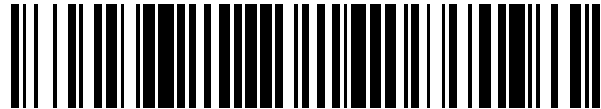


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 358 029**

21 Número de solicitud: 200902117

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/34** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **20.10.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **05.05.2011**

Fecha de la concesión: **12.03.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **23.03.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**23.03.2012**

73 Titular/es:  
**UNIVERSIDAD DE ALMERÍA  
OTRI - EDIFICIO CENTRAL  
CTRA. SACRAMENTO, S/N  
04120 LA CAÑADA DE SAN URBANO, ALMERÍA,  
ES**

72 Inventor/es:  
**MOYANO LÓPEZ, FRANCISCO y  
NOLASCO SORIA, HECTOR GERARDO**

74 Agente/Representante:  
**No consta**

54 Título: **COMPOSICIÓN Y MÉTODO CINÉTICO DE MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPASA.**

57 Resumen:

La presente invención pertenece al campo de las composiciones químicas utilizadas en métodos de determinación de actividad enzimática. En particular, la presente invención se encuadra en los métodos cinéticos de determinación de la actividad lipasa que utilizan sustratos sintéticos.

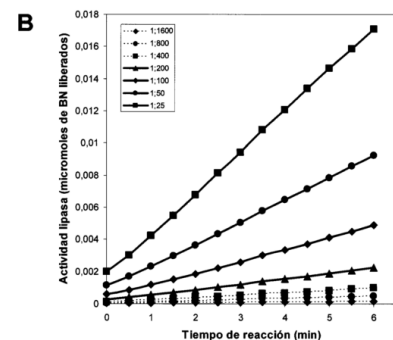
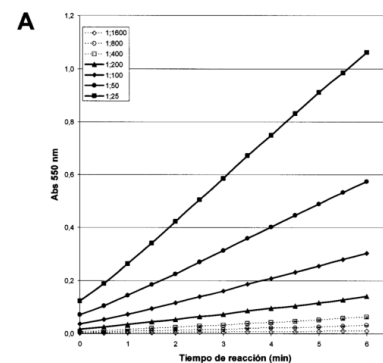


Fig. 7

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

ES 2 358 029 B1

## DESCRIPCIÓN

Composición y método cinético de medición de la actividad lipasa.

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo de las composiciones químicas utilizadas en métodos de determinación de actividad enzimática. En particular, la presente invención se encuadra en los métodos cinéticos de determinación de la actividad lipasa que utilizan sustratos sintéticos.

10

**Antecedentes de la invención**

Los métodos de medición de actividad lipasa existentes en el campo de la técnica requieren el análisis individual de muestras, con procedimientos de múltiples pasos por lo que son difíciles de automatizar. Los métodos conocidos de medición de la actividad lipasa incluyen métodos de punto final y métodos cinéticos con sustratos sintéticos. En ambos métodos, las mezclas de reacción presentan una elevada turbidez debido a la baja solubilidad de los sustratos sintéticos en soluciones acuosas, lo que limita la utilización de estos métodos en la industria alimentaria, química o farmacéutica.

15

20

Para posibilitar la cuantificación de la actividad lipasa mediante técnicas espectrofotométricas en el rango visible, los métodos de punto final requieren un paso último de extracción de la solución cromófora. Los métodos cinéticos, en cambio, no han podido adaptarse a técnicas colorimétricas. Las alternativas que existen en el campo de la técnica comprenden el pH Stat (velocidad de consumo de hidróxido para mantener el pH) o pH Shift o pH drop (caída de pH), que tienen el inconveniente de requerir el análisis individual de cada réplica de cada muestra. En 2003 He *et al.*, idearon un método cinético de medición de la actividad esterasa mediante absorbancia de 1-naftol en el rango de luz ultravioleta (He *et al.*, 2003. Arch Insect Biochem Physiol. 54:68-76). Sin embargo, el 1-naftol no es un sustrato específico para lipasas, sino uno general para esterasas, y la medición en UV requiere contenedores especiales como por ejemplo cubetas de cuarzo lo que dificulta la monitorización simultánea de múltiples pruebas.

25

30

McKellar *et al.*, diseñaron en 1986 un método de punto final que incluye un ensayo colorimétrico altamente específico para lipasas, pues el sustrato sintético utilizado, el  $\beta$ -naftil caprilato (BNC), presenta un enlace ester entre el ácido caprílico y el  $\beta$ -naftol (BN) que es insensible a la acción de esterasas que no sean lipasas. Sin embargo, este ensayo presenta la desventaja de que las muestras deben centrifugarse para poder medir la actividad por lo que no es posible obtener una medida total de la actividad lipasa en una muestra dada. En 1989, Versaw *et al.*, idearon una mejora de dicho método que presenta más sensibilidad y no requiere la centrifugación de las muestras, por lo que permite la medida de la actividad lipasa total de una muestra. Dicha mejora consiste en la extracción y solubilización del cromóforo (formado por la reacción de Fast Blue BB (FBBB) con el  $\beta$ -naftol liberado en la reacción enzimática del BNC) con un solvente orgánico compuesto por etanol y etil acetato. La adición de dicho solvente produce una mezcla clara, apta para estudios de absorbancia en el visible. Sin embargo, esta medición no es posible de manera cinética debido a que la naturaleza hidrofóbica del sustrato provoca la turbidez de la muestra y hace imprescindible la extracción del cromóforo.

35

40

Las lipasas actúan en la interfase grasa-agua por lo cual algunos inventores han intentado generar una emulsión de reactivos mediante la utilización de surfactantes con el objeto de aumentar la superficie de sustrato expuesta a la enzima. Los detergentes no-iónicos han demostrado ser capaces de optimizar la actividad enzimática de lipasas procaríotas y eucariotas a concentraciones cercanas a su concentración micelar crítica (CMC) gracias a su habilidad de aumentar la superficie de sustrato expuesta al enzima. Por ejemplo, la utilización de detergentes no-iónicos derivados del polioxietileno, como el Tween 20, consigue máxima actividad enzimática de lipasas procaríotas a concentraciones de entre 0,03-0,25% de la mezcla de reacción. En fuerte contraste, los detergentes aniónicos como los alquilbenceno sulfonatos y los alquil sulfatos han demostrado ser potentes inhibidores de la actividad lipasa incluso a pequeñas concentraciones (Helistö *et al.*, 1998 Enzyme and microbial Technology 23:113-117), por lo que se utilizan en los métodos de punto final previamente a la extracción del cromóforo para detener la reacción (Bardi *et al.*, 1993. J. Inst. Brew. 99: 385-388; He *et al.*, 2003. Arch Insect Biochem Physiol. 54:68-76).

50

55

La acción inhibitoria sobre la actividad lipasa de los detergentes aniónicos de debe a su habilidad de producir la desnaturalización del enzima por desestabilización de sus estructuras terciaria y/o cuaternaria. En efecto, esta es la base de la utilización del dodecil sulfato sódico (SDS) para separación de proteínas en las electroforesis en gel de acrilamida (PAGE), debido al poder desnaturador de los alquil benceno sulfonatos lineares (LAS) y los alquil sulfatos, como el sodio dodecil sulfato (SDS) considerado el más potente de su clase de detergentes (Anionic surfactants Analytical Chemistry, Surfactant science series. Vol 43. 1992. Marcel Dekker, Inc.). LAS es inhibidor de lipasas procaríotas y eucariotas a concentraciones cercanas e inferiores a su CMC (130  $\mu$ M) (Helistö *et al.*, 1998 Enzyme and microbial Technology 23:113-117). Las mismas propiedades se atribuyen en el campo de la técnica al SDS cuya CMC es 8,5 mM a 25°C.

60

65

Los inventores de la presente solicitud han descubierto que añadiendo un detergente aniónico a la mezcla de reacción a una concentración por encima de su CMC, en un método cinético para la medición de actividad lipasa, se obtiene una solución clara, apta para técnicas de espectrofotometría en el visible, que no afecta significativamente la actividad enzimática ni provoca una desnaturalización del enzima en el tiempo de reacción establecido y que puede, por tanto, utilizarse en el análisis cinético de la actividad lipasa. Además, los inventores de la presente solicitud han

ideado un método de detección o medición de la actividad lipasa que permite la cuantificación simultánea de múltiples muestras de diferente origen en volúmenes micrométricos.

### Breve descripción de las figuras

5

Figura 1: Cinética de actividad lipasa a diferentes concentración del detergente aniónico. La concentración final del sustrato BNC y del reactivo cromogénico en la mezcla de reacción final fue de 1 mM. La actividad lipasa se mide como incremento de absorbancia a 550 nm por unidad de tiempo. La actividad lipasa se ve favorecida a concentraciones finales del detergente aniónico superiores a 0,2% (6,9 mM) e igual o inferiores a 0,4% (13,5 mM). En el eje de las ordenadas se expresa la absorbancia a 550 nm y en el eje de las abscisas el tiempo de reacción en minutos. El recuadro superior izquierdo indica concentración final de SDS en % y el recuadro superior derecho la concentración final mM de SDS en los tratamientos.

10

Figura 2: Cinética de actividad lipasa a diferentes concentraciones del reactivo BNC. La concentración final del reactivo cromogénico en la mezcla de reacción final fue de 1 mM y del detergente aniónico fue de 0,4% (13,5 mM). La actividad lipasa se mide como incremento de absorbancia a 550 nm por unidad de tiempo. La actividad lipasa se ve favorecida a concentraciones finales de 1 mM del sustrato BNC. En el eje de las ordenadas se expresa la absorbancia a 550 nm y en el eje de las abscisas el tiempo de reacción en minutos. El recuadro superior izquierdo indica concentración final de BNC (mM) en los tratamientos.

15

20

Figura 3 Cinética de actividad lipasa a diferentes concentraciones del reactivo cromogénico. La concentración final del sustrato BNC en la mezcla de reacción final fue de 1 mM y del detergente aniónico fue de 0,4% (13,5 mM). La actividad lipasa se mide como incremento de absorbancia a 550 nm por unidad de tiempo. La actividad lipasa se ve favorecida a concentraciones finales de 1 mM del reactivo cromogénico. En el eje de las ordenadas se expresa la absorbancia a 550 nm y en el eje de las abscisas el tiempo de reacción en minutos. El recuadro superior izquierdo indica concentración final del reactivo cromogénico (mM) en los tratamientos.

25

Figura 4 Concentración óptima del detergente aniónico, en la mezcla de reacción final, para la actividad lipasa. La actividad lipasa se expresa como la velocidad de generación de color, por la formación del complejo cromogénico (BN-FBBB), en Unidades de Absorbancia a 550 nm/minuto (pendientes de las rectas de las reacciones de la Fig. 1). La actividad lipasa se ve favorecida a concentraciones finales, del detergente aniónico, cercanas a 0,4% (13,5 mM). En el eje de las ordenadas se expresa la actividad lipasa como velocidad de generación de color (abs 550 nm/min) y en el eje de las abscisas la concentración del detergente aniónico en la mezcla de reacción final. En la figura A, la concentración se expresa en % y en la figura B en mM.

35

Figura 5 Espectro de absorción de la reacción coloreada debida a la formación del complejo cromogénico (BN-FBBB). La absorbancia se ve favorecida a longitudes de onda cercanas entre 545 y 550 nm. En el eje de las ordenadas se expresa la absorbancia (unidades de Abs) y en el eje de las abscisas la longitud de onda (nm) a la cual es medida la absorbancia de la reacción coloreada.

40

Figura 6 Curva estándar de  $\beta$ -naftol (BN). Concentraciones conocidas de BN se agregaron a la mezcla de reacción final. Se mide la absorbancia a 550 nm y se construye la curva graficando concentración de BN contra Abs a 550 nm. Se hace una regresión y se obtiene la ecuación de la curva, cuya pendiente permite calcular la concentración de BN de una muestra desconocida. En el eje de las ordenadas se expresa la absorbancia a 550 nm y en el eje de las abscisas la concentración total de BN en la mezcla de reacción.

45

Figura 7 Ejemplo de la aplicación de la mezcla de reacción completa (MRC) y método cinético para medir la actividad lipasa. 187  $\mu$ L de la MRC se depositaron en los pocillos de una microplaca de poliestireno y se añadieron 5  $\mu$ L de la solución de lipasa a diferente concentración. La mezcla se dejó en agitación a 300 rpm a 25°C y se leyó la absorbancia a 550 nm cada 30 segundos. En el eje de las ordenadas se expresa la absorbancia a 550 nm y en el eje de las abscisas la concentración final de lipasa (mg) en la mezcla de reacción. En la figura A, actividad lipasa se expresa, en las ordenadas, como abs a 550 nm y en la figura B en micromoles de BN liberados.

50

### Descripción detallada de la invención

55

La presente invención presenta una solución al problema de la cuantificación espectrofotométrica de la actividad lipasa para métodos cinéticos que utilizan sustratos sintéticos derivados del naftol. Los inventores de la presente solicitud han elaborado una composición particular que comprende un detergente aniónico. El cual, sin inhibir la actividad enzimática, elimina la opacidad de las mezclas de reacción permitiendo la lectura espectrofotométrica en el rango visible (Fig. 7) al tiempo que favorece la interacción enzima-sustrato al aumentar la superficie de sustrato expuesta al enzima.

60

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es una composición para la medición cinética de la actividad enzimática lipasa que comprende:

65

- Un *reactivo A* emulsificante que comprende un detergente aniónico,
- Un *reactivo B* que comprende un sustrato lipasa sintético,

- Un reactivo C que comprende un reactivo cromogénico,

donde los reactivos A, B y C se mezclan inmediatamente antes de añadir el enzima.

5 Cada uno de los tres reactivos es esencial para llevar a cabo la medición cinética de la actividad enzimática.

El reactivo A comprende, de manera esencial para la invención, un detergente aniónico. Un detergente aniónico adecuado para la presente invención es aquel que presenta un elevado balance hidrófilo-lipófilo (HLB) debido a la presencia en su molécula de iones fuertemente hidrofílicos como el  $\text{COO}^-$  o el  $\text{SO}_3^-$ . El balance HLB preferido para la presente invención tiene un valor cercano a 40. Por lo tanto, el detergente aniónico comprendido en el reactivo A puede ser un alquil aril sulfonato, como el alquil benceno sulfonato lineal (LAS), el ácido sulfónico dodecil benzeno (DDBSA) o un dodecil sulfato como el dodecil sulfato sódico (SDS) o una mezcla de estos. Preferentemente, el detergente aniónico comprendido en el reactivo A es el dodecil sulfato de sodio (SDS).

15 El reactivo A comprende además otras sustancias que optimizan las superficies de contacto entre la enzima y el sustrato. Estas sustancias comprenden estabilizadores, emulsionantes, emulgentes, surfactantes y detergentes que pueden ser de naturaleza lipídica, proteica, alcohólica, sacarídica o mezclas de estas. Por lo tanto, preferentemente, el reactivo A comprende además una sal biliar como emulsionante. Una sal biliar es una molécula compuesta por sodio o potasio y un ácido biliar. Un ácido biliar adecuado para la sal biliar de la presente invención es el ácido cólico o un derivado de este como el ácido glicocólico, el ácido taurocólico, el ácido Taurodeoxicólico. Muy preferentemente, la sal biliar comprendida en el reactivo A es el Taurocolato de sodio.

La sal biliar y el detergente aniónico comprendidos en el reactivo A están diluidos en una solución tampón a pH básico, preferentemente pH 7,0-12,0. Esta solución tampón es una dilución de Tris-HCl que el experto en la materia sabe sustituir por cualquier otra solución tampón comúnmente usadas en el campo de la técnica.

Muy preferentemente la composición del reactivo A es: 9,3-13,5 mM Dodecil Sulfato Sódico (SDS); 0,5-20 mM Taurocolato de sodio; 0,5-135 mM Tris-HCl, pH 8.0.

30 El reactivo B de la composición de la presente invención comprende una disolución de un derivado del naftaleno en un solvente aprotico. Dicho derivado del naftaleno es un sustrato lipasa sintético como por ejemplo el  $\alpha$ -naftil caprilato o el  $\beta$ -naftil caprilato, que por hidrólisis enzimática de su enlace ester, libera el grupo naftol. Preferentemente, la disolución comprendida en el reactivo B es 34,5-38,4 mM  $\beta$ -naftil caprilato presolubilizado en DMSO. La figura 2 muestra la absorbancia de distintas concentraciones de BNC en el reactivo B durante la medición de la actividad lipasa a 550 nm. El reactivo B puede comprender alternativamente sustratos lipasa naturales, puros o no, tales como triglicéridos con grupos naftol. La composición de la presente invención es específica para medir la actividad lipasa, pero puede adaptarse fácilmente a la medición de la actividad esterasa simplemente mediante la sustitución del sustrato sintético preferido (ácidos grasos de 8 carbonos o más) por otro sustrato, sintético o natural, que comprenda un ácido graso con menos de 8 carbonos.

40 Una vez liberado el grupo naftol a la mezcla de reacción, queda libre para reaccionar en una reacción cromogénica con un compuesto azoico. Por lo tanto, otro componente esencial de la composición de la presente invención es un compuesto azoico comprendido en el reactivo C cromogénico. La figura 3 muestra la absorbancia de distintas concentraciones del reactivo C cromogénico durante la medición de la actividad lipasa, a 550 nm. Un compuesto cromogénico es aquel que tras una reacción química es capaz de absorber una determinada longitud de onda en el rango visible. Los compuestos azoicos donde el grupo azo está conjugado con dos anillos aromáticos, absorben radiación electromagnética en el espectro visible, por lo que presentan coloración. El experto en la materia sabe sustituir el reactivo C en función del sustrato elegido para obtener una reacción cromogénica. El experto ajusta entonces el rango de longitud de onda medido en el espectrofotómetro al rango de absorción del compuesto cromogénico. Preferentemente, la disolución comprendida en el reactivo C es 34,5-38,4 mM (por ej. FBBB) presolubilizado en DMSO.

La mezcla de reacción completa (MRC), que comprende los 3 reactivos A, B y C, se realiza justo antes de la adición de la enzima lipasa o del extracto donde se quiera evaluar o monitorizar la actividad lipasa. El experto en la materia sabe calcular los volúmenes de los reactivos A, B y C a añadir en función del volumen final deseado para cada muestra teniendo en cuenta que la mezcla de reacción completa (MRC: Reactivo A + Reactivo B + Reactivo C) de la presente invención comprende 9,3-13,5 mM SDS, 0,5-20 mM Taurocolato de Sodio, 0,9-1,03 mM BNC, 0,9-1,03 mM FBBB. Otro objeto de la presente invención es un método de medición de la actividad lipasa que comprende los pasos de:

- (a) mezcla de los reactivos A, B y C (MRC).
- (b) inicio de la reacción enzimática mediante la adición del enzima lipasa a la mezcla obtenida en (a), formando así la mezcla de reacción final.
- (c) determinación de la absorbancia en un rango entre 500-600 nm (preferentemente a 550 nm) en puntos de tiempo consecutivos.
- (d) Cálculo de la velocidad de reacción (formación de color en U Abs 550/min). Mediante la construcción de la recta ( $y = mx + b$ , donde m es la actividad lipasa expresada como velocidad de reacción en U Abs

550 nm/min. Se calcula la  $R^2$  para determinar la linealidad de la respuesta Abs/tiempo, considerándola aceptable, de forma arbitraria, con valor arriba de 0,98.

- (e) Cálculo de la cantidad de producto por unidad de tiempo (BN liberado por unidad de tiempo, mediante el uso de la curva estándar de la Fig. 6).

Donde la actividad lipasa se expresa en función de la cantidad de producto obtenido por unidad de tiempo.

El efecto del SDS en la mezcla de reacción es dual, por un lado afecta la actividad de la lipasa a determinadas concentraciones y por otro lado solubiliza los reactivos, de la MRC, a fin de facilitar la actividad lipasa y la clarificación y medición espectrofotométrica. La Figura 4 es una representación de como disminuye la actividad lipasa a concentraciones por debajo de 0,26% (9,3 mM) SDS y por encima de 0,4% (13,5 mM) SDS en la mezcla de reacción final. La concentración de la composición de la presente invención comprende el rango de 0,2 a 0,6% (6,9 a 20,8 mM) de SDS en la mezcla de reacción final. En virtud de la mínima diferencia en la actividad lipasa, expresada como velocidad inicial de reacción entre los tratamientos de 0,26% (9,3 mM) SDS ( $m= 0,3469$ ) y 0,4% (13,5 mM) SDS ( $m= 0,3185$ ), se propone usar la concentración de SDS al 0,4% (13,5 mM) en la mezcla de reacción final, a fin de favorecer la solubilización de los reactantes hidrofóbicos de la MRC).

Una realización preferida del método de la presente invención presenta una concentración final del detergente aniónico durante la reacción enzimática (b) de 13,5 mM (0,4%) SDS.

El método de medición de la actividad cinética de la presente invención comprende también el uso como estabilizante en el reactivo A de las propias sales biliares de la especie origen de la lipasa en estudio.

Las enzimas, fluidos y extractos con actividad lipasa deben conservarse a temperaturas bajo cero (congelación) a fin de mantener estable la actividad lipasa antes de la medición. Las enzimas deben estar clarificadas por centrifugación (10000 xg, 5 min) o por filtración (0.2 micras), para evitar interferencia espectrofotométrica. El pH óptimo para cada enzima puede variar, por lo que se puede usar el buffer al pH correspondiente en sustitución del Tris-HCl, 200 mM, pH 8. Algunas lipasas, pueden requerir la presencia de co-lipasas. Así mismo, algunas enzimas pueden requerir la presencia de iones divalentes en la MRC. En estos casos se pueden agregar al reactivo A. Si se trabaja a un pH diferente a valores entre pH 8 y 10, debe construirse una curva estándar de  $\beta$ -naftol al pH correspondiente.

Preferentemente la composición de los reactivos y concentración en la MRC y en la mezcla de reacción final se presenta en la tabla siguiente:

REACTIVOS	Peso Molecular	Conc. Reactivo (%), p/v	Conc. Reactivo (mM)	Conc. en MRC (mM)	Conc. final en reacción (MRC+lipasa) (mM)
<b>REACTIVO A</b>					
Detergente aniónico*	288,38	0,42	14,65	13,87	13,50
Taurocolato de sodio	537,7	0,03	0,55	0,52	0,50
Tris	121,14	1,71	141,24	133,69	130,21
<b>REACTIVO B</b>					
Sustrato**	270,37	1,04	38,47	1,03	1,00
<b>REACTIVO C</b>					
Reactivo Cromogénico***	415,94	1,60	38,47	1,03	1,00

\* Dodecyl sulfato de sodio, \*\*BNC, \*\*\*FBBB

Convenientemente, el método de la presente invención, puede llevarse a cabo tanto en volúmenes del rango de mililitros como del rango de microlitros lo cual permite además la lectura simultánea de múltiples pruebas, utilizando por ejemplo una microplaca de poliestireno de fondo plano.

Ejemplo 1

*Materiales y Métodos*

Dodecil sulfato de Sodio (SDS) (Sigma, No. Catálogo L-5750); Taurocolato sódico (Sigma, No. Catálogo T-4009-5G); Tris-HCl (Sigma-Aldrich, No. Catálogo Cat 25,285-9);  $\beta$ -naftil caprilato (Gold Biotechnology, No. Catálogo N-100-1); Fast Blue BB (Sigma, No. Catálogo F-3378); DMSO (Sigma-Aldich No. Catálogo 154938);  $\beta$ -naftol

(BN)(Sigma-Aldrich No. 185507), lipasa de *Candida rugosa* (SIGMA, No. Catálogo L-1754). Microplacas de poliestireno (Thermo Scientific, No. Catálogo 950227); espectrofotómetro (ThermoLabsystems, Multiskan EX Mod. No. 355).

5        Previamente a la adición de la lipasa, se preparó la mezcla de reacción completa (MRC) para 100 mediciones mediante la adición de 17.7 ml de reactivo A, 0,5 ml de reactivo B y 0,5 ml de reactivo C (volumen total de 18.7 ml) en agitación a 300 rpm. Posteriormente, se disolvió la lipasa en agua a una concentración de 20 mg/mL. De esta solución stock de lipasa se diluyó 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, en agua destilada.

10       Alícuotas de 187 uL de la MRC se depositaron en los pocillos de la microplaca de poliestireno y sobre ellos se añadieron 5 ul de la correspondiente solución estándar de BN (predisuelta en DMSO), de concentración conocida o de la dilución de lipasa correspondiente. La mezcla se dejó en agitación a 300 rpm a 25°C y se leyó la absorbancia de los pocillos a 550 nm cada 30 segundos. Con los valores de la absorbancia de las soluciones de BN de concentración conocida se halló la curva estándar (Fig. 6) mediante la cual se calcularon los moles de b-naftol liberados por minuto por acción de la lipasa. La figura 7 muestra los resultados del ensayo donde la actividad lipasa se expresó en U de lipasa, equivalentes a la liberación de 1  $\mu$ M de naftol por minuto.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

1. Composición para la medición cinética (MRC) de la actividad lipasa que comprende:

- Un reactivo A emulsificante que comprende un detergente aniónico,
- Un reactivo B que comprende un sustrato lipasa sintético,
- Un reactivo C que comprende un reactivo cromogénico,

donde los reactivos A, B y C se mezclan inmediatamente antes de añadir el enzima.

2. Composición según la reivindicación 1 donde el detergente aniónico del reactivo A se elige del grupo formado por el alquil benceno sulfonato linear (LAS), el ácido sulfónico dodecil benceno (DDBSA), el dodecil sulfato sódico (SDS) o mezclas de estos.

3. Composición según la reivindicación 1 o 2 donde el reactivo A comprende dodecil sulfato sódico (SDS).

4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 donde el reactivo A comprende además alguna sustancia del grupo formado por estabilizadores, emulsionantes, emulgentes, surfactantes, detergentes y mezclas de estos.

5. Composición según la reivindicación 4 donde la sustancia estabilizadora comprende una sal sódica o potásica de un ácido biliar a elegir de entre el ácido cólico, el ácido taurocólico, el ácido taurodeoxicólico y mezclas de estos.

6. Composición según la reivindicación 5 donde la sustancia estabilizadora es el taurocolato de sodio.

7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 donde el reactivo A está compuesto por:

9,3-13,5 mM Dodecil Sulfato Sódico

0,5-20 mM Taurocolato de sodio

0,5-135 mM Tris-HCl, pH 8.0.

8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 donde el reactivo B comprende una disolución de un derivado del naftaleno en un solvente aprotico.

9. Composición según la reivindicación 8 donde dicha disolución es 0,02-3,00 mM  $\beta$ -naftil caprilato en DMSO.

10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 donde el reactivo C comprende un compuesto azoico.

11. Composición según la reivindicación 10 donde dicho compuesto azoico es la 4-amino-2,5 diethoxybenzanilida (FBBB).

12. Composición según la reivindicación 1 que comprende:

0,2-0,6% (6.9- 20.8 mM) SDS,

0,5-20 mM Taurocolato de Sodio,

0,9-1 mM BNC,

0,9-1 mM FBBB.

en disolución acuosa a pH 7-12.

13. Método de medición de la actividad lipasa que comprende los pasos de:

- (a) mezcla de los reactivos A, B y C de la reivindicación 1
- (b) inicio de la reacción enzimática mediante la adición del enzima lipasa a la mezcla obtenida en (a)
- (c) determinación de la absorbancia en un rango entre 500-600 nm en puntos de tiempo consecutivos.

(d) Cálculo de la velocidad de reacción.

(e) Cálculo de la cantidad de producto por unidad de tiempo.

5 Donde la actividad lipasa se expresa en función de la cantidad de producto obtenido por unidad de tiempo.

10 14. Método según la reivindicación 10 donde la concentración final del detergente aniónico durante la reacción enzimática (b) es menor a 8% SDS (277.41 mM).

15 15. Kit para la medición cinética de la actividad lipasa en una muestra que comprende la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-12 e instrucciones de uso según el método de cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14.

20

25

30

35

40

45

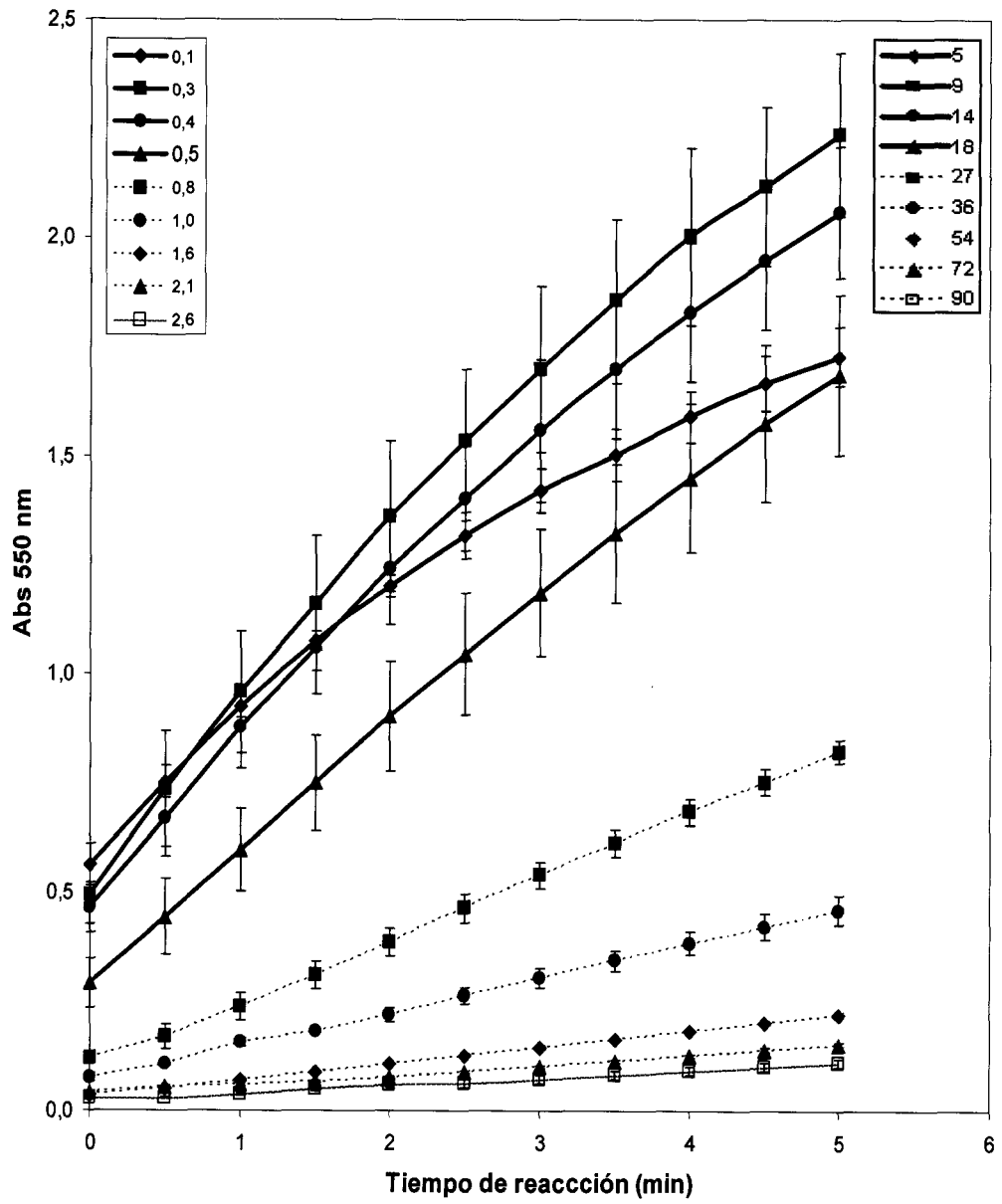
50

55

60

65





**Fig. 1**

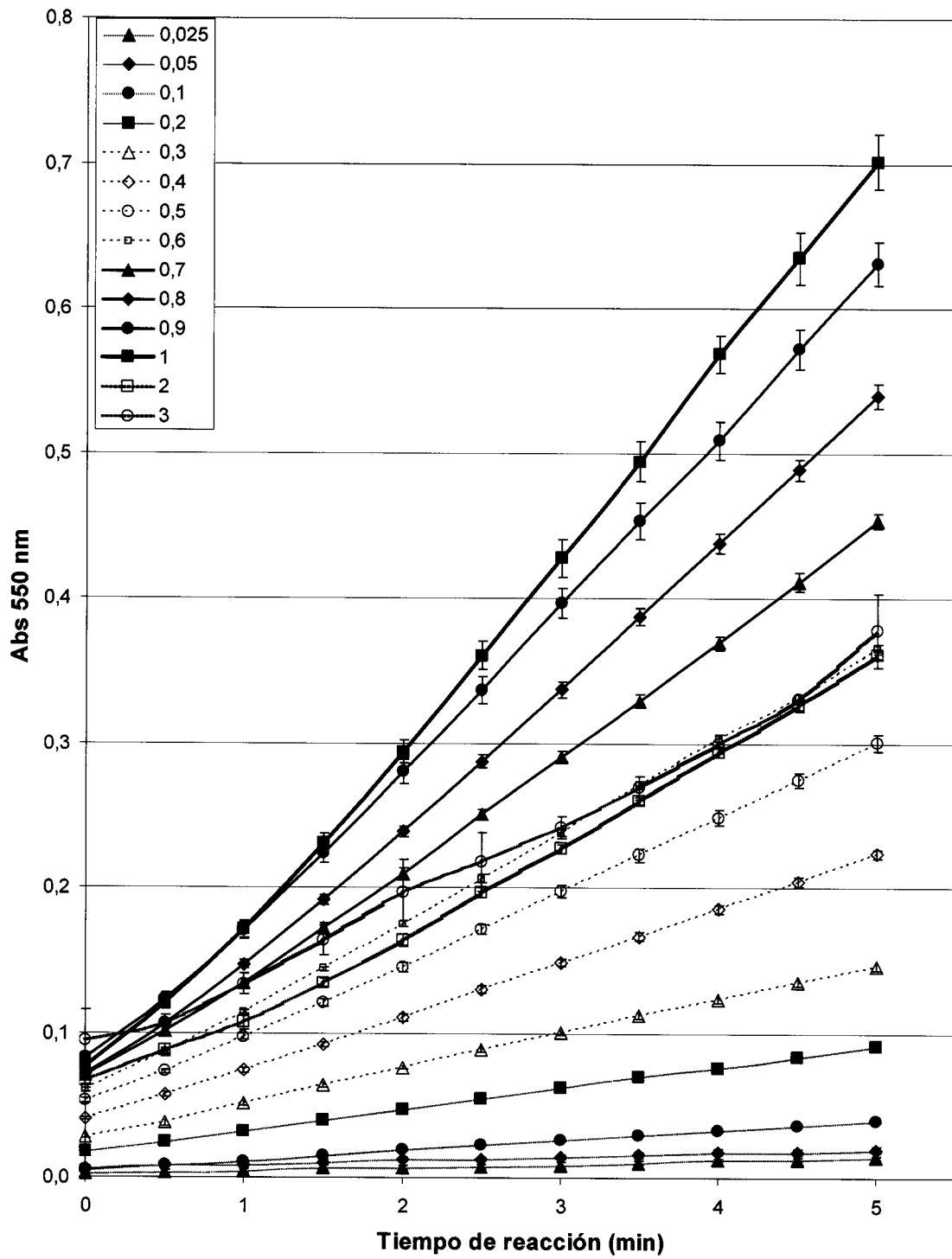


Fig. 2

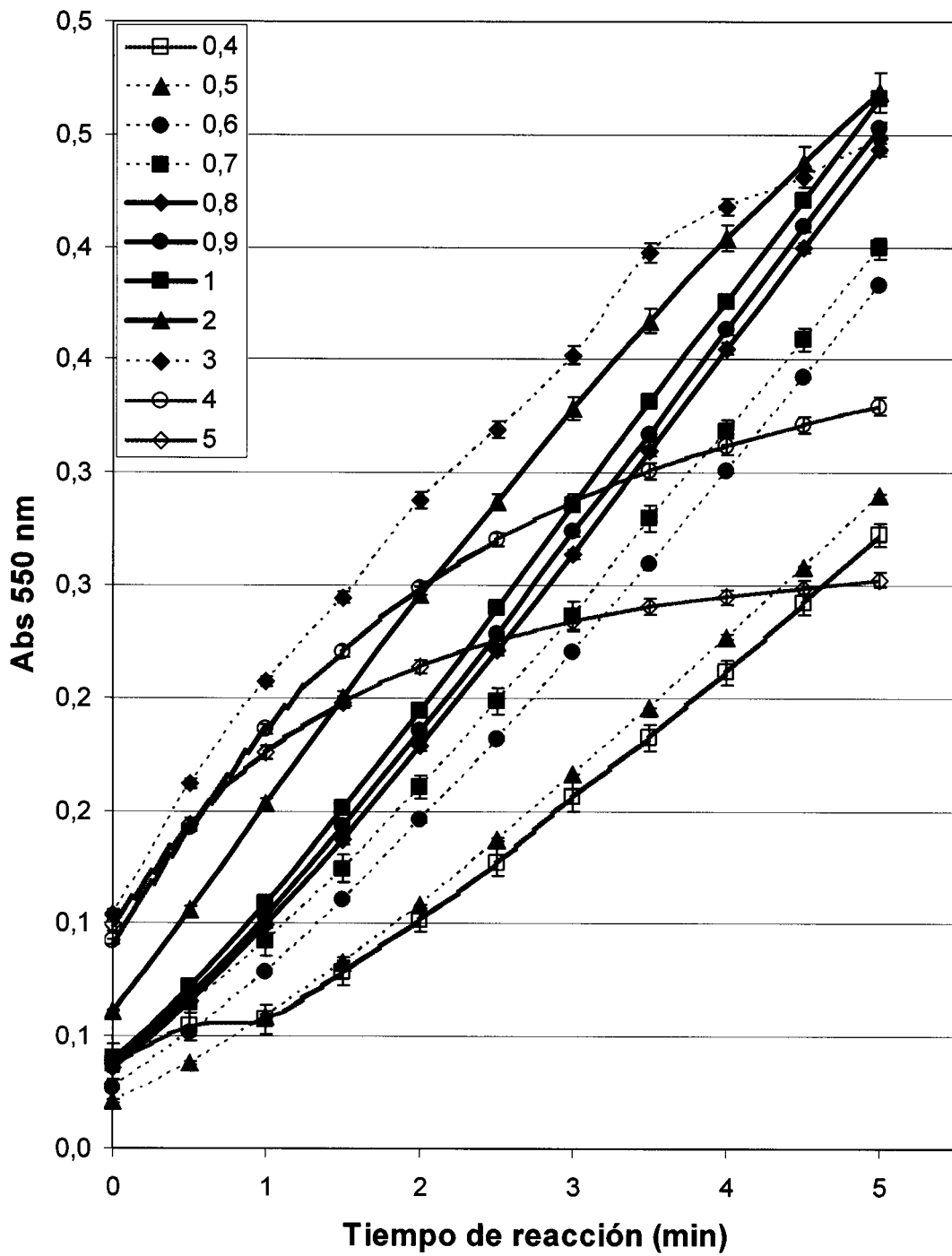
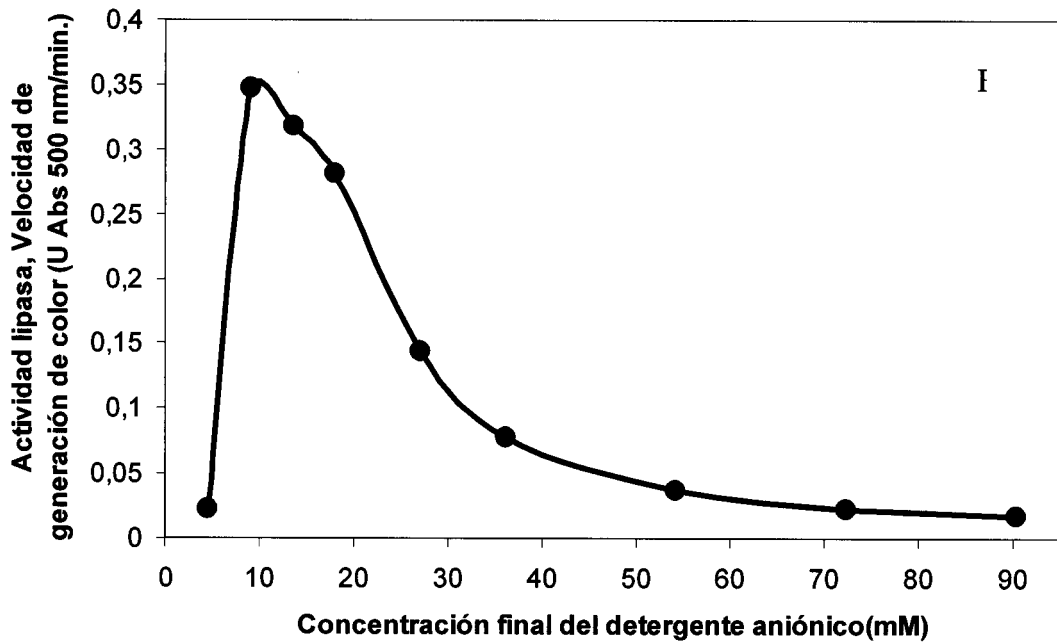
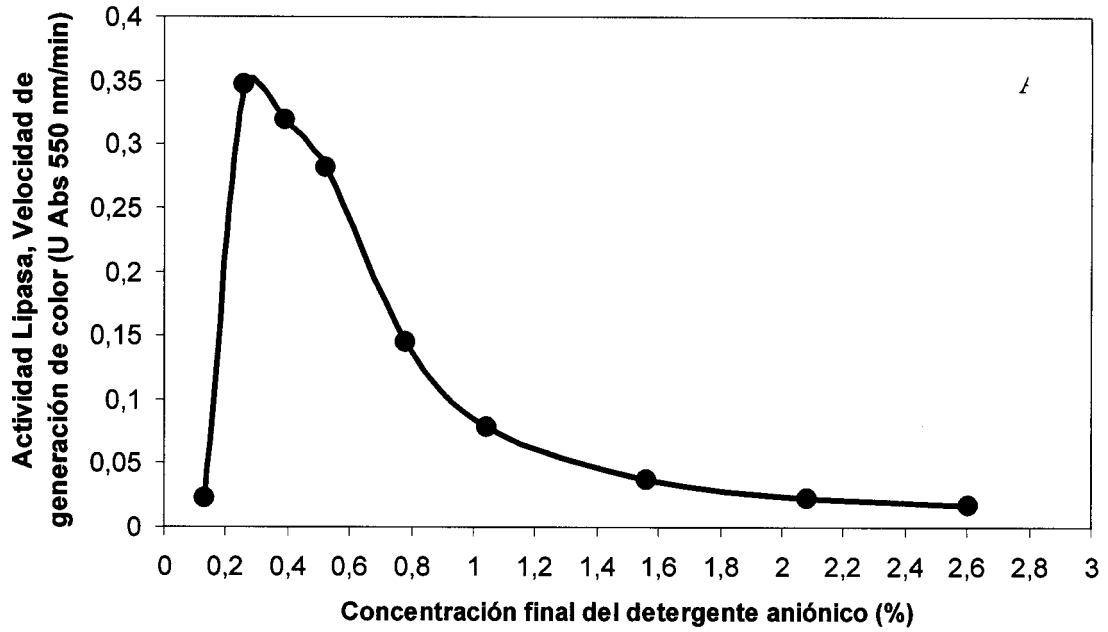
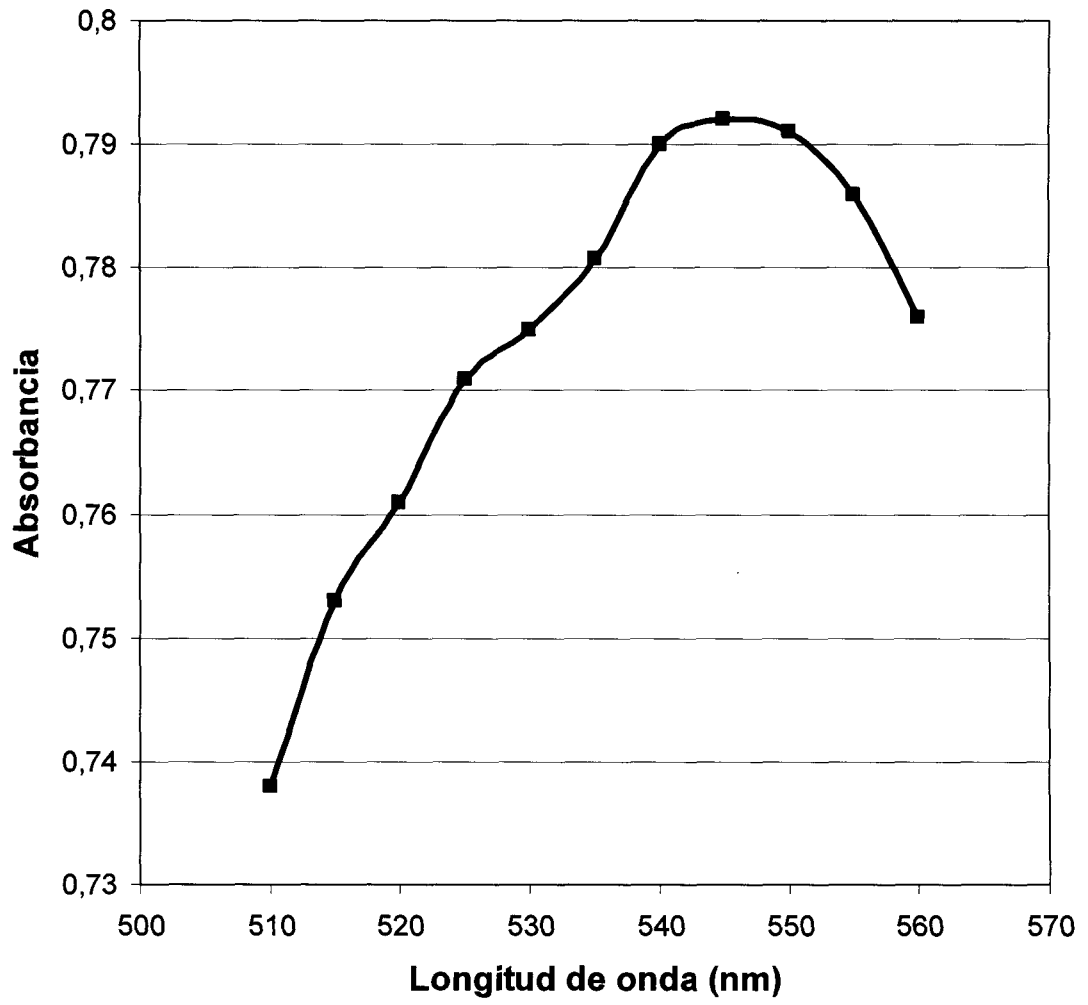


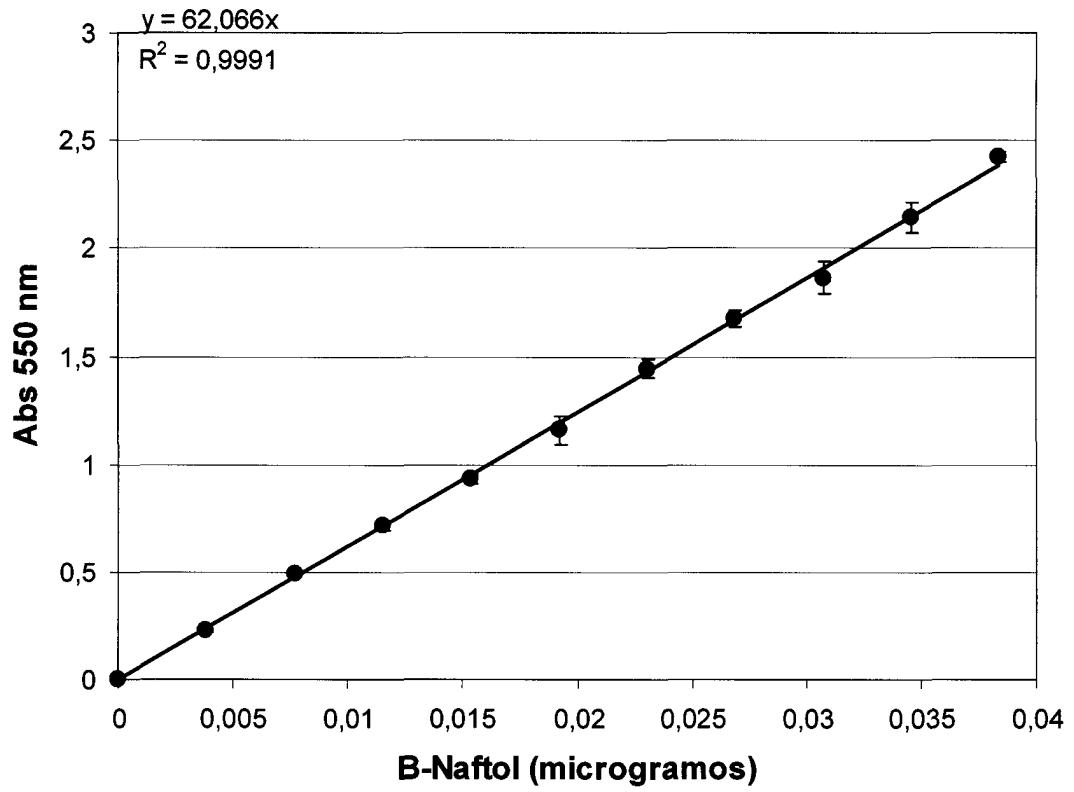
Fig. 3



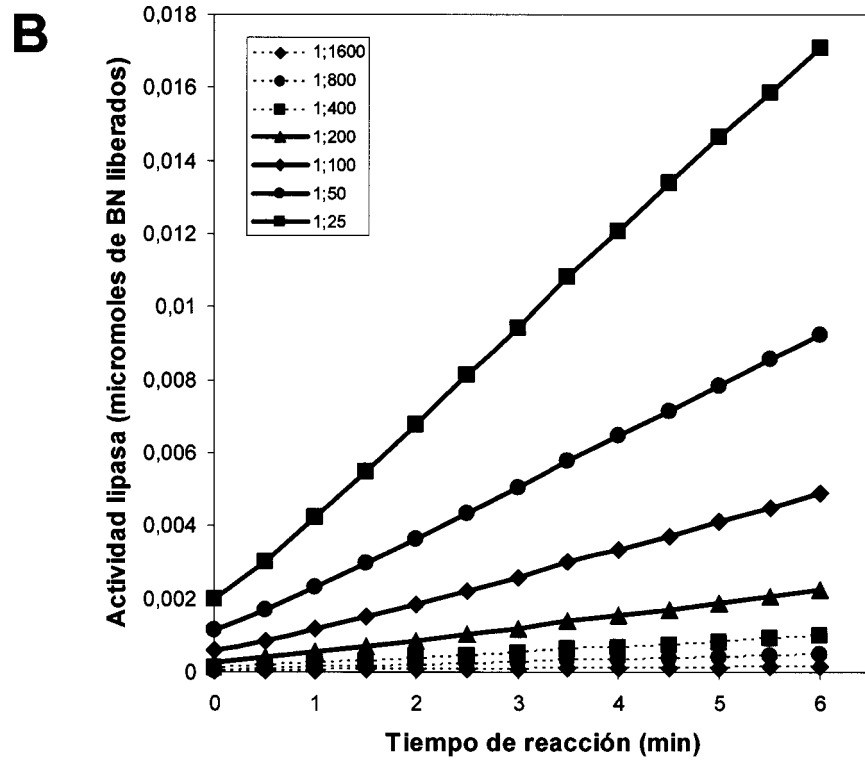
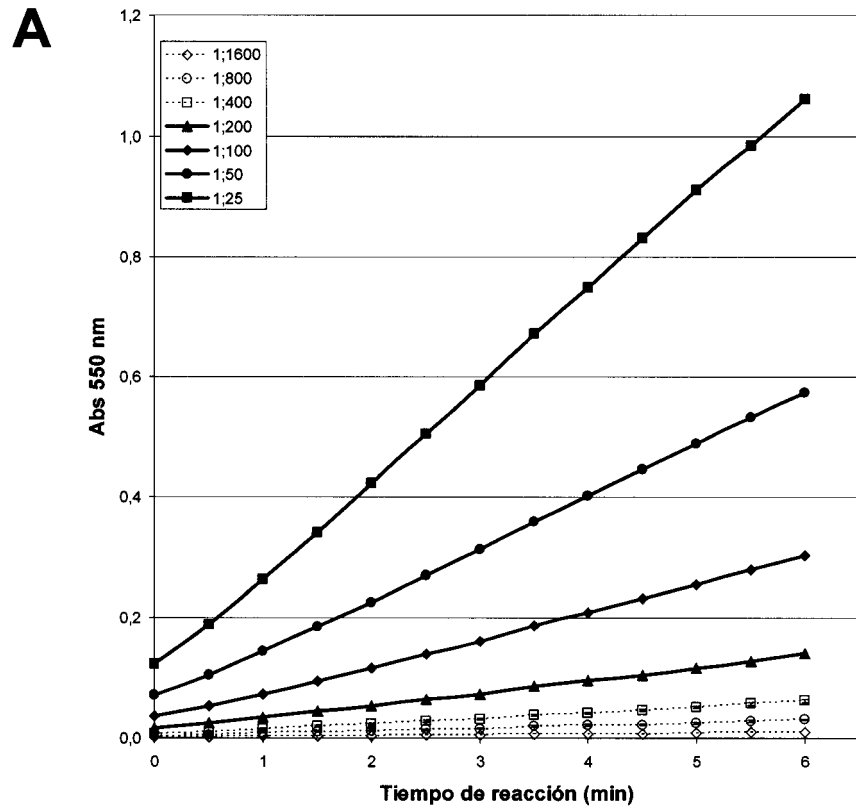
**Fig. 4.**



**Fig. 5**



**Fig. 6**



**Fig. 7**



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②<sup>1</sup> N.º solicitud: 200902117

②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 20.10.2009

③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: **C12Q1/34** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	McKELLAR R. C. et al. A rapid colorimetric assay for the extracelular lipase of <i>Pseudomonas fluorescens</i> B52 using $\beta$ -naphthyl caprylate. Journal of Dairy Research. 1986, Vol. 53, páginas 117-127, todo el documento.	1-15
A	PERERA E. et al. Polymorphism and partial characterization of digestive enzymes in the spiny lobster <i>Panulirus argus</i> . Comparative Biochemistry and Physiology, Part B. 28.03.2008, Vol. 150, páginas 247-254, todo el documento.	1-15
A	PERERA E. et al. Changes in digestive enzymes through developmental and molt stages in the spiny lobster, <i>Panulirus argus</i> . Comparative Biochemistry and Physiology, Part B. 16.07.2008, Vol. 151, páginas 250-256, todo el documento.	1-15
A	GILHAM D. et al. Techniques to measure lipase and esterase activity <i>in vitro</i> . Methods. 2005, Vol. 36, páginas 139-147, todo el documento.	1-15
A	KAMACHI S. et al. Spectrophotometric assay for lipase in serum using a chromogenic substrate, Orange I Laurate. Chem. Pharm. Bull. 1983, Vol. 31, N° 8, páginas 2732-2736, todo el documento.	1-15
A	MA J. et al. Overexpression and characterization of a lipase from <i>Bacillus subtilis</i> . Protein Expression and Purification. 01.07.2005, Vol. 45, páginas 22-29, todo el documento.	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

**Fecha de realización del informe**

31.03.2011

**Examinador**

M. Cumbreño Galindo

**Página**

1/5



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

C12Q

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.03.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-15	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-15	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión.-**

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

**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	McKELLAR R. C. et al. Journal of Dairy Research. Vol. 53, páginas 117-127.	1986
D02	PERERA E. et al. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B., Vol. 150, páginas 247-254.	28.03.2008
D03	PERERA E. et al. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B. Vol. 151, páginas 250-256.	16.07.2008
D04	GILHAM D. et al. Methods. Vol. 36, páginas 139-147.	2005
D05	KAMACHI S. et al. Pharm. Bull. Vol. 31, Nº 8, páginas 2732-2736.	1983
D06	MA J. et al. Protein Expression and Purification. Vol. 45, páginas 22-29.	01.07.2005

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

La presente invención tiene por objeto una composición para la medición cinética de la actividad lipasa que comprende: un reactivo A emulsificante que comprende un detergente aniónico; un reactivo B que comprende un sustrato lipasa sintético y un reactivo C que comprende un reactivo cromogénico donde los reactivos A, B y C se mezclan inmediatamente antes de añadir el enzima (reivindicación 1). El reactivo A comprende dodecil sulfato sódico (SDS), taurocolato de sodio y Tris-HCl; el reactivo B comprende  $\beta$ -naftil caprilato y el reactivo C comprende FBBB (reivindicaciones de la 2 a la 12). También tiene por objeto un método de medición de la actividad lipasa utilizando la composición mencionada (reivindicaciones 13 y 14) y el kit que comprende dicha composición (reivindicación 15).

D01 describe un ensayo para determinar la actividad de la lipasa extracelular de *Pseudomonas fluorescens* B52 utilizando  $\beta$ -naftil caprilato como sustrato. La mezcla de reacción contiene  $\beta$ -naftil caprilato, TES, taurocolato de sodio y la propia enzima a ensayar. Como reactivo cromogénico se utiliza Fast Blue BB y la absorbancia se mide a 540 nm. Además, se comprueba el efecto inhibitor que ejercen varias concentraciones de dos detergentes en la actividad lipasa: Cetrimida, detergente catiónico, y Tritón X-100, el cual es un detergente no-iónico.

D02 identifica las principales enzimas digestivas de *Panulirus argus* y, en el caso de la actividad lipasa, esta es medida utilizando  $\beta$ -naftil caprilato. La mezcla de reacción contiene: 10  $\mu$ l de  $\beta$ -naftil caprilato 100 mM, 100  $\mu$ l de taurocolato de sodio 100 mM, 900  $\mu$ l de Tris-HCl 50 mM y 10  $\mu$ l del extracto de la enzima. Esta mezcla es incubada 30 minutos a 37 °C tras lo cual se añade el reactivo cromogénico Fast Blue BB. La absorbancia es registrada a 510 nm.

D03 examina las variaciones que se producen en las principales enzimas digestivas en las diferentes fases del desarrollo de *Panulirus argus*. Para analizar la actividad lipasa, se utiliza  $\beta$ -naftil caprilato. La mezcla de reacción contiene: 10  $\mu$ l de  $\beta$ -naftil caprilato 100 mM, 100  $\mu$ l de taurocolato de sodio 100 mM, 900  $\mu$ l de Tris-HCl 50 mM y 10  $\mu$ l del extracto de la enzima. Esta mezcla es incubada 30 minutos a 37 °C tras lo cual se añade el reactivo cromogénico Fast Blue BB. La absorbancia es registrada a 510 nm.

D04 revisa los métodos desarrollados para llevar a cabo el análisis de la actividad de lipasas y esterases *in vitro* como son los ensayos cromogénicos, la cuantificación de los ácidos grasos liberados o las técnicas cromatográficas. Entre los primeros, por ejemplo, se utilizan soluciones de naftil ésteres como sustratos, junto con Tris-HCl, goma arábiga y dioctil sulfosuccinato.

D05 describe un método para analizar lipasa en suero utilizando Orange I Laurate como sustrato cromogénico. La mezcla de reacción contiene, además del sustrato cromogénico, dodecil sulfato sódico y colato de sodio. Después se añade el suero y se determina la absorbancia a 475 nm. El dodecil sulfato sódico es un activador de lipasas e inhibidor de esterases; el colato sódico es emulsificante, activador de lipasas e inhibidor de esterases.

D06 caracteriza una lipasa de *Bacillus subtilis* A.S.1.1655 determinando cuáles son sus condiciones óptimas de reacción, especificidad de sustrato y el efecto de los iones metálicos y el taurocolato de sodio. Su actividad se determina midiendo la cantidad de p-nitrofenol liberado a partir de p-nitrofenil caprilato a 420 nm. Para ello se mezcla p-nitrofenil caprilato a una concentración final en la mezcla de reacción de 0.2 mM junto con tris-HCl 50 mM y la enzima.

## NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA

En la literatura consultada, constituida por documentos de patentes y por publicaciones científicas, se ha encontrado que para llevar a cabo la medición cinética de la actividad lipasa es conocido en el estado de la técnica el empleo en la mezcla de reacción de  $\beta$ -naftil caprilato como sustrato sintético junto con taurocolato de sodio como emulsificante, Tris-HCl y el reactivo cromogénico Fast Blue BB.

Sin embargo, aunque sí se anticipa en los documentos citados el uso de detergentes en la mezcla de reacción para determinar la actividad lipasa y, en concreto, se menciona la utilización del dodecil sulfato sódico como activador de lipasas e inhibidor de esterasas, en la documentación y bases de datos consultadas no se ha encontrado una composición para la medición cinética de la actividad lipasa que comprenda los mismos reactivos que la que es objeto de la presente solicitud incluyendo tal detergente aniónico y, más específicamente, dodecil sulfato sódico.

Por consiguiente, las reivindicaciones de la 1 a la 15 cumplen con los requisitos de novedad y actividad inventiva.