños pueden causar mal olor, lo cual no suele ser deseado en el procesamiento de dichas enzimas.

Se puede realizar una diferenciación adicional para las proteasas estabilizadas con iones divalentes, que se pueden desactivar en la mayoría de los casos con la aplicación de agentes aglutinante para iones divalentes (como agentes quelantes, quelatos, agentes secuestrantes, ácidos fosfónicos y sales de los mismos, y poliacrilatos). Ejemplos comerciales de este tipo de enzima son SAVINASE® o ALCALASE®, cada una disponible de Novozymes (con sede en Bagsvaerd, Dinamarca). En el caso de que la proteasa no sea sensible a los agentes aglutinantes divalentes, tales como BLAZE® Pro 100L o ESPERASE®, debido a que el ion divalente puede unirse muy fuertemente a la enzima, la enzima debe desactivarse mediante uno de los dos primeros métodos (inactivación por exposición a agentes reductores para reducir los enlaces disulfuro, aplicación de pH extremo o un aumento de temperatura para perturbar las interacciones hidrófobas).

El calcio, en un ejemplo no limitante, es esencial para la estabilidad de una enzima. Algunos tipos de enzimas tienen el ion Ca muy fuertemente unido a su estructura, mientras que otras enzimas pueden liberar más fácilmente el ion Ca en el agua circundante. En caso de que no haya dureza en el agua, puede haber un equilibrio entre el ion Ca en la estructura de la enzima y su liberación a la fase acuosa. El ion Ca "libremente disponible" en la fase acuosa puede unirse a un agente aglutinante, un quelato, un fosfonato o cualquier combinación de estas sustancias. La enzima se puede desactivar liberando su ion Ca en un entorno donde no hay ion Ca presente. El ion Ca liberado se une entonces con más fuerza, por ejemplo, a un quelato. Como resultado, no hay iones Ca libres disponibles para estabilizar la enzima y la enzima no permanece activa. Con el método de pH-metro (*pH-stat*) se puede medir indirectamente la actividad enzimática. Este método se ha usado para medir la actividad enzimática en presencia de un agente aglutinante que incluye, en ejemplos no limitantes, quelatos y fosfonatos.

Como se usa en el presente documento, el término "tensioactivo" significa un agente de limpieza activo de una solución de limpieza que puede realizar cualquier combinación de humectación e incluso penetración en la suciedad del equipo a limpiar, aflojando la suciedad depositada en la superficie del equipo y emulsionando la suciedad para mantenerla suspendida en la solución para su eliminación del equipo. Los tensioactivos también tienden a reducir la tensión superficial en la solución de limpieza. Se pueden seleccionar tensioactivos que sean de naturaleza polar o hidrófila, tales como tensioactivos cargados negativamente o aniónicos. Se pueden seleccionar tensioactivos que sean de naturaleza no polar o hidrófoba, tales como tensioactivos no iónicos que no tienen carga. También se pueden usar tensioactivos anfóteros que se comportan como tensioactivos aniónicos, catiónicos y no iónicos, dependiendo del pH, aunque el uso de tensioactivos catiónicos es menos preferido de acuerdo con determinadas realizaciones de la invención. Convencionalmente, los tensioactivos se han elegido en soluciones de limpieza para una temperatura de uso particular.

Como se usa en el presente documento, "% en volumen" se refiere al porcentaje de un compuesto nombrado basándose en el volumen del compuesto en relación con el volumen total de la solución en la que está incorporado el compuesto, a menos que se indique expresamente lo contrario.

- 5 Como se usa en el presente documento, "% en peso" se refiere al porcentaje de un compuesto nombrado basándose en el peso del compuesto en relación con el peso total de la solución en la que está incorporado el compuesto, a menos que se indique expresamente lo contrario.

10 Un aspecto de la invención descrita en el presente documento se refiere a una solución de limpieza para su uso en la limpieza de membranas que tiene una enzima y un agente, proporcionando el agente un control adecuado del pH de la limpieza. La solución de limpieza puede comprender además un agente aglutinante y opcionalmente un tensioactivo. En particular, las soluciones de limpieza son particularmente útiles para limpiar membranas cuando se necesita una temperatura elevada y/o un pH más alto, en particular para desactivar eventualmente la enzima. En una realización de la invención, la solución de limpieza generalmente comprende una enzima y un agente de alcalinidad.

15 En la limpieza de determinadas membranas, existen límites estrictos tanto en cuanto a los tipos de compuestos que pueden incluirse en la solución de limpieza como a los límites superiores de temperatura y/o pH. Las soluciones de limpieza de la invención permiten cumplir estas limitaciones.

También es necesario el control de los iones sujetos a precipitación. En particular, dichos iones incluyen el calcio. En una realización de la invención, la solución de limpieza comprende un agente aglutinante que puede incluir un agente quelante para impedir que cualesquiera iones divalentes presentes en la solución precipiten.

20 En una realización de la invención, el tensioactivo puede usarse como un potenciador o como parte de una composición de limpieza alcalina o ácida. En determinadas realizaciones de la invención, el tensioactivo se puede usar como un adyuvante de limpieza de membranas para mejorar la eliminación de proteínas, grasas y otras suciedades de las membranas. En determinadas otras realizaciones de la invención, el tensioactivo puede seleccionarse para mejorar las propiedades de hidrofilia de la membrana y mejorar las propiedades de permeación de procesamiento. En determinadas realizaciones de la invención, el tensioactivo se elige para proporcionar buenas características de enjuague, baja formación de espuma, buenas propiedades de eliminación de suciedad o limpieza, biodegradabilidad y/o un coste relativamente bajo. No se prefieren usos de tensioactivos que causan ensuciamiento de la membrana, así como otros problemas con respecto a las superficies de membrana. Por ejemplo, determinados tensioactivos catiónicos a menudo pueden estar asociados con un ensuciamiento irreversible de la membrana debido a la incapacidad de enjuagar o lavar el tensioactivo de la superficie. Se entiende que la membrana tiene una carga superficial negativa y, por lo tanto, un tensioactivo catiónico se siente fuertemente atraído por la superficie de la membrana y no se puede eliminar fácilmente. Cualquier tensioactivo residual en la superficie actúa como un agente ensuciador que causa bajas tasas de producción y flujo de agua, lo que da como resultado un rendimiento de producción deficiente.

35 En determinadas realizaciones, se eligen tensioactivos que no afectan negativamente a la superficie de la membrana, tales como, sin intención de ser limitante, un tensioactivo aniónico que no es fácilmente atraído a la superficie de la membrana debido a que tanto la membrana como el tensioactivo tienden a estar cargados negativamente. En determinadas realizaciones de la invención, un tensioactivo aniónico se elige para mejorar la capacidad de enjuague del tensioactivo y al mismo tiempo permitir que el tensioactivo ayude a limpiar grasas y proteínas debido a su tensión superficial reducida.

40 Se pueden incluir tensioactivos no iónicos en la solución de limpieza, de acuerdo con determinadas realizaciones de la invención. Un tensioactivo no iónico puede caracterizarse por tener propiedades positivas tales como desengrasado, baja formación de espuma, humectación y reducción de la tensión superficial. Sin embargo, no se prefieren los tensioactivos no iónicos que pueden causar problemas de ensuciamiento en la membrana debido a sus características generales de capacidad de enjuague deficiente. Los tensioactivos no iónicos son moléculas técnicamente neutras, pero la previsibilidad de si funcionarán bien o no como potenciadores de tensioactivos en un tipo particular de membrana es menos segura. El peso molecular, el equilibrio hidrófilo-lipófilo, la ramificación, la linealidad, la longitud de la cadena de alcohol, la humectación de Draves y el grado de etoxilación por sí solos no predicen adecuadamente si un tensioactivo no iónico funcionará bien o no en una membrana. Además, el tipo de superficie de membrana, tal como polietersulfona (PES) o polifluoruro de vinilo (PVDF), tienen diferentes energías superficiales que también afectan el modo en que un tensioactivo funciona en la superficie y el agente ensuciador funciona en la superficie. El límite de peso molecular o el tamaño de poro de una membrana en particular probablemente también afectarán a la funcionalidad de un tensioactivo debido al ensuciamiento de los poros, la penetración de los poros para limpiar los poros, la exclusión de la permeación de la membrana debido a la ramificación y el peso molecular, y la facilidad de permeación debido a la linealidad.

55 En determinadas realizaciones de la invención, el tensioactivo comprende uno o más tensioactivos aniónicos que incluyen uno cualquiera o una combinación de sal de Na de ácido alquil (C12) bencenosulfónico; ácido alquil (C12) bencenosulfónico, ácido dodecilbencenosulfónico; sal de Na de ácido alcano (C13-17) sulfónico, sulfonato de alcano secundario; sulfato de 2-etilhexilo; sulfonato de cumeno; sulfonato de xileno; sal de K de éster de fosfato de

alquilarilo alcoxi; sal de Na de ácido alfa-olefina sulfónico; y un ácido alquil éter carboxílico que incluye, en ejemplos no limitantes, un ácido alquil (C4-8) éter (5EO) carboxílico, un ácido alquil (C8) éter (5EO) carboxílico, un ácido alquil (C4) éter (6EO) carboxílico y un ácido alquil (C8) éter (8EO) carboxílico. Los tensioactivos aniónicos divulgados en el presente documento pueden usarse en combinación con cualquiera de los otros tensioactivos divulgados en el presente documento, de acuerdo con determinadas realizaciones de la invención.

En determinadas realizaciones de la invención, el tensioactivo comprende uno o más tensioactivos no iónicos que incluyen uno cualquiera o una combinación de óxidos de amina, tales como, por ejemplo, sin pretender ser limitante, un óxido de alquil dimetil amina tal como, en un ejemplo no limitante, un óxido de alquil (C12-14) dimetil amina; un poliglucósido tal como, en un ejemplo no limitante, poliglucósido C10; un alquilglucósido tal como, en ejemplos no limitantes, un alquilglucósido C8; un etoxilato de alcohol tridecílico; un etoxilato de hexan-1-ol; un sofrolípido, que es un compuesto glucolípido tensioactivo que puede sintetizarse a partir de una especie de levadura no patógena; un glicerofosfolípido, que es una grasa de lecitina que puede encontrarse en muchos alimentos; y polietilenglicol. Cualquiera de los tensioactivos no iónicos divulgados en el presente documento se puede usar en combinación con cualquiera de los otros tensioactivos divulgados en el presente documento, de acuerdo con determinadas realizaciones de la invención.

En determinadas otras realizaciones de la invención, el tensioactivo no iónico puede caracterizarse generalmente por la presencia de un grupo hidrófobo orgánico y un grupo hidrófilo orgánico y puede producirse mediante la condensación de un compuesto hidrófobo orgánico alifático, alquilaromático o polioxialquilénico con una fracción de óxido alcalino hidrófilo que en la práctica común es óxido de etileno o un producto de polihidratación del mismo, polietilenglicol. En determinadas realizaciones de la invención, se puede incluir propilenglicol en la solución de limpieza. La solución de limpieza puede comprender un compuesto hidrófobo que tiene un grupo hidroxilo, carboxilo, amino o amido con un átomo de hidrógeno reactivo que puede condensarse con óxido de etileno, o sus aductos de polihidratación, o sus mezclas con alcoxilenos tales como óxido de propileno para formar un agente tensioactivo no iónico. La longitud de la fracción de polioxialquileo hidrófilo que se condensa con cualquier compuesto hidrófobo particular se puede ajustar fácilmente para producir un compuesto dispersable en agua o soluble en agua que tenga el grado deseado de equilibrio entre propiedades hidrófilas e hidrófobas.

Los tensioactivos no iónicos útiles en la presente invención pueden incluir productos de condensación de un mol de un alcohol saturado o insaturado, de cadena lineal o ramificada que tiene de 6 a 24 átomos de carbono con de 3 a 50 moles de óxido de etileno; ésteres de polietilenglicol, otros ésteres de ácidos alcanóicos formados por reacción con glicéridos, glicerina y alcoholes polihídricos (sacáridos o sorbitán/sorbitol); alcoholes grasos etoxilados de C₆-C₁₈ y alcoholes grasos etoxilados y propoxilados mixtos de C₆-C₁₈, en particular aquellos que son solubles en agua; alcoholes grasos etoxilados de C₁₀-C₁₈ que tienen un grado de etoxilación de aproximadamente 3 a aproximadamente 50, de promedio; alquilpolisacáridos no iónicos que incluyen un grupo hidrófobo que contiene de aproximadamente 6 a aproximadamente 30 átomos de carbono y un polisacárido, por ejemplo, un poliglucósido, grupo hidrófilo que contiene de aproximadamente 1,3 a 10 unidades de sacárido, de promedio; un etoxilato de alcohol de Guerbet de fórmula R¹-(OC₂H₄)_n-(OH), en donde R¹ es un grupo alquilo ramificado de C₉-C₂₀ y n es de aproximadamente 2 a aproximadamente 10; un etoxilato de alcohol de Guerbet de fórmula R¹-(OC₂H₄)_n-(OH) donde R¹ es un grupo alquilo ramificado de C₁₀ a C₁₈ y n es de 5 a 10 o de 7 a 9. En determinadas realizaciones de la invención, R¹ puede ser un grupo alquilo ramificado de C₈ a C₁₂ y n es de 2 a 4.

Los tensioactivos de la solución de limpieza pueden incluir sulfonatos de alcano que tienen un grupo alcano con de aproximadamente 6 a aproximadamente 24 átomos de carbono. En determinados ejemplos no limitantes, los alcanosulfonatos pueden incluir alcanosulfonatos secundarios tales como alquilosulfonato secundario de sodio C₁₄-C₁₇.

En determinadas realizaciones de la invención, el tensioactivo comprende uno o más tensioactivos anfóteros que incluyen uno cualquiera o una combinación de alquil (C12-14) dimetil betaína; sal de mono Na de dipropionato de alquil (C12-14) amino; sal de mono Na de dipropionato de alquil (C8) amino; y cocoanfo dipropionato Na. Los tensioactivos anfóteros divulgados en el presente documento pueden usarse en combinación con cualquiera de los otros tensioactivos divulgados en el presente documento, de acuerdo con determinadas realizaciones de la invención.

Aunque se pueden incluir otros compuestos funcionales en la solución de limpieza, la solución de limpieza comprenderá al menos una enzima y un agente que tenga un pH compatible con la enzima. En una realización de la invención, la solución de limpieza puede comprender de aproximadamente 5 a aproximadamente 1000 ppm, de aproximadamente 10 a aproximadamente 750 ppm, de aproximadamente 25 a aproximadamente 600 ppm o de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 ppm de la enzima. En una realización preferida de la invención, las soluciones de limpieza comprenden una enzima serina proteasa.

En determinadas realizaciones de la invención, la solución de limpieza incluye un agente de estabilización de enzimas para estabilizar las enzimas en la solución. Por ejemplo, el agente de estabilización puede ser un agente soluble en agua que genera iones de calcio y/o magnesio. La variación en las concentraciones de dichos iones es posible dependiendo de un número múltiple de factores, incluida la multiplicidad, los tipos y la concentración de

enzimas incorporadas. En determinados ejemplos no limitantes, el agente de estabilización de enzimas puede comprender cloruro de calcio dihidrato y/o formiato de sodio. Los ejemplos no limitantes de sales de calcio o magnesio solubles en agua que se pueden emplear incluyen cloruro de calcio, hidróxido de calcio, formiato de calcio, malato de calcio, maleato de calcio, hidróxido de calcio y acetato de calcio. También pueden ser útiles las sales de calcio o magnesio correspondientes a las sales identificadas. Sin pretender de ser limitante, en determinadas circunstancias puede ser útil aumentar los niveles de calcio y/o magnesio.

En determinadas condiciones, sin pretender ser limitante, el calcio es esencial para la estabilidad de una enzima. Algunos tipos de enzimas permiten que el ion de calcio se una muy fuertemente a su estructura. Otras enzimas pueden liberar más fácilmente el ion de calcio en el agua circundante. Ciertamente, la multiplicidad, la concentración de enzimas y otras condiciones de la solución de limpieza también pueden afectar al grado en que los iones de calcio permanecen unidos a la o las enzimas. En particular, cuando hay una falta sustancial de dureza del agua, puede establecerse un equilibrio entre los iones de calcio en la estructura de la enzima y la liberación de iones de calcio a la fase acuosa. Los iones de calcio "libremente disponibles" en la fase acuosa pueden unirse a un agente aglutinante que incluye, en ejemplos no limitantes, un quelato, fosfonato, gluconato o cualquier combinación de estas sustancias o cualquier sustancia que actúe como agente aglutinante. En una realización de la invención, la enzima se puede desactivar liberando los iones de calcio unidos a ella en un entorno donde no hay iones de calcio presentes. La liberación de iones de calcio en esta circunstancia se produce cuando los iones de calcio se unen más fuertemente a un agente aglutinante presente en la solución de limpieza. Como resultado, no habrá iones de calcio libres disponibles para estabilizar la enzima y esta ya no estará activa.

En determinadas realizaciones de la invención, la solución de limpieza puede comprender un agente de alcalinidad. En una realización de la invención, la solución de limpieza puede comprender de aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 2 % en peso, de aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 1 % en peso, o de aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 0,5 % en peso o de aproximadamente el 0,01 al 0,2 % en peso del agente de alcalinidad. En determinadas realizaciones de la invención, se incluye una cantidad suficiente de agente de alcalinidad para proporcionar un pH de la solución de limpieza en un intervalo de aproximadamente 8,5 a aproximadamente 12 o, preferentemente, de aproximadamente 9 a aproximadamente 11.

En otras realizaciones de la invención, la solución de limpieza puede comprender un tampón. En una realización de la invención, la solución de limpieza puede comprender de aproximadamente el 0,05 a aproximadamente el 1 % en peso, de aproximadamente el 0,05 a aproximadamente el 0,8 % en peso, de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 0,5 % en peso del tampón. Los reguladores de pH que pueden incluirse en la solución de limpieza incluyen uno cualquiera o más de hidróxido de potasio (por ejemplo, en el intervalo del 4,5-6,5 % en peso), bicarbonato de sodio (por ejemplo, en el intervalo del 8-12 % en peso) y carbonato de sodio (por ejemplo, en el intervalo del 4-8 % en peso).

En determinadas realizaciones de la invención, la solución de limpieza comprende adicionalmente un agente aglutinante. La solución de limpieza puede comprender de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 ppm, de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 ppm, de aproximadamente 25 a aproximadamente 300 ppm, o de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 ppm del agente aglutinante, de acuerdo con determinadas realizaciones de la invención.

Ejemplos no limitantes de agentes aglutinantes que pueden incluirse en la solución de limpieza de la invención son ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y cualquier sal del mismo, ácido (hidroxietil)etilendiaminotriacético (HEDTA) y cualquier sal del mismo, tripolifosfato de potasio (KTPP), un ácido fosfónico y cualquier sal del mismo, ácido nitrilotriacético (NTA) y cualquier sal del mismo, ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y cualquier sal del mismo, ácido glucónico (GA) y cualquier sal del mismo, ácido glutámico diacético (GLDA) y cualquier sal del mismo, ácido metilglicindiacético (MGDA) y cualquier sal del mismo, ácido iminodisuccínico (IDS) y cualquier sal del mismo, ácidos aminocarboxílicos y cualquier sal de los mismos, ácido hidroxietano difosfónico (HEDP) y cualquier sal del mismo, ácido aminotris(metilenfosfónico) (ATMP) y cualquier sal del mismo, ácido 2-fosfonobutano-1,2,4-tricarboxílico (PBTC) y cualquier sal del mismo, ácido etilendiaminotetra(metilenfosfónico) (EDTMP) y cualquier sal del mismo, ácido dietilentriaminopenta(metilenfosfónico) (DTPMP) y cualquier sal del mismo, un poliacrilato, gluconato de sodio (gluconato de Na) y cualquier combinación de los mismos. Un ácido poliacrílico parcialmente neutralizado (que tiene un M en el rango de aproximadamente 2,5 k a aproximadamente 5 k) se puede incluir en la solución de limpieza, de acuerdo con una realización de la invención.

En determinadas otras realizaciones de la invención, la solución de limpieza puede comprender un alquilpoliglucósido, siendo el grupo alquilo de aproximadamente C₂ a aproximadamente C₁₈, de aproximadamente C₅ a aproximadamente C₁₂, o de aproximadamente C₈ a aproximadamente C₁₀. Se puede incluir un ácido alquilsulfúrico o cualquier sal del mismo en la solución de limpieza, de acuerdo con determinadas realizaciones de la invención. En determinadas realizaciones de la invención, el tensioactivo puede incluir sulfato de 2-etilhexilo, sal de mono Na de dipropionato de alquil (C8) amino, poliglucósido C10, sal de mono Na de ácido alquil (C12) bencenosulfónico y cualquier combinación de los mismos y en cualquier combinación con los otros tensioactivos que se divulgan en el presente documento.

En otras realizaciones de la invención, la solución de limpieza comprende adicionalmente un tensioactivo. En una realización de la invención, la solución de limpieza puede comprender de aproximadamente 1 a aproximadamente 2000 ppm, de aproximadamente 25 a aproximadamente 1000 ppm, de aproximadamente 50 a aproximadamente 750 ppm o, preferentemente, de aproximadamente 150 a aproximadamente 1000 ppm del tensioactivo.

- 5 Un aspecto de la invención proporciona el uso de la solución de limpieza de la invención para limpiar una membrana. La figura 1 es un diagrama de flujo que muestra las etapas de un método de limpieza de una membrana de acuerdo con una realización de la invención. El método de limpieza de una membrana **1** incluye las etapas de enjuagar previamente la membrana **10**. El tiempo de enjuague previo puede durar entre aproximadamente 2 minutos y aproximadamente 30 minutos.
- 10 Otra etapa en la limpieza de la membrana **1** incluye limpiar la membrana usando una solución que comprende una enzima y un agente que tiene un pH compatible con la enzima e impedir que cualesquiera iones divalentes en la solución precipiten **20**. Se configura una solución de limpieza, que contiene una enzima y un agente que tiene un pH compatible con la membrana y una temperatura compatible con la membrana. Esta etapa de limpieza puede durar entre aproximadamente 2 minutos y aproximadamente 45 minutos.
- 15 Otra etapa en la limpieza de la membrana **1** incluye reducir la actividad de la enzima **30**. Como se describe con más detalle en el presente documento, reducir la actividad de la enzima **30** incluye añadir un agente aglutinante y, opcionalmente, uno o más de los siguientes: añadir un agente reductor, aumentar el pH y aumentar la temperatura. Sin pretender limitarse a la teoría, cualesquiera aumentos de pH y temperatura para reducir la actividad de la enzima **30** están limitados por lo que la membrana es capaz de soportar. Adicionalmente, la membrana debe ser compatible con cualquier agente aglutinante y/o agente reductor usado. La reducción de la actividad de la enzima **30** puede durar hasta aproximadamente 45 minutos.

Otra etapa en la limpieza de la membrana **1** incluye enjuagar posteriormente la membrana para la eliminación de la solución **40**. El tiempo de enjuague posterior puede durar entre aproximadamente 2 minutos y aproximadamente 30 minutos.

- 25 En una realización de la invención, un método de limpieza de una membrana incluye las etapas de enjuagar previamente la membrana; limpiar la membrana usando una solución que comprende una enzima y un agente que tiene un pH compatible con la enzima, teniendo la composición una temperatura compatible con la membrana; impedir que cualesquiera iones divalentes en la solución precipiten; reducir la actividad enzimática añadiendo un agente aglutinante capaz de desactivar la enzima a la solución, en donde el método es sin enjuagar la solución de la membrana desde el momento en que la solución se pone en contacto con la membrana hasta el momento en que se usa para reducir la actividad de la enzima; y enjuagar posteriormente la membrana para eliminar la solución. En determinadas realizaciones de la invención, la solución puede comprender adicionalmente un tensioactivo.
- 30

El método de limpieza de la membrana incluye la etapa de añadir un agente aglutinante para la desactivación de la enzima. En determinadas realizaciones de la invención, la etapa para reducir la actividad enzimática incluye añadir un agente reductor. En otra realización más de la invención, la etapa para reducir la enzima puede incluir uno o ambos de aumentar un pH y aumentar una temperatura de la solución.

- 35 Preferentemente, se usará suficiente agente aglutinante para desactivar la enzima después de que esta realice su función deseada en la operación de limpieza. En una realización de la invención, el agente aglutinante que se añade a la solución de limpieza puede comprender de aproximadamente 1 a aproximadamente 6000 ppm, de aproximadamente 5 a aproximadamente 2000 ppm, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 ppm de la solución. Para la eliminación de las sales de calcio, la solución de limpieza puede comprender de aproximadamente 1 a aproximadamente 4000 ppm de agente aglutinante adicional. Los ejemplos no limitantes del agente aglutinante que se puede añadir incluyen ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y cualquier sal del mismo, ácido (hidroxietil)etilendiaminotriacético (HEDTA) y cualquier sal del mismo, tripolifosfato de potasio (KTPP), un ácido fosfónico y cualquier sal del mismo, ácido nitrilotriacético (NTA) y cualquier sal del mismo, ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y cualquier sal del mismo, ácido glutámico diacético (GLDA) y cualquier sal del mismo, ácido metilglicindiacético (MGDA) y cualquier sal del mismo, ácido iminodisuccínico (IDS) y cualquier sal del mismo, ácidos aminocarboxílicos y cualquier sal de los mismos, ácido hidroxietano difosfónico (HEDP) y cualquier sal del mismo, ácido aminotris(metilenfosfónico) (ATMP) y cualquier sal del mismo, ácido 2-fosfonobutano-1,2,4-tricarboxílico (PBTC) y cualquier sal del mismo, ácido etilendiaminotetra(metilenfosfónico) (EDTMP) y cualquier sal del mismo, ácido dietilentriaminopenta(metilenfosfónico) (DTPMP) y cualquier sal del mismo, un poliacrilato, un copolímero de ácido acrílico-ácido maleico y cualquier sal del mismo, y cualquier combinación de los mismos.
- 40
- 45
- 50

En una realización de la invención, la cantidad total de agente aglutinante en relación con el contenido de enzima es al menos aproximadamente 0,2 g de agente aglutinante/g de enzima presente en solución, de aproximadamente 0,2 g de agente aglutinante/g de enzima presente en solución a aproximadamente 200 g de agente aglutinante/g de enzima presente en solución, o de aproximadamente 0,2 g de agente aglutinante/g de enzima presente en solución a aproximadamente 80 g de agente aglutinante/g de enzima presente en solución. En determinadas realizaciones de la invención, el agente aglutinante comprende EDTA y la solución de limpieza comprende de aproximadamente 0,2 g de EDTA/g de enzima presente en solución a aproximadamente 80 g de EDTA/g de enzima presente en solución, de

aproximadamente 0,2 g de EDTA/g de enzima presente en solución a aproximadamente 60 g de EDTA/g de enzima presente en solución, o de aproximadamente 0,2 g de EDTA/g de enzima presente en solución a aproximadamente 40 g de EDTA/g de enzima presente en solución.

5 En determinadas otras realizaciones de la invención, el agente aglutinante comprende MGDA y la solución de limpieza comprende de aproximadamente 0,2 g de MGDA/g de enzima presente en solución a aproximadamente 100 g de MGDA/g de enzima presente en solución, de aproximadamente 0,2 g de MGDA/g de enzima presente en solución a aproximadamente 80 g de MGDA/g de enzima presente en solución, o de aproximadamente 0,5 g de MGDA/g de enzima presente en solución a aproximadamente 60 g de MGDA/g de enzima presente en solución.

10 En una realización de la invención, el pH de la solución en la etapa de limpieza puede ser de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 11,0, de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 11,0, de aproximadamente 8 a aproximadamente 11, o de aproximadamente 8,5 a aproximadamente 10,5. En determinadas realizaciones de la invención, la temperatura de la solución en la etapa de limpieza puede ser de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 70 °C, de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 50 °C, menos de aproximadamente 60 °C o menos de aproximadamente 50 °C.

15 En una realización de la invención, la solución se pone en contacto con la membrana durante de aproximadamente 2 a aproximadamente 90 minutos, de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 60 minutos, o de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 45 minutos. En una realización de la invención, la reducción en la actividad enzimática puede deberse, al menos en parte, a la adición de al menos uno del agente aglutinante y el agente reductor.

20 En determinadas realizaciones de la invención, el pH puede aumentarse de aproximadamente 10,5 a aproximadamente 13,5, de aproximadamente 8,5 a aproximadamente 13,0, de aproximadamente 11,0 a aproximadamente 12,0 o de aproximadamente 12,0 a aproximadamente 13,0. En otras realizaciones de la invención, la temperatura puede aumentarse a menos de aproximadamente 55 °C, menos de aproximadamente 70 °C, menos de aproximadamente 75 °C o menos de aproximadamente 80 °C. En determinadas realizaciones de la invención, la temperatura se aumenta de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C, de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C, de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 85 °C o de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 70 °C.

25 En determinadas realizaciones de la invención, el pH se aumenta de aproximadamente 8,5 a aproximadamente 13,5 y la temperatura se aumenta de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 85 °C o de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C. En determinadas otras realizaciones de la invención, el pH se aumenta de aproximadamente 8,5 a aproximadamente 13,5 y la temperatura se aumenta de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C. En otras realizaciones más de la invención, el pH se aumenta de aproximadamente 8,5 a aproximadamente 13,0 y la temperatura se aumenta de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 85 °C o de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 70 °C. En otras realizaciones más de la invención, el pH se aumenta a aproximadamente 8,5 a aproximadamente 11,5 y la temperatura se aumenta a aproximadamente 50 °C, después de lo cual se añade a continuación un agente reductor para reducir la actividad enzimática.

30 En una realización de la invención, una actividad de la enzima se atenúa en al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 % o al menos aproximadamente un 95 %. En determinadas realizaciones de la invención, la actividad de la enzima se puede reducir aumentando al menos uno del pH o la temperatura de la solución de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 45 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos, o de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 20 minutos. En determinadas realizaciones de la invención, la actividad de la enzima se reduce aumentando al menos uno del pH o la temperatura de la solución durante aproximadamente 15 minutos.

El método de limpieza de la membrana puede comprender añadir un agente de alcalinidad a la solución que se pone en contacto con la membrana antes de añadir el agente aglutinante para reducir la actividad de la enzima.

50 El método de limpieza de la membrana se realiza sin enjuagar la solución de la membrana entre el momento en que la solución de limpieza se pone en contacto con la membrana y el momento en que se usa para reducir la actividad de la enzima.

55 En una realización de la invención, se proporciona un método para limpiar una membrana usada para el tratamiento de cualquier suciedad proteica soluble que incluye las siguientes etapas: enjuagar previamente con una solución de enjuague previo que comprende agua durante un período de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 30 minutos; limpiar la membrana usando una solución que comprende una enzima y un agente que tiene un pH compatible con la enzima de acuerdo con la definición de solución y etapa de limpieza como se define con más detalle en el presente documento durante un período de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 45 minutos, en donde se impide que cualesquiera iones divalentes en la solución precipiten; añadir un agente

aglutinante y opcionalmente un agente reductor, incluyendo opcionalmente aumentar al menos uno de un pH y una temperatura de la solución en donde el método es sin enjuagar la solución de la membrana desde el momento en que la solución se pone en contacto con la membrana hasta el momento en que se usa para reducir la actividad de la enzima; después de la etapa de adición y aumento opcional continuar lavando la membrana del orden de hasta aproximadamente 45 minutos; y enjuagar posteriormente con una solución de enjuague posterior que comprende agua durante un período de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 30 minutos.

La actividad enzimática en una solución se puede medir indirectamente usando un método de pH-metro. El método de pH-metro se puede usar para medir la actividad enzimática en presencia de un agente aglutinante que incluye, en ejemplos no limitantes, quelatos, fosfonato y gluconato. La acción de la proteasa sobre las proteínas crea grupos funcionales ácidos. Por lo tanto, la hidrólisis de proteínas reduce el pH de la solución con el tiempo. El grado de liberación de aminoácidos durante la descomposición enzimática se puede medir mediante la cantidad de sosa cáustica necesaria para mantener constante el pH de la solución. Además, sin pretender limitarse a la teoría, se prefiere mantener el pH en un valor en el que la actividad enzimática esté en su máximo. Adicionalmente, la temperatura en combinación con el pH debe mantenerse en un valor preferido para maximizar la actividad de la enzima.

El grado de hidrólisis se identifica mediante la siguiente ecuación:

$$DH\% = \frac{V \times N}{M \times \alpha \times h_{tot}} \times 100 \quad (1)$$

Donde:

DH% = grado de hidrólisis, %

V = volumen de NaOH añadido, ml

N = molaridad de la solución de NaOH, mol/l

M = masa total de proteína, g

α = grado promedio de disociación de los grupos α -amino liberados durante la hidrólisis

h_{tot} = número total de enlaces peptídicos, mmol/g

EJEMPLOS

La invención se define además mediante referencia a los siguientes ejemplos, que describen soluciones de limpieza y métodos para realizar una limpieza acelerada de una operación de membrana a base de productos lácteos de acuerdo con la invención y el rendimiento de los mismos en una operación de limpieza de membrana.

EJEMPLO 1

Se realizaron pruebas de inactivación para diferentes enzimas usando análisis colorimétrico para determinar la actividad enzimática. Inicialmente se formuló una solución patrón de tampón al 0,5 % en peso que tenía un pH de 9,53. Usando esta solución patrón se formaron soluciones enzimáticas separadas. Se añadieron distintas concentraciones de hidróxido de sodio (NaOH) para ajustar el pH de la solución al nivel deseado. La tabla 1 identifica las soluciones enzimáticas que se formularon usando las enzimas proteasas ALCALASE® 2.5L, ESPERASE® 8.0L, SAVINASE® Ultra 16 XL y BLAZE® Pro 100L, todas adecuadas para la hidrólisis de proteínas, cada una disponible de Novozymes (con sede en Bagsvaerd, Dinamarca).

TABLA 1

Soluciones de limpieza que tienen un 0,5 % en peso de tampón con distintos tipos de enzimas				
Solución de limpieza	Enzima		NaOH, % en peso	pH
	Nombre	Concentración, % peso		
1	ESPERASE 8.0L	0,3	0,000	9,50
2			0,050	11,20
3			0,125	12,00
4			0,625	12,80

ES 3 010 557 T3

5	ALCALASE 2.5L	0,3	0,000	9,49
6			0,050	11,36
7			0,125	12,01
8			0,625	12,80
9	SAVINASE Ultra 16 XL	0,3	0,000	9,51
10			0,050	11,32
11			0,125	12,01
12			0,625	12,79
13	BLAZE Pro 100L	0,3	0,000	10,85
14			0,050	11,95
15			0,625	12,84

La tabla 2 muestra las actividades enzimáticas de las soluciones identificadas en la tabla 1 a distintas temperaturas. Aquellas soluciones marcadas con 100 % indican una actividad enzimática que es mayor que un límite de detección superior del método de medición, mientras que aquellas marcadas con u.d. identifican una actividad enzimática que es menor que el límite de detección del método de medición.

5

TABLA 2

Actividades enzimáticas a diversas temperaturas			
Solución de limpieza	Actividad enzimática		
	50 °C	60 °C	70 °C
1	100 %	100 %	100 %
2	100 %	100 %	<u>u.d.</u>
3	100 %	<u>u.d.</u>	<u>u.d.</u>
4	<u>u.d.</u>	<u>u.d.</u>	<u>u.d.</u>
5	100 %	100 %	<8 %
6	100 %	<65 %	<u>u.d.</u>
7	<u>u.d.</u>	<u>u.d.</u>	<u>u.d.</u>
8	<u>u.d.</u>	<u>u.d.</u>	<u>u.d.</u>
9	100 %	100 %	<u>u.d.</u>
10	100 %	<u>u.d.</u>	<u>u.d.</u>
11	<u>u.d.</u>	<u>u.d.</u>	<u>u.d.</u>
12	<u>u.d.</u>	<u>u.d.</u>	<u>u.d.</u>
13	100 %	<30 %	<u>u.d.</u>
14	<20 %	<u>u.d.</u>	<u>u.d.</u>
15	<u>u.d.</u>	<u>u.d.</u>	<u>u.d.</u>

La tabla 3A identifica una serie de soluciones de limpieza que tienen un 0,5 % en peso de un tampón y un 0,2 % en

ES 3 010 557 T3

peso de ESPERASE 8.0L. Se midió la actividad enzimática de la solución de limpieza a distintas concentraciones del agente reductor de enzimas ditionito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) a diversos niveles de dilución y los resultados también se muestran en la tabla 3A. Las soluciones marcadas con o.d. indican una actividad enzimática que está por encima de un límite de detección del método de medición, mientras que las marcadas con u.d. identifican una actividad enzimática que está por debajo del límite de detección del método de medición.

5

TABLA 3A

Efecto de la concentración y dilución del agente reductor de enzimas sobre la actividad enzimática				
Concentración, % en peso			Dilución de la solución	Actividad enzimática
Tampón	ESPERASE 8.0L	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$		
0,5	0,0	0,00	0	<u>u.d.</u>
0,5	0,0	0,05	0	<u>u.d.</u>
0,5	0,0	0,10	0	<u>u.d.</u>
0,5	0,0	0,15	0	<u>u.d.</u>
0,5	0,0	0,20	0	<u>u.d.</u>
0,5	0,0	0,25	0	<u>u.d.</u>
0,5	0,2	0,00	0	<u>o.d.</u>
0,5	0,2	0,05	0	<u>o.d.</u>
0,5	0,2	0,10	0	<u>o.d.</u>
0,5	0,2	0,15	0	<u>o.d.</u>
0,5	0,2	0,20	0	<u>o.d.</u>
0,5	0,2	0,25	0	<u>u.d.</u>
0,5	0,2	0,00	5X	<u>o.d.</u>
0,5	0,2	0,05	5X	<u>o.d.</u>
0,5	0,2	0,10	5X	<u>o.d.</u>
0,5	0,2	0,15	5X	<u>o.d.</u>
0,5	0,2	0,20	5X	0,22794
0,5	0,2	0,25	5X	<u>u.d.</u>
0,5	0,2	0,00	10X	0,93602
0,5	0,2	0,05	10X	0,81721
0,5	0,2	0,10	10X	0,71910
0,5	0,2	0,15	10X	0,65791
0,5	0,2	0,20	10X	0,21666
0,5	0,2	0,25	10X	<u>u.d.</u>

Se llevaron a cabo pruebas similares para una serie de soluciones de limpieza que tenían un 0,5 % en peso de un tampón y un 0,5 % en peso de BLAZE Pro 100L, cuyos resultados se incluyen en la tabla 3B.

TABLA 3B

Efecto de la concentración y dilución del agente reductor de enzimas sobre la actividad enzimática				
Concentración, % en peso			Dilución de la solución	Actividad enzimática
Tampón	BLAZE Pro 100L	Na ₂ S ₂ O ₄		
0,5	0,2	0,00	0	0,75783
0,5	0,2	0,05	0	0,70535
0,5	0,2	0,10	0	0,69190
0,5	0,2	0,15	0	0,65687
0,5	0,2	0,20	0	0,63666
0,5	0,2	0,25	0	0,62515

Las pruebas en las tablas 3A y 3B muestran que una concentración de ditionito de sodio del 0,25 % en peso desactiva ESPERASE 8.0L, pero no BLAZE Pro 100L con un tiempo de contacto de cinco minutos a 50 °C.

5 EJEMPLO 2

En las investigaciones sobre qué agente aglutinante (por ejemplo, EDTA, KTPP, IDS, PBTC o ATMP y, eventualmente, el propio sistema tampón de carbonato de sodio, como agentes aglutinantes ejemplificantes no limitantes) tiene el mayor impacto en la disminución de la actividad enzimática en la solución de uso, se llevaron a cabo pruebas mezclando diferentes agentes aglutinantes junto con la enzima ESPERASE 8.0L o ALCALASE 2.5L tipo DX perteneciente a la clase de serina proteasas o, para ser más precisos, a la clase de las subtilasas.

Las soluciones de limpieza se prepararon en agua de ósmosis inversa (OI) sin la enzima y se calentaron a 50 °C. El pH de la solución de limpieza se ajustó a 9,0 y a continuación se añadió la enzima. La temperatura de la solución de limpieza se mantuvo a 50 °C durante 60 minutos. Se tomaron dos muestras de la solución de limpieza cuando se añadió la enzima y en los siguientes intervalos después de que se añadió la enzima: 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos y 60 minutos. Una vez tomadas, las muestras se colocaron inmediatamente en un baño de hielo para detener la reacción y se midió la actividad enzimática de las muestras. La tabla 4 identifica las soluciones de limpieza que se pusieron a prueba e incluyeron sosa cáustica, un tensioactivo, un tampón y la enzima proteasa ESPERASE 8.0L.

TABLA 4

Compuestos	Solución de limpieza														
	16º	17º	18º	19º	20º	21º	22º	23º	24º	25º	Concentración, % en peso				
agua (blanda)	99,54	99,60	99,63	99,52	99,51	99,58	99,56	99,53	99,56	99,50					
hidróxido de potasio	0,0800	0,0841	0,0841	0,0841	0,0858	0,0858	0,0858	0,0858	0,0858	0,0858					
ácido fosfórico	0,0416	0,0416	0,0416	0,0416	0,0416	0,0416	0,0416	0,0416	0,0416	0,0416					
Sai de Na de 1,2-benzisotiazolin-3-onas	0,00013	0,00013	0,00013	0,00013	0	0	0	0	0	0					
ácido 2-fosfonobutano, 1,2,4-tricarboxílico - PBTC	0,0033	0,0033	0,0033	0,0033	0	0	0	0	0	0					
carbonato de sodio - Na ₂ CO ₃	0,033	0,033	0	0,0198	0,0198	0,0198	0	0,0198	0,0198	0,0198					
bicarbonato de sodio - NaHCO ₃	0	0	0	0,033	0,033	0,033	0	0,033	0,033	0,033					
ácido etilendiaminotetraacético - EDTA	0,0588	0	0	0,0588	0,0157	0	0,0157	0	0,0157	0					
sai de Na del ácido-iminodisuccínico - IDS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0224					
trifosfato de potasio - K ₃ TPP	0	0	0	0	0,0495	0	0,0495	0,0495	0	0,0495					
ácido aminodimetilfosfónico - ATMP	0	0	0	0	0,0033	0,0033	0,0033	0,0033	0,0033	0,0033					
propilenglicol	0,1400	0,1400	0,1400	0,1400	0,1400	0,1400	0,1400	0,1400	0,1400	0,1400					
aquil (C12-14) dimetilbetainas	0,0758	0,0758	0,0758	0,0758	0,0758	0,0758	0,0758	0,0758	0,0758	0,0758					
ácido sulfúrico	0,0004	0,0004	0,0004	0,0004	0,0004	0,0004	0,0004	0,0004	0,0004	0,0004					
ESPERASE 8,0L	0,0250	0,0250	0,0250	0,0250	0,0250	0,0250	0,0250	0,0250	0,0250	0,0250					
pH	9,01	8,96	9,06	9,00	9,04	9,06	9,03	9,03	9,06	9,06					

ES 3 010 557 T3

La tabla 5 muestra la actividad relativa de la ESPERASE 8.0L después de ser añadida a la solución de limpieza, 20 minutos después de la adición y 60 minutos después de la adición. Cabe señalar que * significa sin tampón.

TABLA 5

Solución de limpieza	Agente aglutinante	Actividad relativa de ESPERASE 8.0L, %		
		Después de la adición	Después de 20 min	Después de 60 min
16	0,0588 % de EDTA + 0,0033 % de PBTC	100	89	80
17	0,0033 % de PBTC	100	98	100
18	0,0033 % de PBTC*	100	100	95
19	0,0588 % de EDTA + 0,0033 % de PBTC	100	96	88
20	0,0157 % de EDTA + 0,0495 % de KTPP + 0,0033 % de ATMP	100	65	59
21	0,0033 % de ATMP	100	98	101
22	0,0157 % de EDTA + 0,0495 % de KTPP + 0,0033 % de ATMP*	100	91	80
23	0,0495 % de KTPP + 0,0033 % de ATMP	100	101	100
24	0,0157 % de EDTA + 0,0033 % de ATMP	100	63	54
25	0,0224 % de IDS + 0,0495 % de KTPP + 0,0033 % de ATMP	100	96	88

- 5 Como se muestra en la tabla 5, la mayor reducción en la actividad de ESPERASE 8.0L después de 60 minutos se logró con la solución de limpieza 24 (63 % de actividad relativa después de 20 minutos y 54 % de actividad relativa después de 60 minutos), que usó una combinación de agente aglutinante del 0,0157 % en peso de EDTA + el 0,0033 % en peso de ATMP, seguida de la solución de limpieza 20 (65 % de actividad relativa después de 20 minutos y 59 % de actividad relativa después de 60 minutos), que usó una combinación de agente aglutinante del 0,0157 % en peso de EDTA + el 0,0495 % en peso de KTPP + el 0,0033 % en peso de ATMP.
- 10

En la tabla 6 se identifican las soluciones de limpieza que se pusieron a prueba e incluyeron sosa cáustica, un tampón y la enzima proteasa ALCALASE 2.5L.

TABLA 611

Compu ^{es} to ^{es}	Solución-de-limpieza ^{as}									
	26 ^{as}	27 ^{as}	28 ^{as}	29 ^{as}	30 ^{as}	31 ^{as}	32 ^{as}	33 ^{as}	34 ^{as}	35 ^{as}
	Concentración, %-en-peso ^{as}									
agua-(blanda) ^{as}	99,70 ^{as}	99,76 ^{as}	99,79 ^{as}	99,68 ^{as}	99,67 ^{as}	99,74 ^{as}	99,72 ^{as}	99,69 ^{as}	99,72 ^{as}	99,66 ^{as}
hidróxido-de-potasio ^{as}	0,0800 ^{as}	0,0841 ^{as}	0,0841 ^{as}	0,0841 ^{as}	0,0858 ^{as}	0,0858 ^{as}	0,0858 ^{as}	0,0858 ^{as}	0,0858 ^{as}	0,0858 ^{as}
ácido-fosfórico ^{as}	0,0416 ^{as}	0,0416 ^{as}	0,0416 ^{as}	0,0416 ^{as}	0,0416 ^{as}	0,0416 ^{as}	0,0416 ^{as}	0,0416 ^{as}	0,0416 ^{as}	0,0446 ^{as}
sal-de-Na-de-1,2-benzisotiazolin-3-on ^{as}	0,00013 ^{as}	0,00013 ^{as}	0,00013 ^{as}	0,00013 ^{as}	0 ^{as}	0 ^{as}	0 ^{as}	0 ^{as}	0 ^{as}	0 ^{as}
ácido-2-fosforobutano-,1,2,4-tricarboxílico--PBTC ^{as}	0,0033 ^{as}	0,0033 ^{as}	0,0033 ^{as}	0,0033 ^{as}	0 ^{as}	0 ^{as}	0 ^{as}	0 ^{as}	0 ^{as}	0 ^{as}
carbonato-de-sodio--Na ₂ CO ₃ ^{as}	0,033 ^{as}	0,033 ^{as}	0 ^{as}	0,0198 ^{as}	0,0198 ^{as}	0,0198 ^{as}	0 ^{as}	0,0198 ^{as}	0,0198 ^{as}	0,0198 ^{as}
bicarbonato-de-sodio--NaHCO ₃ ^{as}	0 ^{as}	0 ^{as}	0 ^{as}	0,033 ^{as}	0,033 ^{as}	0,033 ^{as}	0 ^{as}	0,033 ^{as}	0,033 ^{as}	0,033 ^{as}
ácido-etilendiaminotetraacético--EDTA ^{as}	0,0588 ^{as}	0 ^{as}	0 ^{as}	0,0588 ^{as}	0,0157 ^{as}	0 ^{as}	0,0157 ^{as}	0 ^{as}	0,0157 ^{as}	0 ^{as}
sal-de-Na-del-ácido-iminodisuccínico--IDS ^{as}	0 ^{as}	0 ^{as}	0 ^{as}	0 ^{as}	0 ^{as}	0 ^{as}	0 ^{as}	0 ^{as}	0 ^{as}	0,0224 ^{as}
trifosfato-de-potasio--KTPP ^{as}	0 ^{as}	0 ^{as}	0 ^{as}	0 ^{as}	0,0495 ^{as}	0 ^{as}	0,0495 ^{as}	0,0495 ^{as}	0 ^{as}	0,0495 ^{as}
ácido-aminotrimetilenfosfónico--ATMP ^{as}	0 ^{as}	0 ^{as}	0 ^{as}	0 ^{as}	0,0033 ^{as}	0,0033 ^{as}	0,0033 ^{as}	0,0033 ^{as}	0,0033 ^{as}	0,0033 ^{as}
propilenglicol ^{as}	0,0500 ^{as}	0,0500 ^{as}	0,0500 ^{as}	0,0500 ^{as}	0,0500 ^{as}	0,0500 ^{as}	0,0500 ^{as}	0,0500 ^{as}	0,0500 ^{as}	0,0500 ^{as}
sal-de-Na-de-1,2-benzisotiazolin-3-on ^{as}	0,0002 ^{as}	0,0002 ^{as}	0,0002 ^{as}	0,0002 ^{as}	0,0002 ^{as}	0,0002 ^{as}	0,0002 ^{as}	0,0002 ^{as}	0,0002 ^{as}	0,0002 ^{as}
cloruro-de-calcio ^{as}	0,0025 ^{as}	0,0025 ^{as}	0,0025 ^{as}	0,0025 ^{as}	0,0025 ^{as}	0,0025 ^{as}	0,0025 ^{as}	0,0025 ^{as}	0,0025 ^{as}	0,0025 ^{as}
ALCALASE-2.5L-tipo-DX ^{as}	0,0268 ^{as}	0,0268 ^{as}	0,0268 ^{as}	0,0268 ^{as}	0,0268 ^{as}	0,0268 ^{as}	0,0268 ^{as}	0,0268 ^{as}	0,0268 ^{as}	0,0268 ^{as}
pH ^{as}	8,97 ^{as}	9,09 ^{as}	9,04 ^{as}	9,07 ^{as}	9,03 ^{as}	9,03 ^{as}	9,02 ^{as}	9,06 ^{as}	9,02 ^{as}	9,05 ^{as}

ES 3 010 557 T3

La tabla 7 muestra la actividad relativa de la ALCALASE 2.5L después de ser añadida a la solución de limpieza, 20 minutos después de la adición y 60 minutos después de la adición. Cabe señalar que * significa sin tampón.

TABLA 7

Solución de limpieza	Agente aglutinante	Actividad relativa de ESPERASE 8.0L, %		
		Después de la adición	Después de 20 min	Después de 60 min
26	0,0588 % de EDTA + 0,0033 % de PBTC	100	57	16
27	0,0033 % de PBTC	100	95	84
28	0,0033 % de PBTC*	100	76	55
29	0,0588 % de EDTA + 0,0033 % de PBTC	100	61	35
30	0,0157 % de EDTA + 0,0495 % de KTPP + 0,0033 % de ATMP	100	39	10
31	0,0033 % de ATMP	100	94	88
32	0,0157 % de EDTA + 0,0495 % de KTPP + 0,0033 % de ATMP*	100	35	3
33	0,0495 % de KTPP + 0,0033 % de ATMP	100	68	38
34	0,0157 % de EDTA + 0,0033 % de ATMP	100	63	15
35	0,0224 % de IDS + 0,0495 % de KTPP + 0,0033 % de ATMP	100	87	52

- 5 Como se muestra en la tabla 7, la mayor reducción en la actividad de ALCALASE 2.5L después de 60 minutos se logró con la solución de limpieza 32 (35 % de actividad relativa después de 20 minutos y 3 % de actividad relativa después de 60 minutos), que usó una combinación complejante del 0,0157 % en peso de EDTA + el 0,0495 % en peso de KTPP + el 0,0033 % en peso de ATMP, seguida de la solución de limpieza 30 (39 % de actividad relativa después de 20 minutos y 10 % de actividad relativa después de 60 minutos), que usó una combinación de agente aglutinante del 0,0157 % en peso de EDTA + el 0,0495 % en peso de KTPP + el 0,0033 % en peso de ATMP.

EJEMPLO 3

- Se realizaron una serie de pruebas en múltiples tipos diferentes de enzimas usando una variedad de agentes aglutinantes. Las enzimas proteasas usadas en estas pruebas fueron ALCALASE® 2.5L, ESPERASE® 8.0L, SAVINASE® Ultra 16 XL, SAVINASE® Evity 16 XL y BLAZE® Pro 100L, todas disponibles de Novozymes (con sede en Bagsvaerd, Dinamarca). Los agentes aglutinantes puestos a prueba fueron sales de EDTA, MGDA NTA, GLDA, HEDTA, DTPA, gluconato, KTPP, ATMP, PBTC, HEDP, EDTMP, DTPMP y poliacrilato.

- Se prepararon soluciones de sustrato de 100 ml que tenían una concentración de suero dulce del 0,25 % en volumen en agua blanda basándose en el volumen total de la solución. Esto se logró añadiendo aproximadamente 0,9588 g de una solución de suero dulce en polvo al 80 % con una densidad de 0,3084 g/ml a 1 l de agua blanda. La solución se calentó a 50 °C y el pH de la solución se ajustó a 10. Se añadieron 0,3 ml de solución enzimática que tenía una concentración de enzima del 5 % en volumen a la solución de sustrato calentada y con pH ajustado. A continuación, esta solución combinada se tituló con NaOH 0,1 M para mantener el pH a 10 durante 10 minutos. A continuación se añadió el agente aglutinante y se mezcló con la solución durante el transcurso de 30 minutos mientras se mantenía el pH a 10. A continuación se añadieron aproximadamente 0,09588 g de solución fresca de suero en polvo a 100 ml de la solución, y la solución se tituló con NaOH 0,1 M para mantener el pH a 10 durante el transcurso de 10 minutos.

- El valor h_{tot} para el concentrado de proteína de suero es 8,8 y el valor $1/\alpha$ a 50 °C y un pH de 10 es 1. El grado de hidrólisis, DH%, se calculó en el transcurso de la adición de la enzima, la adición del agente aglutinante y la adición de la enzima fresca. Como muestran los datos, el DH% primero aumenta rápidamente, seguido de un aumento más lento con el tiempo. Simultáneamente, la sosa cáustica también reacciona con el sustrato. El efecto de este grado de reacción se mide utilizando una solución "en blanco", que está libre de cualquier enzima.

Después de la adición de los agentes aglutinantes, dependiendo de la sustancia, se atenúa o termina cualquier

ES 3 010 557 T3

cambio en el DH%. Después de añadir sustrato fresco, la enzima continúa trabajando y sigue una velocidad de reacción similar a la experimentada al comienzo del experimento o se desactiva, por lo que cualquier cambio en la hidrólisis es principalmente el resultado de solo la reacción de la sosa cáustica con el sustrato.

- 5 Las tablas 8A, 8B y 8C proporcionan la variación en el DH% del suero dulce en polvo para diferentes concentraciones de sal de Na de EDTA como agente aglutinante dosificado a las soluciones de sustrato enzimático nombradas correspondientes, a un pH de 10 y 50 °C.

TABLA 8A

Agente aglutinante	0,001 % en peso de EDTA		0,005 % en peso de EDTA		0,01 % en peso de EDTA	
Enzima	SAVINASE Ultra 16 XL	Blanco	SAVINASE Ultra 16 XL	Blanco	SAVINASE Ultra 16 XL	Blanco
Tiempo, s	Grado de hidrólisis, %					
0	0,00	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00
60	7,56	0,00	9,3	0,0	8,21	0,12
120	9,97	0,00	12,0	0,0	10,95	0,25
180	11,49	0,00	13,4	0,0	12,25	0,28
240	12,10	0,00	14,2	0,0	13,03	0,31
300	12,68	0,00	14,8	0,0	13,74	0,31
360	13,23	0,00	15,4	0,0	14,26	0,31
420	13,71	0,13	15,9	0,0	14,61	0,31
480	13,96	0,31	16,4	0,0	15,08	0,31
540	14,45	0,43	16,7	0,0	15,38	0,31
600	14,67	0,53	17,0	0,0	15,79	0,31
660	14,67	0,53	17,0	0,0	15,79	0,31
720	14,67	0,53	17,0	0,0	15,79	0,31
780	14,67	0,53	17,0	0,0	15,79	0,31
840	14,67	0,53	17,0	0,0	15,79	0,31
900	14,67	0,53	17,0	0,0	15,79	0,31
960	14,89	0,53	17,3	0,0	15,79	0,31
1020	15,10	0,53	17,6	0,0	15,79	0,31
1080	15,32	0,53	17,8	0,0	15,79	0,31
1140	15,47	0,53	18,0	0,0	15,79	0,31
1200	15,54	0,53	18,1	0,0	15,79	0,31
1260	15,76	0,53	18,3	0,3	15,79	0,31
1320	15,95	0,53	18,6	0,3	15,79	0,31
1380	16,16	0,53	18,7	0,3	15,84	0,41
1440	16,38	0,68	19,0	0,3	15,98	0,41
1500	16,59	0,68	19,1	0,5	15,98	0,41

ES 3 010 557 T3

1560	16,81	0,83	19,3	0,5	16,12	0,52
1620	17,01	0,83	19,4	0,7	16,23	0,52
1680	17,19	0,94	19,6	0,7	16,23	0,72
1740	17,25	1,05	19,8	0,7	16,35	0,72
1800	17,44	1,05	19,9	1,0	16,44	0,72
1860	17,65	1,15	20,1	1,0	16,47	0,72
1920	17,74	1,30	20,3	1,0	16,54	0,74
1980	17,86	1,30	20,4	1,2	16,66	0,83
2040	18,02	1,37	20,5	1,2	16,78	0,83
2100	18,19	1,50	20,7	1,2	16,93	1,00
2160	18,37	1,50	20,9	1,4	16,93	1,00
2220	18,53	1,59	21,0	1,4	17,06	1,00
2280	18,74	1,71	21,2	1,4	17,06	1,00
2340	18,74	1,71	21,4	1,6	17,12	1,08
2400	18,95	1,80	21,6	1,6	17,22	1,22
2460	34,52	6,92	38,2	9,3	23,34	8,17
2520	36,12	6,93	40,2	9,3	23,46	8,17
2580	36,96	7,05	41,2	9,3	23,61	8,17
2640	37,75	7,17	42,0	9,3	23,66	8,17
2700	38,26	7,21	42,5	9,3	23,84	8,17
2760	38,72	7,30	43,0	9,3	23,84	8,17
2820	39,13	7,43	43,4	9,3	23,97	8,17
2880	39,54	7,56	43,9	9,3	24,06	8,17
2940	39,99	7,56	44,3	9,3	24,17	8,17
3000	40,24	7,68	44,7	9,3	24,30	8,17

TABLA 8B

Agente aglutinante	0,125 % en peso de EDTA				0,25 % en peso de EDTA	
Enzima	SAVINASE Ultra 16 XL	ALCALASA 2.5L	ESPERASE 8.0L	Blanco	SAVINASE Ultra 16 XL	Blanco
Tiempo, s	Grado de hidrólisis, %					
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
60	9,74	9,59	9,22	0,28	11,61	1,30
120	13,09	12,46	12,87	0,75	14,78	2,37
180	14,27	14,24	14,95	1,11	16,62	3,24
240	15,47	15,67	16,26	1,54	18,09	3,93

ES 3 010 557 T3

300	16,34	16,57	17,66	1,75	19,18	4,56
360	16,92	17,40	18,68	2,12	20,18	5,16
420	17,79	18,24	19,56	2,32	21,15	5,64
480	18,30	18,88	20,38	2,50	21,85	6,19
540	18,81	19,64	21,17	2,89	22,50	6,67
600	19,48	20,55	21,84	3,09	23,27	7,04
660	19,48	20,55	23,91	3,09	23,29	7,04
720	19,48	20,55	23,91	3,09	23,29	7,04
780	19,48	20,55	24,24	3,09	23,29	7,04
840	19,48	20,55	24,50	3,09	23,29	7,04
900	19,48	20,55	24,70	3,09	23,29	7,04
960	19,48	20,55	24,70	3,09	23,29	7,04
1020	19,48	20,55	24,91	3,09	23,29	7,04
1080	19,48	20,55	25,10	3,09	23,29	7,04
1140	19,48	20,55	25,30	3,09	23,29	7,04
1200	19,48	20,55	25,30	3,09	23,29	7,04
1260	19,48	20,55	25,42	3,09	23,29	7,04
1320	19,48	20,55	25,62	3,09	23,29	7,04
1380	19,48	20,55	25,82	3,09	23,29	7,04
1440	19,48	20,55	25,99	3,09	23,29	7,04
1500	19,48	20,55	26,01	3,09	23,29	7,04
1560	19,48	20,55	26,22	3,09	23,29	7,04
1620	19,48	20,55	26,35	3,09	23,29	7,04
1680	19,48	20,55	26,58	3,09	23,29	7,04
1740	19,48	20,55	26,82	3,09	23,29	7,04
1800	19,48	20,55	26,82	3,09	23,29	7,04
1860	19,48	20,55	27,07	3,09	23,29	7,04
1920	19,48	20,55	27,36	3,09	23,29	7,04
1980	19,48	20,55	27,36	3,09	23,29	7,04
2040	19,48	20,55	27,57	3,09	23,29	7,04
2100	19,48	20,55	27,83	3,09	23,29	7,04
2160	19,48	20,55	28,12	3,09	23,29	7,04
2220	19,48	20,55	28,32	3,09	23,29	7,04
2280	19,48	20,55	28,56	3,09	23,29	7,04
2340	19,48	20,55	28,65	3,09	23,29	7,04
2400	19,48	20,55	28,91	3,09	23,29	7,04

ES 3 010 557 T3

2460	25,86	25,50	43,22	9,90	25,17	12,35
2520	25,86	25,50	46,70	9,90	25,17	12,35
2580	25,86	25,80	48,79	9,90	25,17	12,35
2640	25,86	26,05	49,96	9,90	25,38	12,56
2700	25,86	26,34	50,90	10,10	25,60	12,77
2760	25,95	26,61	51,77	10,12	25,66	12,98
2820	26,07	26,80	52,33	10,27	25,91	13,29
2880	26,33	27,00	52,99	10,27	26,04	13,60
2940	26,33	27,31	53,52	10,42	26,32	13,82
3000	26,54	27,51	54,04	10,58	26,60	14,07

TABLA 8C

Agente aglutinante	0,5 % en peso de EDTA				1,0 % en peso de EDTA		
Enzima	SAVINASE Ultra 16 XL	SAVINASE Evity 16 XL	BLAZE Pro 100L	Blanco	ESPERASE 8.0L	BLAZE Pro 100L	Blanco
Tiempo, s	Grado de hidrólisis, %						
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
60	10,80	10,19	9,76	0,53	9,91	9,13	0,95
120	13,74	12,74	12,81	1,01	13,30	12,48	1,81
180	15,61	14,29	14,62	1,51	15,41	13,86	2,57
240	16,92	15,48	15,85	1,90	16,98	15,19	3,12
300	17,98	16,32	16,95	2,26	18,35	16,28	3,63
360	18,77	17,32	17,64	2,61	19,36	17,00	4,15
420	19,57	18,10	18,38	2,97	20,31	17,83	4,64
480	20,36	18,84	18,89	3,31	21,18	18,57	5,13
540	21,00	19,60	19,30	3,46	22,01	19,30	5,66
600	21,60	20,16	19,59	3,72	22,80	19,87	5,97
660	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97
720	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97
780	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97
840	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97
900	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97
960	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97
1020	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97
1080	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97
1140	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97

ES 3 010 557 T3

1200	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97
1260	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97
1320	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97
1380	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97
1440	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97
1500	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97
1560	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97
1620	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97
1680	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97
1740	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97
1800	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97
1860	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97
1920	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97
1980	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97
2040	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97
2100	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97
2160	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97
2220	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97
2280	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97
2340	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97
2400	21,60	20,16	19,66	3,72	22,80	19,87	5,97
2460	29,44	25,23	29,35	9,10	34,66	32,31	9,66
2520	29,44	25,69	32,54	9,10	37,85	35,05	9,99
2580	29,44	25,94	33,91	9,14	40,10	36,85	10,55
2640	29,44	26,34	34,72	9,32	41,66	37,87	10,77
2700	29,51	26,68	35,48	9,53	42,71	38,81	11,01
2760	29,75	27,06	36,16	9,76	43,48	39,68	11,50
2820	29,96	27,33	36,80	10,03	44,37	40,41	11,96
2880	30,25	27,61	37,15	10,19	45,30	41,30	12,33
2940	30,51	28,04	37,63	10,55	46,16	41,97	12,71
3000	30,66	28,26	38,13	10,70	46,69	42,58	13,14

La figura 2 proporciona una representación gráfica de la variación en el DH% de suero dulce en polvo para soluciones de sustrato enzimático dosificadas con un 0,5 % en peso de EDTA como agente aglutinante. Los resultados muestran que la enzima BLAZE Pro 100L todavía está activa después de la adición de sustrato fresco 30 minutos después de ser dosificada con un 0,5 % en peso de EDTA, ya que el grado de hidrólisis sigue una velocidad de reacción similar a la encontrada al comienzo del experimento. Sin embargo, las enzimas SAVINASE Ultra 16 XL y SAVINASE Ecity 16 XL puestas a prueba se desactivan con un 0,5 % en peso de EDTA ya que, después de la adición de sustrato fresco, el grado de hidrólisis sigue la velocidad de reacción encontrada para la solución en

blanco.

La figura 3 proporciona una representación gráfica de la variación en el DH% de suero dulce en polvo para soluciones de sustrato enzimático dosificadas con un 0,125 % en peso de EDTA como agente aglutinante, mientras que la figura 4 proporciona una representación gráfica de la variación en el DH% de suero dulce en polvo para soluciones de sustrato enzimático dosificadas con un 1,0 % en peso de EDTA como agente aglutinante. Con la cantidad reducida de EDTA, las enzimas puestas a prueba SAVINASE Ultra 16 XL y ALCALASE 2.5L se desactivan ya que, después de la adición de sustrato fresco, el grado de hidrólisis sigue la velocidad de reacción encontrada para la solución en blanco. Sin embargo, la ESPERASE 8.0L puesta a prueba permanece activa después de la adición de EDTA y sustrato fresco como se muestra en la figura 3. Con la mayor cantidad de EDTA, ambas enzimas puestas a prueba ESPERASE 8.0L y BLAZE Pro 100L siguen activas 30 minutos después de la adición de sustrato fresco después de haber sido dosificadas con un 1,0 % en peso de EDTA ya que el grado de hidrólisis sigue una velocidad de reacción similar a la encontrada al comienzo del experimento, véase la figura 4.

Como demuestran los datos que se muestran en la tabla 8A y se ilustran gráficamente en la figura 5, incluso cuando la solución de sustrato basada en enzima SAVINASE Ultra 16 XL se dosifica con un 0,01 % en peso de EDTA, este agente aglutinante aún es eficaz para desactivar esta enzima a esta concentración ya que, después de la adición de sustrato fresco, el grado de hidrólisis sigue la velocidad de reacción como se encontró para la solución en blanco. Sin embargo, una dosificación con una concentración tan baja como un 0,001 % en peso de EDTA o incluso al 0,005 % en peso de EDTA no es eficaz para desactivar la enzima SAVINASE Ultra 16 XL ya que, después de la adición de sustrato fresco, el grado de hidrólisis no continúa siguiendo la velocidad de reacción de la solución en blanco a esta concentración reducida de EDTA.

Las tablas 9A y 9B proporcionan la variación en el DH% para suero dulce en polvo para el 0,115 % en peso, el 0,23 % en peso y el 0,46 % en peso de sal de Na de MGDA como agente aglutinante dosificado a las soluciones de sustrato enzimático nombradas correspondientes a un pH de 10 y 50 °C.

TABLA 9A

Agente aglutinante	0,115 % en peso de MGDA		0,23 % en peso de MGDA	
Enzima	SAVINASE 16 Ultra XL	Blanco	SAVINASE 16 Ultra XL	Blanco
Tiempo, s	Grado de hidrólisis, %			
0	0,00	0,00	0,00	0,00
60	10,84	0,07	12,05	0,49
120	13,56	0,68	14,57	1,04
180	15,16	1,36	16,29	1,55
240	16,15	1,70	17,74	1,94
300	17,08	2,31	18,81	2,43
360	17,88	2,62	19,66	2,74
420	18,74	2,95	20,52	3,09
480	19,24	3,36	21,17	3,44
540	19,78	3,79	21,80	3,82
600	20,26	4,12	22,46	4,09
660	20,28	4,12	22,46	4,09
720	20,28	4,12	22,46	4,09
780	20,28	4,12	22,46	4,09
840	20,28	4,12	22,46	4,09
900	20,28	4,12	22,46	4,09
960	20,28	4,12	22,46	4,09

ES 3 010 557 T3

1020	20,28	4,12	22,46	4,09
1080	20,28	4,12	22,46	4,09
1140	20,28	4,12	22,46	4,09
1200	20,28	4,12	22,46	4,09
1260	20,28	4,12	22,46	4,09
1320	20,28	4,12	22,46	4,09
1380	20,28	4,12	22,46	4,09
1440	20,28	4,12	22,46	4,09
1500	20,28	4,12	22,46	4,09
1560	20,28	4,12	22,46	4,09
1620	20,28	4,12	22,46	4,09
1680	20,28	4,12	22,46	4,09
1740	20,28	4,12	22,46	4,09
1800	20,28	4,12	22,46	4,09
1860	20,28	4,12	22,46	4,09
1920	20,28	4,12	22,46	4,09
1980	20,28	4,12	22,46	4,09
2040	20,28	4,12	22,46	4,09
2100	20,28	4,12	22,46	4,09
2160	20,28	4,12	22,46	4,09
2220	20,28	4,12	22,46	4,09
2280	20,28	4,12	22,46	4,09
2340	20,28	4,12	22,46	4,09
2400	20,28	4,12	22,46	4,09
2460	27,19	13,77	27,78	15,38
2520	27,19	13,77	27,78	15,43
2580	27,19	13,77	28,64	15,73
2640	27,19	14,02	28,90	15,84
2700	27,19	14,02	29,07	16,15
2760	27,19	14,24	29,26	16,29
2820	27,19	14,40	29,53	16,45
2880	27,40	14,70	29,91	16,67
2940	27,40	14,70	30,06	16,82
3000	27,56	14,97	30,41	17,00

ES 3 010 557 T3

TABLA 9B

Agente aglutinante	0,46 % en peso de MGDA			
Enzima	SAVINASE Ultra 16 XL	SAVINASE Evity 16 XL	BLAZE Pro 100L	Blanco
Tiempo, s	Grado de hidrólisis, %			
0	0,00	0,00	0,00	0,00
60	11,39	10,19	9,21	0,00
120	14,36	12,74	11,48	0,65
180	16,17	14,29	12,97	0,96
240	17,52	15,48	14,07	1,61
300	18,55	16,32	15,04	1,91
360	19,69	17,32	15,77	2,22
420	20,46	18,10	16,57	2,56
480	21,19	18,84	17,37	2,87
540	21,71	19,60	17,92	3,17
600	22,39	20,16	18,52	3,45
660	22,39	20,16	18,52	3,45
720	22,39	20,16	18,52	3,45
780	22,39	20,16	18,52	3,45
840	22,39	20,16	18,52	3,45
900	22,39	20,16	18,52	3,45
960	22,39	20,16	18,52	3,45
1020	22,39	20,16	18,52	3,45
1080	22,39	20,16	18,52	3,45
1140	22,39	20,16	18,52	3,45
1200	22,39	20,16	18,52	3,45
1260	22,39	20,16	18,52	3,45
1320	22,39	20,16	18,52	3,45
1380	22,39	20,16	18,52	3,45
1440	22,39	20,16	18,52	3,45
1500	22,39	20,16	18,52	3,45
1560	22,39	20,16	18,52	3,45
1620	22,39	20,16	18,52	3,45
1680	22,39	20,16	18,52	3,45
1740	22,39	20,16	18,52	3,45
1800	22,39	20,16	18,52	3,45

ES 3 010 557 T3

1860	22,39	20,16	18,52	3,45
1920	22,39	20,16	18,52	3,45
1980	22,39	20,16	18,52	3,45
2040	22,39	20,16	18,52	3,45
2100	22,39	20,16	18,52	3,45
2160	22,39	20,16	18,52	3,45
2220	22,39	20,16	18,52	3,45
2280	22,39	20,16	18,52	3,45
2340	22,39	20,16	18,52	3,45
2400	22,39	20,16	18,52	3,45
2460	26,92	25,23	32,77	6,41
2520	27,39	25,69	36,17	6,41
2580	27,57	25,94	37,42	6,41
2640	27,81	26,34	38,31	6,41
2700	28,03	26,68	39,05	6,67
2760	28,49	27,06	39,58	6,73
2820	28,73	27,33	40,31	7,08
2880	28,99	27,61	40,84	7,19
2940	29,35	28,04	41,31	7,57
3000	29,63	28,26	41,87	7,84

La figura 6 proporciona una representación gráfica de la variación en el DH% de suero dulce en polvo para soluciones de sustrato enzimático dosificadas con un 0,46 % en peso de MGDA como agente aglutinante, mientras que la figura 7 proporciona una representación gráfica de la variación en el DH% de suero dulce en polvo para una solución de sustrato enzimático dosificada con un 0,115 % en peso de MGDA como agente aglutinante. Como se muestra en la figura 6, la enzima BLAZE Pro 100L todavía está activa 30 minutos después de la adición de un 0,46 % en peso de MGDA con la adición de sustrato fresco ya que el grado de hidrólisis sigue una velocidad de reacción que es similar a la encontrada al comienzo del experimento. Sin embargo, las enzimas SAVINASE Ultra 16 XL y SAVINASE Ecity 16 XL puestas a prueba se desactivan con un 0,46 % de MGDA y al menos la enzima SAVINASE Ultra 16 XL se desactiva con un 0,115 % en peso de MGDA (véase la figura 7) ya que, después de la adición de sustrato fresco, el grado de hidrólisis sigue la velocidad de reacción encontrada para la solución en blanco.

La tabla 10 proporciona la variación en el DH% para suero dulce en polvo para un 0,33 % en peso de sal de Na de HEDP como agente aglutinante dosificado a las soluciones de sustrato enzimático nombradas correspondientes a un pH de 10 y 50 °C.

TABLA 10

Agente aglutinante	0,33 % en peso de HEDP				
Enzima	SAVINASE Ultra 16 XL	ALCALASE 2.5L	ESPERASE 8.0L	BLAZE Pro 100L	Blanco
Tiempo, s	Grado de hidrólisis, %				
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ES 3 010 557 T3

60	10,99	10,81	9,87	9,75	1,26
120	13,94	13,48	13,70	12,96	1,94
180	15,81	15,54	15,95	14,37	2,74
240	17,12	17,08	17,69	15,52	3,27
300	18,19	18,19	18,89	16,61	3,82
360	19,01	19,45	20,06	17,26	4,12
420	19,85	20,35	21,14	17,98	4,65
480	20,58	21,18	22,03	18,65	5,18
540	21,21	21,95	22,86	19,29	5,45
600	21,88	22,72	23,54	19,98	5,97
660	32,83	22,72	23,54	20,00	5,97
720	41,58	22,72	23,54	20,00	5,97
780	42,77	22,72	23,54	20,32	5,97
840	43,61	22,72	23,54	20,92	8,99
900	44,28	22,72	23,54	21,57	8,99
960	44,75	22,72	23,54	21,91	8,99
1020	45,18	22,72	23,54	22,21	8,99
1080	45,63	22,72	23,54	22,47	8,99
1140	45,63	22,72	23,54	22,62	8,99
1200	45,73	22,72	23,54	22,86	8,99
1260	45,74	22,72	23,54	23,05	8,99
1320	45,74	22,72	23,54	23,27	8,99
1380	45,74	22,72	23,54	23,55	8,99
1440	46,03	22,72	23,54	23,83	8,99
1500	46,03	22,72	23,54	23,83	8,99
1560	46,03	22,72	23,54	24,04	8,99
1620	46,17	22,72	23,54	24,32	8,99
1680	46,17	22,72	23,54	24,59	8,99
1740	46,35	22,72	23,54	24,84	8,99
1800	46,35	22,72	23,54	24,99	8,99
1860	46,51	22,72	23,54	25,27	8,99
1920	46,72	22,72	23,54	25,57	8,99
1980	46,72	22,72	23,54	25,57	8,99
2040	46,91	22,72	23,54	25,85	8,99
2100	46,91	22,72	23,54	26,06	8,99
2160	47,05	22,72	23,54	26,38	9,30

ES 3 010 557 T3

2220	47,27	22,72	23,54	26,62	9,64
2280	47,27	22,72	23,54	26,68	9,64
2340	47,52	22,72	23,70	26,95	9,94
2400	47,52	22,72	23,94	27,24	10,19
2460	57,73	33,09	40,32	44,16	21,18
2520	57,98	33,09	44,05	47,00	21,18
2580	58,23	33,09	46,08	48,37	21,76
2640	58,45	33,49	47,30	49,22	22,10
2700	58,71	33,85	48,34	49,95	22,37
2760	59,13	33,85	49,22	50,51	22,68
2820	59,24	34,17	49,89	51,18	22,95
2880	59,40	34,46	50,48	51,73	23,24
2940	59,62	34,77	51,09	52,10	23,64
3000	59,83	35,05	51,64	52,66	23,88

La figura 8 proporciona una representación gráfica de la variación en el DH% de suero en polvo dulce para soluciones de sustrato enzimático dosificadas con un 0,33 % en peso de HEDP como agente aglutinante. Como se muestra en esta figura, 30 minutos después de la adición de un 0,33 % en peso de HEDP y la adición del sustrato fresco, el grado de hidrólisis de ESPERASE 8.0L y BLAZE Pro 100L puestas a prueba sigue una velocidad de reacción similar a la encontrada al comienzo del experimento, lo que indica que estas enzimas todavía están activas. Por el contrario, las SAVINASE y ALCALASE 2.5L puestas a prueba se desactivan con la adición de un 0,33 % en peso de HEDP ya que, después de la adición de sustrato fresco, el grado de hidrólisis sigue una velocidad de reacción similar a la de la solución en blanco.

La tabla 11 proporciona la variación en el DH% para suero dulce en polvo para sales de Na del 1,0 % en peso de poliacrilato, el 0,48 % en peso de ATMP y el 0,57 % en peso de EDTMP como diversos agentes aglutinantes dosificados a las soluciones de sustrato enzimático SAVINASE ULTRA 16 XL a un pH de 10 y 50 °C.

TABLA 11

Agente aglutinante	1 % en peso de poliacrilato		0,48 % en peso de ATMP		0,57 % en peso de EDTMP	
Enzima	SAVINASE Ultra 16 XL	Blanco	SAVINASE Ultra 16 XL	Blanco	SAVINASE Ultra 16 XL	Blanco
Tiempo, s	Grado de hidrólisis, %					
0	0,00	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00
60	10,78	0,00	11,14	1,14	10,10	0,00
120	14,09	0,52	14,81	1,91	13,14	0,00
180	15,53	0,92	16,90	2,76	14,83	0,27
240	16,84	1,17	18,32	3,35	16,08	0,43
300	17,92	1,62	19,55	3,98	17,00	0,62
360	18,80	2,14	20,59	4,44	17,69	0,84
420	19,53	2,36	21,57	4,90	18,43	1,02
480	20,45	2,62	22,28	5,42	18,98	1,18

ES 3 010 557 T3

540	21,06	3,12	23,02	5,69	19,50	1,37
600	21,64	3,34	23,75	6,22	20,00	1,57
660	21,64	3,34	41,64	25,46	48,53	30,94
720	21,64	3,34	42,48	26,18	78,07	52,79
780	21,64	3,34	43,28	26,74	88,83	54,58
840	21,64	3,34	43,85	27,17	88,83	56,57
900	21,64	3,34	44,34	27,66	88,83	58,49
960	21,64	3,34	44,78	27,92	89,24	59,99
1020	21,92	3,34	45,02	28,15	90,23	60,98
1080	22,29	3,66	45,34	28,41	91,00	61,89
1140	22,59	3,89	45,80	28,66	91,90	62,50
1200	22,87	4,34	46,05	28,97	92,41	63,02
1260	23,04	4,56	46,22	29,20	92,88	63,27
1320	23,20	4,79	46,63	29,48	93,31	63,49
1380	23,45	5,04	46,90	29,75	93,78	63,70
1440	23,65	5,32	47,15	29,92	94,30	63,83
1500	23,81	5,66	47,33	30,13	94,53	63,93
1560	24,14	5,92	47,76	30,13	94,89	64,08
1620	24,52	6,18	47,98	30,43	95,11	64,29
1680	24,52	6,32	48,29	30,75	95,35	64,29
1740	24,84	6,57	48,51	30,96	95,66	64,47
1800	24,84	6,84	48,80	30,99	96,07	64,64
1860	25,06	7,09	49,05	31,20	96,07	64,64
1920	25,25	7,40	49,31	31,54	96,38	64,85
1980	25,52	7,49	49,58	31,75	96,57	64,94
2040	25,70	7,82	49,85	31,86	96,83	65,10
2100	25,94	7,92	50,05	32,04	96,97	65,26
2160	26,17	8,28	50,34	32,26	97,22	65,26
2220	26,44	8,50	50,65	32,53	97,22	65,50
2280	26,44	8,67	50,88	32,74	97,46	65,69
2340	26,71	8,90	51,12	32,99	97,62	65,83
2400	26,95	9,20	51,40	33,15	97,85	65,97
2460	35,25	17,32	62,68	43,91	110,35	78,42
2520	36,10	17,32	63,13	44,16	110,62	78,42
2580	36,70	17,54	63,82	44,44	110,88	78,42
2640	37,32	17,91	64,26	44,72	111,22	78,42

ES 3 010 557 T3

2700	37,93	18,09	64,68	44,87	111,50	78,60
2760	38,47	18,27	65,25	45,25	111,87	78,89
2820	39,13	18,50	65,58	45,49	112,05	79,10
2880	39,58	18,53	65,85	45,65	112,20	79,29
2940	40,06	18,80	66,36	45,85	112,42	79,52
3000	40,56	18,95	66,65	46,28	112,72	79,77

La figura 9 proporciona una representación gráfica de la variación en el DH% de suero dulce en polvo para soluciones de sustrato enzimático dosificadas con un 1,0 % en peso de poliacrilato como agente aglutinante. Esta prueba revela que cuando se usa un 1,0 % en peso de poliacrilato para desactivar SAVINASE Ultra 16 XL, el grado de hidrólisis después de la adición de sustrato adicional (después de 40 minutos desde el comienzo de la prueba) sigue una velocidad significativamente menor en comparación con el comienzo del experimento. Sin embargo, la velocidad de reacción aumenta en comparación con la de la solución en blanco, lo que indica que Savinase Ultra 16XL no está completamente desactivada.

La tabla 12 proporciona la variación en el DH% para suero dulce en polvo para un 0,63 % en peso de KTPP como agente aglutinante dosificado a las soluciones de sustrato enzimático nombradas correspondientes a un pH de 10 y 50 °C.

TABLA 12

Agente aglutinante	0,63 % en peso de KTPP			
Enzima	SAVINASE Ultra 16 XL	SAVINASE Evity 16 XL	BLAZE Pro 100L	Blanco
Tiempo, s	Grado de hidrólisis, %			
0	0,00	0,00	0,00	0,00
60	10,85	10,37	8,94	0,00
120	14,02	13,10	11,34	0,00
180	15,82	15,04	12,59	0,19
240	17,00	16,52	13,62	0,39
300	18,02	17,69	14,47	0,58
360	19,04	18,66	15,21	0,81
420	19,80	19,58	15,95	1,02
480	20,64	20,31	16,59	1,24
540	21,29	21,15	17,27	1,61
600	21,95	21,97	17,74	1,79
660	28,97	31,26	24,69	8,98
720	30,46	32,29	25,96	9,96
780	31,23	32,83	26,77	10,46
840	31,84	33,17	27,41	10,90
900	32,40	33,49	27,80	11,10
960	32,79	33,89	28,21	11,27
1020	32,96	34,12	28,61	11,42

ES 3 010 557 T3

1080	33,25	34,40	28,97	11,60
1140	33,41	34,68	29,38	11,69
1200	33,59	34,93	29,78	11,88
1260	33,85	35,11	29,94	12,01
1320	34,00	35,32	30,33	12,18
1380	34,30	35,54	30,52	12,34
1440	34,46	35,89	30,85	12,34
1500	34,59	36,14	31,22	12,46
1560	34,70	36,35	31,41	12,65
1620	34,99	36,44	31,54	12,84
1680	35,16	36,81	31,85	12,98
1740	35,29	37,00	32,00	12,99
1800	35,50	37,11	32,27	13,14
1860	35,62	37,31	32,49	13,29
1920	35,87	37,54	32,67	13,39
1980	36,03	37,74	32,83	13,54
2040	36,13	38,10	33,08	13,67
2100	36,44	38,28	33,25	13,82
2160	36,62	38,47	33,41	14,01
2220	36,78	38,72	33,66	14,21
2280	36,99	39,03	33,94	14,21
2340	36,99	39,18	34,10	14,40
2400	37,23	39,36	34,28	14,55
2460	46,11	48,17	49,33	23,08
2520	46,11	48,75	52,13	23,08
2580	46,40	49,25	53,58	23,08
2640	46,62	49,74	54,32	23,23
2700	46,84	50,08	55,10	23,33
2760	47,12	50,50	55,71	23,56
2820	47,14	50,99	56,20	23,73
2880	47,36	51,33	56,63	23,93
2940	47,82	51,59	57,01	23,93
3000	47,91	52,20	57,56	24,22

La tabla 13 proporciona la variación en el DH% para suero dulce en polvo para un 0,37 % en peso y un 1,0 % en peso de gluconato de Na como agente aglutinante dosificado a las soluciones de sustrato enzimático SAVINASE Ultra 16 XL a un pH de 10 y 50 °C.

ES 3 010 557 T3

TABLA 13

Agente aglutinante	0,37 % en peso de gluconato		1,0 % en peso de gluconato	
Enzima	SAVINASE 16 Ultra XL	Blanco	SAVINASE 16 Ultra XL	Blanco
Tiempo, s	Grado de hidrólisis, %			
0	0,00	0,00	0,00	0,00
60	11,62	1,23	11,55	0,00
120	14,45	2,36	14,27	0,25
180	16,43	3,22	16,11	0,40
240	17,65	4,03	17,29	0,73
300	19,00	4,83	18,34	0,91
360	20,09	5,39	19,23	1,19
420	21,10	6,27	20,02	1,41
480	22,06	6,88	20,66	1,74
540	22,98	7,68	21,46	1,95
600	23,65	8,49	22,10	2,13
660	28,76	13,97	32,58	13,60
720	29,92	15,20	34,08	14,67
780	30,81	16,02	35,18	15,65
840	31,61	16,86	35,97	16,17
900	32,41	17,62	36,59	16,65
960	33,13	18,36	37,26	16,94
1020	33,84	19,10	37,84	17,40
1080	34,63	19,86	38,39	17,73
1140	35,25	20,52	39,00	18,16
1200	36,08	21,23	39,54	18,47
1260	36,90	22,03	40,10	18,77
1320	37,47	22,86	40,64	19,01
1380	38,13	23,52	41,16	19,46
1440	38,90	24,15	41,69	19,77
1500	39,43	24,94	42,24	20,02
1560	40,23	25,55	42,54	20,48
1620	40,81	26,24	43,16	20,82
1680	41,31	26,73	43,67	21,03
1740	42,11	27,46	44,22	21,43
1800	42,65	27,96	44,47	21,69
1860	43,48	28,67	45,02	22,10

ES 3 010 557 T3

1920	44,01	29,30	45,30	22,44
1980	44,66	30,04	45,75	22,74
2040	45,37	30,58	46,18	23,07
2100	45,94	31,37	46,67	23,35
2160	46,54	31,92	46,92	23,75
2220	47,20	32,50	47,52	24,03
2280	47,71	33,22	47,81	24,30
2340	48,22	33,74	48,10	24,54
2400	48,85	34,29	48,66	24,84
2460	68,00	43,56	64,65	34,73
2520	70,84	44,44	67,11	34,88
2580	72,46	45,19	68,46	35,34
2640	73,85	45,73	69,40	35,61
2700	74,96	46,47	70,29	36,16
2760	75,97	47,05	70,97	36,49
2820	76,92	47,80	71,54	36,82
2880	77,88	48,31	72,04	37,23
2940	78,67	49,02	72,64	37,53
3000	79,56	49,52	73,14	37,89

La tabla 14 proporciona la variación en el DH% para suero dulce en polvo para un 0,45 % en peso de sal de Na de HEDTA como agente aglutinante dosificado a las soluciones de sustrato enzimático nombradas correspondientes a un pH de 10 y 50 °C.

5

TABLA 14

Agente aglutinante	0,45 % en peso de HEDTA			
Enzima	SAVINASE Ultra 16 XL	SAVINASE Evity 16 XL	BLAZE Pro 100L	Blanco
Tiempo, s	Grado de hidrólisis, %			
0	0,00	0,00	0,00	0,00
60	10,26	8,93	9,03	0,33
120	13,46	12,05	10,40	0,90
180	15,18	12,99	12,37	1,38
240	16,27	14,08	13,02	1,75
300	17,19	14,72	13,55	2,12
360	18,17	15,43	14,44	2,47
420	19,04	15,90	15,02	2,96
480	19,55	16,67	15,49	3,26

ES 3 010 557 T3

540	20,01	17,02	15,98	3,60
600	20,94	17,73	16,39	3,87
660	20,94	17,73	16,39	3,87
720	21,03	18,44	16,39	3,87
780	23,34	19,71	16,39	3,87
840	24,72	21,04	17,61	3,87
900	25,59	21,61	18,61	3,87
960	25,99	22,20	19,47	3,87
1020	26,33	22,46	20,26	3,87
1080	26,63	22,82	20,57	3,87
1140	26,63	22,82	20,63	3,87
1200	26,63	22,82	20,76	3,87
1260	26,63	22,82	20,76	3,87
1320	26,63	22,82	20,76	3,87
1380	26,63	22,82	20,76	3,87
1440	26,63	22,82	20,76	3,87
1500	26,63	22,82	20,76	3,87
1560	26,63	22,82	20,76	3,87
1620	26,63	22,82	21,00	3,87
1680	26,63	22,82	21,00	3,87
1740	26,63	23,10	21,00	3,87
1800	26,63	23,10	21,37	3,87
1860	26,63	23,10	21,37	3,87
1920	26,63	23,10	21,37	3,87
1980	26,63	23,10	21,77	3,87
2040	26,63	23,38	21,77	3,87
2100	26,63	23,38	21,77	3,87
2160	26,63	23,38	22,12	3,87
2220	26,63	23,83	22,12	3,87
2280	26,91	23,83	22,12	3,87
2340	26,91	24,12	22,55	3,87
2400	26,91	24,14	22,55	3,87
2460	36,46	33,45	37,78	13,46
2520	36,46	33,45	40,46	13,46
2580	36,46	33,45	42,16	13,46
2640	37,18	33,78	43,23	13,46

ES 3 010 557 T3

2700	37,18	33,85	43,72	13,46
2760	37,55	34,21	44,17	13,46
2820	37,55	34,50	44,65	13,46
2880	37,97	34,50	45,21	13,62
2940	37,97	34,90	45,70	13,76
3000	38,72	35,02	46,11	13,83

La tabla 15 proporciona la variación en el DH% para las sales de Na de suero dulce en polvo para un 0,66 % en peso de DTPA, un 0,08 % en peso de NTA y un 0,46 % en peso de GLDA como diversos agentes aglutinantes dosificados en las soluciones de sustrato enzimático SAVINASE Ultra 16 XL a un pH de 10 y 50 °C.

5

TABLA 15

Agente aglutinante	0,66 % en peso de DTPA		0,08 % en peso de NTA		0,46 % en peso GLDA	
Enzima	SAVINASE Ultra 16 XL	Blanco	SAVINASE Ultra 16 XL	Blanco	SAVINASE Ultra 16 XL	Blanco
Tiempo, s	Grado de hidrólisis, %					
0	0,00	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00
60	11,15	0,81	11,20	0,77	10,41	0,99
120	13,95	1,39	14,10	1,47	12,96	1,64
180	15,33	1,88	15,61	2,03	14,40	2,46
240	16,53	2,34	16,77	2,53	15,30	2,95
300	17,47	2,83	17,76	2,86	16,26	3,36
360	18,20	3,20	18,57	3,36	16,93	3,73
420	18,87	3,58	19,39	3,64	17,49	3,98
480	19,50	4,00	19,98	4,12	18,10	4,43
540	20,05	4,31	20,69	4,50	18,53	4,67
600	20,54	4,68	21,24	4,92	18,97	4,80
660	20,54	4,68	21,25	4,92	22,87	4,81
720	20,54	4,68	21,25	4,92	22,87	5,35
780	20,54	4,68	21,25	4,92	23,28	7,11
840	20,54	4,68	21,25	4,92	23,37	8,28
900	20,54	4,68	21,25	4,92	23,62	9,06
960	20,54	4,68	21,25	4,92	23,62	9,23
1020	20,54	4,68	21,25	4,92	23,62	9,54
1080	20,54	4,68	21,25	4,92	23,62	9,57
1140	20,54	4,68	21,25	4,92	23,62	9,58
1200	20,54	4,68	21,25	4,92	23,62	9,58

ES 3 010 557 T3

1260	20,54	4,68	21,25	4,92	23,62	9,58
1320	20,54	4,68	21,25	4,92	23,62	9,58
1380	20,54	4,68	21,25	4,92	23,62	9,58
1440	20,54	4,68	21,25	4,92	23,68	9,58
1500	20,54	4,68	21,25	4,92	23,96	9,58
1560	20,54	4,68	21,25	4,92	23,96	9,58
1620	20,54	4,68	21,25	4,92	24,19	9,58
1680	20,54	4,68	21,25	4,92	24,20	9,58
1740	20,54	4,68	21,25	4,92	24,41	9,58
1800	20,54	4,68	21,25	4,92	24,57	9,58
1860	20,54	4,68	21,25	4,92	24,93	9,58
1920	20,54	4,68	21,25	4,92	25,13	9,58
1980	20,54	4,68	21,25	4,92	25,38	9,58
2040	20,54	4,68	21,25	4,92	26,18	9,58
2100	20,54	4,68	21,25	4,92	26,33	9,58
2160	20,54	4,68	21,25	4,92	26,33	9,58
2220	20,54	4,68	21,25	4,92	26,78	9,58
2280	20,54	4,68	21,25	4,92	27,00	9,58
2340	20,54	4,68	21,25	4,92	27,21	9,58
2400	20,54	4,68	21,25	4,92	27,96	9,58
2460	26,80	11,48	23,62	8,58	37,17	17,73
2520	26,98	11,48	23,62	8,58	37,17	17,73
2580	27,40	11,64	23,62	8,58	37,63	17,73
2640	27,60	11,64	23,95	8,58	37,91	17,73
2700	27,80	11,83	23,95	8,58	38,21	17,73
2760	28,05	12,20	24,24	8,77	38,51	17,73
2820	28,46	12,31	24,24	9,02	38,83	17,73
2880	28,80	12,39	24,59	9,05	39,14	18,07
2940	28,98	12,74	24,84	9,43	39,32	18,41
3000	29,31	12,91	24,84	9,45	39,81	18,41

La tabla 16 proporciona la variación en el DH% para las sales de Na de suero dulce en polvo para un 0,36 % en peso de PBTC y un 0,75 % en peso de DTPMP como diversos agentes aglutinantes dosificados a las soluciones de sustrato enzimático SAVINASE Ultra 16 XL a un pH de 10 y 50 °C.

ES 3 010 557 T3

TABLA 16

Agente aglutinante	0,36 % de PBTC		0,75 % en peso de DTPMP	
Enzima	SAVINASE 16 Ultra XL	Blanco	SAVINASE 16 Ultra XL	Blanco
Tiempo, s	Grado de hidrólisis, %			
0	0,00	0,00	0,00	0,00
60	11,02	0,00	10,77	0,24
120	13,95	0,37	13,74	0,65
180	15,47	0,74	15,36	0,88
240	16,60	1,10	16,44	1,03
300	17,49	1,47	17,46	1,21
360	18,29	1,81	18,39	1,35
420	19,07	2,17	19,20	1,51
480	19,79	2,52	20,07	1,68
540	20,39	2,95	21,01	1,84
600	20,99	3,20	21,75	2,02
660	21,22	3,25	21,77	2,02
720	21,22	3,25	23,06	7,35
780	22,18	3,25	24,53	8,95
840	22,95	3,46	25,79	10,20
900	23,65	3,93	26,55	11,10
960	24,12	4,15	27,17	11,93
1020	24,57	4,58	27,70	12,44
1080	24,98	4,67	27,92	12,87
1140	25,39	4,90	28,00	13,08
1200	25,62	5,10	28,00	13,33
1260	25,90	5,19	28,00	13,33
1320	26,02	5,42	28,00	13,58
1380	26,28	5,62	28,00	13,58
1440	26,53	5,62	28,00	13,90
1440	26,53	5,62	28,00	13,90
1500	26,69	5,70	28,00	13,90
1560	26,84	5,99	28,00	13,90
1620	27,00	6,16	28,16	13,90
1680	27,21	6,26	28,16	14,07
1740	27,42	6,53	28,22	14,12
1800	27,58	6,59	28,27	14,37

ES 3 010 557 T3

1860	27,67	6,78	28,42	14,37
1920	27,77	6,97	28,65	14,58
1980	27,98	7,12	28,76	14,58
2040	28,04	7,27	28,82	14,83
2100	28,19	7,45	29,04	15,05
2160	28,34	7,66	29,04	15,18
2220	28,34	7,73	29,15	15,38
2280	28,41	7,92	29,32	15,61
2340	28,62	8,16	29,47	15,61
2400	28,62	8,23	29,67	15,87
2460	40,16	18,37	41,08	26,95
2520	40,67	18,66	41,40	27,46
2580	41,72	19,01	41,77	27,74
2640	42,80	19,33	41,94	27,97
2700	43,49	19,61	42,22	28,25
2760	44,08	19,84	42,30	28,56
2820	44,69	20,03	42,55	28,56
2880	45,34	20,24	42,79	28,78
2940	45,71	20,40	42,99	29,19
3000	46,32	20,65	43,22	29,38

La tabla 17 ofrece una visión de conjunto de los resultados de las pruebas con cada una de las sales de los agentes aglutinantes dosificadas a la solución de sustrato enzimático a un pH de 10 y 50 °C. Una "D" representa que la enzima se desactivó, mientras que una "A" representa que la enzima estaba activa después de la segunda adición del sustrato. Un "-" representa no puesto a prueba. Como muestra esta tabla, la mayoría de los agentes aglutinantes puestos a prueba muestran una desactivación de SAVINASE Ultra 16 XL, en condiciones de limpieza que tienen un pH de 10 y 50 °C. Los agentes aglutinantes puestos a prueba a determinadas concentraciones son eficaces para desactivar SAVINASE Evity 16 XL. Los agentes aglutinantes puestos a prueba fueron ineficaces para desactivar BLAZE Pro 100L y ESPERASE 8.0L. Un 0,125 % en peso de EDTA y un 0,33 % en peso de HEDP fueron capaces de desactivar ALCALASE 2.5L.

TABLA 17

Agente aglutinante	Concentración, % peso	Enzima				
		SAVINASE Ultra 16 XL	SAVINASE Evity 16 XL	BLAZE Pro 100L	ESPERASE 8.0L	ALCALASE 2.5L
EDTA	1,000	-	-	A	A	-
	0,500	D	D	A	-	-
	0,250	D	-	-	-	-
	0,125	D	-	-	A	D
	0,01	D	-	-	-	-
	0,005	A	-	-	-	-

ES 3 010 557 T3

	0,001	A	-	-	-	-
MGDA	0,460	D	D	A	-	-
	0,230	D	-	-	-	-
	0,115	D	-	-	-	-
NTA	0,080	D	-	-	-	-
GLDA	0,460	D	-	-	-	-
HEDTA	0,450	D	D	A	-	-
DTPA	0,660	D	-	-	-	-
Gluconato	0,370	A	-	-	-	-
	1,000	A	-	-	-	-
KTPP	0,630	D	D	A	-	-
ATMP	0,480	D	-	-	-	-
PBTC	0,360	D < 100 %	-	-	-	-
HEDP	0,330	D	-	A	A	D
EDTMP	0,570	D	-	-	-	-
DTPMP	0,750	D	-	-	-	-
Poliacrilato	1,000	D < 100 %	-	-	-	-

La tabla 18 muestra los resultados de las pruebas de las sales de agente aglutinante usando SAVINASE Ultra 16 XL.

TABLA 18

Agente aglutinante	Concentración, % peso	Grado de hidrólisis, %				Conclusión
		Después de 5 minutos de la adición inicial del sustrato		Después de 5 minutos de la segunda adición de sustrato		
		SAVINASE Ultra 16 XL	Blanco	SAVINASE Ultra 16 XL	Blanco	
EDTA	0,50	16,4	1,7	0,2	0,6	D
	0,25	19,2	4,6	0,4	0,4	D
	0,125	16,3	1,7	0,0	0,2	D
	0,01	13,7	0,3	0,0	0,0	D
	0,005	14,8	0,0	13,4	0,6	A
	0,001	12,7	0,0	12,5	0,4	A
MGDA	0,46	17,1	1,3	1,2	0,3	D
	0,23	18,8	2,4	1,3	0,8	D
	0,115	17,1	2,3	0,0	0,3	D
NTA	0,08	17,8	2,9	0,3	0,0	D

ES 3 010 557 T3

GLDA	0,46	16,3	3,4	0,7	0,0	D
HEDTA	0,45	17,2	2,1	0,8	0,0	D
DTPA	0,66	17,5	2,8	1,4	0,4	D
Gluconato	0,37	19,0	4,8	19,3	2,5	A
	1,0	18,3	0,9	16,7	1,7	A
KTPP	0,63	16,6	0,4	0,9	0,2	D
ATMP	0,48	19,6	4,0	2,3	1,1	D
PBTC	0,36	17,5	1,5	5,1	1,2	D < 100 %
HEDP	0,33	18,2	3,8	1,2	1,5	D
EDTMP	0,57	17,0	0,6	1,5	0,3	D
DTPMP	0,75	17,5	1,2	1,2	2,1	D
Poliacrilato	1,0	17,9	1,6	3,7	0,8	D < 100 %

5 La limpieza enzimática con SAVINASE Ultra 16 XL se puede desactivar mediante la adición de los agentes aglutinantes a las concentraciones identificadas, excepto con el uso de gluconato y PBTC en la tabla 18, en esta solución de limpieza sin enjuague intermedio y sin una etapa de desactivación adicional usando, por ejemplo, un ácido que reduzca el pH. Esto reduce significativamente el tiempo total de limpieza y, por tanto, acelera la limpieza de la membrana.

La tabla 19 muestra los resultados de las pruebas de las sales de agente aglutinante que desactivaron eficazmente la enzima SAVINASE Evity 16 XL.

TABLA 19

Agente aglutinante	Concentración, % peso	Grado de hidrólisis, %				Conclusión
		Después de 5 minutos de la adición inicial del sustrato		Después de 5 minutos de la segunda adición de sustrato		
		SAVINASE Evity 16 XL	Blanco	SAVINASE Evity 16 XL	Blanco	
EDTA	0,5	16,3	1,7	1,6	0,6	D
MGDA	0,46	16,3	1,3	1,6	0,3	D
HEDTA	0,45	14,7	2,1	0,7	0,0	D
KTPP	0,63	17,7	0,4	1,5	0,2	D

10

Los resultados en la tabla 19 muestran que SAVINASE Evity 16XL también puede desactivarse usando un agente aglutinante de manera similar y también puede usarse en un procedimiento de limpieza de membrana acelerada.

La tabla 20 muestra los resultados de las pruebas de las sales de agente aglutinante en la enzima BLAZE Pro 100L.

TABLA 20

Agente aglutinante	Concentración, % peso	Grado de hidrólisis, %				Conclusión
		Después de 5 minutos de la adición inicial del sustrato		Después de 5 minutos de la segunda adición de sustrato		
		BLAZE Pro 100L	Blanco	BLAZE Pro 100L	Blanco	
EDTA	1,0	16,3	3,6	12,8	1,6	A
	0,5	15,4	1,7	9,5	0,6	A
MGDA	0,46	13,6	1,3	14,9	0,3	A
HEDTA	0,45	13,5	2,1	8,1	0,0	A
KTPP	0,63	13,3	0,4	11,8	0,2	A
HEDP	0,33	16,6	1,2	11,5	1,5	A

La tabla 21 muestra los resultados de las pruebas de las sales de agente aglutinante en la enzima ESPERASE 8.0L.

TABLA 21

Agente aglutinante	Concentración, % peso	Grado de hidrólisis, %				Conclusión
		Después de 5 minutos de la adición inicial del sustrato		Después de 5 minutos de la segunda adición de sustrato		
		ESPERASE 8.0L	Blanco	ESPERASE 8.0L	Blanco	
EDTA	1,0	18,4	3,6	14,0	1,6	A
	0,125	17,7	1,7	16,3	0,2	A
HEDP	0,33	18,9	1,2	13,1	1,5	A

5

La tabla 22 muestra los resultados de las pruebas de las sales de agente aglutinante en la enzima ALCALASE 2.5L.

TABLA 22

Agente aglutinante	Concentración, % peso	Grado de hidrólisis, %				Conclusión
		Después de 5 minutos de la adición inicial del sustrato		Después de 5 minutos de la segunda adición de sustrato		
		ALCALASE 2.5L	Blanco	ALCALASE 2.5L	Blanco	
EDTA	0,125	16,6	1,7	0,8	0,2	D
HEDP	0,33	18,2	1,2	0,7	1,5	D

Los resultados en la tabla 22 muestran que ALCALASE 2.5L también se puede desactivar usando un agente aglutinante de manera similar y también se puede usar en un procedimiento de limpieza de membrana acelerada.

10

En resumen, sin pretender limitarse a la teoría, estas pruebas demuestran que las enzimas estructuradas para tener una fuerte unión a calcio, tales como BLAZE Pro 100L y ESPERASE 8.0L, tienden a no desactivarse tan fácilmente mediante un agente aglutinante. En lugar de ello, normalmente se deben aplicar mayores valores de pH y/o temperaturas para desactivar las enzimas que son algo o totalmente resistentes a dicho agente aglutinante y también pueden usarse en un procedimiento de limpieza de membrana acelerada.

15

EJEMPLO 4

Estas pruebas se realizaron para mostrar el principio de funcionamiento de un protocolo de limpieza seleccionado de la invención en un aparato de prueba de membranas en laboratorio. Se usó un equipo de prueba de membranas en laboratorio semiautomatizado que contiene cuatro (4) celdas de membrana. Cada una de estas celdas contiene una superficie de membrana de 20*5 cm². Para estas pruebas se usó una membrana de ultrafiltración (UF) fabricada a partir de polietersulfona (PES) disponible de Alfa Laval, tipo GR81PP. Las cuatro (4) celdas funcionan en paralelo y se toma un valor medio usando la información recopilada de las cuatro (4) celdas. La solución de ensuciamiento para estas pruebas incluyó un 0,55 % en peso de suero ácido WPC en polvo al 80 % en peso en agua blanda. A continuación se identifican las etapas para el procedimiento de prueba:

- 1 Limpiar las membranas nuevas con una solución cáustica: una solución a base de hidróxido de sodio (NaOH) que tenga un pH de 12 y un 0,0375 % en peso de 2-etilhexilsulfato de sodio.
- 2 Medir el flujo de agua limpia (CWF) o CWF(1).
- 3 Implementar el ensuciamiento mediante una filtración de una (1) hora usando la solución de suero ácido identificada anteriormente, a una temperatura inicial de 2-3 °C.
- 4 Enjuagar
- 5 Medir CWF(2)
- 6 Limpiar con las soluciones de limpieza descritas.
- 7 Enjuagar
- 8 Medir CWF(3)
- Como se identificó anteriormente, el flujo de agua limpia (CWF) se mide antes y después de la etapa de ensuciamiento, y después de la etapa de limpieza. El CWF se calcula como un porcentaje usando la siguiente fórmula:

$$\text{Recuperación de CWF (\%)} = \frac{\text{CWF después de la etapa de limpieza}}{\text{CWF antes del ensuciamiento}} \times 100$$

- La tabla 23 a continuación identifica tres soluciones de limpieza separadas que se pusieron a prueba y los resultados de CWF para cada una de estas soluciones.

TABLA 23

Compuesto	Solución		
	1	2	3
	Concentración, % en peso		
bicarbonato de sodio en polvo	0,0005	0,0005	0,0005
carbonato de sodio (denso)	0,0003	0,0003	0,0003
hidróxido de potasio	0,0002675	0,0002675	0,0002675
ácido poliacrílico (M= 4,5k)	0,000072	0,000072	0,000072
glucósido de alquilo (C8-10)	0,00004375	0,00004375	0,00004375
2-etilhexilsulfato de sodio	0,000115	0,000115	0,000115
sal de mono-Na de dipropionato de alquil (C8)	0,00006	0,00006	0,00006

ES 3 010 557 T3

amino			
proteasa	0,00025	0,00025	0,00025
propilenglicol	0,00235	0,00235	0,00235
cloruro de calcio dihidrato	0,000002	0,000002	0,000002
Formiato de Na	0,0001	0,0001	0,0001
ácido alquilbencenosulfónico	0	0	0,0004176
hidróxido de sodio	0	0	0,0000555

Los componentes anteriores se mezclan durante 30 minutos y a continuación se añaden los siguientes compuestos.

sal de 4-Na del ácido etilendiaminotetraacético	0,0017	0,0034	0,0034
glucósido de alquilo (C8-10)	0	0,0000875	0,0000875
2-etilhexilsulfato de sodio	0,00006	0,0001	0,0001
sal de mono-Na de dipropionato de alquil (C8) amino	0,00004	0,00005	0,00005

La solución se vuelve a mezclar durante 30 minutos.

Resultados de la prueba

CWF antes del ensuciamiento, L/m ² *h*bar	17,5 +/- 1,7	19,7 +/- 2,2	25,3 +/- 3,9
CWF después del ensuciamiento, L/m ² *h*bar	2,2 +/- 1,0	1,7 +/- 0,7	1,9 +/- 0,4
CWF después de la limpieza, L/m ² *h*bar	12,2 +/- 3,1	12,2 +/- 2,0	24,7 +/- 3,9
Recuperación de CWF, %	69 +/- 11	62 +/- 7	98 +/- 4

5 Como muestran los resultados en la tabla 23, después de limpiar la membrana con la solución 3, el CWF se recupera completamente y se considera limpio. No se requiere ninguna etapa de desactivación adicional ni humectación de la membrana para desactivar la enzima y restaurar la humectación de la membrana, respectivamente. Esta solución de limpieza inventiva reduce significativamente el tiempo de limpieza, así como el uso de agua para el enjuague intermedio en las etapas posteriores y la demanda de energía para calentar las soluciones de limpieza posteriores y las etapas de circulación de la solución de limpieza y de enjuague.

Adicionalmente, se proporcionaría una formulación concentrada de producto que permitiría alcanzar las concentraciones de las soluciones identificadas anteriormente, tras diluirse con agua en el proceso de limpieza.

REIVINDICACIONES

1. Un método de limpieza de una membrana, comprendiendo el método:
enjuagar previamente la membrana;
- 5 limpiar la membrana usando una solución que comprende una enzima y un agente que tiene un pH compatible con la enzima, teniendo la solución una temperatura compatible con la membrana; impidiendo que cualesquiera iones divalentes en la solución precipiten;
reducir una actividad de la enzima añadiendo un agente aglutinante capaz de desactivar la enzima a la solución, en donde el método es sin enjuagar la solución de la membrana desde el momento en que la solución se pone en contacto con la membrana hasta el momento en que se usa para reducir la actividad de la enzima; y
10 enjuagar posteriormente la membrana para eliminación de la solución.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la solución comprende adicionalmente un agente aglutinante capaz de formar un complejo con iones divalentes en la solución para impedir que los iones divalentes precipiten.
- 15 3. El método de la reivindicación 2, en donde el agente aglutinante capaz de formar un complejo con los iones divalentes comprende al menos uno de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y cualquier sal del mismo, ácido (hidroxietil)etilendiaminotriacético (HEDTA) y cualquier sal del mismo, tripolifosfato de potasio (KTPP), un ácido fosfónico y cualquier sal del mismo, ácido nitrilotriacético (NTA) y cualquier sal del mismo, ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y cualquier sal del mismo, ácido glucónico (GA) y cualquier sal del mismo, ácido glutámico diacético (GLDA) y cualquier sal del mismo, ácido metilglicindiacético (MGDA) y cualquier sal del mismo, ácido iminodisuccínico (IDS) y cualquier sal del mismo, ácidos aminocarboxílicos y cualquier sal de los mismos, ácido hidroxietano difosfónico (HEDP) y cualquier sal del mismo, ácido aminotris(metilenfosfónico) (ATMP) y cualquier sal del mismo, ácido 2-fosfonobutano-1,2,4-tricarboxílico (PBTC) y cualquier sal del mismo, ácido etilendiaminotetra(metilenfosfónico) (EDTMP) y cualquier sal del mismo, ácido dietilentriaminopenta(metilenfosfónico) (DTPMP) y cualquier sal del mismo, un poliacrilato, un copolímero de ácido acrílico-ácido maleico y cualquier sal del mismo y gluconato de sodio (gluconato de Na).
- 20 4. El método de la reivindicación 3, en donde una concentración del agente aglutinante capaz de formar un complejo con los iones divalentes es del 0,001 % en peso al 1 % en peso basándose en el peso total de la solución.
- 30 5. El método de la reivindicación 3, en donde el poliacrilato comprende un ácido poliacrílico parcialmente neutralizado que tiene un peso molecular en el intervalo de 2,5 kDa a 5 kDa.
- 35 6. El método de la reivindicación 1, en donde la solución comprende adicionalmente un tensioactivo.
7. El método de la reivindicación 6, en donde el tensioactivo comprende al menos uno de un tensioactivo aniónico, un tensioactivo no iónico y un tensioactivo anfótero.
- 40 8. El método de la reivindicación 1, en donde el agente aglutinante capaz de desactivar la enzima comprende al menos uno de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y cualquier sal del mismo, ácido (hidroxietil)etilendiaminotriacético (HEDTA) y cualquier sal del mismo, tripolifosfato de potasio (KTPP), un ácido fosfónico y cualquier sal del mismo, ácido nitrilotriacético (NTA) y cualquier sal del mismo, ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y cualquier sal del mismo, ácido glutámico diacético (GLDA) y cualquier sal del mismo, ácido metilglicindiacético (MGDA) y cualquier sal del mismo, ácido iminodisuccínico (IDS) y cualquier sal del mismo, ácidos aminocarboxílicos y cualquier sal de los mismos, ácido hidroxietano difosfónico (HEDP) y cualquier sal del mismo, ácido aminotris(metilenfosfónico) (ATMP) y cualquier sal del mismo, ácido 2-fosfonobutano-1,2,4-tricarboxílico (PBTC) y cualquier sal del mismo, ácido etilendiaminotetra(metilenfosfónico) (EDTMP) y cualquier sal del mismo, ácido dietilentriaminopenta(metilenfosfónico) (DTPMP) y cualquier sal del mismo, un poliacrilato y un
- 45

copolímero de ácido acrílico-ácido maleico y cualquier sal del mismo.

9. El método de la reivindicación 8, en donde el método cumple al menos una de las siguientes condiciones:
 - (i) una concentración del agente aglutinante capaz de desactivar la enzima es del 0,005 % en peso al 1 % en peso basándose en el peso total de la solución;
 - (ii) una proporción en peso del agente aglutinante capaz de desactivar la enzima con respecto a la enzima es de al menos aproximadamente 0,2 g de agente aglutinante por gramo de enzima;
10. El método de la reivindicación 1, en donde la reducción de una actividad de la enzima comprende además añadir un agente reductor a la solución.
11. El método de la reivindicación 10, en donde el agente reductor comprende ditionito de sodio, preferentemente a una concentración de al menos aproximadamente el 0,2 % en peso basándose en el peso total de la solución.
12. El método de la reivindicación 1, en donde la reducción de una actividad de la enzima comprende además aumentar un pH de la solución, o aumentar una temperatura de la solución, o ambos.
13. El método de la reivindicación 12, en el que el método cumple al menos una de las siguientes condiciones:
 - (i) el pH se aumenta de 11 a 13;
 - (ii) la temperatura se aumenta de 50 °C a 85 °C
 - (iii) el pH se aumenta de 12,0 a 13,0 y la temperatura se aumenta de 50 °C a 60 °C
 - (iv) el pH se aumenta de 11,0 a 12,0 y la temperatura se aumenta de 60 °C a 85 °C.
14. El método de la reivindicación 1, en donde la membrana se ha usado para el tratamiento de proteínas, adecuadamente en donde la membrana se ha usado para el tratamiento de suero ácido, suero dulce y leche desnatada.
15. El método de la reivindicación 1, en donde:
 - enjuagar previamente la membrana se realiza usando una solución de enjuague previo que comprende agua durante un período de 2 minutos a 30 minutos.
 - limpiar la membrana se realiza durante un período de 2 minutos a 45 minutos;
 - reducir la actividad de la enzima se realiza durante un período de hasta aproximadamente 40 minutos; y
 - enjuagar posteriormente la membrana se realiza usando una solución de enjuague posterior que comprende agua durante un período de 2 minutos a 30 minutos.

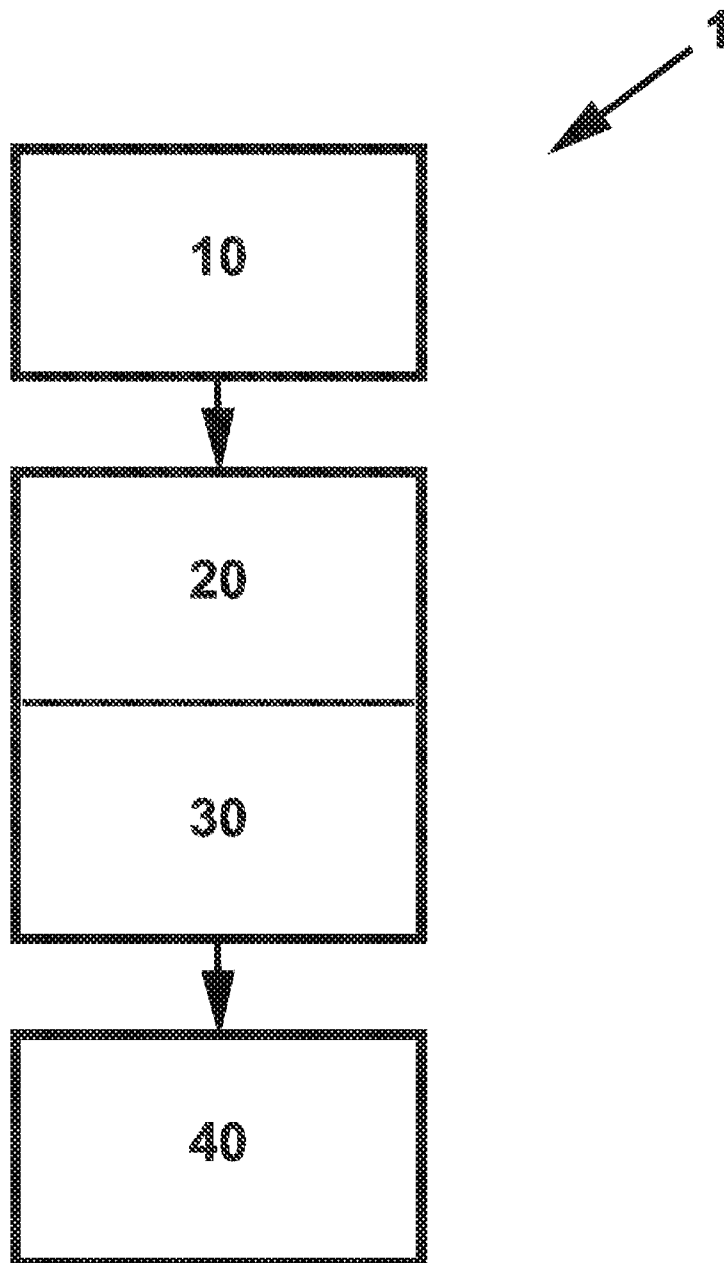
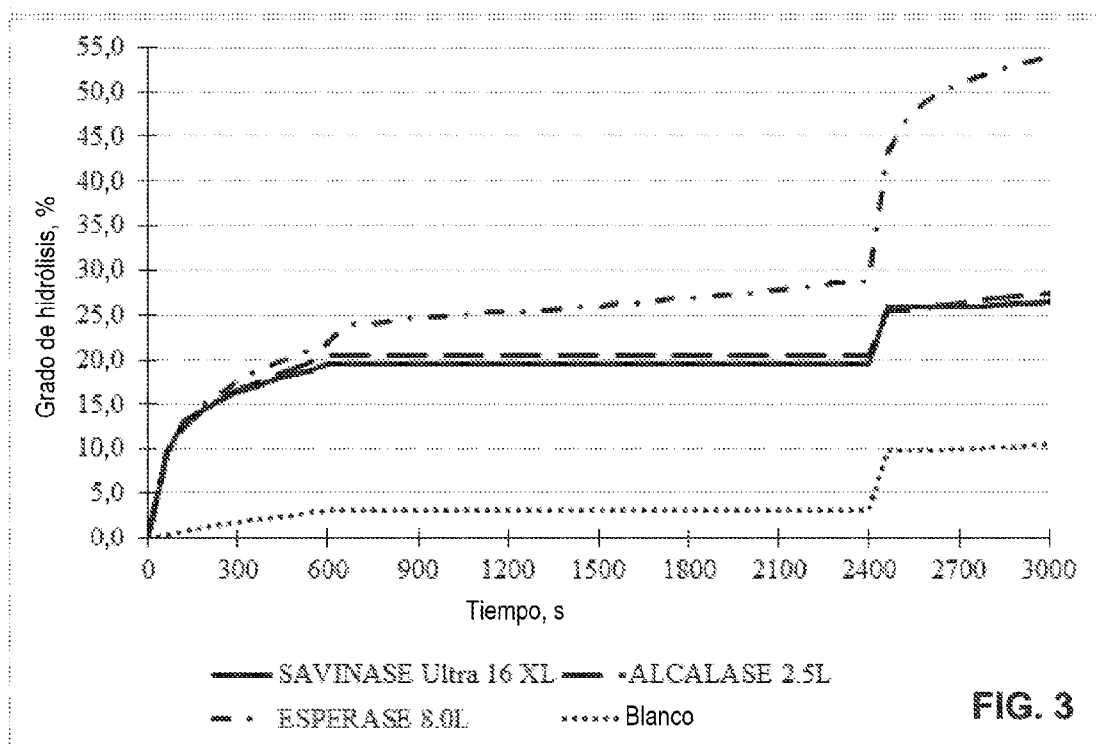
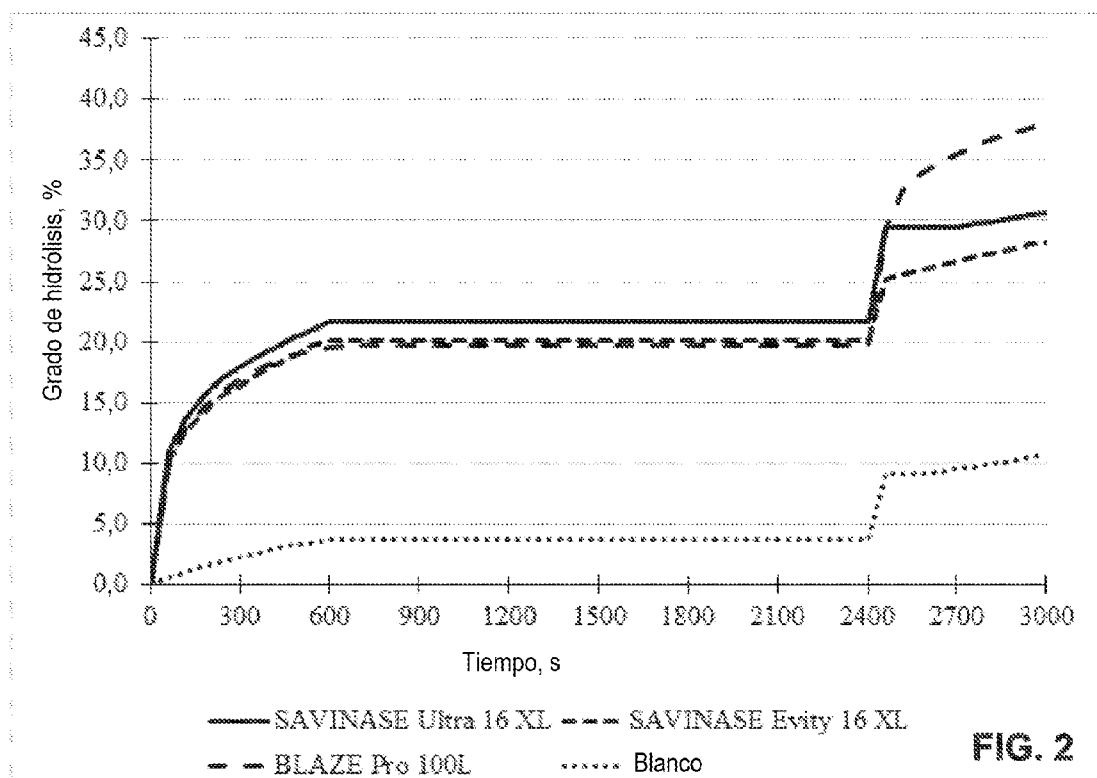
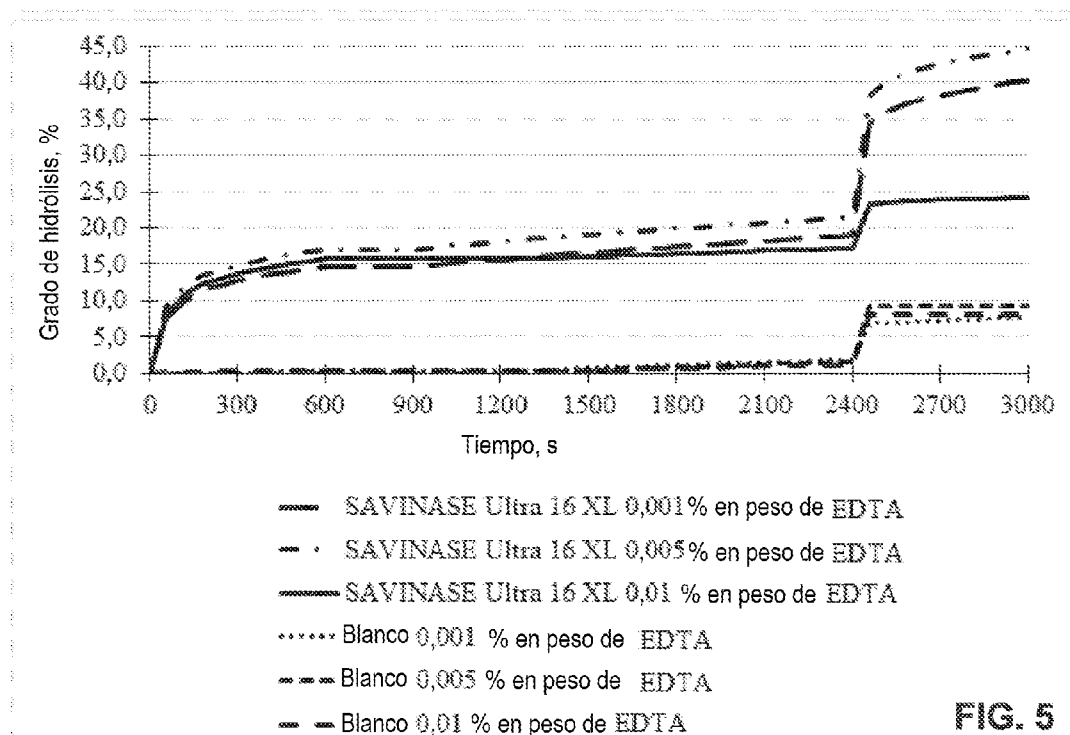
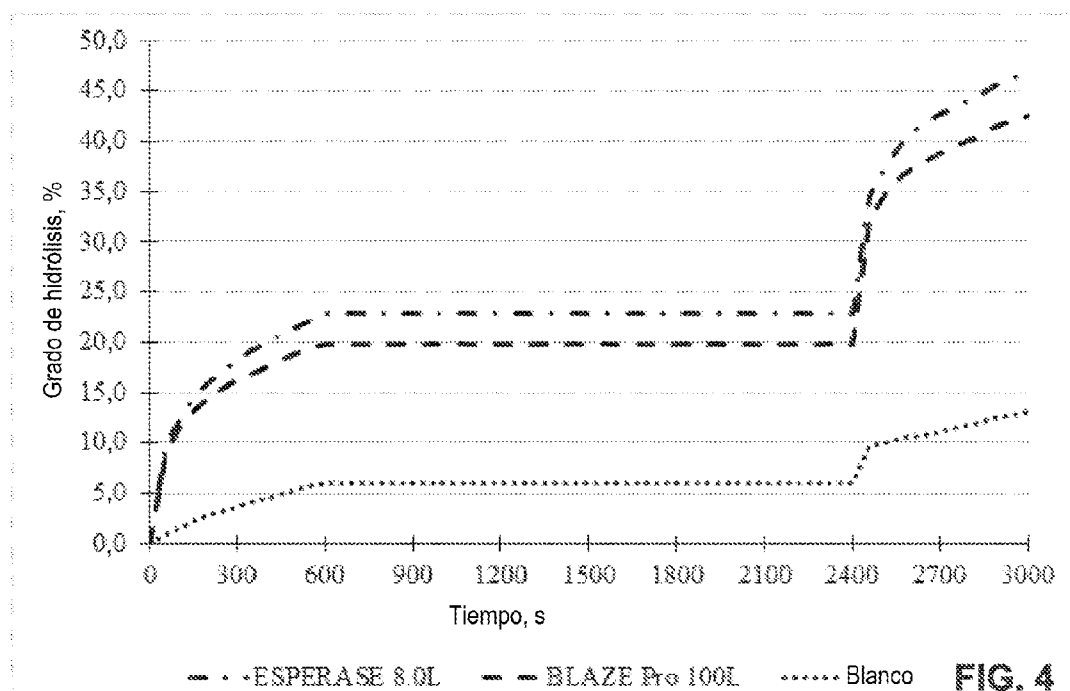
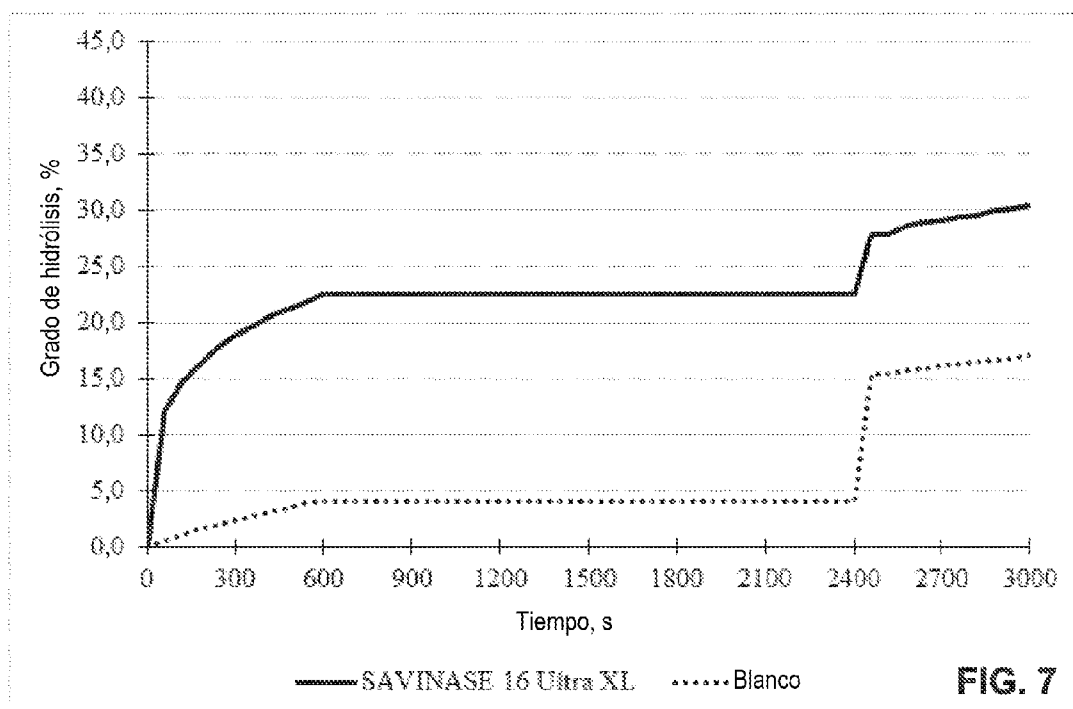
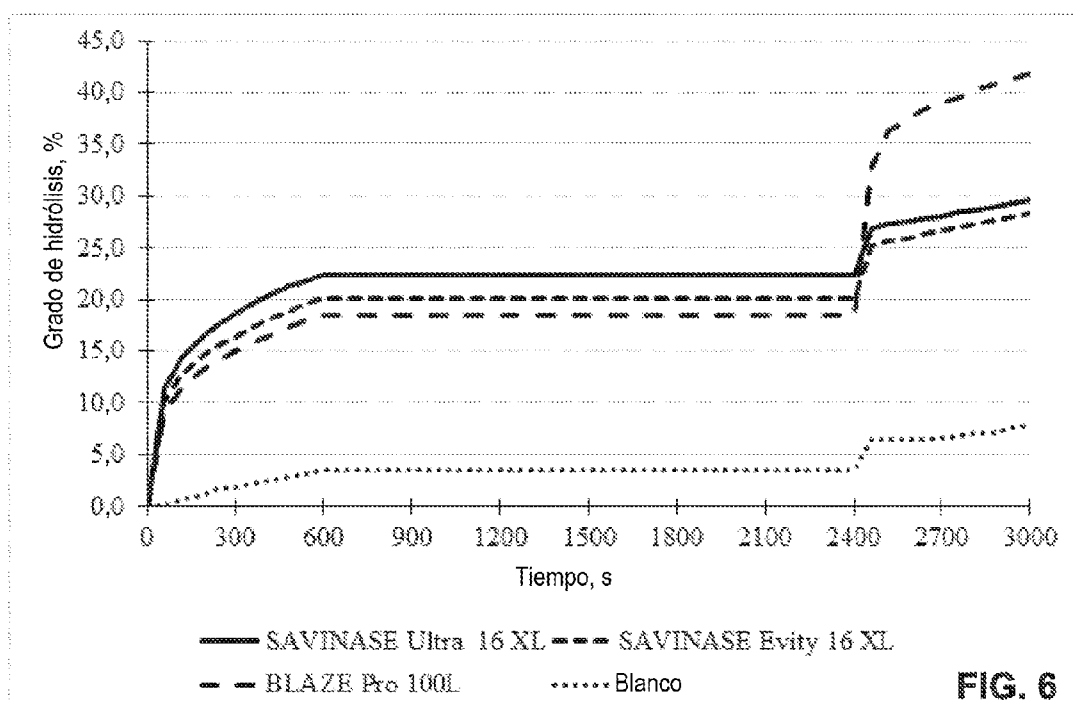


FIG. 1







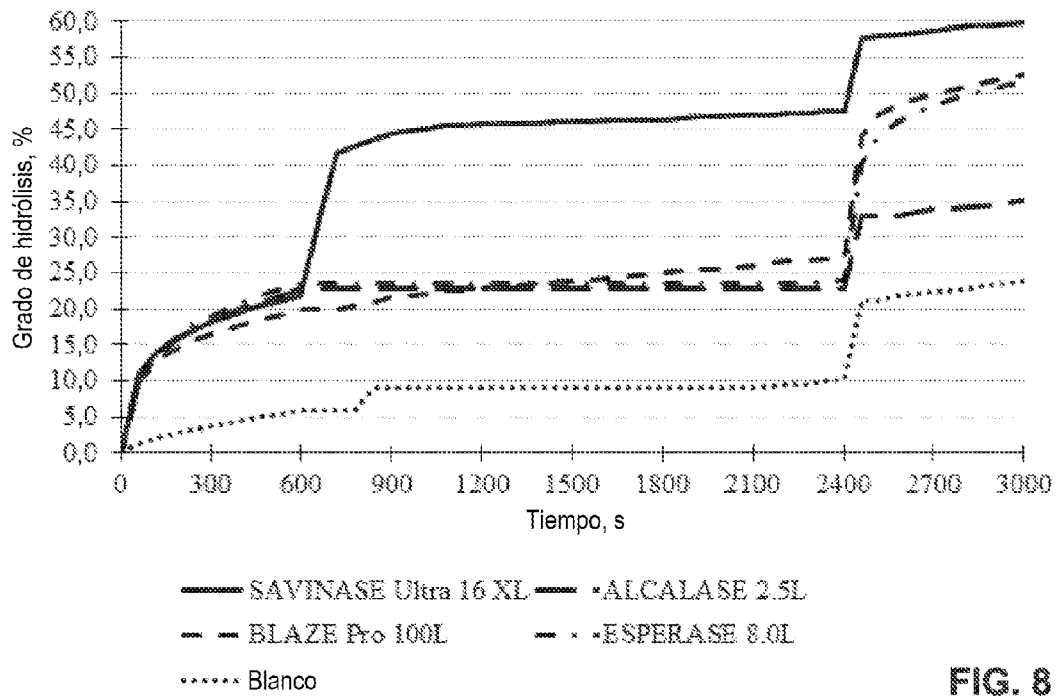


FIG. 8

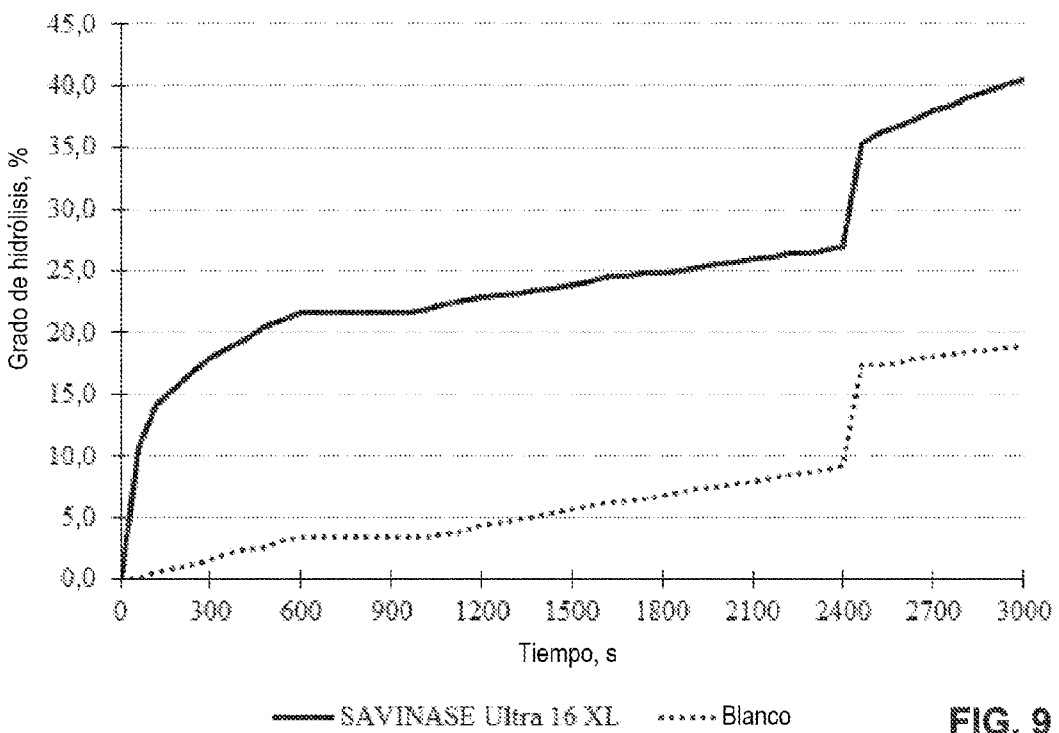


FIG. 9