

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 818 198**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/34 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2016 PCT/DK2016/050144**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2016 WO16188533**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2016 E 16799394 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020 EP 3303608**

54 Título: **Sistema y dispositivos de ensayo de actividad enzimática**

30 Prioridad:

26.05.2015 DK 201570311

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

09.04.2021

73 Titular/es:

**KØBENHAVNS UNIVERSITET (KU) (50.0%)
(University of Copenhagen), Nørregade 10
1165 København K, DK y
DANMARKS TEKNISKE UNIVERSITET (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KRACUN, STJEPAN KRESIMIR;
SCHÜCKEL, JULIA;
WILLATS, WILLIAM GEORGE TYCHO y
CLAUSEN, MAD S HARTVIG**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 818 198 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

Sistema y dispositivos de ensayo de actividad enzimática

El trabajo que ha conducido a esta invención ha recibido financiación del Séptimo Programa Marco de la Unión Europea (FP7/2007-2013) en virtud del acuerdo de subvención n.º 263916.

5 **Campo técnico**

La invención se refiere a un sistema de ensayo de actividad enzimática y a dispositivos para determinar la actividad de degradación enzimática de los biopolímeros en una muestra líquida. La invención también se refiere a dispositivos para realizar ensayos de actividad de degradación enzimática de los biopolímeros.

Antecedentes de la técnica

10 Las enzimas constituyen una familia de proteínas implicada en la catalización de las reacciones químicas dentro de los organismos vivos. Como resultado de su importancia, hay numerosas situaciones en las que es necesario y/o beneficioso medir los niveles de enzimas, y lo que es más importante, la actividad enzimática.

15 Dentro de la familia de las enzimas, hay muchas clases de enzimas que actúan facilitando la división del sustrato, por ejemplo, a través de hidrólisis o eliminación. Dicha división del sustrato se denomina normalmente como degradación del sustrato.

20 Las enzimas que degradan o modifican los polisacáridos están muy difundidas en los procariotas y eucariotas y tienen múltiples funciones biológicas y aplicaciones biotecnológicas. Recientes avances en la secuenciación del genoma y de las secreciones, junto con las herramientas bioinformáticas asociadas, han permitido identificar supuestamente grandes números de enzimas que actúan sobre los carbohidratos. Sin embargo, hay una escasez de métodos para la determinación de forma rápida de las actividades bioquímicas de estas enzimas.

En muchos procesos, por ejemplo, procesos industriales, es conveniente controlar la degradación de los polisacáridos, tal como en la producción de biocombustibles u otros procesos que implican la fermentación de azúcares y carbohidratos de material vegetal mediante la utilización de enzimas con propiedades seleccionadas.

25 Los ensayos enzimáticos que comprenden la prueba de la capacidad de una muestra para descomponer un sustrato de polisacáridos reticulados se conocen desde hace más de 30 años.

30 Por ejemplo, el documento US 4.066.509 describe un método para determinar la actividad o la concentración de una enzima hidrolizante, por ejemplo, una endoenzima. La actividad se determina proporcionando una capa de detección que comprende una matriz portadora y un sustrato no soluble en agua tal como el almidón, el dextrano, la celulosa y la albúmina que se marca con un marcador detectable, por ejemplo teñido y reticulado para formar un gel, y cuyo sustrato, después de actuar sobre el mismo una enzima hidrolizante, se descompone en fragmentos solubles capaces de difundirse a través de la matriz portadora para provocar la formación de un área no marcada en dicha capa de detección; y medir el tamaño del área no marcada como una medida de la actividad de la concentración de dicha enzima.

35 En el documento US 5.496.707 se describe un método de ensayo para hemicelulasas que comprende: a) teñir directamente, utilizando un colorante reactivo, un producto natural no soluble o una forma modificada de un material de fibra natural; y b) añadir la enzima al producto teñido producido en la etapa a) y, después de un período de incubación específico, separar el componente líquido del producto teñido no soluble, por ejemplo, mediante una simple filtración, y determinar la cantidad de colorante liberado en la solución separada por medios espectrofotométricos.

40 El documento US2010028916 describe un método para la detección de una enzima E1 en una muestra líquida que comprende las etapas de: a) proporcionar un complejo (Sa-Sb-M), en donde (Sa-Sb) es un sustrato S de E1 escindible en Sa y Sb por E1, y M es un marcador vinculado a Sb, b) incubar la muestra con el complejo en condiciones que permitan la división de S en Sa y Sb por E1, c) separar el complejo no escindido (Sa-Sb-M) de la muestra, y d) medir M en la muestra.

45 El documento WO 15036000 describe un sustrato enzimático que comprende un material vegetal de micropartículas degradables enzimáticamente que tiene un contenido de polisacáridos en el rango del 35 por ciento (p/p) al 95 por ciento (p/p) y que comprende un marcador que al degradarse se libera. En un ejemplo, los sustratos de polisacáridos reticulados cromogénicos se utilizan en un ensayo enzimático realizado en una placa de microtitulación de 96 pocillos.

50 Ten et al. describieron un método para la determinación cualitativa de las enzimas degradadoras de polisacáridos. "Novel no soluble dye-labeled substrates for screening insulin-degrading microorganism". Journal of Microbiological Methods 69 (2007) 353-357. El ensayo se realizó proporcionando un sustrato de insulina gelificado y teñido, que se inoculó en una placa de agar. Se detectaron colonias del microorganismo degradante de la insulina en forma de aureolas en la placa de agar.

Un sustrato cromogénico de hidrogel y un ensayo para detectar la actividad enzimática de una muestra se describen

en "A new generation of versatile chromogenic multi-colored substrates for high-throughput analysis of biomass-degrading enzymes", de Kracun et al. *Biotechnology for biofuels* (2015), vol. 8, N.º 70, págs. 1 a 16. El sustrato cromogénico de hidrogel se obtiene a partir de polisacáridos que se tiñen y reticulan. El sustrato se dispensó por medio de jeringas en placas filtrantes de 96 pocillos. Se añadió a cada pocillo una solución que contenía enzima o solución tampón. Después de un tiempo de incubación se observó si productos oligosacáridos teñidos solubles serían liberados.

El documento CN 104 062 271 describe un método para detectar una sustancia en el agua. El método comprende proporcionar un dispositivo de detección que comprende un gel seco de polímeros. El gel se denomina xerogel, pero no se le dan otras características. El gel se carga con fluorescente no soluble en agua. El gel se encapsula en un material polimérico que incluye un sustrato con una cubierta de película polimérica permeable, donde al menos uno de éstos es transparente. Durante la utilización, se obtiene una primera medición del espectro de emisión de las sondas fluorescentes en la superficie seca del gel. El gel se sumerge en una solución acuosa que comprende la sustancia que se va a detectar durante un tiempo seleccionado, en la que después se elimina el agua. Posteriormente, se obtiene una segunda medición del espectro de emisión de las sondas fluorescentes en la superficie del gel. Comparando el primer y el segundo espectro de emisión, se puede determinar la cantidad de la sustancia en la solución acuosa.

El documento GB 2 085 159 describe un elemento de análisis químico multicapa que comprende una capa de soporte que forma un soporte que puede transmitir la luz e impermeable al agua; una primera capa reactiva en el soporte que comprende una capa de reacción formadora de color, compuesta por un compuesto cromógeno capaz de formar un colorante después de reaccionar con un grupo reactivo formador de colorante; y una segunda capa reactiva que comprende una capa de sustrato compuesta por un sustrato no difusible que comprende el grupo reactivo formador de colorante, que, en esencia, es incoloro y es capaz de formar un colorante después de la reacción con el compuesto cromógeno, los sustratos son capaces de reaccionar con un analito para formar un compuesto difusor, en esencia, incoloro que contiene el grupo reactivo formador de colorante.

Descripción de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo de ensayo de actividad enzimática adecuado para la determinación de la actividad de degradación enzimática de los biopolímeros en una muestra líquida, cuyo sistema y dispositivo de ensayo sea a la vez rápido y sencillo de utilizar.

En un aspecto de la descripción un objetivo es proporcionar un sistema de ensayo de actividad enzimática adecuado para la determinación de la actividad de degradación enzimática de los biopolímeros en una muestra líquida, cuyo sistema de ensayo sea a la vez rápido y sencillo de utilizar y que además se pueda utilizar para realizar determinaciones cuantitativas, es decir, un grado de actividad enzimática en relación con una referencia seleccionada.

En un aspecto de la invención un objetivo es proporcionar un dispositivo de ensayo de la actividad enzimática adecuado para la determinación de la actividad de degradación enzimática de los biopolímeros en una muestra líquida, cuyo sistema de ensayo sea a la vez rápido y sencillo de utilizar y que no requiera ningún equipo de lectura costoso.

Estos y otros objetivos se han resuelto mediante las invenciones o formas de realización de las mismas según se define en las reivindicaciones y se describe en la presente memoria a continuación.

Se ha descubierto que las invenciones o las formas de realización de las mismas tienen un número de ventajas adicionales que quedarán claras para el experto en la técnica a partir de la siguiente descripción.

El dispositivo de actividad enzimática de la invención es adecuado para la determinación de la actividad de degradación enzimática de los biopolímeros en una muestra líquida. El dispositivo de actividad enzimática comprende un sustrato de biopolímero y una estructura de soporte sólida que soporta dicho sustrato de biopolímero. El sustrato de biopolímero comprende un xerogel teñido y no soluble en agua que comprende una red de biopolímeros reticulados.

El término "biopolímeros", según se utiliza en la presente memoria, tiene por objeto designar los polímeros producidos o producibles por organismos vivos, así como los derivados, fracciones, combinaciones o combinaciones de los mismos, incluidos los polímeros modificados. Los biopolímeros contienen unidades monoméricas que se unen covalentemente (se polimerizan) para formar estructuras más grandes; es decir, son biomoléculas poliméricas, preferiblemente en forma de polinucleótidos (tales como el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN)), polipéptidos y proteínas (tales como la caseína, la albúmina de suero bovino, el colágeno y otras), polisacáridos (polisacáridos de la pared celular de las plantas y los hongos o polisacáridos de la matriz extracelular (MEC) tales como los glicosaminoglicanos y otros) o cualquier combinación o modificación de los mismos. Como ya se ha mencionado, los biopolímeros se pueden modificar, por ejemplo, mediante la unión de fracciones o similares que no destruyan la degradabilidad de los biopolímeros para las enzimas naturales.

El sustrato puede comprender cualquier combinación de biopolímeros y normalmente se construirá de manera que tenga una degradabilidad adecuada para la enzima que se va a analizar.

Los biopolímeros se reticulan, donde el grado de reticulación se selecciona de forma ventajosa de tal manera que el xerogel no sea soluble en agua en estado no degradado. Al mismo tiempo, es conveniente que el grado de reticulación

no sea demasiado alto porque una reticulación demasiado alta puede impedir que la enzima tenga suficiente acceso para degradar los biopolímeros. Para un biopolímero o una combinación de biopolímeros determinada, el experto en la técnica podrá encontrar un grado de reticulación adecuado.

5 El término "no soluble en agua" se utiliza en la presente memoria para indicar que el sustrato no se debe disolver en agua desmineralizada a 25 °C. De forma ventajosa, el sustrato de biopolímero es suficientemente estable y no soluble en agua para mantener su estructura reticulada cuando se sumerge en agua desmineralizada a 25 °C y opcionalmente se coloca en una mesa vibratoria de laboratorio durante al menos unos 30 minutos.

El término "en esencia" se debe entender en la presente memoria en el sentido de que comprende las variaciones y tolerancias de los productos ordinarios.

10 Cabe destacar que la expresión «comprende/que comprende" cuando se utiliza en la presente memoria se debe interpretar como un término abierto, es decir, se debe considerar que especifica la presencia de una o más características específicamente declaradas, tales como elemento(s), unidad(es), número(s) entero(s), etapa(s), componente(s) y combinación(es) de los mismos, pero no excluye la presencia o adición de una otra u otras características declaradas más.

15 A lo largo de la descripción o las reivindicaciones, el singular abarca el plural, a menos que se especifique lo contrario o lo exija el contexto.

20 De acuerdo con una forma de realización de la invención se ha comprobado que mediante la utilización del dispositivo de actividad enzimática de acuerdo con las reivindicaciones que comprenden el sustrato que comprende o consta de un xerogel, se puede realizar un ensayo enzimático muy preciso y fiable que sea incluso más preciso durante la utilización que utilizar los sustratos de la técnica anterior. Se ha descubierto que al proporcionar los biopolímeros en forma de una construcción reticulada en forma de gel que se seca para formar un xerogel, la cantidad de líquido dentro del xerogel cuando se rehumedece es altamente reducida en comparación con la cantidad de líquido en el gel original. Se ha comprobado además que esta reducción de líquido da como resultado un ensayo mucho más preciso.

25 La estructura de soporte sólida puede ser en principio cualquier tipo de estructura de soporte que sea lo suficientemente estable para soportar el xerogel en estado seco o rehumedecido. Esto significa, en consecuencia, que la estructura de soporte sólida debe ser no soluble en el agua y de forma ventajosa, en esencia, rígida, preferiblemente de tal manera que no se doble al utilizar el dispositivo de actividad enzimática de acuerdo con su utilización ordinaria.

30 De forma ventajosa, la estructura de soporte sólida se selecciona a partir de un pocillo que contiene una placa de prueba, un tubo, un dispositivo de flujo lateral o un dispositivo microfluídico. Estos diferentes tipos de estructuras de soporte se describen con más detalle a continuación.

Preferiblemente la estructura de soporte sólida es, en esencia, rígida, de modo que se puede sostener manualmente o por un aparato durante la utilización. Se ha descubierto que es ventajoso fabricar la estructura de soporte sólida completamente o parcialmente a partir de un polímero. Preferiblemente la estructura de soporte sólida se puede obtener a partir de moldeo por inyección o un proceso similar para la producción en masa.

35 Según ya se ha mencionado, el sustrato de biopolímero puede comprender biomoléculas poliméricas de cualquier tipo o tipos adecuados. Por lo general, es conveniente que el sustrato de biopolímero se componga para probar la actividad enzimática de una o más enzimas objetivo.

En una forma de realización, el sustrato de biopolímero comprende biomoléculas poliméricas reticuladas seleccionadas a partir de polinucleótidos, polipéptidos, polisacáridos o cualquier combinación de los mismos.

40 Los biopolímeros se pueden obtener de forma ventajosa de fuentes naturales, por ejemplo, en forma de fracciones o derivados o modificaciones de las mismas. En algunas situaciones es conveniente producir artificialmente los biopolímeros o, alternativamente, los biopolímeros se pueden obtener en parte a partir de fuentes naturales y en parte sintetizados artificialmente.

45 En una forma de realización, las biomoléculas poliméricas del sustrato de biopolímero comprenden polinucleótidos seleccionados a partir de fuentes naturales, modificadas o artificiales de ADN o ARN, fracciones o derivados de las mismas.

El ADN o el ARN, las fracciones o los derivados de los mismos pueden, por ejemplo, incluir el ADN disponible en el mercado del esperma de salmón o el ARN de diferentes especies de hongos.

50 En una forma de realización, las biomoléculas poliméricas del sustrato de biopolímero comprenden polipéptidos seleccionados a partir de la caseína, la albúmina de suero bovino, el colágeno y otros.

En una forma de realización, las biomoléculas poliméricas del sustrato de biopolímero comprenden polisacáridos seleccionados a partir de la celulosa, la amilosa, el dextrano, el xilano, la pectina, y los glucanos, los mananos, los galactanos, los arábigos.

Por lo general, los polisacáridos de origen vegetal, de las algas, animal y fúngico son muy adecuados para utilizar en la invención.

5 La tabla 1 enumera ejemplos de biopolímeros adecuados para el sustrato de biopolímero. Los sustratos de la invención se denominan generalmente como CBX (xerogel de biopolímero cromogénico) o CPX (xerogel de polisacárido cromogénico y/o xerogel de polinucleótido cromogénico y/o xerogel de polisacárido cromogénico). El término "cromogénico" se utiliza en la presente memoria para indicar que la reacción que incluye la actividad enzimática se puede detectar extrayendo colorante o fragmentos de biopolímero enlazados al colorante.

El sustrato de biopolímero se puede construir para que sea degradable principalmente por uno o más tipos seleccionados de enzimas, asegurando que los enlaces enzimáticos degradables se seleccionen en consecuencia.

10 En una forma de realización, los biopolímeros comprenden al menos aproximadamente el 50 % de unidades monoméricas, en esencia, idénticas, tal como al menos aproximadamente el 60 %, tal como al menos aproximadamente el 70 %, tal como al menos aproximadamente el 80 %, tal como al menos aproximadamente el 90 % de unidades monoméricas, en esencia, idénticas. Al tener un sustrato con una gran cantidad de unidades monoméricas idénticas, el sustrato de biopolímero será muy sensible para las enzimas con actividad de degradación para los enlaces entre dichas unidades monoméricas. En algunas situaciones es conveniente que el sustrato de biopolímero sea menos sensible para las enzimas seleccionadas y, en dichos casos, la cantidad de enlaces degradables disponibles para dichas enzimas se puede reducir mediante una selección adecuada de biopolímeros y unidades monoméricas de los biopolímeros.

20 En una forma de realización, los biopolímeros comprenden varios enlaces degradables por enzimas y preferiblemente al menos aproximadamente el 50 % de los enlaces degradables por enzimas son degradables por enzimas idénticas, tal como al menos aproximadamente el 60 %, tal como al menos aproximadamente el 70 %, tal como al menos aproximadamente el 80 %, tal como al menos aproximadamente el 90 % de unidades monoméricas, en esencia, idénticas de los enlaces degradables por enzimas son degradables por un tipo de enzimas.

25 Un tipo de enzima incluye un grupo de enzimas que es capaz de degradar un tipo de enlace químico de un sustrato de biopolímero. Un tipo de enzima puede, por ejemplo, degradar los polisacáridos (glicosil hidrolasa, glicosil liasa, polisacárido lítico monooxigenasa...), degradar las proteínas (proteasas) pertenecientes a cualquiera de las diferentes clases (serina, treonina, cisteína, aspartato, ácido glutámico y metaloproteasas), enzimas desoxirribonucleasa (DNasa) y ribonucleasa (RNasa) (cualquier enzima capaz de degradar el ADN y/o el ARN).

En la tabla 2 se enumeran otros ejemplos de tipos de enzimas.

30 En una forma de realización, el sustrato de biopolímero comprende varios enlaces degradables por enzimas, preferiblemente al menos aproximadamente el 75 %, tal como al menos aproximadamente el 80 %, tal como al menos aproximadamente el 90 %, tal como en esencia todos los enlaces degradables por enzimas son exclusivamente degradables por un tipo de enzima.

En una forma de realización, los biopolímeros del sustrato comprenden varias unidades monoméricas diferentes.

35 El xerogel se puede obtener mediante cualquier método adecuado que comprenda el suministro de varios biopolímeros, el teñido y el reticulado de los biopolímeros y el secado de los biopolímeros reticulados.

El teñido se realiza de forma ventajosa antes y/o de forma simultánea con el reticulado.

40 Para realizar el reticulado de los biopolímeros, los biopolímeros se deben sumergir y preferiblemente disolver, al menos parcialmente, en un líquido y, por lo general, el reticulado requiere la utilización de un reticulador o el reticulado se puede iniciar mediante una radiación tal como la radiación ultravioleta.

45 El reticulado de biomoléculas se puede realizar, por ejemplo, según se describe en Stjepan Kresimir Kracun, Julia Schtickle, Borge Westereng, Lisbeth Thygesen, Rune Monrad, Vincent G H Eijsink, William Willats, A new generation of versatile chromogenic substrates for high-throughput analysis of biomass-degrading enzymes, *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8:70. El sustrato con base de hidrogel, es decir, en el que el hidrogel no se ha sometido a secado, se denomina como hidrogel biopolímero cromogénico CBH o hidrogel polisacárido/polinucleótido/polisacárido CPH cromogénico, aunque el colorante o color no se forma cromogénicamente, sino que simplemente se libera solo o se enlaza al fragmento o fragmentos del sustrato después de la degradación del mismo. Los sustratos de la invención se denominan generalmente como CBX o CPX, según se ha explicado anteriormente.

50 En una forma de realización, la reticulación se realiza utilizando al menos un reticulador seleccionado a partir de reticuladores homo-bi-funcionales y/o reticuladores hetero-bi-funcionales y/o agentes de activación.

Entre los ejemplos de reticuladores homofuncionales se encuentran el alcanol diol diglicidil éter, tal como el butanodiol diglicidil éter; los dihalo-alcanos, tal como el dibromohexano; los diaminoalcanos en general, tal como el diaminopropano; la N, N'-metilenebisacrilamida; el anhídrido succínico y la divinil sulfona.

Entre los ejemplos de reticuladores hetero-bi-funcionales se encuentran la epiclorhidrina, el metacrilato de glicídico

y/o la acrilamida.

Entre los ejemplos de agentes de activación que facilitan la formación de hidrogeles se encuentran la N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina; el persulfato de amonio; el persulfato de sodio; las carbodiimidas tales como el clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida y el meto-p-toluenosulfonato de N-ciclohexil-N'-(2-morfolinoetilico) carbodiimida.

5

El líquido en el que se sumergen (disuelven) los biopolímeros, en principio, puede ser cualquier clase de líquido que no dañe el sustrato de biopolímero. Preferiblemente el agua líquida, el alcohol (preferiblemente etanol) o cualquier mezcla de los mismos que comprenda opcionalmente aditivos adecuados tales como los surfactantes.

De forma ventajosa, el líquido en el que se sumergen los biopolímeros es fácil de eliminar después de la reticulación utilizando secado al aire, secado al horno (por ejemplo, a aproximadamente 30 hasta aproximadamente 90 °C) o liofilización, por ejemplo, a aproximadamente -5 hasta aproximadamente -150 °C, tal como a aproximadamente -50 hasta aproximadamente -90 °C.

10

La densidad del xerogel depende en gran medida de los biopolímeros y de los grados de reticulado. Se ha descubierto que es conveniente que tenga una densidad menor que la que habría tenido en un aerogel correspondiente.

15

De forma ventajosa, el xerogel tiene una densidad de al menos aproximadamente 0,02 g/cm³, preferiblemente de aproximadamente 0,05 hasta aproximadamente 0,8 g/cm³, tal como desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 0,5 g/cm³.

En una forma de realización preferida, el xerogel se puede obtener a partir de un proceso que comprende la producción de un hidrogel de biopolímero teñido y el secado del hidrogel mediante liofilización.

20

En una forma de realización, el xerogel se puede obtener a partir de un proceso que comprende la producción de un gel de biopolímero teñido seleccionado a partir de un alcogel, un aerogel o una combinación de los mismos y el secado del gel, preferiblemente mediante secado al aire o secado al horno.

En una forma de realización, el xerogel se puede obtener a partir de un proceso que comprende la reticulación y el teñido de varias biomoléculas poliméricas en un fluido acuoso para formar un hidrogel, congelando el hidrogel a una temperatura inferior a, aproximadamente -25 °C, y liofilizando el hidrogel.

25

En una forma de realización el hidrogel se coloca sobre la estructura de soporte sólida, posteriormente el hidrogel se congela y se seca sobre la estructura de soporte sólida. En otra forma de realización el hidrogel se dispone en una bandeja, se congela y se seca y posteriormente se desplaza a la estructura de soporte sólida.

Se ha descubierto que se obtiene una calidad muy y sorprendentemente alta del sustrato de biopolímero cuando el sustrato de biopolímero se produce a partir de un hidrogel secado mediante liofilización. Sin estar ligado a la teoría, se cree que la liofilización del aerogel da como resultado el daño de al menos algunos nanoporos, lo que da como resultado de este modo una distribución más uniforme del tamaño de los poros.

30

De forma ventajosa, el xerogel tiene una porosidad (fracción de gas) desde aproximadamente el 20 % hasta aproximadamente el 85 %, tal como desde aproximadamente el 25 % hasta aproximadamente el 80 %, tal como desde aproximadamente el 30 % hasta aproximadamente el 75 %.

35

En una forma de realización, el xerogel tiene un volumen que es aproximadamente el 90 % o menos con respecto al volumen del gel a partir del que se obtiene el xerogel por secado. De forma ventajosa, el xerogel tiene un volumen que es aproximadamente el 80 % o menos, tal como el 70 % o menos con respecto al volumen del gel a partir del que se obtiene el xerogel por secado.

40

En una forma de realización el xerogel tiene un área superficial de al menos aproximadamente 100 m²/g, tal como desde aproximadamente 150 hasta aproximadamente 900 m²/g, tal como desde aproximadamente 200 hasta aproximadamente 800 m²/g.

El área superficial se determina utilizando el Análisis de área superficial de Brunauer-Emmett-Teller (BET).

Una parte del colorante se puede situar espacialmente dentro de la red de biopolímeros reticulados.

45

El colorante se une de forma química a los biopolímeros. En una forma de realización el colorante se une de forma química a los biopolímeros antes o de forma simultánea con el reticulado de los biopolímeros. Se ha descubierto que el dispositivo de actividad enzimática que comprende un sustrato de biopolímero en el que el colorante se une de forma química a los biopolímeros proporciona una determinación cuantitativa o cualitativa muy precisa de la actividad enzimática de una muestra líquida. Cualquier riesgo de falso positivo es muy bajo o incluso inexistente. Dado que el colorante se une de forma química a los biopolímeros, cualquier riesgo de que los daños mecánicos de la red dieran lugar a la liberación de colorante dando como resultado determinaciones positivas falsas es prácticamente insignificante. Además, prácticamente no existe riesgo de lavar una cantidad demasiado grande de colorante en un prelavado, ya que los fragmentos de colorante o de biopolímero enlazados que comprenden el colorante enlazado

50

generalmente no se lavarán sin la degradación de los biopolímeros reticulados.

En una forma de realización el colorante se enlaza de forma covalente a los biopolímeros del sustrato. De esta manera, el sustrato de biopolímero se vuelve aún más estable contra la liberación no enzimática no deseada del colorante debido a daños mecánicos.

- 5 El colorante puede ser, en principio, cualquier clase de colorante que se pueda detectar de forma visual y/o óptica, por ejemplo, utilizando un espectrómetro, tal como el espectrómetro que detecta las ondas electromagnéticas, por ejemplo, con longitudes de onda en el rango desde aproximadamente 300 nm hasta aproximadamente 2500 nm, tal como desde aproximadamente 400 nm hasta aproximadamente 1500 nm, comprendiendo preferiblemente el rango visual desde aproximadamente 400 nm hasta aproximadamente 700 nm. Dichos colorantes son bien conocidos por el experto en la técnica.

Entre los ejemplos de colorantes adecuados que se pueden utilizar solos o en cualquier combinación se encuentran los colorantes de clorotriazina (colorantes de monoclora y diclorotriazina), los colorantes de monofluoroclorotriazina, los colorantes de difluorocloropirimidina, los colorantes de dicloroquinoxalina, los colorantes de tricloropirimidina, los colorantes de vinil amida y de vinil sulfona.

- 15 De forma ventajosa, el colorante se selecciona a partir de colorantes que absorben en el espectro visible y cuya detección se basa en la absorbancia, así como colorantes que absorben en el rango UV-VIS-IR, pero su detección se basa en la emisión de fluorescencia. Entre ellos se pueden incluir los azocolorantes, los diazocolorantes, los colorantes de antraquinona y los colorantes de ftalocianina, entre otros.

- 20 También se pueden utilizar colorantes cuya unión al sustrato no sea covalente, tal como el blanco calcofluor, el sirofluor y el rojo congo. Estos colorantes son especialmente adecuados para su utilización cuando al menos una parte del colorante se sitúa espacialmente dentro de la red de biopolímeros reticulados. De esta manera el colorante queda atrapado dentro del sustrato y cuando el sustrato de biopolímero se somete a degradación el colorante se libera en una proporción correspondiente al grado de degradación.

En una forma de realización el colorante es un colorante fluorescente (fluoróforo).

- 25 La cantidad de colorante puede ser, en principio, muy baja. De forma ventajosa, el colorante está presente en una cantidad suficiente para permitir la detección incluso de un bajo grado de degradación del sustrato de biopolímero. El experto en la técnica podrá determinar una cantidad adecuada de colorante para un sustrato específico.

- 30 Los xerogeles como tales pueden ser muy frágiles y se ha descubierto que el xerogel se puede someter a daños mecánicos durante el transporte u otras manipulaciones del dispositivo de actividad enzimática. Un daño mecánico del xerogel puede, en determinada situación, ser muy desventajoso, en particular cuando se tienen que realizar ensayos cuantitativos. Para dichos dispositivos de actividad enzimática puede ser conveniente manipular el dispositivo de actividad enzimática con mucho cuidado para evitar o reducir el daño mecánico.

- 35 En una forma de realización preferida se ha descubierto que, al añadir un estabilizador al sustrato de biopolímero, se aumenta la resistencia contra el daño mecánico del sustrato de biopolímero. Seleccionando un estabilizador que sea soluble en un líquido que, en esencia, no disuelva o degrade el xerogel - tal como un líquido acuoso, el estabilizador se puede eliminar mediante dicho líquido, por ejemplo, agua o un líquido que comprenda agua, tal como una solución tampón acuosa antes de añadir una muestra para prueba al sustrato de biopolímero. De esta manera, el estabilizador no influirá en el ensayo.

- 40 De forma ventajosa, el sustrato de biopolímero comprende un estabilizador para estabilizar el xerogel, donde el estabilizador comprende al menos un polímero orgánico y es soluble en un líquido que no disuelve ni degrada el xerogel. Preferiblemente el estabilizador es soluble en un líquido acuoso y/o alcohólico, tal como el agua, el etanol o una combinación de los mismos.

- 45 En una forma de realización, el estabilizador comprende además hasta un 5% en peso de surfactante(s) y/o colorante(s). Se ha descubierto que es una ventaja incluir al menos un colorante en el estabilizador. De esta manera, el usuario se puede asegurar de que el estabilizador se elimine por completo antes de añadir la muestra.

Se debe entender que no es necesario eliminar el estabilizador antes de su utilización, en particular para los ensayos que son meramente o principalmente cualitativos, es decir, cuando no se requiere una gran exactitud del nivel de actividad enzimática, por ejemplo, cuando es conveniente hacer ensayos en ese lugar sin actividad enzimática, con poca actividad enzimática o con mucha actividad enzimática.

- 50 Además, si sólo se utiliza una pequeña cantidad de estabilizador, es posible que no afecte en absoluto al ensayo enzimático. El experto en la técnica puede, mediante unas pocas pruebas, determinar cuándo es conveniente la eliminación del estabilizador.

En una forma de realización, el estabilizador consiste, en esencia, de un polímero orgánico y hasta aproximadamente un 5 % en peso de aditivo, tal como surfactante(s) y/o colorante(s), en donde el estabilizador es soluble en un líquido

que no disuelve o degrada el xerogel, preferiblemente el estabilizador es soluble en un líquido acuoso y/o alcohólico, tal como el agua, el etanol o una combinación de los mismos.

5 En una forma de realización el polímero orgánico del estabilizador comprende al menos un compuesto seleccionado a partir del vinilo que contiene compuestos, tales como la polivinilpirrolidona, el acetato de polivinilo, el alcohol polivinílico y copolímeros que comprenden uno o más de los compuestos de vinilo mencionados; polímeros a base de acrilamida/acrilato o copolímeros de los mismos, tales como el copolímero de octilacrilamida/acrilatos/metacrilato de butilaminoetilo y el copolímero de acrilatos/T-butilacrilamida; polímeros a base de silicona/siloxano, tales como el polidimetilsiloxano; poliéteres tales como el polietilenglicol; el glicerol; el etilenglicol, el propilenglicol, y/o cualquier combinación de los mismos.

10 De forma ventajosa, se utiliza un estabilizador químico que tiene las propiedades de mantener el sustrato en su lugar en el recipiente que lo contiene y que se puede lavar fácilmente durante una etapa de activación.

La etapa de activación comprende la rehumectación del xerogel mediante un líquido adecuado que no degrade el xerogel, por ejemplo, según se mencionó anteriormente. En general es conveniente utilizar agua o una solución tampón acuosa. De forma simultánea, se puede eliminar cualquier excedente de colorante.

15 El(los) estabilizador(es) se puede(n) añadir por cualquier método, por ejemplo, en forma de soluciones/mezclas con otros disolventes tales como agua o alcoholes, o polímero puro. En una forma de realización, el estabilizador se mezcla con los biopolímeros antes, durante o después de la reticulación, tal como antes del secado. De forma ventajosa, el estabilizador se pulveriza sobre el xerogel seco.

20 Se ha descubierto que cuando el estabilizador se mezcla con los biopolímeros antes de la reticulación, el estabilizador tiende a bloquear el filtro donde se aplica un filtro. Por lo tanto, para la producción de sustratos de biopolímeros para ensayos utilizando filtros es conveniente que el estabilizador se añada después de que los biopolímeros se hayan reticulado.

Además, se ha descubierto que es muy eficaz y proporciona un grado preferido de estabilización mecánica aplicar el estabilizador sobre el sustrato de biopolímero después de la reticulación y antes del secado.

25 En una forma de realización, el sustrato de biopolímero comprende hasta un 5% en peso de estabilizador, tal como por ejemplo desde 0,01 hasta aproximadamente un 3% en peso de estabilizador.

De forma ventajosa, el estabilizador se encuentra predominantemente en una zona del área superficial exterior del xerogel. Preferiblemente el sustrato de biopolímero comprende un revestimiento exterior en al menos una sección del sustrato de biopolímero.

30 En una forma de realización, el estabilizador se distribuye en la mayor parte de la superficie del xerogel y, opcionalmente, al menos en parte dentro del sustrato de biopolímero.

En una forma de realización, el estabilizador se distribuye en el área superficial del xerogel que no está en contacto con un filtro.

35 En una forma de realización, el estabilizador se distribuye en el área superficial del xerogel que no está en contacto con el soporte sólido.

En una forma de realización, el estabilizador se distribuye en la mayor parte de la superficie del xerogel, que de otro modo estaría expuesta, es decir, la superficie del xerogel que sin el estabilizador habría quedado expuesta.

40 En una forma de realización, la estructura de soporte sólida es una placa de microtitulación que comprende al menos un pocillo. Dicha estructura de soporte sólida en lo siguiente se denomina como una placa de microtitulación. La placa de microtitulación puede ser en principio cualquier clase de placa de microtitulación con cualquier número y tamaño de pocillo(s). De forma ventajosa, la placa de multimicrotitulación es una placa de microtitulación que comprende varios pocillos.

45 En una forma de realización, la placa de multimicrotitulación es una placa de microtitulación, que comprende preferiblemente hasta aproximadamente 1536 pocillos. El término "microplaca de microtitulación" se utiliza en la presente memoria para designar placas de microtitulación que comprenden al menos un pocillo que tiene un pocillo con un volumen menor de aproximadamente 10 ml, tal como menor de aproximadamente 1 ml.

Una microplaca adecuada tiene de forma ventajosa 6, 24, 96, 384 o incluso 1536 pocillos de muestra dispuestos espacialmente en orden de filas y columnas. Los pocillos pueden tener cualquier forma tal como redonda o cuadrada.

50 En una forma de realización, la placa de multimicrotitulación comprende uno o más pocillos con un volumen de hasta aproximadamente 25 ml o incluso más.

Preferiblemente la placa de multimicrotitulación comprende al menos tres pocillos, tal como al menos 6 pocillos. Preferiblemente al menos 2 pocillos comprenden idéntico sustrato de biopolímero degradable por enzimas que puede

ser igual o diferente con respecto al colorante.

5 En una forma de realización, un sustrato de biopolímero se tiñe con dos colorantes en los que los colorantes tienen de forma ventajosa diferentes propiedades o colores (por ejemplo, uno es fluorescente, el otro no lo es). Esto permite medir la actividad de una enzima en dos niveles diferentes de forma simultánea. Por ejemplo - un colorante indica una actividad enzimática global y el otro se puede aplicar en una etapa adicional que comprenda electroforesis para separar los oligómeros teñidos solubles, por ejemplo, utilizando electroforesis de carbohidratos de poliacrilamida (PACE).

En una forma de realización, la estructura de soporte comprende al menos dos pocillos que comprenden diferentes sustratos de biopolímero degradables por enzimas, preferiblemente la estructura de soporte comprende al menos tres sustratos de biopolímero degradables por enzimas diferentes.

10 Al aplicar sustratos de biopolímero iguales y/o diferentes en los diversos pocillos de la placa de multimicrotitulación, el dispositivo de actividad enzimática proporciona un dispositivo muy beneficioso para utilizar en ensayos de actividad enzimática de alto rendimiento, cuyo dispositivo es sencillo y rápido de utilizar, al tiempo que de forma simultánea da como resultado una(s) medición(es) muy precisa(s) de la actividad enzimática de una muestra. El dispositivo de actividad enzimática, que comprende una estructura de soporte sólida de placa de multimicrotitulación, proporciona la base para proporcionar varios ensayos seleccionados de forma simultánea y, al mismo tiempo, obtener de forma simultánea mediciones de alta calidad (con gran precisión) para cada pocillo.

Según se mencionó anteriormente, el sustrato de biopolímero respectivo en los respectivos pocillos puede ser igual o diferente, puede comprender colorante o colorantes iguales o diferentes.

20 La cantidad de sustrato de biopolímero en los respectivos pocillos puede ser igual o diferente. En una forma de realización, la cantidad en peso del sustrato de biopolímero en al menos dos pocillos con un sustrato de biopolímero degradable por enzimas es, en esencia, igual.

25 La cantidad de sustrato de biopolímero se selecciona en función del tipo de ensayo que se vaya a realizar y de la cantidad de muestra disponible. Es preferible adaptar la cantidad de sustrato de biopolímero y la cantidad de muestra de tal manera que la mayor parte del sustrato de biopolímero se pueda humedecer por la muestra. El experto en la técnica puede encontrar en unos pocos experimentos una correlación adecuada de la cantidad de sustrato de biopolímero y la cantidad de muestra.

En una forma de realización, la cantidad de sustrato de biopolímero en cada pocillo va desde aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 25 g, tal como desde 5 mg hasta aproximadamente 1 g, tal como menos de 50 mg.

30 En una forma de realización, la placa de microtitulación es una placa de microtitulación filtrante que comprende medios filtrantes. Los medios filtrantes pueden ser en principio cualquier clase de medios filtrantes adecuados para la filtración del sustrato de biopolímero posiblemente degradado después de un tiempo de incubación seleccionado con una muestra. Para una filtración óptima de las partes degradadas del sustrato de biopolímero es ventajoso enjuagar con un líquido adicional, tal como agua o solución tampón, y extraer el líquido a través de los medios filtrantes.

35 En una forma de realización los medios filtrantes se disponen de tal manera que el líquido y preferiblemente los fragmentos opcionales degradados a partir del sustrato de biopolímero y dispersados o disueltos por el líquido pueden pasar a través de los medios filtrantes. Preferiblemente, los medios filtrantes se operan por aspiración, sin embargo, no se excluyen formas de realización donde los medios filtrantes se puedan operar por presión o meramente por gravedad.

40 De forma ventajosa, los medios filtrantes se proporcionan mediante una estructura filtrante para cada pocillo, la cual estructura filtrante se dispone en una sección del pocillo, preferiblemente la estructura filtrante de cada pocillo se dispone en una sección inferior del pocillo.

Las placas de microtitulación (por ejemplo, en forma de placas de micro títulos) que comprenden medios filtrantes adecuados son bien conocidas y se pueden emplear, por ejemplo, en la invención.

Tal como la microplaca filtrante se comercializa, por ejemplo, por AHN Biotechnologie GMBH, Nordhausen, Alemania.

45 De forma ventajosa, los medios filtrantes tienen un tamaño de corte suficientemente grande para permitir el paso de los fragmentos disueltos o dispersos degradados del sustrato de biopolímero, al mismo tiempo que retienen el sustrato de biopolímero no degradado en el pocillo o pocillos.

En una forma de realización, los medios filtrantes que tienen un tamaño de corte de aproximadamente 10 µl o menos, tal como de aproximadamente el 5 µl o menos, preferiblemente aproximadamente de 1 µl o menos.

50 En una variación del soporte sólido en forma de placa de microtitulación, el sustrato sólido puede tener forma de tubo, es decir, correspondiente a un solo pocillo de una placa de microtitulación.

En una forma de realización, el tubo es un tubo tipo recipiente según se describe en cualquiera de los siguientes documentos: US 3.593.909; US 4.713.219; US 5.270.011; EP 2 965 816; US 8.540.948, US 2007/0128080 o US

6.783.025.

En una forma de realización el tubo es un tubo de formato Eppendorf con, por ejemplo, un volumen entre 200 microlitros y 2 mililitros. Este tubo se suele denominar como tubo tipo PCR porque es adecuado para realizar la reacción en cadena de la polimerasa

- 5 De forma ventajosa, el tubo puede ser un tubo con formato Eppendorf en lo siguiente denominado como un tubo PCR. En una forma de realización el tubo es un tubo PCR con un filtro, tal como un inserto filtrante. Los tubos PCR son bien conocidos en la técnica y se comercializan, por ejemplo, por Eppendorf. De forma ventajosa, el tubo puede comprender una estructura de tubo principal y un inserto filtrante para ser insertado en la estructura de tubo principal. El sustrato de biopolímero se dispone en el inserto filtrante. El inserto filtrante tiene una parte inferior que comprende un filtro. El
10 filtro puede ser como el descrito anteriormente para el filtro de la placa de microtitulación. De forma ventajosa, la estructura del tubo principal tiene una sección superior y una sección inferior donde el filtro se inserta en la sección superior de tal manera que el filtro esté por encima de la sección inferior y por centrifugación o aspiración (por ejemplo, vacío) el líquido y preferiblemente los fragmentos opcionales degradados del sustrato de biopolímero y dispersados o disueltos por el líquido pueden pasar a través de los medios filtrantes para ser recogidos en la sección inferior de la
15 estructura del tubo principal. De forma ventajosa, el tubo puede tener una tapadera para la protección contra los contaminantes durante el tiempo de incubación opcional.

En un segundo aspecto, la estructura de soporte sólida con la forma de un dispositivo de flujo lateral soporta el sustrato de biopolímero. En este aspecto el sustrato de biopolímero puede ser como el anterior o alternativamente el sustrato de biopolímero es un hidrogel o aerogel no soluble en agua que comprende una red de biopolímeros teñidos y
20 reticulados, donde los biopolímeros y los colorantes son de forma ventajosa según se describieron anteriormente.

En este segundo aspecto, el dispositivo de actividad enzimática para la determinación de la actividad de degradación enzimática de los biopolímeros en una muestra líquida comprende el sustrato de biopolímero y la estructura de soporte sólida con la forma de dispositivo de flujo lateral que soporta el sustrato de biopolímero, en donde el sustrato de biopolímero es un hidrogel, aerogel o xerogel teñido y no soluble en agua que comprende una red de biopolímeros
25 reticulados.

Los dispositivos de flujo lateral y el principio aplicado utilizando los dispositivos de flujo lateral son bien conocidos por un experto en la técnica y el experto en la técnica puede, mediante ensayo y error, encontrar una estructura de soporte sólida adecuada para el dispositivo de flujo lateral.

De forma ventajosa, el dispositivo de flujo lateral comprende un soporte rígido que porta una placa de muestras y una estructura de membrana dispuesta para formar una vía, en donde el sustrato de biopolímero se dispone sobre la placa de muestras.
30

De forma ventajosa, la placa de muestras no es absorbente de líquidos, de tal manera que la placa de muestras no absorbe, en esencia, una muestra aplicada en el sustrato de biopolímero. Preferiblemente la placa de muestras tiene una superficie hidrofóbica que soporta el sustrato de biopolímero.

35 En una forma de realización, la placa de muestras tiene una superficie no porosa que soporta el sustrato de biopolímero. Preferiblemente la placa de muestras no es porosa.

La finalidad de la placa de muestras es soportar la muestra y de tal manera que cuando se aplique la muestra, la muestra no sea aspirada en la placa de muestras o transportada de otra manera lejos del sustrato de biopolímero.

40 En una forma de realización, la placa de muestras tiene una cavidad que contiene el sustrato de biopolímero. La cavidad tiene por ejemplo la forma de una depresión en la placa de muestras.

En una forma de realización, el sustrato de biopolímero se soporta mediante la placa de muestras a una distancia de la estructura de membrana. De esta manera, una muestra añadida al sustrato se puede mantener alejada de la estructura de membrana durante un tiempo de incubación seleccionado.

45 En una forma de realización, la estructura de membrana es de uno o más materiales porosos, preferiblemente de nitrocelulosa.

De forma ventajosa, la estructura de membrana se dispone inmediatamente adyacente o solapada con la placa de muestras, de tal manera que cuando se añada líquido de adición al sustrato de biopolímero después de un tiempo de incubación, el líquido lave los fragmentos degradados (si los hubiese) del sustrato de biopolímero y tiña, lo que se une de forma opcional a los fragmentos, en la estructura de membrana que porta los fragmentos degradados y tiña además
50 en la dirección lateral.

En donde la estructura de membrana comprende un lugar de lectura que preferiblemente es para leer visualmente.

El lado de lectura se puede en principio colocar en cualquier posición de la estructura de membrana. En una forma de realización, el lugar de lectura es un lugar de la estructura de membrana con una distancia lateral a la placa de muestras que soporta el sustrato de biopolímero de al menos aproximadamente 5 mm, tal como al menos

aproximadamente 1 cm, tal como hasta 10 cm o incluso más si se desea.

5 En una forma de realización, el dispositivo de flujo lateral comprende una tapadera para la estructura de membrana de soporte rígido, en donde la tapa comprende una abertura de acceso para introducir líquido en el sustrato de biopolímero. Preferiblemente la tapadera se construye para que permita la lectura desde el lugar de lectura. El lugar de lectura tiene opcionalmente la forma de una ventana transparente en la tapadera o simplemente un orificio pasante en la tapadera.

10 En una forma de realización el soporte rígido del dispositivo de flujo lateral porta varias secciones de placa de muestras y varias secciones de estructura de membrana dispuestas para formar unas varias vías, en esencia, paralelas, en donde cada sección de placa de muestras soporta un sustrato de biopolímero. De esta manera, se pueden realizar varios ensayos de forma simultánea.

En un tercer aspecto, la estructura de soporte sólida con la forma de un dispositivo microfluídico soporta el sustrato de biopolímero. En este aspecto el sustrato de biopolímero puede ser como el anterior o alternativamente el sustrato de biopolímero es un hidrogel o aerogel no soluble en agua que comprende una red de biopolímeros teñidos y reticulados, donde los biopolímeros y los colorantes son de forma ventajosa según se describieron anteriormente.

15 En este segundo aspecto para la determinación de la actividad de degradación enzimática de los biopolímeros en una muestra líquida, el dispositivo de actividad enzimática comprende el sustrato de biopolímero y la estructura de soporte sólida en forma de dispositivo microfluídico que soporta el sustrato de biopolímero, en donde el sustrato de biopolímero es un hidrogel, aerogel o xerogel teñido y no soluble en agua que comprende una red de biopolímeros reticulados.

20 Los dispositivos microfluídicos que comprenden una o más vías microfluídicas son bien conocidos en la técnica y también los métodos de producción de dichos dispositivos microfluídicos son bien conocidos por el experto en la técnica.

De forma ventajosa, el dispositivo microfluídico comprende al menos un canal de flujo que comprende una entrada para alimentar fluido en el canal de flujo, comprendiendo el canal de flujo un lugar de muestreo que comprende el sustrato de biopolímero.

25 De forma ventajosa, el sustrato de biopolímero se fija al menos temporalmente en el lugar de muestreo del canal de flujo, de tal manera que cuando se añade una muestra o líquido adicional, tal como el líquido de lavado, el sustrato de biopolímero o al menos el sustrato de biopolímero no degradado permanece en el lugar de muestreo. Preferiblemente el lugar de muestreo es una cámara, en donde la cámara tiene un área de la sección transversal más grande que el canal de flujo adyacente al lugar de muestreo.

30 En una forma de realización, el canal de flujo comprende un lugar de lectura. Preferiblemente el dispositivo microfluídico comprende una pared transparente en el lugar de lectura. La pared transparente es transparente al menos para el colorante del sustrato de biopolímero, de tal manera que un colorante se pueda leer en el lugar de lectura por medio del lugar de lectura de forma óptica o visual.

35 De forma ventajosa, el lugar de lectura se coloca distante del lugar de muestreo, es decir, más lejos de la entrada que del lugar de muestreo. En principio, el lugar de lectura se puede colocar a cualquier distancia del lugar de muestreo, tal como a partir de unos pocos mm a muchos cm, por ejemplo, desde aproximadamente 5 mm hasta aproximadamente 10 cm o incluso una distancia más grande.

En una forma de realización, el canal de flujo comprende un tope de flujo entre el lugar de muestreo y el lugar de lectura, disponiéndose preferiblemente el tope de flujo inmediatamente adyacente al lugar de muestreo.

40 La detención del flujo es bien conocida dentro de la técnica de los dispositivos microfluídicos, y puede, por ejemplo, adoptar la forma de una barrera hidrofóbica, un borde afilado o un medio similar que impida que un líquido acuoso fluya por las fuerzas capilares.

45 En una forma de realización, el dispositivo microfluídico comprende una sección de sumidero en conexión fluida con el canal de flujo, en donde la conexión fluida con el canal de flujo se coloca distal a la sección de lectura del canal de flujo. Preferiblemente la sección del sumidero tiene un volumen que es más grande que el volumen del canal de flujo.

50 En una forma de realización, el dispositivo microfluídico comprende una sección de pared flexible del canal de flujo y/o de la sección de sumidero en conexión con el canal de flujo, la sección de pared flexible se puede presionar en el canal de flujo y/o en el sumidero para generar flujo de fluido en el canal de flujo, preferiblemente la pared flexible vuelve a su posición inicial cuando se libera la presión que presiona la lámina flexible en el canal de flujo y/o el sumidero.

En una forma de realización, el dispositivo microfluídico comprende un sustrato rígido con una ranura y una lámina que cubre la ranura y se fija al sustrato rígido para formar el canal de flujo.

De forma ventajosa, el sustrato rígido comprende una cavidad, la cavidad se cubre mediante la lámina para proporcionar la sección de sumidero.

Preferiblemente la lámina es una lámina flexible que proporciona una sección de pared flexible del canal de flujo y/o de la sección de sumidero en conexión fluida con el canal de flujo. La sección de pared flexible se puede presionar en el canal de flujo y/o el sumidero para generar flujo de fluido en el canal de flujo, preferiblemente la pared flexible vuelve a su posición inicial cuando se libera la presión que presiona la lámina flexible en el canal de flujo y/o en el sumidero.

- 5 En una forma de realización, el dispositivo microfluídico comprende varios canales de flujo, cada canal de flujo comprende un lugar de muestreo que comprende un sustrato de biopolímero. De esta manera, se pueden realizar varios ensayos de forma simultánea.

10 La descripción también comprende un sistema de ensayo de actividad enzimática de alto rendimiento adecuado para la determinación de la actividad de degradación enzimática de los biopolímeros en una muestra líquida. El sistema de ensayo comprende

- un dispositivo de actividad enzimática que comprende una estructura de soporte sólida en forma de una placa de microtitulación,
- un colector filtrante que comprende cavidades para recoger el filtrado de los pocillos, y
- un espectroscopio para leer el filtrado recogido.

15 Preferiblemente, según se describió anteriormente, el dispositivo de actividad enzimática es una placa de multimicrotitulación donde la estructura de soporte sólida es una placa de microtitulación.

20 En una forma de realización, el sistema comprende una placa filtrante dispuesta para colocarla sobre la placa de microtitulación para cubrir la(s) abertura(s) superior(es) del (de los) pocillo(s). La placa de microtitulación puede comprender medios filtrantes según se describió anteriormente o la placa de microtitulación filtrante puede estar libre de medios filtrantes.

En una forma de realización, el sistema comprende un soporte para sostener el colector filtrante y la estructura de soporte sólida y, opcionalmente, la placa filtrante, si la hay, en posición durante la filtración, de tal manera que el filtrado de los pocillos se recogerá en una o más cavidades del colector filtrante.

25 La invención también comprende un método de determinación de la actividad enzimática de una muestra, comprendiendo el método

- proporcionar un dispositivo de actividad enzimática según se describió anteriormente;
- aplicar una cantidad preseleccionada de la muestra sobre el sustrato de biopolímero;
- permitir que la muestra y el sustrato de biopolímero tengan un tiempo de incubación de al menos aproximadamente 5 segundos, preferiblemente al menos aproximadamente 10 segundos, tal como al menos aproximadamente 30 segundos, tal como al menos aproximadamente 1 minuto;
- observar si se liberan del sustrato de biopolímero fragmentos de colorante y/o de biopolímero portadores de colorante; y
- determinar la actividad enzimática.

35 La determinación de la actividad enzimática puede ser una determinación cualitativa o una determinación cuantitativa. De forma ventajosa, la determinación de la actividad enzimática es una determinación cuantitativa. La determinación se puede efectuar mediante un método que comprenda una calibración, una multiplexación o cualquier método similar de determinación a partir de una lectura óptica o visual.

40 En la forma de realización en la que la estructura de soporte sólida del dispositivo de actividad enzimática es una placa de microtitulación, el método comprende de forma ventajosa la humectación del sustrato de biopolímero antes de añadir la muestra. El sustrato de biopolímero se humedece preferiblemente mediante la adición de un líquido acuoso, tal como el agua, que opcionalmente comprende una solución tampón u otros aditivos adecuados, por ejemplo, surfactantes, y la eliminación de la humedad no absorbida, por ejemplo, mediante aspiración a través del filtro. Opcionalmente, el sustrato de biopolímero se lava una o más veces antes de añadir la muestra para eliminar el exceso de colorante.

45 En una forma de realización en la que la estructura de soporte sólida del dispositivo de actividad enzimática es una placa de microtitulación, el método comprende someter la muestra incubada y el sustrato de biopolímero a una filtración que separe el sustrato de biopolímero no degradado de un filtrado que comprende líquido y fragmentos disueltos o dispersos degradados a partir del sustrato de biopolímero y/o un colorante liberado opcionalmente.

De forma ventajosa, la observación de si el colorante y/o los fragmentos de biopolímero que portan el colorante se

liberan del sustrato de biopolímero se realiza de forma óptica, preferiblemente utilizando un espectroscopio.

5 En la forma de realización en la que la estructura de soporte sólida del dispositivo de actividad enzimática es una placa de dispositivo de flujo lateral, el método comprende añadir líquido acuoso a la muestra incubada y al sustrato de biopolímero, en donde la cantidad de líquido acuoso añadido es suficiente para asegurar la humectación de la membrana.

De forma ventajosa, la observación de si el colorante y/o los fragmentos de biopolímero que portan el colorante se liberan del sustrato de biopolímero se realiza mediante la lectura visual en el lugar de lectura.

10 En la forma de realización, en la que la estructura de soporte sólida del dispositivo de actividad enzimática es un dispositivo microfluídico y la cantidad preseleccionada de la muestra se introduce en el canal de flujo por medio de la entrada.

En una forma de realización, la muestra se extrae hacia el canal de flujo y hacia el sustrato de biopolímero parcial o totalmente mediante fuerzas capilares.

15 De forma ventajosa, la muestra se aspira en el canal de flujo y en el sustrato de biopolímero, preferiblemente presionando y liberando una pared flexible del canal de flujo o del sumidero, opcionalmente presionando y liberando manualmente o utilizando un actuador.

20 En una forma de realización, el método comprende la adición de líquido acuoso por medio de la entrada en el canal, preferiblemente por aspiración a la muestra incubada y al sustrato de biopolímero, en donde la cantidad de líquido acuoso añadido y/o la aspiración es suficiente para asegurar que el líquido llegue a la sección de lectura, por lo que cualesquiera fragmentos teñidos del sustrato de biopolímero degradado o cualquier colorante liberado llega a la sección de lectura y se puede leer por parte del usuario de forma óptica y/o visual.

Todas las características de las invenciones, incluidos los rangos y los rangos preferidos, se pueden combinar de diversas maneras dentro del alcance de la invención, a menos que haya razones específicas para no combinar dichas características.

Breve descripción de los dibujos y ejemplos

25 La invención se explicará con más detalle a continuación en relación con una forma de realización preferida y con referencia a los dibujos en los que:

Las Fig. 1a y 1b muestran un dispositivo de actividad enzimática de una forma de realización de la invención que comprende una estructura de soporte sólida en forma de una placa de multimicrotitulación.

La Fig. 2 muestra una tapa para la estructura de soporte sólida mostrada las Fig. 1a/1b.

30 La Fig. 3A muestra un dispositivo de actividad enzimática de una forma de realización de la invención que comprende una estructura de soporte sólida en forma de un dispositivo de flujo lateral.

La Fig. 3B muestra la estructura de soporte sólida del dispositivo de actividad enzimática de la Fig. 3B.

La Fig. 4 muestra una prueba realizada utilizando el dispositivo de actividad enzimática de la Fig. 3A.

35 La Fig. 5 muestra un dispositivo de actividad enzimática de una forma de realización de la invención que comprende una estructura de soporte sólida en forma de un dispositivo microfluídico.

La Fig. 6 muestra un sistema de ensayo de actividad enzimática de una forma de realización de la descripción.

La Fig. 7a muestra un dispositivo de actividad enzimática de una forma de realización de la invención que comprende una estructura de soporte sólida con la forma de un tubo.

40 La Fig. 7b muestra un dispositivo de actividad enzimática de una forma de realización de la invención que comprende una estructura de soporte sólida con la forma de un tubo con un filtro.

La Fig. 8 muestra los dispositivos de actividad enzimática usados del tipo de dispositivo de actividad enzimática mostrado en la Fig. 7a.

La Fig. 9 muestra dos dispositivos de actividad enzimática del tipo de dispositivo de actividad enzimática mostrado en la Fig. 7b antes o después de su utilización.

45 Las figuras son esquemáticas y se pueden simplificar para mayor claridad. En todas partes se utilizan los mismos números de referencia para partes idénticas o correspondientes. Se debe entender que los ejemplos concretos, si bien indican formas de realización preferidas de la invención, se dan sólo a título ilustrativo.

El dispositivo de actividad enzimática 5 que se muestra en la Fig. 1a se ve en una vista superior y en la Fig. 1b el

dispositivo de actividad enzimática se ve en una vista de sección transversal lateral en la línea A-A' de la Fig. 1a.

El dispositivo de actividad enzimática 5 comprende una placa de multimicrotitulación 5a que comprende varios pocillos 1 dispuestos en una matriz A-H x 1-12. La placa de multimicrotitulación 5a comprende un borde 4 para sostenerla en un soporte adecuado. Los pocillos 1, de la placa de multimicrotitulación 5a tienen un fondo 3 que preferiblemente comprende un filtro que constituye un medio filtrante para separar el líquido del sustrato de biopolímero no degradado. Cada pocillo comprende un sustrato de biopolímero 2 que comprende un xerogel teñido y no soluble en agua que comprende una red de biopolímeros reticulados según se describió anteriormente. En la forma de realización mostrada, los sustratos de biopolímero 2 de los pocillos de las filas A, B, C y D son más pequeños que los sustratos de biopolímero 2 de las filas E, F, G y H.

La Fig. 2 muestra una tapa 6 adecuada para la estructura de soporte sólida 5 mostrada en las Fig. 1a/1b. La tapa 6 comprende varios salientes convexos dispuestos en un patrón correspondiente a los pocillos. De forma ventajosa, la tapa es de un material flexible, tal como el caucho o la silicona. Durante la utilización, la tapa se dispone para cubrir las aberturas de los pocillos y un saliente se inserta en cada pocillo. De esta manera se proporciona una protección adicional del sustrato de biopolímero durante el transporte del dispositivo de actividad enzimática. La tapa 6 también protege de que el sustrato de biopolímero se contamine con suciedad, etc.

El dispositivo de actividad enzimática 10 de la Fig. 3a y la Fig. 3b está compuesto por una estructura de soporte sólida en forma de un dispositivo de flujo lateral. El dispositivo de actividad enzimática 10 comprende una tapadera 11 para la estructura de soporte sólida 10a. La tapadera 11 comprende una abertura de acceso 12 para introducir líquido en un sustrato de biopolímero 12a. La tapadera comprende además una ventanilla de lectura 13 que permite la lectura desde el lugar de lectura.

La estructura de soporte sólida 10a comprende una base rígida 17, que soporta una placa de muestras 14 y una estructura de membrana que comprende varias placas de estructura de membrana 15, 16 de material poroso. Preferiblemente las placas de estructura de membrana 15, 16 tienen porosidades diferentes, de tal manera que el líquido se desplaza muy rápido en la primera placa de estructura de membrana 15 (porosidad más pequeña), mientras que la velocidad de desplazamiento en la segunda placa de estructura de membrana 16 con mayor porosidad, es relativamente baja, mientras que al mismo tiempo la segunda placa de estructura de membrana 16 tiene una capacidad líquida relativamente grande. El lugar de lectura en esta forma de realización está en la segunda placa de estructura de membrana 16.

El dispositivo de actividad enzimática 20 de la Fig. 5 comprende una estructura de soporte sólida en forma de un dispositivo microfluídico que comprende 5 canales de flujo 21 y una entrada común 22 para los canales de flujo 21. Cada canal de flujo 21 comprende un lugar de muestreo que comprende un sustrato de biopolímero 23. Cada canal de flujo 21 comprende un lugar de lectura 24 y está en conexión fluida con una sección de sumidero 25. En la forma de realización mostrada, los lugares de lectura se amplían para contener una cantidad relativamente grande de líquido en comparación con la cantidad de líquido que puede haber en el lugar de muestreo. De esta manera, es fácil evitar que el colorante/fragmentos liberados con el colorante sean arrastrados a la sección de sumidero 25. En una forma de realización alternativa, el lugar de lectura tiene la misma área de sección transversal que el lugar de muestreo.

Durante la utilización, la muestra se añade a la entrada 5 y mediante fuerzas capilares se pone en contacto con los sustratos de biopolímero 23 en cada canal 25. Después de un tiempo de incubación predeterminado, se aspira agua o solución tampón en los canales 21, presionando una película no mostrada que cubre las secciones de sumidero 25 y si el sustrato de biopolímero se ha degradado, el colorante o los fragmentos liberados que comprenda el colorante serán visibles en los lugares de lectura 24.

El sistema de ensayo de actividad enzimática 30, mostrado en la Fig. 6, comprende un dispositivo de actividad enzimática 5, según se muestra en la Fig. 1a/1b, y un colector filtrante 31, que comprende cavidades para recoger el filtrado de los pocillos 1. Las cavidades del colector filtrante 31 se disponen de forma similar a la disposición de la matriz de los pocillos del dispositivo de actividad enzimática 5, por lo que el líquido de un pocillo 1 se recogerá en una cavidad selectiva del colector filtrante 31. El colector filtrante 31 del dispositivo de actividad enzimática 5 se monta en un soporte 35, de tal manera que el filtrado que pase por los medios del filtrado del fondo 3 del dispositivo de actividad enzimática 5 se recogerá en las respectivas cavidades del colector filtrante 31. Una disposición de vacío 36 se conecta al soporte 35 para que el filtrado sea aspirado a través de los fondos 3 de los pocillos.

Un espectroscopio 32, que comprende un brazo móvil 33 y un cabezal de espectroscopio para recoger la luz, se dispone para medir las longitudes de onda emitidas, reflejadas o transmitidas a través del filtrado recogido en las cavidades respectivas del colector filtrante 31.

Una fuente de luz no mostrada se puede disponer de forma ventajosa para iluminar el filtrado recogido.

El dispositivo de actividad enzimática mostrado en la Fig. 7a comprende una estructura de soporte sólida en forma de un tubo 41 con una tapadera 42 y un sustrato de biopolímero 43 como se describió anteriormente dispuesto dentro del tubo

El dispositivo de actividad enzimática mostrado en la Fig. 7b comprende una estructura de soporte sólida en forma de

un tubo 51 con una tapadera 52. El tubo 51 comprende una estructura de tubo principal 56 y un inserto 55 con un filtro 54 en su parte inferior. El dispositivo de actividad enzimática comprende además un sustrato de biopolímero 53 según se describió anteriormente dispuesto dentro del inserto 55. La estructura de tubo principal 56 tiene una sección superior y una sección inferior en la que se inserta el filtro en la sección superior, de tal manera que el filtro se encuentra por encima de la sección inferior.

La Fig. 8 muestra una fila de 8 dispositivos de actividad enzimática utilizados del tipo de dispositivo de actividad enzimática mostrado en la Fig. 7a. El sustrato 43 utilizado en estos dispositivos era un sustrato de biopolímero de oligosacáridos teñido de rojo que era degradable por xilanasas. La muestra líquida sin endo-xilanasas activa se añadió a los 4 dispositivos de actividad enzimática de la izquierda y la muestra líquida con endo-xilanasas activa se añadió a los 4 dispositivos de actividad enzimática restantes. Se cerraron las tapaderas y los dispositivos de actividad enzimática se agitaron manualmente durante aproximadamente 10 segundos. Según se observa las 4 muestras de la izquierda no degradaron el sustrato - el sustrato simplemente fue dañado mecánicamente por la agitación. Las 4 muestras restantes, sin embargo, mostraron claramente que el sustrato estaba degradado y que el colorante que comprende el fragmento soluble o dispersable del biopolímero se distribuyó uniformemente en el fluido de la muestra. La degradación resultante se puede examinar más a fondo mediante espectrometría según se describió anteriormente.

La Fig. 9 muestra dos dispositivos de actividad enzimática en la imagen de la izquierda antes de su utilización. Los dispositivos de actividad enzimática son del tipo mostrado en la Fig. 7b, es decir, un tubo que comprende un filtro.

Se añadió una muestra con actividad enzimática para el sustrato de biopolímero en uno de los dispositivos de actividad enzimática B y se añadió una muestra sin actividad enzimática para el sustrato de biopolímero en uno de los dispositivos de actividad enzimática A. Los dos dispositivos de actividad enzimática se centrifugaron (se hicieron girar) y fue recogido un filtrado que comprendía un colorante opcional o un enlace de colorante a los fragmentos de biopolímero en la sección inferior 51b de los respectivos dispositivos de actividad enzimática A y B. Se observa claramente que no había actividad enzimática de la muestra añadida al sustrato biopolimérico del dispositivo A, mientras que la muestra añadida al sustrato de biopolímero del dispositivo B tenía una alta actividad enzimática. La actividad enzimática se puede cuantificar aún más mediante espectrometría, según se describió anteriormente.

Ejemplo 1

Comparación de la variación de volumen de la placa de producto utilizando hidrogel fresco no seco y sustratos de xerogel liofilizados

De acuerdo con la invención, se ha descubierto que al utilizar sustratos de hidrogel frescos y no secos, fue descubierto que el hidrogel absorbe o comprende una cantidad excesiva de agua con un grado de hinchazón variable e impredecible.

Al liofilizar el hidrogel para obtener sustratos de xerogel de acuerdo con una forma de realización de la invención, los sustratos no se hinchan de nuevo a su volumen original cuando se vuelven a suspender en agua/solución tampón.

Se llevó a cabo un experimento con sustratos frescos (hidrogel no seco) y con sustratos liofilizados de acuerdo con una forma de realización de la invención, en los que los sustratos fueron degradados parcialmente y fueron medidos los volúmenes de recuperación de los sobrenadantes del producto.

El experimento fue llevado a cabo con 12 sustratos diferentes.

La tabla 3 muestra un análisis estadístico de la comparación de la variación de volumen entre ensayos realizados con sustratos frescos y liofilizados

TABLA 3

A		MEDIA	
	SEM DEL VOLUMEN FRESCO SIN ENZIMA	2,5	
	SEM DEL VOLUMEN LIOFILIZADO SIN ENZIMA	1,2	
	SEM DEL VOLUMEN FRESCO CON ENZIMA	7,4	
	SEM DEL VOLUMEN LIOFILIZADO CON ENZIMA	1,0	
	SEM DEL VOLUMEN SIN SUSTRATO	0,3	
B		MEDIA	SEM
	% DE DESVIACIÓN DE VOLUMEN FRESCO SIN ENZIMA	25,8	4,3
	% DE DESVIACIÓN DE VOLUMEN LIOFILIZADO SIN ENZIMA	8,1	3,2
	% DE DESVIACIÓN DE VOLUMEN FRESCO CON ENZIMA	25,6	4,5
	% DE DESVIACIÓN DE VOLUMEN LIOFILIZADO CON ENZIMA	9,3	3,1
	% DE DESVIACIÓN DEL VOLUMEN SIN SUSTRATO	0,9	0,7

El análisis del error estándar medio de las medias (SEM) de la tabla 1 (panel A) muestra que los valores de los sustratos liofilizados sin (1,2 µl) y con la enzima (1,0 µl) son inferiores a los valores de los mismos ajustes con los sustratos frescos (2,5 µl y 7,4 µl, respectivamente).

- 5 Para ver cómo este efecto beneficioso de la liofilización es beneficioso para el ensayo, se realizó un análisis de desviación de volumen en el que se analizó estadísticamente la desviación del volumen recuperado del volumen añadido (Tabla 3, panel B). Se observa que los valores medios de los sustratos frescos sin y con tratamiento enzimático (25,8 % y 25,6 %) son significativamente más altos que los de los sustratos liofilizados (8,1 % y 9,3 %, respectivamente).
- 10 El valor "Sin sustrato" tiene en cuenta la cantidad de líquido que se pierde si sólo se añade el líquido a un pocillo vacío y luego se filtra en un plato de recogida. La diferencia entre el volumen añadido y el volumen recuperado es el valor "Sin sustrato".

Ejemplo 2

Rehinchado después de la liofilización

- 15 Se prepararon 12 hidrogeles diferentes de biopolímeros reticulados. Los hidrogeles se denominan como CPH-X, donde X indica el biopolímero reticulado obtenido a partir de fuentes naturales correspondientes a las fuentes enumeradas en la tabla 1 (amarillo CPH-caseína, amarillo CPH-galactano péptico, amarillo CPH-lichenán, amarillo CPH-arabinosilano, amarillo CPH-amilosa, amarillo CPH-galactomanano, azul CPH-dextrano, azul CPH-arabinan, azul CPH-beta-glucano (cebada), azul CPH-galactano péptico, azul CPH-amilopectina, azul CPH-arabinosilano). Los
- 20 sustratos CPH se transfirieron a una placa filtrante de 96 pocillos (8 réplicas por sustrato CPH). El agua adicional fue eliminada por centrifugación. La placa que contiene el sustrato CPH fue congelada a -80 °C y luego liofilizada.

No se añadió ningún conservante/estabilizador en esta medición, porque no queríamos confundir los datos con la masa añadida de un compuesto adicional.

Sin sustratos	51,35 g
Peso de la placa con el sustrato	66,12 g
Después de la centrifugación (10 min a toda velocidad)	59,48 g
Peso de la placa después de la liofilización	51,59 g
Activación (añadiendo 200 µl de agua a cada pocillo) durante 25 min	70,50 g
Después de la filtración al vacío	56,23 g
Después de la centrifugación (2 min a toda velocidad)	55,26 g

- 25 Para explicar mejor los datos, el peso de una placa filtrante vacía es de 51,35 g y después de que se hayan añadido los sustratos frescos pesaba 66,12 g (lo que supone 14,77 g adicionales y es el peso de 96 pocillos llenos de sustratos). El agua adicional se eliminó por centrifugación dejando 59,48 g, lo que significa que el peso de los sustratos de hidrogel frescos no secos sin agua adicional es de 8,13 g.

- 30 Después de la liofilización, el peso de la placa de sustrato fue reducido a 51,59 g, lo que significa que el peso de los sustratos cuando están secos es de 0,24 g.

Fue añadida agua a los sustratos secos, se incubaron durante 25 minutos y luego se eliminaron mediante filtración al vacío para obtener un peso de 56,23 g, lo que significa que los sustratos han absorbido 4,64 g de agua.

Mediante centrifugación, se podría eliminar algo de agua adicional de los sustratos rehinchados (denominados como "sustratos CPX"), lo que produciría 3,67 g de sustrato rehinchado.

- 35 Analizando estas medidas, descubrimos:

- El sustrato fresco, de hecho, sólo contiene un 3% de peso seco de sustrato, el resto es agua.
- Cuando se liofiliza y se vuelve a hinchar durante 25 minutos en agua desionizada - el sustrato se vuelve a hinchar sólo hasta el 45 % de su contenido de agua original

Ejemplo 3

Dispositivo de flujo lateral

5 Fue proporcionado un dispositivo de actividad enzimática que comprende una estructura de soporte sólida en forma de un dispositivo de flujo lateral, según se muestra en las Fig. 3A y 3B. El sustrato de biopolímero 12a soportado en la placa de muestras 14 era un sustrato de CPX-xilano.

Fue añadida una muestra líquida que comprendía la correspondiente enzima xilanasas al sustrato de biopolímero 12a y le fue permitido un tiempo de incubación de 5 minutos.

10 Durante el tiempo de incubación la xilanasas degradó el sustrato CPX-xilano y produjo una solución coloreada, que comenzó a migrar a lo largo de la primera placa de estructura de membrana 15 según se muestra en la Fig. 4. Posteriormente, fueron añadidos 100 µl de agua al sustrato de biopolímero 12a y el sobrenadante coloreado (producto de la reacción) se desplaza hacia la segunda placa de estructura de membrana 16. Después de 10 minutos la segunda placa de membrana 16 que comprende el lugar de lectura, está coloreada, lo que será visible a través de la ventana de lectura 13. Si el sustrato no es degradado por la enzima, no se libera ningún sobrenadante coloreado y la membrana permanece incolora según se muestra en el control. (Control después de 10 min, Fig. 4).

15 Ejemplo 4

Producción de sustrato CPX con estabilizador

20 El biopolímero xiloglucano se obtiene a partir del tamarindo. Dicho biopolímero se puede adquirir, por ejemplo, en Megazyme International, Irlanda: El biopolímero se disuelve en hidróxido de sodio acuoso (hidróxido de sodio 0,5 M) a temperatura ambiente o calentándolo a 65 °C si es necesario para su completa disolución. Para aumentar la disolución, es conveniente someterlo a agitación a 120 rpm. Después de que la disolución esté completa, se añade el colorante. Se pueden seleccionar diferentes colorantes (ejemplos: rojo reactivo 4, verde reactivo 19, azul reactivo 49, amarillo reactivo 2) y la disolución se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación a 120 rpm.

Después de eso, se añade el reticulador (1, 4-butanediol diglicidil éter), la mezcla de reacción se vortea brevemente y la mezcla de reacción se deja reposar durante 3 días y durante ese tiempo - se forma un aerogel.

25 A continuación, se homogeneiza el aerogel, por ejemplo, utilizando una espátula para dividir de este modo el hidrogel. El tamaño deseado de las partículas de hidrógeno se puede seleccionar por el experto en la técnica. Dividiendo el hidrogel se puede obtener un tamaño de poro más uniforme del xerogel final.

Posteriormente, el hidrogel se lava con agua caliente (80-100 °C) hasta que se elimine todo el exceso de colorante. A continuación, se almacena el aerogel a +4 °C.

30 El aerogel se transfiere a los pocillos (100-150 µl por pocillo) de una placa filtrante de 96 pocillos utilizando una pipeta y se agrega 15 µl de un estabilizador encima de cada parte de pocillo de aerogel. El estabilizador comprende un 0,5% de PVP-360 y/o un 1% de PVP-40. A continuación, la placa se congela a -80 °C durante al menos 30 minutos y se liofiliza durante la noche.

35 Se observará que se obtiene un sustrato de biopolímero de xerogel muy estable y fuerte mecánicamente. El estabilizador asegurará que el sustrato de biopolímero no se dañe durante el transporte del dispositivo de actividad enzimática t.

Ejemplo 5

Utilización del sustrato CPX con estabilizador

La placa que contiene el sustrato CPX seco se puede almacenar a temperatura ambiente hasta su utilización.

40 Durante la utilización, el sustrato CPX se activa añadiendo 200 µl de agua a cada pocillo y se deja incubar durante 15 min. El sustrato CPX seco será restaurado en un hidrogel, pero con una estructura de poros diferente a la que tenía antes del secado según se explicó anteriormente. El agua restante se elimina por filtración al vacío o centrifugación. Después de eso, el sustrato se lava dos veces con 100 µl de agua para eliminar el estabilizador.

45 El experimento se realiza añadiendo la muestra en una solución tampón apropiada (entre pH 3,0-10,0) con un volumen total entre 150-200 µl. Para evitar una evaporación no deseada se puede añadir una tapadera de plástico en la parte superior del pocillo antes de incubar en un tiempo predeterminado (entre 10 min - 24 h) y a una temperatura (hasta 90 °C). La placa se agita de forma ventajosa (alrededor de 150 rpm) durante la reacción. La reacción se detiene separando el sobrenadante del sustrato no degradado (utilizando filtración al vacío o centrifugación). El filtrado se recoge en una placa Elisa (colector filtrante) y se cuantifica utilizando un espectrofotómetro.

Tablas

Tabla 1. Ejemplos de sustratos CPX adecuados para formas de realización del dispositivo de actividad enzimática de la invención.

Sustrato	Fuente
CPX-2-hidroxietilcelulosa (celulosa CPX-HE)	N/A
CPX-amilopectina	patata
CPX-amilosa	patata
CPX-arabinan	remolacha azucarera
CPX-arabinoxilano	trigo
CPX-caseína	leche de vaca
CPX-curdlán	<i>Alcaligenes faecalis</i>
CPX-dextrano	<i>Leuconostoc spp.</i>
CPX-galactomanano	algarrobo
CPX-laminarina	<i>Laminaria digitata</i>
CPX-lichenan	Musgo de Islandia
CPX-pachyman	<i>Poria cocos</i>
CPX-galactano péctico	patata
CPX-pullulan	<i>Aureobasidium pullulans</i>
CPX-rhamnogalacturonano I	patata
CPX-rhamnogalacturonano I (-Gal)*	patata
CPX-rhamnogalacturonano	brote de soja
CPX-xilano	hayedo
CPX-xiloglucano	tamarindo
CPX- β -glucano de cebada	cebada
CPX- β -glucano de avena	avena
CPX- β -glucano de la levadura	levadura

* (cadenas laterales β -1,4-D-galactano eliminadas con endo-galactanasa gal)

Tabla 2. Ejemplos de enzimas que se pueden probar para utilizar con un dispositivo de actividad enzimática dentro del alcance de la invención, incluyendo el código, la fuente y la familia de la base de datos de enzimas activas de carbohidratos (CAZy)

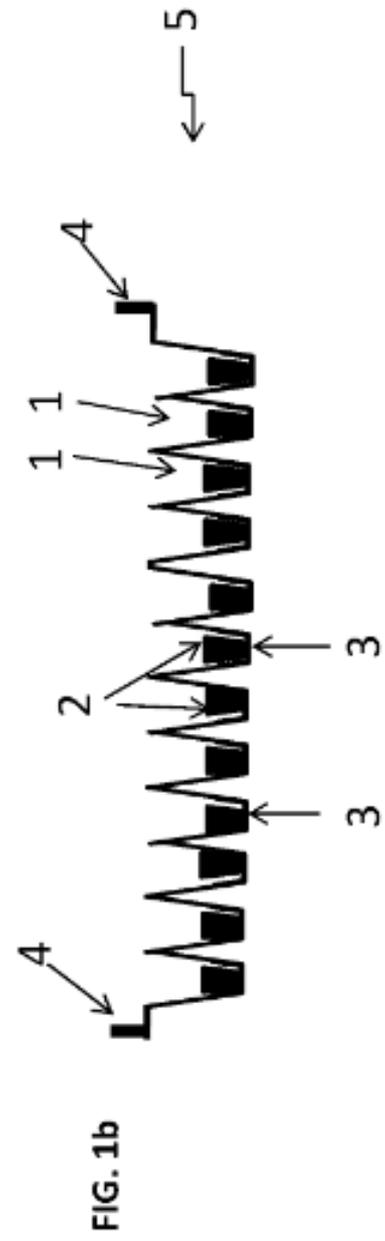
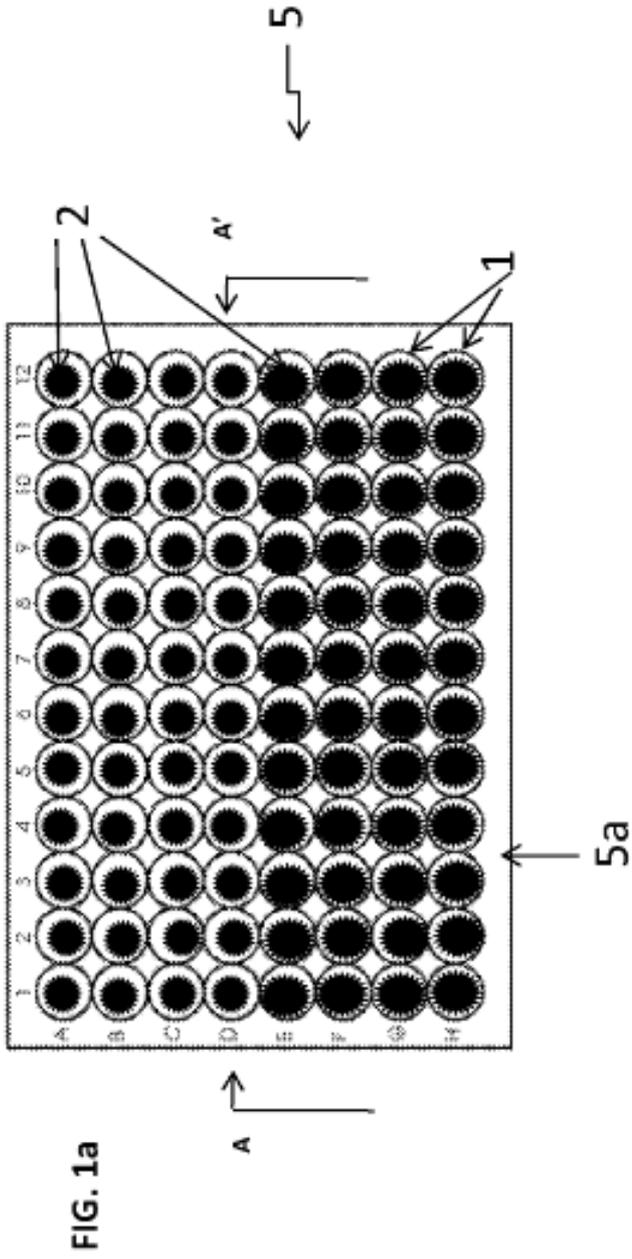
Nombre en clave	Descripción	familia CAZy	Fuente
ara	Endo-arabinasa (<i>Aspergillus niger</i>)	GH43	Megazyme
cel1	Endocelulasa (endo- β -1,4-glucanasa) (<i>Trichoderma longibrachiatum</i>)	GH7	Megazyme
cel2	Celulasa (endo- β -1,4-glucanasa) (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	GH5	Megazyme
Gal	Endo- β -1,4-D-galactanasa (<i>Aspergillus niger</i>)	GH53	Megazyme
glc	Endo- β -1,3-glucanasa (<i>Trichoderma sp.</i>)	GH16	Megazyme
lie	Lichenasa (endo- β -1,3(4)-glucanasa) (<i>Bacillus sp.</i>)	GH16	Megazyme
man	Endo- β -1,4-manasa (<i>Cellvibrio japonicus</i>)	GH26	Megazyme
nz1	Endo- β -1,4-xilanasa (<i>Aspergillus aculeatus</i>)	GH10	Novozymes
nz2	Endo- β -1,4-xilanasa (<i>Thermomyces lanuginosus</i>)	GH11	Novozymes
nz3	Endo- β -1,4-glucanasa (<i>Aspergillus aculeatus</i>)	GH5	Novozymes
nz4	El hongo patentado endo- β -1,4-mananasa	GH5	Novozymes
ply1	Macerase™ Pectinasa (<i>Rhizopus sp.</i>)	N/A	Calbiochem
ply2	Pectoliasa Y-23 (<i>Aspergillus japonicus</i>)	N/A	Bioquímica Duchefa
ply3	Pectoliasa (<i>Aspergillus japonicus</i>)	N/A	Sigma
pec1	Pectato liasa (<i>Cellvibrio japonicus</i>) (<i>Cellvibrio japonicus</i>)	PL10	Megazyme
pec2	Pectato liasa (<i>Aspergillus sp.</i>)	N/A	Megazyme
pol1	Endopoligalacturonasa M2 (<i>Aspergillus niger</i>)	GH28	Megazyme
pol2	Endopoligalacturonasa M1 (<i>Aspergillus niger</i>)	GH28	Megazyme
rgl	Rhamnogalacturonano hidrolasa (<i>Aspergillus aculeatus</i>)	GH28	Novozymes
xg	Xiloglucanasa (<i>Paenibacillus sp.</i>)	GH5	Megazyme
xyl1	P-xilanasa, M4 (<i>Aspergillus niger</i>)	GH11	Megazyme
xyl2	Endo-p-1,4-xilanasa M1 (<i>Trichoderma viride</i>)	GH11	Megazyme
NcLPMO9C	Monoxigenasa polisacárida lítica (<i>Neurospora crassa</i>)	AA9	N/A
Caldo	Caldo de cultivo de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (3d después de la inoculación)	N/A	N/A
Proteinasa K	Proteinasa K (álbum <i>Tritirachium</i>)	N/A	Sigma
Tripsina	Tripsina del páncreas bovino	N/A	Sigma
Elastasa	Elastasa del páncreas porcino	N/A	Sigma

- 5 En lo que antecede se han mostrado algunas formas de realización preferidas, pero cabe destacar que la invención no se limita a éstas, sino que puede realizar de otras maneras dentro de la materia de estudio definida en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un dispositivo de actividad enzimática adecuado para la determinación de la actividad de degradación enzimática de los biopolímeros en una muestra líquida, comprendiendo dicho dispositivo de actividad enzimática un sustrato de biopolímero y una estructura de soporte sólida que soporta dicho sustrato de biopolímero en donde dicho sustrato de biopolímero comprende un xerogel no soluble en agua que comprende una red de biopolímeros reticulados y en donde el sustrato de biopolímero comprende un colorante unido químicamente al biopolímero.
2. El dispositivo de actividad enzimática de la reivindicación 1, en donde el xerogel tiene una densidad desde aproximadamente 0,02 g/cm³ hasta aproximadamente 0,5 g/cm³.
- 10 3. El dispositivo de actividad enzimática de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la estructura de soporte sólida se selecciona a partir de un pocillo que contiene una placa de prueba, un tubo, un dispositivo de flujo lateral o un dispositivo microfluídico.
4. El dispositivo de actividad enzimática de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el sustrato de biopolímero comprende biomoléculas poliméricas reticuladas seleccionadas a partir de polinucleótidos, polipéptidos, polisacáridos o cualquier combinación de los mismos.
- 15 5. El dispositivo de actividad enzimática de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los biopolímeros comprenden varios enlaces degradables por enzimas, preferiblemente al menos aproximadamente el 50 % de dichos enlaces degradables por enzimas son degradables por enzimas idénticas.
6. El dispositivo de actividad enzimática de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los biopolímeros comprenden varios enlaces degradables por enzimas, preferiblemente al menos aproximadamente el 75 % son exclusivamente degradables por enzimas por un tipo de enzima.
- 20 7. El dispositivo de actividad enzimática de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el xerogel se puede obtener a partir de un proceso que comprende la reticulación y el teñido de varias biomoléculas poliméricas en un fluido acuoso para formar un hidrogel, congelando el hidrogel a una temperatura inferior a aproximadamente - 25 °C y liofilizando el hidrogel.
- 25 8. El dispositivo de actividad enzimática de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el xerogel tiene una porosidad (fracción gaseosa) desde aproximadamente el 20 % hasta aproximadamente el 85 %.
9. El dispositivo de actividad enzimática de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el xerogel tiene un volumen, que es aproximadamente el 90 % o menos con respecto al volumen del gel a partir del que se obtiene el xerogel por secado.
- 30 10. El dispositivo de actividad enzimática de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el xerogel tiene un área superficial de al menos aproximadamente 100 m²/g.
11. El dispositivo de actividad enzimática de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el sustrato de biopolímero comprende un estabilizador para estabilizar el xerogel, comprendiendo dicho estabilizador al menos un polímero orgánico y siendo soluble en un líquido que, en esencia, no disuelve ni degrada el xerogel.
- 35 12. El dispositivo de actividad enzimática de la reivindicación 11, en donde el estabilizador es soluble en un líquido acuoso y/o alcohólico, tal como el agua, el etanol o una combinación de los mismos.
13. El dispositivo de actividad enzimática de una cualquiera de las reivindicaciones 11-12, en donde el estabilizador se sitúa predominantemente en un área de la superficie exterior del xerogel.
- 40 14. El dispositivo de actividad enzimática de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes 3-13, en donde el pocillo que contiene la placa de prueba es una placa de microtitulación filtrante que comprende los medios filtrantes, disponiéndose los medios filtrantes de tal manera que el líquido y preferiblemente los fragmentos opcionales degradados a partir del sustrato de biopolímero y dispersados o disueltos por el líquido pueden pasar a través de los medios filtrantes.
- 45 15. El dispositivo de actividad enzimática de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-13, en donde la estructura de soporte sólida tiene la forma de un tubo, comprendiendo el tubo un filtro, preferiblemente el tubo comprende una estructura de tubo principal y un inserto filtrante para ser insertado en la estructura de tubo principal.
- 50 16. El dispositivo de actividad enzimática de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-13, en donde la estructura de soporte sólida tiene la forma de un dispositivo de flujo lateral que soporta dicho sustrato de biopolímero, y en donde el dispositivo de flujo lateral comprende un soporte rígido que lleva una placa de muestras y una estructura de membrana dispuestas para formar una vía, en donde dicho sustrato de biopolímero se dispone sobre dicha placa de muestras, dicha placa de muestras es, en esencia, no absorbente de líquidos, preferiblemente la placa de muestras tiene una superficie hidrofóbica que soporta el sustrato de biopolímero.

- 5 17. El dispositivo de actividad enzimática de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-13, en donde la estructura de soporte sólida tiene la forma de un dispositivo microfluídico que soporta dicho sustrato de biopolímero, en donde el dispositivo microfluídico comprende al menos un canal de flujo que comprende una entrada para la alimentación de fluido en el canal de flujo, comprendiendo dicho canal de flujo un lugar de muestreo que comprende dicho sustrato de biopolímero.
18. Un método de determinación de la actividad enzimática de una muestra, comprendiendo el método
- proporcionar un dispositivo de actividad enzimática que comprende un sustrato de biopolímero y una estructura de soporte sólida que soporta dicho sustrato de biopolímero en donde dicho sustrato de biopolímero comprende un xerogel teñido y no soluble en agua que comprende una red de biopolímeros reticulados;
- 10 - aplicar una cantidad preseleccionada de la muestra sobre el sustrato de biopolímero;
- permitir que la muestra y el sustrato de biopolímero tengan un tiempo de incubación de al menos aproximadamente 5 segundos, preferiblemente al menos aproximadamente 10 segundos, tal como al menos aproximadamente 30 segundos, tal como al menos aproximadamente 1 minuto;
- 15 - observar si se liberan del sustrato de biopolímero fragmentos de colorante y/o de biopolímero portadores de colorante; y
- determinar la actividad enzimática.



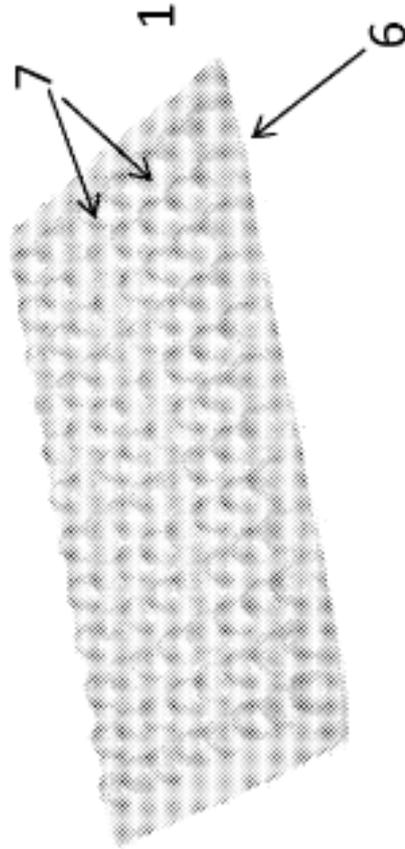


FIG. 2

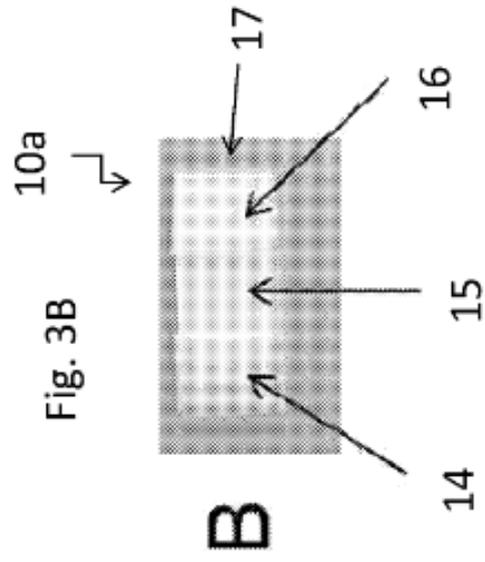
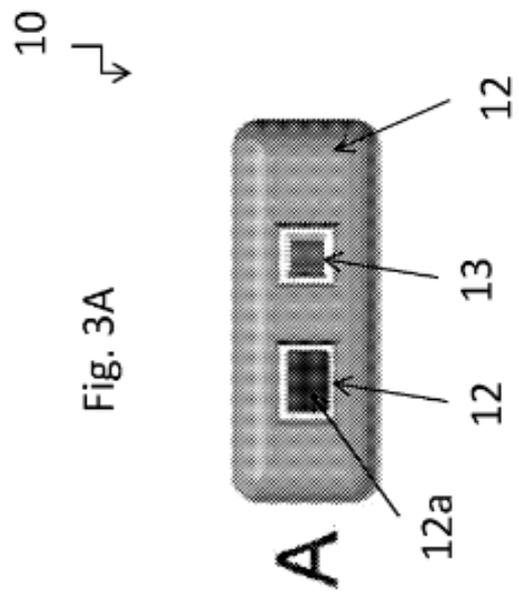
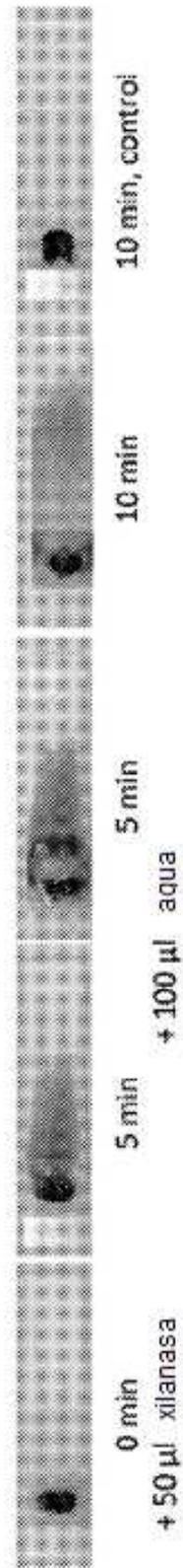


Fig. 4



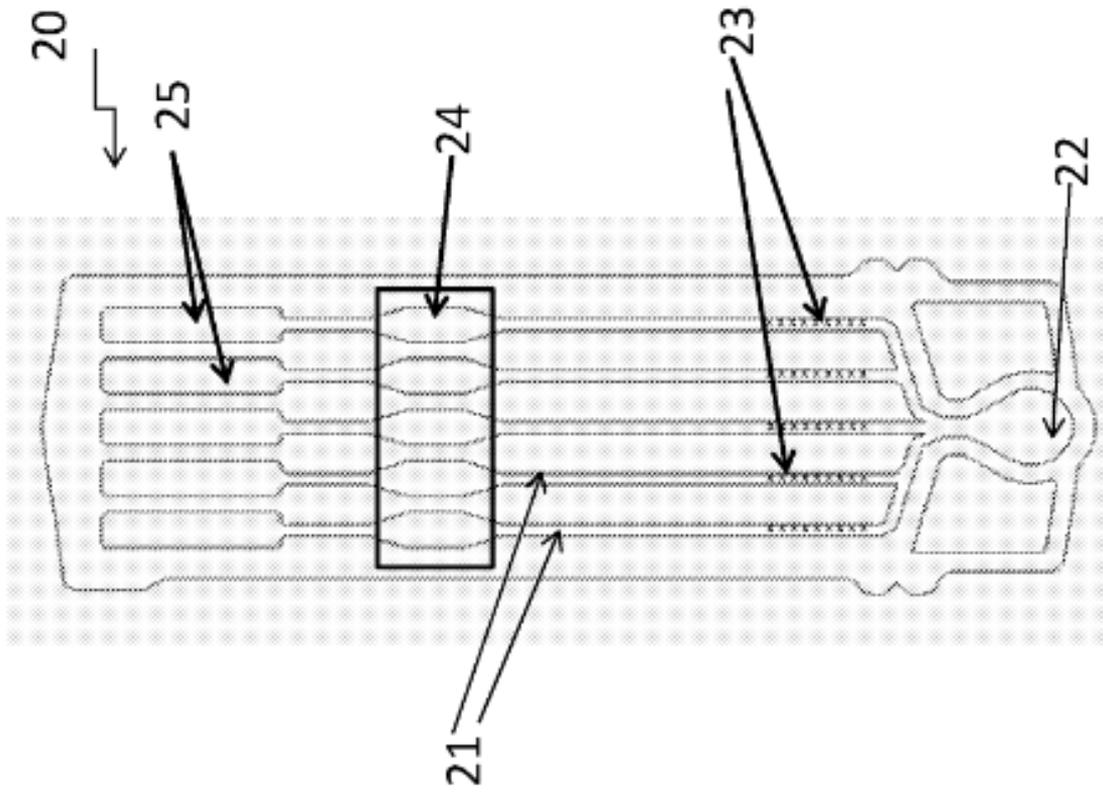


Fig. 5

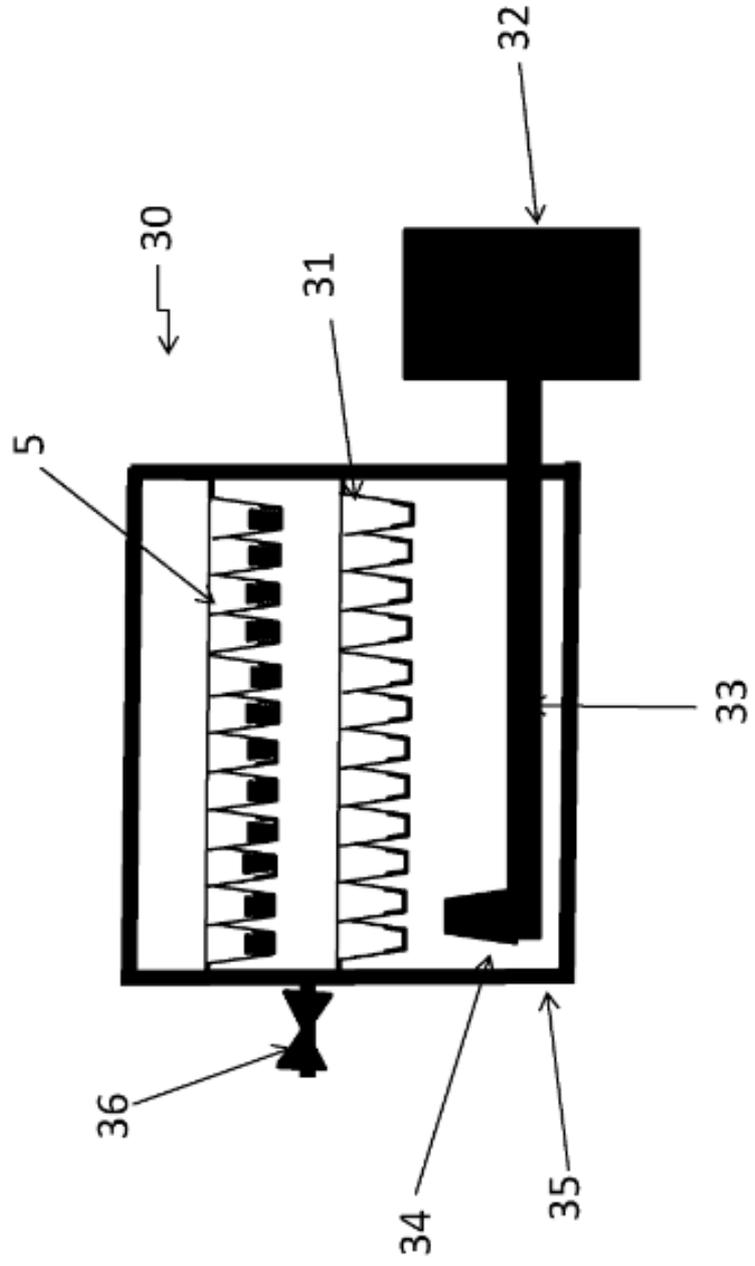


Fig. 6

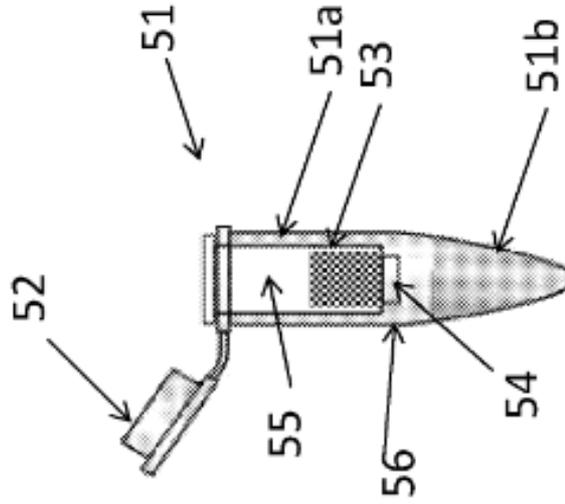


Fig. 7a

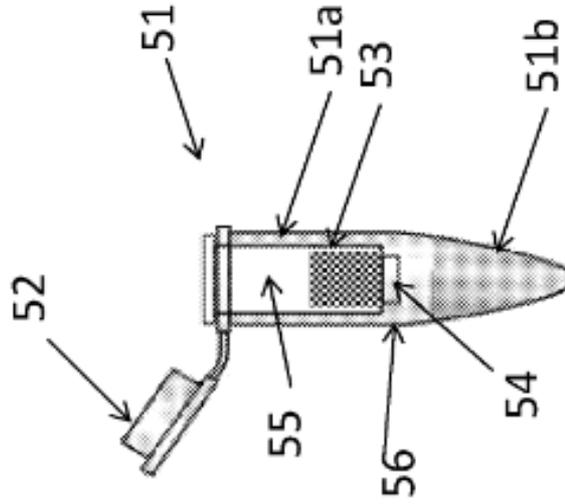


Fig. 7b

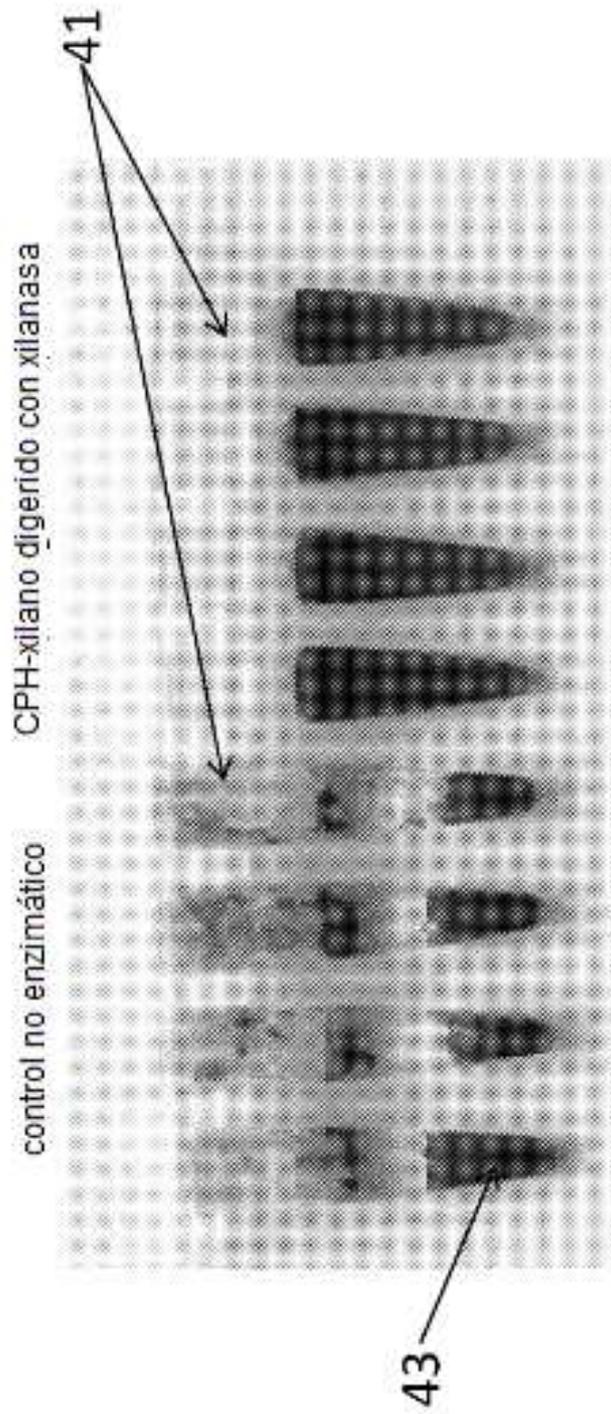


Fig. 8

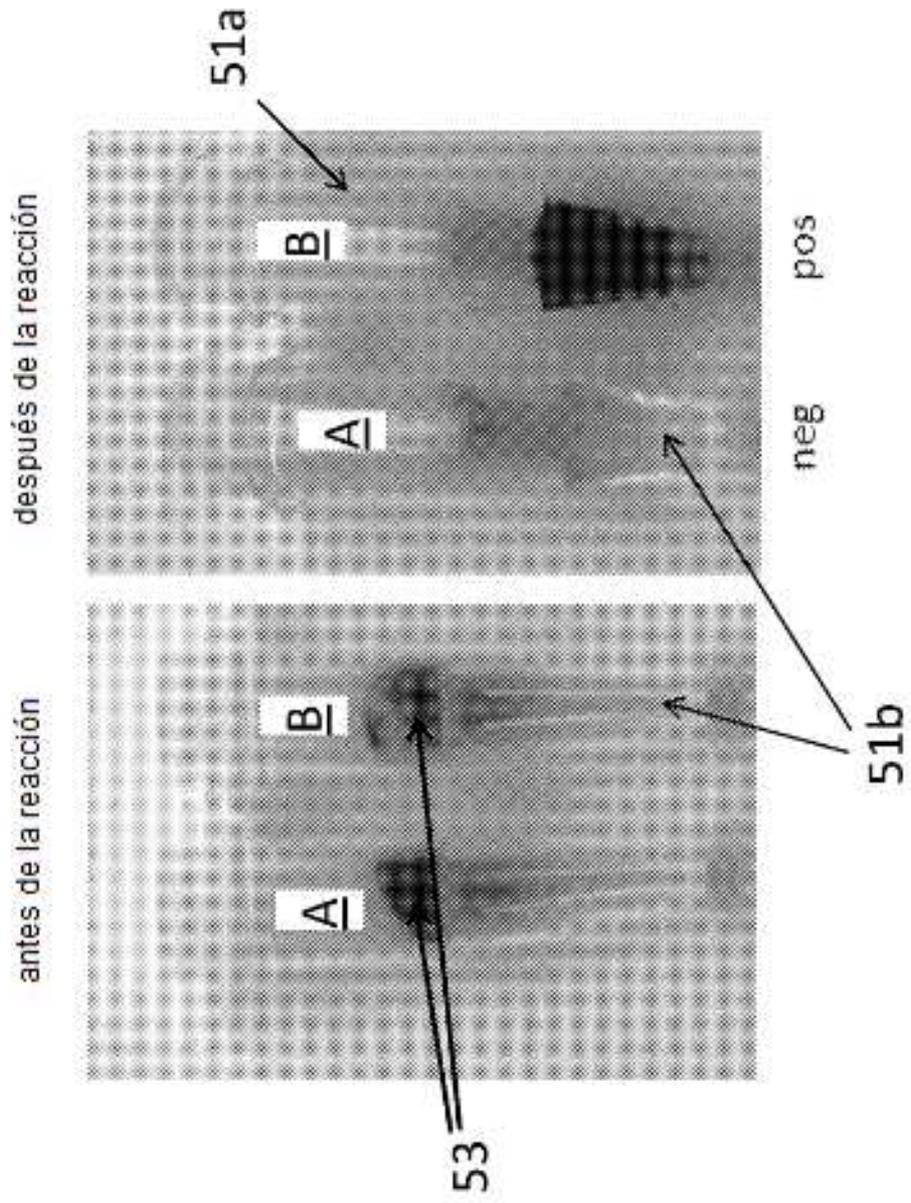


Fig. 9