



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 303 760**

② Número de solicitud: 200600873

⑤ Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12N 9/50 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **24.03.2006**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2008**

Fecha de la concesión: **21.07.2009**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **11.09.2009**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
11.09.2009

⑰ Titular/es:

**Universidade de Santiago de Compostela
Edificio CACTUS-Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

⑱ Inventor/es: **Ageitos Martínez, José Manuel;
Vallejo Vidal, Juan Andrés;
Poza Domínguez, Margarita y
González Villa, Tomás**

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Método analítico para la medida de la actividad κ -caseinolítica de enzimas.**

㉒ Resumen:

Método analítico para la medida de la actividad κ -caseinolítica de enzimas de interés en la industria quesera y en la investigación biológica. Se basa en la medición de la cantidad de κ -caseína degradada, marcada con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína. El método comprende las siguientes etapas: 1) Elaboración del sustrato, FTC- κ -caseína, por unión de isotiocianato de fluoresceína a κ -caseína. 2) Incubación de una muestra enzimática en presencia de FTC- κ -caseína con el tampón adecuado para la enzima. 3) La reacción se detiene por adición de tricloroacético (TCA). 4) La fluorescencia emitida se obtiene midiendo una alícuota del producto de la reacción empleando un fluorímetro. 5) Los valores de actividad se extraen a partir de la ecuación de una recta patrón que relaciona la fluorescencia con la cantidad de κ -caseína degradada.

ES 2 303 760 B1

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

DESCRIPCIÓN

Método analítico para la medida de la actividad κ -caseinolítica de enzimas.

5 El método permite detectar y cuantificar la actividad κ -caseinolítica de enzimas de interés en la industria quesera y en la investigación biológica. Las enzimas que producen la coagulación de la leche y que, por tanto, permiten obtener masas queseras, son aquellas proteasas que actúan sobre la κ -caseína de la leche. El método se basa en la medición de la cantidad de κ -caseína degradada. La κ -caseína es marcada con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína. El método es preciso y permite determinar el grado de purificación de las proteasas a partir de mezclas enzimáticas de origen animal, vegetal, microbiano y recombinante. Debido a su sensibilidad es útil para la caracterización y purificación de enzimas con capacidad κ -caseinolítica.

Estado de la técnica

15 Las caseínas constituyen una familia de fosfoproteínas (α_1 , α_2 , β , κ) que forman casi el 80% de las proteínas de la leche bovina (Lucey *et al.*, 2003, *J. Dairy Sci.* 86:2725-2743). Son proteínas que se encuentran en la leche formando micelas solubles. La solubilidad de las micelas se debe a las moléculas de κ -caseína, que recubren y estabilizan la estructura.

20 Básicamente, existen tres modelos que intentan explicar la disposición espacial de las caseínas en las micelas (Dalglish, 1998, *J Dairy Sci.* 81:3013-3018). Uno de ellos propone que el núcleo de las micelas está compuesto por multitud de submicelas y que la periferia consiste en microvellosidades de κ -caseína (Walstra, 1970, *J. Dairy Res.* 46:317-322; Lucey, 2002, *J. Dairy Sci.* 85:281-294). Otro de los modelos sugiere que el núcleo está formado por fibras de caseína interconexionadas (Holtz, 1992, *Adv. Protein Chem.* 43:51-63). Finalmente, el modelo más reciente (Home, 1998, *Internat. Dairy J.* 8:171-177), propone una doble conexión entre las caseínas que hace que las micelas sean estables. Los tres modelos consideran las micelas de la leche como partículas coloidales formadas por agregados y recubiertas por las moléculas solubles de κ -caseína.

30 El proceso de coagulación de la leche consiste principalmente en tres fases (Carlson, *et al.*, 1987, *Biotechnol. Bioeng.* 29:582-589): i) la degradación enzimática de la κ -caseína, ii) la floculación de las micelas, y iii) la formación del gel. Cada una de las fases sigue una cinética diferente, siendo la degradación de la κ -caseína la fase limitante en el proceso de coagulación de la leche. El proceso entero está influenciado por factores físico-químicos, tales como el pH o la temperatura (Esteves *et al.*, 2003, *J. Dairy Sci.* 86:2558-2567; Vasbinder *et al.*, 2003, *J. Dairy Sci.* 86:1556-1563).

35 Las proteasas coagulantes de la leche actúan sobre la porción soluble de las micelas, la κ -caseína, produciendo una estructura inestable que origina la formación de una masa quesera (Vasbinder *et al.*, 2003, *J. Dairy Sci.* 86:1556-1563). La quimosina (E.C. 3.4.23.4) es una proteasa aspártica que hidroliza el puente proteico fenilalanina₁₀₅ - metionina₁₀₆ de la κ -caseína y está considerada como la proteasa más eficiente en la industria quesera (Rao *et al.*, 1998, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:597-635). Sin embargo, existen otras proteasas capaces de desencadenar la coagulación de la leche, rompiendo otro tipo de enlaces diferentes de la κ -caseína (Lucey, 2002, *op. cited*; Esteves, 2003, *op. cited*). Este efecto permite la obtención de quesos con una gran variedad de propiedades reológicas y organolépticas.

45 El método convencional para cuantificar una enzima coagulante de leche (Poza *et al.*, 2003, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30:691-698) utiliza leche como sustrato, y determina el tiempo transcurrido hasta que aparece el coágulo lácteo. Sin embargo, como la coagulación de la leche puede verse influida por variaciones físico-químicas (Lucey, 2002, *op. cited*; Lucey, 2003, *op. cited*; Vasbinder, 2003, *op. cited*), puede llegar a ocurrir sin la participación de ningún enzima. Como consecuencia, se pueden obtener resultados confusos e irreproducibles, particularmente cuando se trabaja con enzimas con poca actividad. Por otra parte, la medición del tiempo de coagulación no es suficientemente precisa, dado que el momento exacto de la formación del coágulo lácteo es difícil de observar y es subjetivo, lo cual dificulta una determinación precisa de las unidades enzimáticas.

55 Además, aunque está descrito que la hidrólisis de la κ -caseína sigue una cinética clásica de Michaelis-Menten (Carlson, *et al.*, 1987, *Biotechnol. Bioeng.* 29:582-589), es difícil de determinar midiendo el tiempo de la coagulación. Cuando se trabaja con enzimas poco activas, el tiempo que tarda en formarse el coágulo se puede alargar durante horas, siendo posible que tenga lugar una coagulación espontánea de la leche por aumento de la temperatura o por bajada del pH.

60 Para solucionar estos problemas y mejorar el estudio del proceso, se han propuesto diversos métodos: la determinación del diámetro de halos en placas de agar-leche (Poza, *op. cited*); la determinación colorimétrica (Hull, 1947, *J. Dairy Sci.* 30:881-884); y la determinación de la degradación de la caseína marcada previamente con un marcador radioactivo (Christen, 1987, *J. Dairy Sci.* 70:1807-1814), o con un compuesto fluorocrómico (Twining, 1984, *Anal. Biochem.* 143:30-34). Todos estos métodos utilizan caseína como sustrato para detectar la actividad proteolítica y, en algunos casos, la actividad coagulante.

65 El isotiocianato de fluoresceína (FITC) es una sustancia fluorescente, que se une a grupos amino, utilizada para el marcaje de proteínas (Schreiber, A.B., y Haimovich, J., 1983, *Methods Enzymol.*, 93:147-155). El grupo isotiocianato reacciona con los grupos amino terminal y las aminas primarias de la proteína, formando un derivado tiocarbamoil, tiocarbamoil de fluoresceína (FTC) (Twining, 1984, *op. cited*) que queda unido a la proteína.

Descripción de la invención

La característica novedosa esencial del método propuesto, consiste en la sustitución de la caseína como sustrato por otro sustrato más específico, la κ -caseína, marcado con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC). El cambio de sustrato permite la cuantificación de las moléculas de κ -caseína degradadas de un modo preciso y específico, detectando aquellos enzimas que son capaces de actuar sobre el sustrato formado FTC- κ -caseína.

El método analítico para la medida de la actividad κ -caseinolítica de enzimas comprende las siguientes etapas:

a) Elaboración del sustrato: Se incuba κ -caseína en tampón carbonato y NaCl a pH 9.5, con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC), durante una hora en agitación. El sustrato resultante, FTC- κ -caseína, se dializa varias veces frente a carbón activo, tampón Tris-HCl, pH 8.5 y frente a Tris-HCl, pH 7.5. Por último, el sustrato, FTC- κ -caseína, se congela a -20°C en alícuotas de 1 mL.

b) Preparación de la mezcla de reacción: Se incuba la muestra enzimática, en presencia de FTC- κ -caseína con el tampón adecuado para la muestra. Se deja reaccionar en agitación a la temperatura óptima de la enzima. Se detiene la reacción por adición de ácido tricloroacético (TCA) frío y en agitación. Mediante centrifugación, se eliminan las proteínas precipitadas y se guarda el sobrenadante.

c) Medición de la fluorescencia: Se diluye parte del sobrenadante con tampón Tris-HCl, pH 8.5. La cantidad de fluorocromo liberado se mide empleando un fluorímetro robotizado. Se realizan controles negativos sustituyendo la enzima por el tampón; el valor basal de fluorescencia obtenido se resta al obtenido tras la reacción.

d) Construcción de una recta patrón: Se incuban cantidades crecientes del sustrato, FTC- κ -caseína, con una proteasa un tiempo suficiente hasta la completa degradación del sustrato de origen. Así, se obtiene la relación entre la fluorescencia y la cantidad de FTC- κ -caseína degradada.

Se define la unidad enzimática como la cantidad de enzima necesaria para degradar 1 μ g de FTC- κ -caseína en 1 h a 37°C.

e) Interpolación de los datos: A partir de la recta patrón obtenida, se deducen los datos de actividad de la proteasa, a través de la cantidad de fluorescencia emitida.

A continuación se ilustra más ampliamente la invención mediante ejemplos no limitativos:

Ejemplo 1*Preparación del sustrato FTC- κ -caseína*

Para la preparación del sustrato del presente método, 1 g de κ -caseína se disolvió en 100 mL de tampón carbonato 50 mM, pH 9.5 y NaCl 150 mM. Posteriormente, se añadieron 40 mg de isotiocianato de fluoresceína (FITC). La mezcla se agitó suavemente durante una hora a temperatura ambiente. Durante esta hora tiene lugar la unión del tiocarbamoilo de fluoresceína (FTC), derivado de FITC, y las moléculas de κ -caseína. El FITC no unido se eliminó dializando la muestra frente a 1% de carbón activo en 2 L de agua a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, se dializó frente a tampón 50 mM Tris-HCl, pH 8.5 durante toda una noche, seguido de una diálisis frente a tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7.5. La concentración de proteína en la muestra obtenida fue ajustada al 0.5% con tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7.5. El sustrato fue conservado a -20°C en alícuotas de 1 mL. La cantidad de FITC unido a la κ -caseína fue de 14.12 μ g por mg de sólido. Esta determinación se obtuvo comparando el sustrato con un sustrato comercial de FTC-caseína.

Ejemplo 2*Mezcla de reacción*

La mezcla de reacción consistió en 10 μ L de la muestra enzimática, 20 μ L de tampón adecuado para cada enzima y 20 μ L de sustrato de FTC- κ -caseína. La reacción se llevó a cabo en tubos cubiertos de 1,5 mL en condiciones de agitación (180 rpm) a la temperatura óptima de la enzima y un tiempo variable, según las condiciones del experimento. En el caso de las enzimas utilizadas en los ejemplos posteriores (Ejemplos 4 a 7) fueron estas condiciones; 37°C durante un tiempo que varió entre 15 y 180 min, dependiendo del tipo de ensayo. La reacción se detuvo mediante la adición de 120 μ L de ácido tricloroacético (TCA) frío al 5% y agitando fuertemente los tubos. La mezcla se dejó reposar como mínimo 1 hora a temperatura ambiente. Las proteínas insolubilizadas por el TCA se precipitaron mediante centrifugación durante 5 min a 14,000 rpm. Una alícuota de 60 μ L de sobrenadante se diluyó con 400 μ L de tampón 0.50 M Tris-HCl, pH 8,5.

ES 2 303 760 B1

Ejemplo 3

Medición de la fluorescencia

5 Los valores de fluorescencia se obtuvieron mediante la medición de 350 μL de las muestras obtenidas empleando placas de 96 pocillos especiales para la medición por fluorescencias empleando un fluorímetro robotizado con una apertura de 2.5 y unas longitudes de onda de excitación y emisión de 490 y 525 nm, respectivamente.

10 Los niveles de fluorescencia basales fueron sustraídos de los valores de las mediciones para determinar la cantidad de fluorocromo liberado. Se realizaron controles negativos sustituyendo la enzima por el tampón empleado en la reacción.

Ejemplo 4

15 *Diseño de la recta patrón*

Se realizó una recta patrón que relacionó la cantidad de fluorescencia con la cantidad de FTC- κ -caseína degradada. Esto se consiguió incubando concentraciones crecientes del sustrato (de 0 mg/mL a 43 mg/mL de FTC- κ -caseína) en presencia de tripsina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) hasta conseguir la degradación completa. Esto permitió obtener la relación entre la fluorescencia y la cantidad de FTC- κ -caseína degradada.

20 Se definió la unidad enzimática como la cantidad de enzima necesaria para degradar 1 pg de FTC- κ -caseína en 1 h a 37°C.

Ejemplo 5

30 *Estudio comparativo de la acción de la tripsina y de la enzima coagulante de la leche de R. miehei sobre los sustratos FTC- κ -caseína y FTC-caseína*

Se llevó a cabo una recta patrón de FTC-caseína degradada del mismo modo descrito en el ejemplo 4. Con estos valores y los obtenidos en el ejemplo 4 se llevó a cabo una recta patrón que relacionó la cantidad de FTC- κ -caseína y FTC-caseína degradadas (Tabla 1).

35 Se realizaron mediciones con el sustrato comercial FTC-caseína y con el sustrato FTC- κ -caseína del modo descrito en los ejemplos 2 y 3.

40 Se incubó 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tripsina en presencia de los dos sustratos. Los valores obtenidos en el experimento, tal como era de suponer, fueron muy similares, no encontrándose diferencias significativas con un α de 0,05% (Tabla 1).

45 Se incubaron 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la proteasa coagulante de leche procedente de *R. miehei*, que sólo actúa sobre la κ -caseína, en presencia de los dos sustratos. Se obtuvieron valores de actividad 2.65 veces más elevados empleando el método aquí propuesto y empleando FTC- κ -caseína como sustrato que cuando se empleó FTC-caseína como sustrato, tal como se puede observar en la Tabla 1.

TABLA 1

50 *Valores de actividad enzimática de la tripsina y de la enzima prodecente de R. miehei, usando como sustratos FTC-caseína o FTC- κ -caseína*

Muestra enzimática (Dilución)	FTC-caseína	FTC- κ -caseína
Tripsina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	28.28 ¹	28.22
Enzima de <i>R. miehei</i> (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	4.69 ¹	12.41

60 ¹Valores convertidos según la ecuación $Y = 3,6949X$ donde X se refiere a las unidades de FTC-caseína/mL e Y se refiere a las unidades de FTC- κ -caseína/mL. ($R^2 = 0.9981$).

65

ES 2 303 760 B1

Ejemplo 6

Determinación de la actividad enzimática, actividad específica y parámetros cinéticos ($V_{\text{máx}}$ y K_m) de muestras enzimáticas de uso industrial

Se incubaron las siguientes muestras enzimáticas del modo descrito en los ejemplos anteriores.

La proteasa comercial producida por *R. miehei* (13 $\mu\text{g/mL}$), la quimosina obtenida a partir de un cuajar de búfalo lactante (164 $\mu\text{g/mL}$), la proteasa procedente de una infusión de flores de *Cynara cardunculus* (13 $\mu\text{g/mL}$) y la quimosina comercial recombinante producida por *Escherichia coli* (5 $\mu\text{g/mL}$).

Las diluciones de las muestras fueron incubadas frente a concentraciones crecientes de sustrato FTC- κ -caseína (de 0 a 1,47 mg/mL) y las mezclas se incubaron durante 1 h a 37°C. Se midió la actividad y la cantidad de proteína del modo anteriormente descrito. Con estos valores se realizó la gráfica de Michaelis-Menten (Figura 1) y la representación de Lineweaver-Burk (Figura 2), lo cual permitió la obtención de los valores de K_m y $V_{\text{máx}}$ de dichas enzimas (Tabla 2).

TABLA 2

Valores de unidades enzimáticas, actividad específica, concentración de proteína y $V_{\text{máx}}$ y K_m de todas las muestras enzimáticas probadas. Las reacciones se llevaron a cabo a 37°C durante 1 h

Muestra enzimática	$V_{\text{máx}}$	K_m	U/mL	mg proteína/mL	U/mg proteína
<i>B. arnee bubalis</i>	22.124	2.108	10.243	0.164	62.46
<i>C. cardunculus</i>	3.912	0.225	3.841	0.013	295.48
<i>R. miehei</i>	16.611	0.714	14.139	0.013	1,087.63
Quimosina recombinante	0.328	2.280	1.492	0.005	331.66

Ejemplo 7

Estudio de la linealidad y el límite de detección del método

Con el objetivo de observar la linealidad de la degradación de FTC- κ -caseína, la reacción se prolongó en el tiempo. Las muestras enzimáticas consistieron en dos diluciones de la enzima coagulante procedente de *R. miehei* (7 y 13 $\mu\text{g/mL}$) y el sustrato fue FTC- κ -caseína, preparado del modo descrito en los ejemplos anteriores.

Las reacciones se incubaron durante un tiempo variable, desde 5 minutos hasta 3 horas y se realizaron por triplicado (Figura 3).

Con el objeto de observar linealidad en la degradación de κ -caseína cuando la reacción tiene lugar empleando distintas concentraciones de enzima, se realizaron ensayos del mismo modo descrito en ejemplos anteriores, donde las reacciones fueron incubadas durante 1 h y se varió la concentración de la muestra enzimática (de 44 a 440 $\mu\text{g/mL}$) procedente de *R. miehei* (Figura 4).

Tal como se puede observar en las figuras 3 y 4, los resultados originaron una representación lineal en ambos casos. De la figura 3 se extrajo el dato de que el método detecta cantidades mínimas de enzima (tales como 2,6 ng en reacción). Esto lo hace ideal para ser empleado durante la purificación de enzimas; aunque se tenga poca actividad o poca cantidad de enzima, el método permite detectar la enzima.

El método analítico para la medida de la actividad κ -caseinólítica de enzimas detecta actividad sobre la κ -caseína en cantidades que no consiguen originar la coagulación de la leche sin que pueda intervenir factores fisicoquímicos, tales como el pH y la temperatura.

ES 2 303 760 B1

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática de las muestras procedentes de: quimosina recombinante (■), *R. miehei* (○), *B. arnee bubalis* (▲) y *C. cardunculus* (◇). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media.

Figura 2. Representación de Lineweaver-Burk de la actividad enzimática de las muestras procedentes de: quimosina recombinante ($y = 0.072x + 0.629$; $R^2 = 0.995$) (■), *R. miehei* ($y = 0.041x + 0.087$; $R^2 = 0.996$) (○), *B. arnee bubalis* ($y = 0.095x + 0.045$; $R^2 = 0.997$) (▲) y *C. cardunculus* ($y = 0.058x + 0.256$; $R^2 = 0.993$) (◇).

Figura 3. Efecto del tiempo de incubación y el valor de dilución sobre la actividad enzimática de la proteasa procedente de *R. miehei*. Factor de dilución 1/1,000 ($Y = 0.071X + 0.574$; $R^2 = 0.995$) (□) y factor de dilución 1/10,000 ($Y = 0.020X - 0.431$; $R^2 = 0.995$) (■). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media.

Figura 4. Actividad específica de la proteasa procedente de *R. miehei*. ($Y = 46.093X + 4.497$; $R^2 = 0.984$) (□). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 303 760 B1

REIVINDICACIONES

1. Método analítico para la medida de la actividad κ -caseinolítica de enzimas, que comprende las siguientes etapas:

5 a) Elaboración del sustrato: Se incuba κ -caseína en tampón carbonato y NaCl a pH 9.5, con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC), durante una hora en agitación. El sustrato resultante, FTC- κ -caseína, se dializó varias veces frente a carbón activo, tampón Tris-HCl, pH 8.5 y frente a Tris-HCl, pH 7.5. Por último, el sustrato, FTC- κ -caseína, se congela a -20°C en alícuotas de 1 mL.

10 b) Preparación de la mezcla de reacción: Se incuba la muestra enzimática en presencia de FTC- κ -caseína con el tampón adecuado para la muestra. Se deja reaccionar en agitación a la temperatura óptima de la enzima. Se detiene la reacción por adición de ácido tricloroacético (TCA) frío y en agitación. Mediante centrifugación, se eliminan las proteínas precipitadas y se guarda el sobrenadante.

15 c) Medición de la fluorescencia: Se diluye parte del sobrenadante con tampón Tris HCl, pH 8.5. La cantidad de fluorocromo liberado se mide empleando un fluorímetro robotizado. Se realizan controles negativos sustituyendo la enzima por el tampón; el valor basal de fluorescencia obtenido se resta al obtenido tras la reacción.

20 d) Construcción de una recta patrón: Se incuban cantidades crecientes del sustrato FTC- κ -caseína, con una proteasa un tiempo suficiente hasta la completa degradación de sustrato de origen. Así, se obtiene la relación entre la fluorescencia y la cantidad de FTC- κ -caseína degradada.

25 Se define la unidad enzimática como la cantidad de enzima necesaria para degradar 1 μ de FTC- κ -caseína en 1 h a 37°C.

e) Interpolación de los datos: A partir de la recta patrón obtenida, se deducen los datos de actividad de la proteasa, a través de la cantidad de fluorescencia emitida.

30 2. Un método analítico, según la reivindicación 1, donde las enzimas o muestras enzimáticas que se evalúan son proteasas que actúan sobre la κ -caseína.

35 3. Un método analítico, según la reivindicación 1, para la detección de nanogramos de enzima con actividad κ -caseinolítica, y su utilización para llevar a cabo procesos de purificación de enzimas y para la industria quesera.

40

45

50

55

60

65

70

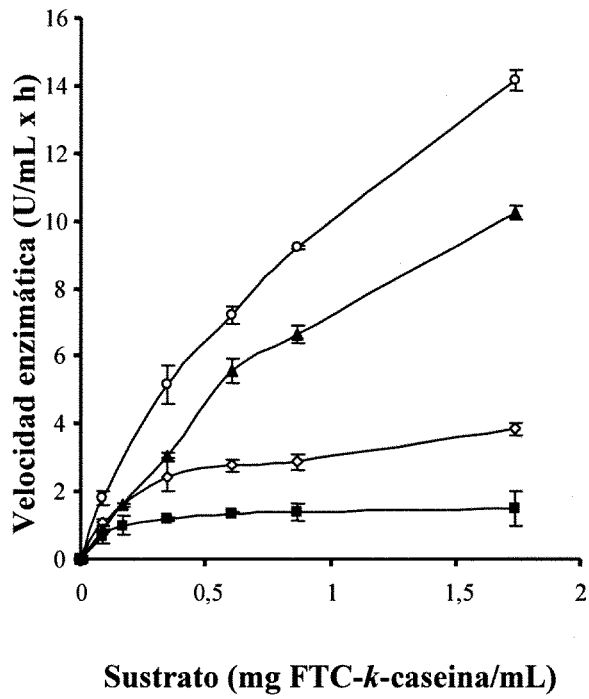


FIGURA 1

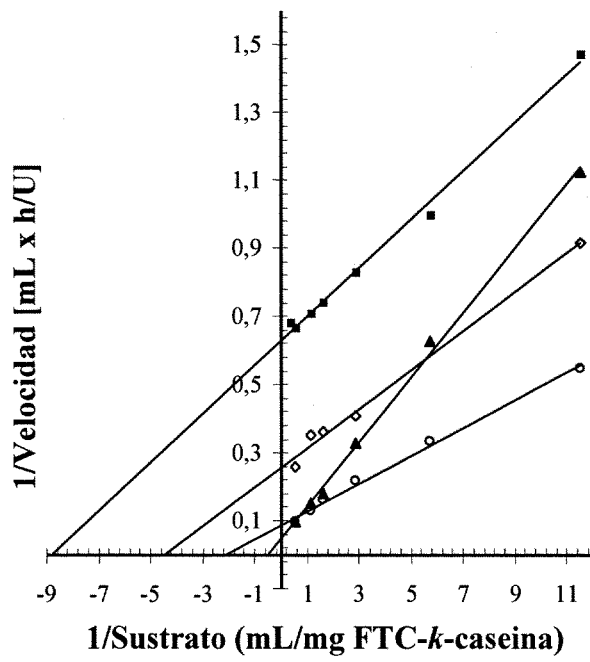


FIGURA 2

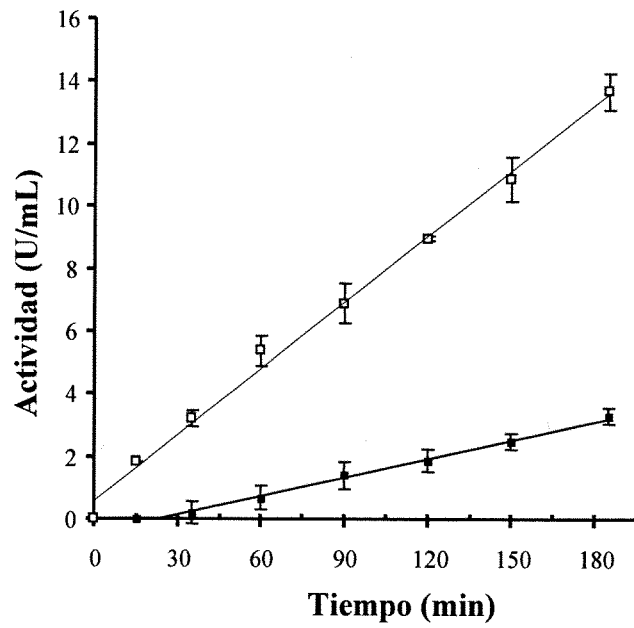


FIGURA 3

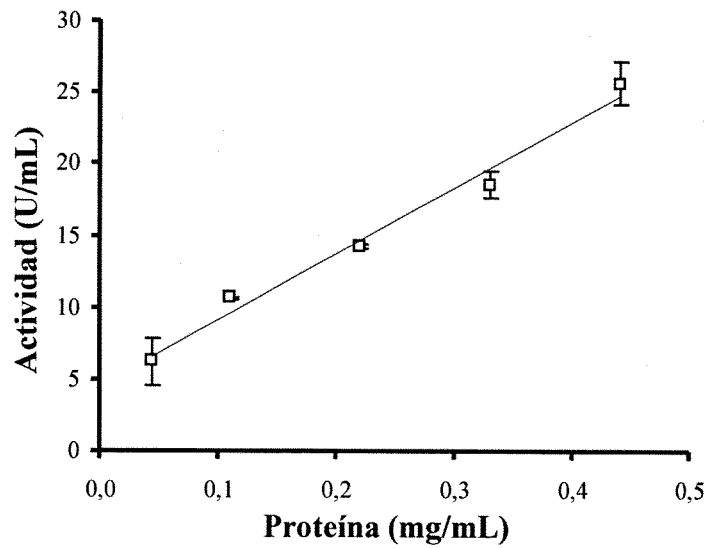


FIGURA 4



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 303 760

② Nº de solicitud: 200600873

③ Fecha de presentación de la solicitud: 24.03.2006

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	I. QUEIROZ MACEDO y col. Specificity and Kinetics of the Milk-Clotting Enzyme from Cardoon (<i>Cynara cardunculus</i> L.) toward Bovine kappa-Casein. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Octubre 1993, Vol. 41, Nº 10, páginas 1537-1540, ISSN 0021-856.	1-3
X	TWINING S.S. Fluorescein Isothiocyanate-Labeled Casein Assay for Proteolytic Enzymes. Analytical Biochemistry, 15 Noviembre 1984, Vol. 143, Nº 1, páginas 30-34, ISSN 0003-2697.	1-3
A	US 5262183 A (MORAN et al.) 16.11.1993, columna 5, líneas 12-64.	1-3
A	WO 0060042 A1 (PROCTER & GAMBLE; KHAN GOLAM FARUQUE; OTANI RYOHEI) 12.10.2000, página 5, línea 23 - página 6, línea 17.	1-3
A	WO 03070009 A1 (GERVAIS DANONE SA) 28.08.2003, página 15, línea 18-página 16, línea 26.	1-3

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

23.07.2008

Examinador

Mª J. de Concepción Sánchez

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12N 9/50 (2006.01)