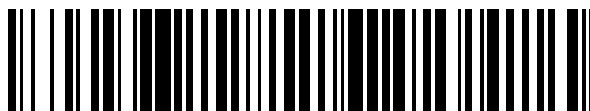


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 295**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/37 (2006.01)

A23K 20/189 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2014 PCT/US2014/023222**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2014 WO14164687**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2014 E 14779286 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 2983497**

54 Título: **Métodos y kits para detectar la actividad de proteasa en muestras complejas**

30 Prioridad:

11.03.2013 US 201361775947 P

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

28.05.2019

73 Titular/es:

**BIORESOURCE INTERNATIONAL, INC. (100.0%)
4222 Emperor Blvd. 460
Durham, NC 27703, US**

72 Inventor/es:

**WANG, JENG-JIE;
TALBOT, BONNYE y
KACZOWKA, STEVEN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 714 295 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

Métodos y kits para detectar la actividad de proteasa en muestras complejas

Campo técnico

5 La presente descripción se refiere a un método para detectar la actividad de proteasa en una muestra compleja. Particularmente, la presente descripción se refiere a un método para detectar la actividad de proteasa en un pienso o en una muestra alimentaria.

Antecedentes

10 Las proteasas se añaden habitualmente a los piensos animales para incrementar la digestibilidad de las proteínas del pienso. En algunos casos, la proteasa se añade al pienso antes del procedimiento de granulación, que implica calentar la mezcla de pienso a altas temperaturas (70°C - 95°C o superior). En otros casos, la enzima proteasa se pulveriza sobre el pienso y/o se mezcla con el mismo. De cualquier manera, con frecuencia resulta deseable medir el nivel de actividad de proteasa en el producto pienso para garantizar que realmente se ha añadido la proteasa, de que la proteasa se ha añadido en la cantidad correcta y que la proteasa ha sobrevivido al procedimiento de granulación y/o mezcla.

15 Se conocen numerosos métodos para la detección de la actividad de proteasa en muestras y los métodos con frecuencia se basan en la utilización de sustratos proteicos naturales, sustratos peptídicos sintéticos o sustratos análogos de péptidos marcados con un cromóforo, un fluoróforo o un radioisótopo para detectar la actividad de proteasa ("MEGAZYME: Assay of endo-Protease using Protazyme AK tablets", noviembre de 2008, véase <http://www.libros.fr/tzr/scripts/downloader2.php?filename=PRODUITS/notice/c2/76/FR.4e75zqcfqfca&mime=application/pdf&originalname=T-PRAK1000.pdf&moid=31>; K Ranfft y H Pfeiffer: "Methode zur Bestimmung proteolytischer Enzyme in Futtermitteln mit gefärbten Substraten", LANDWIRTSCHAFTLICHE FORSCHUNG, vol. 4, 1981, páginas 251-257; B V McCLEARY: "Chapter 4: Analysis of feed enzymes", en: M R BEDFORD, G PARTRIDGE (eds.): "ENZYMES IN FARM ANIMAL NUTRITION", 1a edición, 2001, CAB International, Wallingford, páginas 85-108). Sin embargo, el problema de medir la actividad de proteasa que ha sido añadida a productos de pienso es que los componentes naturales del pienso, incluyendo sustratos proteicos endógenos en el pienso, pueden competir con el sustrato marcado que se utiliza para detectar y medir la actividad de proteasa. Este problema genera un reto significativo de ensayo de la actividad de proteasa en el pienso.

20 Por ejemplo, las tabletas PROTAZYME AK de MEGAZYME, INC. Resultan útiles para cuantificar la actividad de las proteasas puras, tales como VERSAZYME (BIORESOURCE INTERNATIONAL, INC.), RONOZYME PROACT (RONOZYME, INC.) y AXTRA 102 TPT XAP (DANISCO, INC.) previamente a la adición como aditivos al pienso. Sin embargo, la fabricación identifica las limitaciones de utilizar el sustrato PROTAZYME AK para medir la actividad de proteasa una vez se ha añadido al pienso (véase http://secure.megazyme.com/files/FAQ_%27s/T-PRAK1000_1204_FAQ.pdf). En un intento de evitar el problema de que el pienso inhiba la medición de la actividad de proteasa, los métodos actuales requieren etapas para extraer en primer lugar la proteasa añadida respecto del pienso y después separar el pienso insoluble del extracto soluble que contiene proteasa. Las etapas de extracción y separación añaden un nivel de complejidad al ensayo en el pienso que resulta en la necesidad de equipos complejos, tales como, por ejemplo, una trituradora, un micropipeteador, un espectrofotómetro y una centrífuga. La utilización de tales equipos incrementa el coste del ensayo habitualmente también requiere que la muestra se envíe desde la instalación de procesamiento de pienso a un laboratorio que se monta para llevar a cabo el ensayo. En consecuencia, esto incrementa drásticamente el tiempo necesario para obtener los resultados de ensayo.

25 Por consiguiente, sigue existiendo una necesidad no satisfecha de un ensayo de proteasa en el pienso/en el alimento que pueda llevarse a cabo *in situ* y sin necesidad de equipos complejos. El objeto actualmente descrito proporciona tal ensayo.

Compendio

30 Basándose en la descripción que se encuentra contenida en la presente memoria, la presente invención proporciona un método para medir la actividad de proteasa en una muestra de pienso, que comprende:

35 (a) añadir un sustrato para una proteasa a una muestra de pienso que comprende la actividad de proteasa que debe medirse, en la que el sustrato es insoluble en solución acuosa y comprende un polipéptido unido a un grupo productor de señal de cromóforo, de manera que la señal se produce con el corte del polipéptido por parte de la proteasa, en donde el pienso es un pienso animal y la proteasa es un tipo de proteasa que se añade al pienso animal para mejorar la digestibilidad de las proteínas del pienso, en donde el polipéptido es caseína y en donde el pienso animal es un pienso granulado;

40 (b) incubar el sustrato con la muestra de pienso en un tampón de reacción esencialmente libre de fosfato, que comprende 5% a 15% de dodecilsulfato sódico (SDS) a un pH comprendido entre 6,5 y 10 y a una temperatura de 30°C a 65°C durante un periodo de tiempo comprendido entre 30 minutos y 5 horas, para permitir el corte del polipéptido, de manera que se produce la señal para la medición de la actividad de proteasa, y

(c) medir la actividad de proteasa mediante inspección visual de un cambio de color resultante de la señal producida por el cromóforo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para medir la actividad de proteasa en una muestra de pienso, que consiste en:

- 5 (a) añadir un sustrato para una proteasa a una muestra de pienso que comprende la actividad de proteasa que debe medirse, en la que el sustrato es insoluble en solución acuosa y comprende un polipéptido unido a un grupo productor de señal, de manera que la señal se produce con el corte del polipéptido por parte de la proteasa, en donde el pienso es un pienso animal y la proteasa es un tipo de proteasa que se añade al pienso animal para mejorar la digestibilidad de las proteínas del pienso, en donde el polipéptido es caseína y el grupo productor de
10 señal es uno de un cromóforo, un fluoróforo o un radioisótopo, y en donde el pienso animal es un pienso granulado;
- (b) mezclar el sustrato con la muestra de pienso una o más veces;
- (c) incubar el sustrato con la muestra de pienso en un tampón de reacción esencialmente libre de fosfato, que comprende 5% a 15% de dodecilsulfato sódico (SDS) a un pH comprendido entre 6,5 y 10 y a una temperatura de 30°C a 65°C durante un periodo de tiempo comprendido entre 30 minutos y 5 horas, para permitir el corte del
15 polipéptido, de manera que se produce la señal para la medición de la actividad de proteasa, y
- (d) medir cualitativamente, semicuantitativamente o cuantitativamente la actividad de proteasa a partir del nivel de la señal que se produce.

En todavía otro aspecto, la presente invención proporciona un kit para medir la actividad de proteasa en una muestra del pienso, que comprende:

- 20 un sustrato para una actividad de proteasa que debe medirse en una muestra del pienso, en donde el sustrato es insoluble en solución acuosa y comprende un polipéptido unido a un grupo productor de señal de cromóforo, de manera que la señal se produce con el corte del polipéptido por parte de la proteasa, en donde el pienso es un pienso animal y la proteasa es un tipo de proteasa que se añade al pienso animal para mejorar la digestibilidad de las proteínas del pienso, en donde el polipéptido es caseína y en donde el pienso animal es un pienso granulado;
- 25 un tampón de reacción esencialmente libre de fosfato, que comprende 5% a 15% de dodecilsulfato sódico (SDS) en un intervalo de pH de 6,5 a 10 para la actividad de proteasa, y
- un manual de instrucciones para incubar el sustrato con una muestra de pienso que presenta la actividad de proteasa que debe medirse en el tampón de reacción esencialmente libre de fosfato bajo condiciones que permiten el corte del polipéptido, de manera que se produce la señal para la medición de la actividad de proteasa mediante inspección visual de un cambio de color en la muestra de pienso resultante de la señal producida por
30 el cromóforo.

Determinados aspectos del objeto actualmente descrito que se han indicado anteriormente en la presente memoria, a los que se hace referencia en su totalidad o en parte mediante el objeto actualmente descrito, otros aspectos se pondrán de manifiesto a medida que transcurra la descripción, tomados en consideración con los Ejemplos y figuras adjuntos, tal como se describen mejor a continuación en la presente memoria.

En una realización, se proporcionan métodos para medir la actividad de proteasa en una muestra de pienso o de alimento que incluye añadir un sustrato para una proteasa a la muestra que presenta la actividad de proteasa que debe medirse, en donde el sustrato es insoluble en solución acuosa y presenta un polipéptido unido a un grupo productor de señal, de manera que se produce la señal con el corte del polipéptido por la proteasa, e incubar el sustrato con la muestra en un tampón de reacción esencialmente libre de fosfato bajo condiciones que permitan el corte del polipéptido, de manera que se produce la señal para la medición de la actividad de proteasa.

En una realización, se proporcionan métodos para medir la actividad de proteasa en una muestra de pienso o alimento que consiste en añadir un sustrato para una proteasa a la muestra que presenta la actividad de proteasa que debe medirse, en donde el sustrato es insoluble en solución acuosa y presenta un polipéptido unido a un grupo productor de señal, de manera que la señal se produce con el corte del polipéptido por la proteasa; mezclar el sustrato con la muestra una o más veces; incubar el sustrato con la muestra en un tampón de reacción esencialmente libre de fosfato bajo condiciones que permiten el corte del polipéptido, de manera que se produce la señal para la medición de la actividad de proteasa, y medir cualitativa, semicuantitativa o cuantitativamente la actividad de proteasa a partir del nivel de señal que se produce.

En una realización, se proporcionan kits para medir la actividad de proteasa en una muestra de pienso o de alimento que incluye añadir un sustrato para una actividad de proteasa que debe medirse, en donde el sustrato es insoluble en solución acuosa y presenta un polipéptido unido a un grupo productor de señal, de manera que se produce la señal con el corte del polipéptido por la proteasa; un tampón de reacción esencialmente libre de fosfato y un manual de instrucciones para incubar el sustrato con la muestra que presenta la actividad de proteasa que debe medirse en el
55 tampón de reacción esencialmente libre de fosfato bajo condiciones que permitan el corte del polipéptido, de manera

que se produce la señal para la medición de la actividad de proteasa.

En una realización, se proporcionan kits para medir la actividad de proteasa en una muestra de pienso o de alimento, que incluye: 1) un sustrato para una actividad de proteasa que debe medirse, en donde el sustrato es insoluble en solución acuosa y presenta un polipéptido unido a un grupo productor de señal, de manera que la señal se produce con el corte del polipéptido por la proteasa; un tampón de reacción esencialmente libre de fosfato, y 3) un manual de instrucciones para incubar el sustrato con una muestra de pienso que presenta la actividad de proteasa que debe medirse, consistiendo el manual de instrucciones en las etapas de adición del sustrato para la proteasa a la muestra de pienso; la mezcla del sustrato con la muestra de pienso una o más veces; incubar el sustrato con la muestra de pienso en el tampón de reacción esencialmente libre de fosfato bajo condiciones que permiten el corte del polipéptido, de manera que la señal se produce para la medición de la actividad de proteasa, y medir cualitativa, semicuantitativa o cuantitativamente la actividad de proteasa a partir del nivel de señal que se produce. La presente invención y realizaciones de la misma se explican en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

El compendio anterior, así como la descripción detallada, posteriormente, se entiende mejor al leerlo junto con las figuras adjuntas. Con fines ilustrativos, en las figuras se muestran realizaciones ejemplares; sin embargo, el objeto actualmente descrito no se encuentra limitado a los métodos específicos y realizaciones ejemplares descritas.

La FIG. 1 es una fotografía que muestra la medición de proteasa en tampón de NaPO_4 200 mM, pH 9,0, en presencia y en ausencia de pienso utilizando un sustrato proteína insoluble que comprende caseína ligada a azurina. La muestra etiquetada con "0 U/g VZ en pienso" es una muestra que contiene pienso sin enzima proteasa añadido; la muestra etiquetada "300 U/g VZ sin pienso" es una muestra sin pienso que contiene ~300 U/g de enzima proteasa, y la muestra etiquetada "300 U/g VZ en pienso" es una muestra que contiene pienso con adición puntual de ~300 U/g de enzima proteasa.

La FIG. 2 es una fotografía del mismo ensayo de actividad de proteasa mostrado en la figura 1, excepto en que se sustituyó el tampón de fosfato por tampón de Tri-Cl 200 mM, pH 9,0. La muestra etiquetada "Ctrl" es pienso sin ninguna proteasa añadida y la muestra etiqueta "VZ" es el mismo pienso con adición puntual de ~1,000 U/g de enzima proteasa.

Las FIGS. 3A-3D son fotografías (3A) y representaciones gráficas (3B-3D) de la respuesta de color producida por el ensayo de proteasa en el pienso con concentraciones crecientes de proteasa utilizando 4 cantidades diferentes de sustrato PROTAZYME AK. La FIG. 3A muestra la respuesta visual con 10 mg de sustrato; la FIG. 3B muestra la respuesta lineal de absorbancia con 25 mg de sustrato; la FIG. 3C muestra la respuesta lineal de absorbancia con 50 mg de sustrato, y la FIG. 3D muestra la respuesta lineal de absorbancia con 100 mg de sustrato.

La FIG. 4 es una fotografía de la respuesta de color visual producida por el ensayo de proteasa en el pienso con concentraciones crecientes de proteasa utilizando 100 mg de sustrato de PROTAZYME AK en Tris-Cl 200 mM, pH 9,0, que contiene SDS al 5% a 40°C. Cada tubo contenía 3,5 g de pienso granulado al que se había añadido la cantidad designada de actividad de proteasa (U/g) tras la granulación del pienso. El tubo etiquetado con "Muestra" contenía 389 U/g de actividad de proteasa añadida antes de la granulación del pienso.

La FIG. 5 es una fotografía que muestra la respuesta de color visual producida por el ensayo de proteasa en el pienso utilizando 100 mg de un sustrato de caseína insoluble en donde la caseína se encuentra ligada a azul brillante Remazol (RBB, por sus siglas en inglés) en Tris-Cl 200 mM, pH 9,0, que contenía SDS al 5% a 50°C durante 2 h. El Ctrl (-) es pienso sin proteasa VERSAZYME añadida, el Ctrl (+) contiene 500 U/g de proteasa VERSAZYME añadida después del procesamiento del pienso y la Muestra contiene 389 U/g de proteasa VERSAZYME añadida antes del procesamiento del pienso.

Descripción detallada

A continuación, se describe el objeto actualmente descrito de manera más completa haciendo referencia a las figuras adjuntas, algunas de las cuales, aunque no todos los casos del objeto actualmente descrito, se muestran.

Siguiendo las convenciones antiguas de la legislación de patentes, los términos "un" o "una" y "el" o "la" se refieren a "uno o más" en su uso en la presente solicitud, incluyendo las reivindicaciones. De esta manera, por ejemplo, la referencia a "un sujeto" incluye una pluralidad de sujetos, a menos que el contexto indique claramente lo contrario (p.ej., una pluralidad de sujetos), etc.

Durante toda la presente especificación y en las reivindicaciones, los términos "comprende" y "comprendiendo" se utilizan en un sentido no excluyente, excepto en donde el contexto sugiera lo contrario. De manera similar, el término "incluye" y sus variantes gramaticales pretenden ser no limitativas, de manera que la recitación de elementos en una lista no es excluyente de otros elementos similares que pueden sustituirse o añadirse a los elementos en la lista.

Para los fines de esta especificación y reivindicaciones adjuntas, el término "aproximadamente" utilizado en relación a uno o más números o intervalos numéricos, debe entenderse que se refiere a la totalidad de tales números, incluyendo todos los números en un intervalo, y modifica ese intervalo mediante la extensión de los límites superior e inferior a

los valores numéricos indicados. La recitación de intervalos numéricos mediante puntos extremos incluye todos los números, p.ej., números enteros, incluyendo fracciones de los mismos, subsumidos dentro de ese intervalo (por ejemplo, la recitación de 1 a 5 incluye 1, 2, 3, 4 y 5, así como las fracciones de los mismos, p.ej., 1,5, 2,25, 3,75, 4,1 y similares) y cualquier intervalo dentro de ese intervalo.

5 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos utilizados en la presente memoria presentan los mismos significados entendidos comúnmente por el experto ordinario en la materia a la que se refiere la presente descripción.

Los presentes inventores han encontrado el resultado inesperado de que el tampón fosfato ampliamente utilizado para medir la actividad de proteasa puede interferir con la medición de la actividad en la presencia de muestras de pienso. Los presentes inventores han encontrado que la actividad de proteasa puede, sin embargo, medirse en presencia de
10 pienso en el caso de que el tampón utilizado se encuentre libre de fosfato. Estos inesperados resultados se muestran en las figuras 1 y 2, posteriormente. La figura 1 muestra la actividad de proteasa (300 U/g VZ) medida en presencia y en ausencia de pienso en un tampón que contiene fosfato. La muestra etiquetada con "0 U/g VZ en pienso" es una muestra que contiene pienso sin enzima proteasa añadida; la muestra etiquetada "300 U/g VZ sin pienso" es una muestra sin pienso que contiene ~300 U/g de enzima proteasa, y la muestra etiquetada "300 U/g VZ en pienso" es
15 una muestra que contiene pienso con adición puntual de ~300 U/g de enzima proteasa. Tal como puede observarse en la figura 1, aparentemente se da una ausencia prácticamente completa de actividad de proteasa en la muestra que contiene pienso, mientras que se observó un nivel elevado de actividad de proteasa en la muestra sin pienso.

Antes del hallazgo descrito en la presente memoria, los resultados negativos observados en presencia de pienso (tal como se ejemplifica en la figura 1) se cree que se debían a la competición entre sustratos proteicos endógenos en el
20 pienso. Los resultados mostrados en la figura 2 indican que éste no es el caso. La figura 2 muestra los resultados para el ensayo de actividad de proteasa mostrado en la figura 1, excepto en que se sustituyó el tampón de fosfato por tampón de Tri-Cl 200 mM, pH 9,0. La muestra etiquetada "Ctrl" es pienso sin ninguna proteasa añadida y la muestra etiquetada "VZ" es el mismo pienso con adición puntual de ~1,000 U/g de enzima proteasa. Inesperadamente, y al contrario que con la utilización de un tampón de fosfato, el tampón Tris resulta en una señal positiva fácilmente
25 identificable de actividad de proteasa (+VZ) en presencia de pienso, tal como puede observarse en la figura 2. Además, se observó una reducción significativa de la señal de reacción de actividad de proteasa al añadir una cantidad pequeña de fosfato (tampón de NaPO₄ al 2,5%) al tampón Tris en la misma reacción indicada para la figura 2 (resultados no mostrados). La señal de reacción se redujo visiblemente en presencia de incluso la pequeña cantidad de tampón fosfato.

Como consecuencia de este resultado, la presente descripción proporciona métodos para medir la actividad de
30 proteasa en un pienso o en una muestra de alimento en tampones de reacción esencialmente libres de fosfato. Los métodos, composiciones y kits de la presente exposición se describen en mayor detalle posteriormente.

Definiciones

El término "muestra" para los fines de la especificación y reivindicaciones pretende referirse a cualquier muestra que contiene actividad de una proteasa que debe medirse. Entre las muestras ejemplares se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, muestras complejas, tales como muestras de pienso, muestras alimentarias, muestras de ingredientes de
35 piensos, muestras de componentes de piensos, muestras de componentes alimentarios, muestras de caldo de fermentación y muestras de medio de cultivo celular. Además, para los fines de la especificación y reivindicaciones, los términos "pienso", "alimento", "muestra de pienso" y "muestra alimentaria" se utilizan intercambiabilmente en la presente memoria. De manera similar, y para los fines de la especificación y reivindicaciones, las expresiones "ensayo del pienso" y "ensayo alimentario" se utilizan intercambiabilmente en la presente memoria.

El término "proteasa" para los fines de la especificación y reivindicaciones pretende referirse a cualquier enzima proteasa. En un aspecto, la proteasa es un tipo de proteasa que se utiliza en la industria agrícola como aditivos de
45 pienso animal para mejorar la digestibilidad del pienso. Entre las proteasas aditivos de pienso ejemplares de la presente descripción se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, la proteasa VERSAZYME de BIORESOURCE INTERNATIONAL, INC., la proteasa RONOZYME PROACT de DSM, INC. y la proteasa AXTRA 102 TPT XAP de DANISCO, INC.

Para los fines de la especificación y reivindicaciones, los "sustratos" del objeto actualmente descrito son insolubles en solución acuosa e incluyen un polipéptido unido a un grupo productor de señal de manera que se produce la señal con el corte del polipéptido por parte de la proteasa que se está midiendo. El término "polipéptido" se utiliza en su
50 sentido más amplio y para los fines de la especificación y reivindicaciones incluye péptidos, polipéptidos y proteínas, así como péptidos, polipéptidos y proteínas que contienen uno o más aminoácidos no naturales y cualquier otra modificación química que permita que el polipéptido funcione como un sustrato para la enzima proteasa la actividad de la cual se está midiendo. El "grupo productor de señal" del "sustrato" puede unirse al "polipéptido" por cualesquiera medios, incluyendo medios covalentes o no covalentes, de manera que puede producirse una señal por el grupo
55 productor de señal con el corte del polipéptido mientras se encuentra presente en la "muestra" por parte de la proteasa que se está midiendo. En un ejemplo, el grupo productor de señal se une al polipéptido mediante entrecruzamiento. Entre los grupos productores de señal de los sustratos de proteasa insolubles de la presente descripción se incluyen, por ejemplo, cromóforos, fluoróforos y radioisótopos capaces de producir una señal con el corte del polipéptido por parte de la proteasa que puede medirse en la muestra. Entre los grupos productores de señal específica de la presente

descripción se incluyen, por ejemplo, el pigmento Azo, el azul brillante Remazol, la p-nitroanilina y el yodo-125. Entre los sustratos ejemplares de la presente descripción se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, caseína entrecruzada con azurina y caseína de gelatina-azul brillante Remazol. Los sustratos de proteasa insolubles que contienen un grupo productor de señal que produce un cambio de color con el corte del sustrato puede resultar útiles con el ensayo de proteasa del pienso para la inspección visual semicuantitativa y para generar resultados cuantitativos mediante la lectura de la absorbancia con un espectrofotómetro.

Para los fines de la especificación y reivindicaciones, la expresión “tampón de reacción esencialmente libre de fosfato” pretende referirse a que el tampón de reacción no es un tampón a base de fosfato y no se ha añadido fosfato exógeno al tampón de reacción. Por ejemplo, la expresión “esencialmente libre de fosfato” no pretende excluir un tampón de reacción que puede contener cantidades residuales de fosfato.

En una realización, se proporcionan métodos para medir la actividad de proteasa en una muestra de pienso o de alimento que incluye añadir un sustrato para una proteasa a la muestra que presenta la actividad de proteasa que debe medirse, en donde el sustrato es insoluble en solución acuosa y presenta un polipéptido unido a un grupo productor de señal, de manera que se produce la señal con el corte del polipéptido por la proteasa, e incubar el sustrato con la muestra en un tampón de reacción esencialmente libre de fosfato bajo condiciones que permitan el corte del polipéptido, de manera que se produce la señal para la medición de la actividad de proteasa. En el método, el pienso puede ser un pienso animal y la proteasa puede ser un tipo de proteasa que se añade al pienso animal para mejorar la digestibilidad de a proteína en el pienso.

En el método de medición de actividad de proteasa en una muestra de pienso o de alimento, el polipéptido puede ser caseína y el grupo productor de señal puede ser uno de entre un cromóforo, un fluoróforo o un radioisótopo. El grupo productor de señal puede ser un cromóforo y la actividad de proteasa puede medirse mediante inspección visual de un cambio de color que resulta de la señal producida por el cromóforo. La medición de la actividad de proteasa puede ser una medición semicuantitativa realizada mediante comparación de la señal producida por el cromóforo con la señal producida por el cromóforo en una curva estándar de una o más muestras de pienso que comprenden una cantidad conocida de la proteasa. En el método, el polipéptido puede ser caseína y el grupo productor de señal puede ser azurina o azul brillante Remazol.

En una realización, el método para la medición de la actividad de proteasa en una muestra de pienso o de un alimento puede incluir además la mezcla de la muestra de pienso y el sustrato una o más veces durante la incubación. En el método, el tampón puede incluir aproximadamente 1% a 15% de un detergente iónico. En el método, el pienso animal puede ser un pienso granulado y el tampón puede incluir aproximadamente 5% a 10% de dodecilsulfato sódico (SDS). En el método, el tampón de reacción puede presentar un intervalo de pH de entre aproximadamente 6,5 y 11 o un intervalo de pH de entre aproximadamente 7 y 9. En el método, el tampón de reacción puede ser un tampón Tris a un pH de aproximadamente 7 a 9. En el método, las condiciones que permiten el corte del polipéptido pueden ser la incubación a una temperatura comprendida entre aproximadamente 30°C y 65°C durante un periodo de tiempo comprendido entre 30 minutos y 5 horas.

En una realización del método para la medición de la actividad de proteasa en una muestra de pienso o de un alimento, el pienso puede ser pienso animal y la proteasa puede ser un tipo de proteasa que se añade al pienso animal para mejorar la digestibilidad de las proteínas del pienso; el polipéptido puede ser caseína y el grupo productor de señal puede ser un cromóforo; el tampón de reacción puede ser un tampón Tris a un pH de entre aproximadamente 7 y 9 con aproximadamente 1% a 15% de SDS y las condiciones que permiten el corte del polipéptido pueden ser la incubación a una temperatura comprendida entre aproximadamente 30°C y 65°C durante un periodo comprendido entre 30 minutos y 5 horas. El método puede incluir además medir la actividad de proteasa mediante inspección visual de un cambio de color que resulta de la señal producida por el cromóforo.

De esta manera, los presentes métodos no requieren la centrifugación o la filtración de la muestra para separar el tampón de reacción respecto de la muestra de pienso o alimento con el fin de obtener una medición de la actividad de proteasa en la muestra. Lo anterior permite llevar a cabo el ensayo sin utilizar caros equipos. Además, los presentes métodos para medir la actividad de proteasa pueden llevarse a cabo en el sitio de procesamiento del pienso/alimento, evitando la necesidad de transportar las muestras externamente para el análisis y, de esta manera, evitando largos retrasos en la obtención de los resultados de las muestras.

En otro caso de la presente descripción, se proporcionan métodos para medir la actividad de proteasa en una muestra de pienso o alimento que consiste únicamente en las etapas de 1) añadir un sustrato para una proteasa a la muestra que presenta la actividad de proteasa que debe medirse, en donde el sustrato es insoluble en solución acuosa y presenta un polipéptido unido a un grupo productor de señal, de manera que la señal se produce con el corte del polipéptido por la proteasa; 2) mezclar el sustrato con la muestra una o más veces; 3) incubar el sustrato con la muestra en un tampón de reacción esencialmente libre de fosfato bajo condiciones que permiten el corte del polipéptido, de manera que se produce la señal para la medición de la actividad de proteasa, y 4) medir cualitativa, semicuantitativa o cuantitativamente la actividad de proteasa a partir del nivel de señal que se produce.

En otro caso de la presente descripción, se proporcionan kits para medir la actividad de proteasa en una muestra de pienso o de un alimento, incluyendo los kits: 1) un sustrato para la medición de una actividad de proteasa, en donde

el sustrato es insoluble en solución acuosa y presenta un polipéptido unido a un grupo productor de señal, de manera que la señal se produce con el corte del polipéptido por la proteasa; 2) un tampón de reacción esencialmente libre de fosfato, y 3) un manual de instrucciones para incubar el sustrato con la muestra que presenta la actividad de proteasa que debe medirse en el tampón de reacción esencialmente libre de fosfato bajo condiciones que permiten el corte del polipéptido de manera que se produce la señal para la medición de la actividad de proteasa. El pienso puede ser un pienso animal y la proteasa puede ser un tipo de proteasa que se añade al pienso animal para mejorar la digestibilidad de las proteínas en el pienso.

Los kits pueden incluir además uno o más tubos para la incubación. En un aspecto del kit, el grupo productor de señal puede ser un cromóforo y el manual de instrucciones puede incluir además instrucciones para medir la actividad de proteasa mediante inspección visual de un cambio de color que resulta de la señal producida por el cromóforo. El polipéptido en el kit puede ser caseína y el grupo productor de señal puede ser uno de entre un cromóforo, un fluoróforo o un radioisótopo. El polipéptido en el kit puede ser caseína y el grupo productor de señal puede ser azurina o azul brillante Remazol.

En un aspecto del kit, el manual de instrucciones puede incluir además instrucciones para medir la actividad de proteasa de una manera semicuantitativa mediante la comparación de la señal producida por el cromóforo a la señal producida por el cromóforo en una curva estándar de una o más de las muestras de pienso que comprenden una cantidad conocida de la proteasa. El kit de instrucciones puede incluir además instrucciones para mezclar la muestra de pienso y el sustrato una o más veces durante la incubación.

En el kit, el tampón de reacción puede incluir aproximadamente 1% a 15% de un detergente iónico. El pienso animal puede ser un pienso granulado y el tampón de reacción en el kit puede incluir aproximadamente 5% a 10% de dodecilsulfato sódico (SDS). El tampón de reacción en el kit puede presentar un intervalo de pH de entre aproximadamente 6,5 y 11, o de entre aproximadamente 7 y 9. El tampón de reacción en el kit puede ser un tampón Tris a un pH de entre aproximadamente 7 y 9. En un aspecto del kit, las condiciones que permiten el corte del polipéptido pueden ser la incubación a una temperatura comprendida entre aproximadamente 30°C y 65°C durante un periodo de tiempo comprendido entre 30 minutos y 5 horas.

En una realización del kit, el pienso puede ser pienso animal, la proteasa puede ser un tipo de proteasa que se añade al pienso animal para mejorar la digestibilidad de las proteínas del pienso; el polipéptido puede ser caseína y el grupo productor de señal puede ser un cromóforo; el tampón de reacción puede ser un tampón Tris a un pH de entre aproximadamente 7 y 9 con aproximadamente 1% a 15% de SDS y las condiciones que permiten el corte del polipéptido pueden ser la incubación a una temperatura comprendida entre aproximadamente 30°C y 65°C durante un periodo de tiempo comprendido entre 30 minutos y 5 horas. El kit puede incluir además medir la actividad de proteasa mediante inspección visual de un cambio de color que resulta de la señal producida por el cromóforo.

En una realización, se proporcionan kits para medir la actividad de proteasa en una muestra de pienso o de alimento, que incluye: 1) un sustrato para una actividad de proteasa que debe medirse, en donde el sustrato es insoluble en solución acuosa y presenta un polipéptido unido a un grupo productor de señal, de manera que la señal se produce con el corte del polipéptido por la proteasa; 2) un tampón de reacción esencialmente libre de fosfato, y 3) un manual de instrucciones para incubar el sustrato con una muestra de pienso que presenta la actividad de proteasa que debe medirse, consistiendo el manual de instrucciones en las etapas de adición del sustrato para la proteasa a la muestra de pienso; la mezcla del sustrato con la muestra de pienso una o más veces; incubar el sustrato con la muestra de pienso en el tampón de reacción esencialmente libre de fosfato bajo condiciones que permiten el corte del polipéptido, de manera que la señal se produce para la medición de la actividad de proteasa, y medir cualitativa, semicuantitativa o cuantitativamente la actividad de proteasa a partir del nivel de señal que se produce.

De esta manera, los kits de la presente descripción no requieren la centrifugación o la filtración de la muestra para separar el tampón de reacción respecto de la muestra de pienso o alimento con el fin de obtener una medición de la actividad de proteasa en la muestra. Lo anterior permite llevar a cabo el ensayo utilizando el kit sin utilizar caros equipos. Además, los presentes kits para medir proteasas pueden utilizarse en el sitio de procesamiento del pienso/alimento, evitando la necesidad de transportar las muestras externamente para el análisis y, de esta manera, evitando largos retrasos en la obtención de los resultados de las muestras.

Ejemplos

Los Ejemplos a continuación han sido incluidos para proporcionar una guía para el experto ordinario en la materia para la práctica de realizaciones representativas de la materia descrita en la presente memoria. A la luz de la presente exposición y el nivel general del experto en la materia, éste apreciará que los Ejemplos a continuación pretenden ser ejemplares únicamente y que pueden realizarse numerosos cambios, modificaciones y/o alteraciones sin apartarse del alcance del objeto descrito en la presente memoria.

Ejemplo 1

Hallazgo inesperado de interferencia de fosfato con el ensayo de proteasa en el pienso

Mientras se intentaba medir la cantidad de proteasa que se había añadido anteriormente a una muestra de pienso

animal, los presentes inventores encontraron el inesperado resultado de que el tampón de fosfato, ampliamente utilizado para medir la actividad de proteasa, estaba interfiriendo con la medición de la actividad en la presencia del pienso. Los presentes inventores encontraron que la actividad de proteasa podía medirse en presencia de pienso en el caso de que el tampón utilizado se encontrase libre de fosfato. Estos inesperados resultados se muestran en las figuras 1 y 2. La figura 1 muestra la actividad de proteasa (300 U/g de VERSAZYME/CIBENZA DP100, BIORESOURCE INC.) medida en presencia y en ausencia de pienso en un tampón que contiene fosfato. El ensayo de actividad de proteasa utilizado en la figura 1 se llevó a cabo introduciendo 3,5 g de pienso en una probeta cónica de 50 ml, añadiendo el enzima proteasa VERSAZYME, resuspendiendo el pienso en 16 ml de tampón de NaPO₄ 200 mM, pH 9,0, que contenía una tableta (100 mg) de sustrato PROTAZYME AK, nº de cat. I-AZCAS, MEGAZYME, INC., e incubando durante la noche a 50°C. El sustrato de PROTAZYME AK es insoluble en soluciones acuosas y comprende proteína caseína unida a azurina. De esta manera, el corte del sustrato PROTAZYME AK resulta en la producción de un color verde-azul que puede observarse visualmente o cuantificarse mediante la lectura de la absorbancia del sobrenadante de la muestra a 590 nm. Tal como puede observarse en la figura 1, aparentemente se da una ausencia prácticamente completa de actividad de proteasa en la muestra que contiene pienso, mientras que se observó un nivel elevado de actividad de proteasa en la muestra sin pienso.

Antes del hallazgo descrito en la presente memoria, los resultados negativos observados en presencia de pienso (tal como se ejemplifica en la figura 1) se cree que se debían a la competición entre sustratos proteicos endógenos en el pienso. Los resultados descritos posteriormente en la presente memoria y mostrados en la figura 2 indican que éste no es el caso. La figura 2 muestra los resultados del ensayo de actividad de proteasa en presencia de pienso al utilizar un tampón de Tris-Cl 200 mM, pH 9,0; en lugar del tampón fosfato (1.000 U/g, para este experimento se utilizó la enzima VERSAZYME). Inesperadamente, y al contrario que al utilizar un tampón fosfato, el tampón Tris resultó en una señal positiva fácilmente identificable en presencia de pienso (véase la figura 2).

Además, se observó una reducción significativa de la señal de reacción al añadir una pequeña cantidad de fosfato al tampón Tris en la misma reacción que se describe para la figura 2 (las condiciones de tampón eran: 97,5% de Tris-Cl 200 mM, pH 9,0, y 2,5% de NaPO₄ 200 mM, pH 9,0) (resultados no mostrados). La señal de reacción se redujo visiblemente en presencia de tampón de NaPO₄ al 2,5%. Sin ceñirse a ninguna teoría de mecanismo, estos resultados indican que los resultados negativos observados con la utilización de tampón fosfato se deben a una interferencia negativa de los fosfatos en el pienso y no en la competición de sustratos proteicos endógenos en el pienso, tal como creen comúnmente los expertos en la materia.

El hallazgo de que el fosfato interfiere con la medición de la actividad de proteasa en el pienso ha sido un resultado muy inesperado porque existe la creencia generalizada en el campo de que los componentes proteicos del pienso son lo que interfiere con la medición. Se cree generalmente que determinados componentes proteicos del pienso actúan como sustratos competidores con el sustrato marcado añadido para la proteasa que se está midiendo. Por ejemplo, el fabricante del sustrato PROTAZYME AK para el uso en la medición de la actividad de proteasa afirma lo siguiente en una publicación de preguntas frecuentes: "P. 3: ¿Resulta posible realizar una determinación "en el pienso" con las tabletas de Protazyme AK (proteasas neutras y/o ácidas)? A: Resulta difícil determinar las proteasas en las muestras alimentarias porque estas contienen gran cantidad de proteínas endógenas que actúan como sustrato alternativo. Este es un problema independiente del procedimiento de ensayo utilizado. (véase http://secure.megazyme.com/files/FAQ%27s/T-PRAK1000_1204_FAQ.pdf).

Ejemplo 2

Ensayo de proteasas en el pienso en tampón libre de fosfato - la concentración de detergente

Se deseaba desarrollar un ensayo para la actividad de proteasas en presencia de una muestra compleja, tal como un pienso animal o un alimento, que pudiese realizarse *in situ*, en un tiempo relativamente corto y que no requiriese una cara instrumentación. Se llevaron a cabo los experimentos siguientes para determinar la cantidad de detergente a incluir en el ensayo.

Los experimentos siguientes se llevaron a cabo para determinar el efecto del tipo y concentración de detergente sobre el ensayo de proteasas en el pienso. En el primer experimento, se amasaron 3,5 g de un pienso de tipo harina en una probeta cónica de 50 ml con una dosis del enzima VERSAZYME (0, 123, 243, 359 o 471 U/g) resuspendidos en 16 ml de Tris-Cl 200 mM, pH 9,0, que contenía 1% de dodecilsulfato sódico (SDS) que contenía el sustrato PROTAZYME AK (100 mg) y se incubó a 50°C durante 2 h (véase la Tabla I). Los resultados muestran que la adición de 1% de SDS redujo significativamente el tiempo de ensayo a aproximadamente 2 h a 50°C del pienso en harina. Estas condiciones de ensayo son suficientemente robustas para detectar concentraciones de enzima VERSAZYME de tan solo 125 U/g, que es menos de la mitad de la dosis típica añadida al pienso. Resulta igualmente importante el nivel de fondo mínimo que se observa en el pienso de control (resultados no mostrados). Tal nivel de fondo reducido permite una fácil identificación de una señal positiva y puede permitir la eliminación de la necesidad de controlar el pienso en el ensayo acabado. Esto es un punto especialmente importante ya que los piensos de control con frecuencia no se encuentran disponibles una vez la granuladora empieza a incorporar el enzima proteasa en el pienso. Se llevaron a cabo estudios adicionales con el pienso en harina en el laboratorio, produciendo cada uno una reacción positiva consistentemente fuerte (datos no mostrados).

Tabla I. Ensayo en el pienso a 50°C, 2 h, 1% de SDS

Muestra (pienso en harina)	VERSAZYME (U/g)	Reacción
1	0	Negativo
2	123	Positivo
3	243	Positivo
4	359	Positivo
5	471	Positivo

5 El experimento descrito anteriormente se repitió utilizando pienso granulado en lugar del pienso en harina. Se llevó a cabo una tanda de granulado en la granuladora NC STATE BLISS PELLET MILL para obtener el pienso granulado. El análisis inicial de este pienso granulado no resultó en una señal robusta de actividad de proteasa, tal como se observó para el pienso en harina (datos no mostrados). En un intento de superar la respuesta limitada, se incorporaron concentraciones crecientes de SDS en el tampón de ensayo.

10 Se analizó el pienso granulado en un tampón de Tris-Cl 200 mM, pH 9,0, complementado con 1%, 2%, 3%, 4% o 5% de SDS y las muestras se incubaron a 50°C durante hasta 3 h. Los resultados para las muestras de 1% de SDS y 5% de SDS se proporcionan posteriormente, en la Tabla II. La muestra etiquetada "Ctrl (-)" es pienso sin proteasa VERSAZYME añadida, la muestra etiquetada con "Muestra" es pienso al que se han añadido 389 U/g de las proteasas VERSAZYME antes del procedimiento de granulado, y la muestra etiquetada "Ctrl (-) + VZ" es pienso con adición puntual de 350 U/g de proteasa VERSAZYME después del procedimiento de granulado. Los datos indican que el incremento de la concentración de SDS a 5% en el tampón de ensayo produjo una señal fácilmente identificable tanto de la Muestra como de las muestras Ctrl (-) + VZ en 2 h a 50°C. El nivel de actividad de proteasa VERSAZYME detectado para la Muestra era de 271 U/g (datos no mostrados). Resulta importante que la concentración incrementada de SDS no incrementó la señal de fondo en el pienso de control sin proteasa añadida (datos no mostrados).

Tabla II. Ensayo en el pienso a 50°C, 1,5 h, 1% a 5% de SDS

Muestra (pienso granulado)	VERSAZYME añadido (U/g)	Reacción (5% de SDS)	Reacción (1% de SDS)
(-) Ctrl	0	Negativo	Negativo
Muestra	389	Positivo	Negativo
(-) Ctrl + VZ	350	Positivo	Positivo

20 El experimento descrito anteriormente se repitió utilizando pienso granulados de diversos orígenes. Se obtuvieron tres muestras diferentes de pienso granulado a base de trigo (granulado a 65°C) de NOVUS INTERNATIONAL para el análisis. La utilización de las mismas condiciones de ensayo (SDS al +5%) que las indicadas anteriormente para el pienso granulado NC STATE BLISS MILL resultó en una señal fácilmente identificable tras la incubación durante 45 min a 50°C (véase la Tabla III, a continuación). Estos resultados demuestran la reproducibilidad del ensayo de proteasa con una diversidad de pienso granulados.

Tabla III Ensayo en el pienso a 50°C, 45 min, 5% de SDS

Pienso granulado procedente de 3 fuentes separadas	VERSAZYME añadido	Reacción
Ctrl	No	Negativo
1	Sí	Positivo
2	Sí	Positivo
3	Sí	Positivo

El experimento de ensayo de proteasa descrito anteriormente se repitió a 30°C pero no se produjo una señal robusta a esta temperatura más baja. Con el fin de optimizar las condiciones para llevar a cabo el ensayo de actividad de

proteasa en el pienso a temperaturas más próximas a la temperatura ambiente, se repitió el ensayo de proteasa utilizando concentraciones de detergente más elevadas. Las concentraciones de SDS sometidas a ensayo eran 5, 7,5, 10 y 15% (Tris-Cl 200 mM, pH 9,0). Las muestras de pienso granulado NC STATE BLISS MILL y NOVUS INTERNATIONAL produjeron ambas una señal visualmente identificable a las concentraciones de SDS de 10% y 5% dentro de un periodo de incubación de 4 h a 30°C (datos no mostrados).

El experimento de ensayo de proteasa descrito anteriormente se repitió utilizando Tween-20, Tween-80 o Triton X-100 en lugar de SDS. El experimento se llevó a cabo tal como se ha descrito anteriormente, utilizando pienso NC STATE BLISS PELLET MILL TURKEY PELLET, 350 U/g de proteasa VERSAZYME, 0%, 1%, 5% o 10% de uno de Tween-20, Tween-80 o Triton X-100 y se incubó a 50°C durante hasta 5 h. Además, se incluyó en el experimento una muestra de control positivo que contenía 5% de SDS. Ninguno de los detergentes, Tween-20, Tween-80 o Triton X-100, produjo una señal significativa incluso tras 5 h a 50°C (datos no mostrados). En comparación, la muestra de control de 5% de SDS produjo una reacción fuertemente positiva (datos no mostrados).

Ejemplo 3

Ensayo de proteasa en el pienso en tampón libre fosfato - estudios del pH y el tampón

Debido a que el pH óptimo para la actividad de la proteasa VERSAZYME es de entre 10 y 11, se planteó la hipótesis de que el incremento del pH del tampón de ensayo de proteasa incrementaría la respuesta de señal y permitiría reducir el tiempo de incubación. El ensayo de actividad de proteasa en el pienso se repitió tal como se ha indicado anteriormente a 50°C durante 120 min utilizando cada uno de los tampones siguientes complementado con 10% de SDS. Tris-Cl 200 mM, pH 9,0; Na₂CO₃ 200 mM, pH 9,0; Na₂CO₃ 20 mM, pH 10,0 y Na₂CO₃ 200 mM, pH 10,8. Se midió el pH final de cada una de las muestras resuspendidas y se muestra posteriormente, en la Tabla IV. En contraste con el esperado incremento de la actividad de proteasa, este juego de tampones y un incremento del pH de la muestra presentaron un impacto adverso sobre la actividad de proteasa medida (véase la Tabla V). Además, el tampón Tris-Cl, pH 9,0, presentó un mejor rendimiento que los tampones de Na₂CO₃ a todos los valores de pH sometidos a ensayo (datos no mostrados).

Tabla IV. Evaluación del ensayo en el pienso del pH del tampón

Tampón	pH esperado	pH observado	diferencia de pH
TRIS	9,0	7,54	1,46
Na ₂ CO ₃	9,0	7,03	1,97
Na ₂ CO ₃	10,0	8,2	1,8
Na ₂ CO ₃	10,8	9,04	1,76

Tabla V. Ensayo en el pienso con diversos tampones y pH

Muestra de pienso granulado	VERSAZYME añadido (U/g)	Tris de reacción, pH 9,0	Na ₂ CO ₃ de reacción, pH 9,0	Na ₂ CO ₃ de reacción, pH 10,0	Na ₂ CO ₃ de reacción, pH 10,8
1	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2	175	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
3	262,5	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
4	350	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
5	462,5	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo

Se llevó a cabo un experimento similar para someter a ensayo los efectos de utilizar tampones de glicina a pH 9,0 y superior y tampones de Tris-Cl pH 9,0 con molaridad incrementada. El ensayo de actividad de proteasa en el pienso se repitió tal como se ha indicado anteriormente a 30°C durante 2,5 h con agitación periódica para mezclar el contenido utilizando cada uno de los tampones siguientes complementado con 10% de SDS. Tris-Cl 200 mM, pH 9,0; Tris-Cl 0,5 M, pH 9,0; glicina 0,5 M, pH 9,0 o glicina 0,5 M, pH 10,6. Inesperadamente, los tampones de Tris-Cl de 200 mM y 0,5 M produjeron resultados muy similares (datos no mostrados). Ambos tampones de Tris funcionaron mejor que los tampones de glicina analizados (datos no mostrados).

Se llevó a cabo otro experimento similar para someter a ensayo los efectos de utilizar los tampones CAPSO, CAPS, CHES y citrato tanto a pH elevado como a pH bajo. El ensayo de actividad de proteasa en el pienso se repitió tal como se ha indicado anteriormente a 50°C durante 15 min utilizando cada uno de los tampones siguientes complementado con 5% de SDS. CAPSO 200 mM, pH 9,0 y 10,0; CAPS 200 mM, pH 9,0 y 10,0; CHES, pH 9,0 y 10,0, o citrato, pH 3,0 y 4,0. Los tampones CHES, CAPSO y CAPS produjeron todas respuestas fácilmente identificables tanto a pH 9,0 como a 10,0 (véase la Tabla VI, a continuación). La respuesta de actividad de proteasa fue mejor a pH 9,0 que a pH más elevados. Esto resulta inesperado ya que la proteasa VERSAZYME presenta una actividad específica más alta a niveles de pH más alcalino. El tampón de citrato de pH bajo no produjo ninguna reacción identificable incluso tras 3 h a 50°C (datos no mostrados).

5

10

Tabla VI. Ensayo en el pienso con tampones CHES, CAPSO y CAPS

Muestra de pienso granulado	VERSAZYME añadido (U/g)	CHES pH 9,0	CHES pH 10,0	CAPSO pH 9,0	CAPSO pH 10,0	CAPS pH 9,0	CAPS pH 10,0
1	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2	350	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

Ejemplo 4

Ensayo de proteasa en el pienso en tampón libre de fosfato - respuesta cuantitativa y visualmente cualitativa del ensayo

15

Se determinó la linealidad de la respuesta del ensayo de proteasa utilizando el sustrato de PROTAZYME AK y un pienso en harina a base de maíz según el procedimiento general descrito en el Ejemplo 1. Se investigó un abanico de concentraciones de sustrato PROTAZYME AK (10, 25, 50 y 100 mg) con incubación a 50°C para determinar espectrofotométricamente las cantidades que proporcionarían una respuesta lineal de la actividad de proteasa y que también pudiesen cuantificarse cualitativamente de modo visual. Específicamente, se añadieron 3,5 g del pienso a tubos cónicos de 50 ml que contenían 10, 25, 50 o 100 mg del sustrato PROTAZYME AK. A las muestras se añadió enzima proteasa VERSAZYME resuspendido en Tris 200 mM, pH 9,0, 1% de SDS para conseguir una curva estándar con 0, 175, 262,5, 350 y 462,5 unidades de actividad de proteasa por gramo de pienso. A continuación, las muestras se resuspendieron en un volumen final de 20 ml de Tris 200 mM, pH 9,0, 1% de SDS y se incubaron a 50°C durante 90 min.

20

25

Tras 90 min de incubación, las muestras se inspeccionaron visualmente. La figura 3A es una fotografía de las muestras experimentales utilizando la cantidad de 10 mg del sustrato PROTAZYME AK. Bajo las condiciones analizadas, la concentración de 10 mg de sustrato permitió la mejor inspección visual de la respuesta, aunque la cantidad de 10 mg de sustrato no produjo una respuesta espectrofotométrica ideal. Además de la inspección visual, se extrajeron 1,5 ml de cada muestra y se centrifugaron a 3.500 x g durante 5 min para granular la fracción de pienso insoluble de la muestra. El sobrenadante resultante se diluyó 2 veces o 4 veces y se leyó la absorbancia a A₅₉₀. Los datos muestran una respuesta lineal espectrofotométrica para cada una de las concentraciones de 25, 50 y 100 mg de sustrato (véase las figuras 3B-3D, respectivamente). De esta manera, el ensayo de proteasa en el pienso puede utilizarse para permitir una inspección visual de la respuesta, así como para producir una respuesta lineal a concentraciones de proteasa crecientes.

30

35

En un experimento similar en pienso granulado, se preparó una curva estándar de enzima proteasa VERSAZYME de 0 a 400 U/g en pienso granulado y el ensayo de proteasa se llevó a cabo tal como se ha indicado anteriormente, utilizando 100 mg de sustrato PROTAZYME AK en 20 ml de Tris-Cl 200 mM, pH 9,0, que contenía 5% de SDS a 40°C. Como control adicional, se incluyó en este examen una muestra de pienso con adición de 389 U/g de enzima proteasa VERSAZYME antes del procesamiento del pienso ("Muestra"). Tal como se indica en la figura 4, la curva estándar permite una identificación visual fácil de las diferencias entre 0, 100, 200, 250, 300 y 350 U/g de enzima proteasa. El color aparentemente sólo empieza a saturarse a las concentraciones de 350 a 400 U/g. Basándose en esta curva estándar, se identifica fácilmente que la Muestra contiene más de 350 U/g de enzima proteasa.

40

45

Basándose en estos resultados, el ensayo de proteasa puede resultar útil para medir cuantitativamente la actividad de proteasa mediante la medición de la absorbancia a 590 nm en la fracción soluble de una muestra de pienso. Además, el ensayo de proteasa puede resultar útil para evaluar cualitativamente la cantidad de actividad de proteasa en una muestra de pienso mediante la inspección visual de la muestra de pienso sin necesidad de una etapa de centrifugación o filtración para separar las fracciones soluble e insoluble y sin necesidad de un espectrofotómetro para medir un valor de absorbancia.

Ejemplo 5

Ensayo de proteasa en el pienso en tampón libre de fosfato - otras proteasas de pienso comerciales

El ensayo de proteasa en el pienso se sometió a ensayo para otras proteasas aparte de la proteasa VERSAZYME

que se encuentran disponibles comercialmente para la adición a pienso. Específicamente, se examinaron las proteasas de pienso RONOZYME PROACT (DSM INC.) y AXTRA 102 TPT XAP (DANISCO INC). Para este ensayo de proteasa, se examinaron concentraciones crecientes de SDS comprendidas entre 0,1% y 5% debido a dudas sobre la estabilidad del enzima en este detergente. El ensayo de proteasa se llevó a cabo según la descripción siguiente para cada uno de los enzimas. En primer lugar, se amasaron 3,5 g de pienso de tipo harina en un tubo de centrifuga de 50 ml; se añadió sustrato PROTAZYME AK (100 mg) y después se añadieron 20 ml de Tris-Cl 200 mM, pH 9,0, que contenía SDS (0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 5% o 10% de SDS) a las muestras individuales.

Enzima proteasa VERSAZYME: se diluyeron 100 mg de enzima proteasa VERSAZYME en 40 ml de Tris-Cl 200 mM, pH 9,0 y se añadieron puntualmente 710 µl de la dilución de enzima sobre las muestras de pienso (aproximadamente 350 U/g de pienso).

Enzima proteasa AXTRA XAP: se diluyeron 20 mg de AXTRA XAP en 10 ml de Tris-Cl 200 mM, pH 9,0, y se añadieron 482 µl de la dilución de enzima sobre las muestras de pienso, el mismo nivel de dosis propuesto por el fabricante (250 g/Tm de pienso).

Enzima proteasa ONOZYME PROACT: se diluyeron 20 mg de RONOZYME PROACT en 10 ml de Tris-Cl 200 mM, pH 9,0, y se añadieron 385 µl de la dilución de enzima sobre el pienso, el mismo nivel de dosis propuesto por el fabricante (200 g/Tm de pienso).

A continuación, se incubó cada una de las muestras a 50°C en un baño de agua durante 1,75 h. Se mezclaron las muestras bajo agitación vigorosa cada 10 min y se comprobó el desarrollo de color. Tanto la enzima proteasa RONOZYME PROACT como la AXTRA 102 TPT funcionaron bien en este ensayo, con el mejor desarrollo de color en 5% de SDS. Además, incluso a la concentración más alta de SDS, de 10%, tanto RONOZYME PROACT como AXTRA 102 TPT mostraron un elevado nivel de desarrollo de color. Estos resultados indican que el ensayo de proteasa en el pienso de la presente exposición puede resultar útil para medir la actividad de proteasas que se añaden al pienso aparte de la proteasa VERSAZYME.

Ejemplo 6

Ensayo de proteasa en el pienso en tampón libre de fosfato - Estudios sobre la temperatura

Se llevaron a cabo los experimentos siguientes para determinar las condiciones para llevar a cabo el ensayo de proteasa en el pienso a temperatura ambiente. Para estos experimentos se utilizaron 3,5 g de pienso granulado (NC STATE BLISS PELLET MILL, TURKEY PELLET) con 100 mg de sustrato PROTAZYME AK. Las muestras de pienso (control sin proteasa añadida + 300 U/g de VERSAZYME + RONOZYME PROACT (200 g/Tm de pienso) o + AXTRA XAP 102 TPT (250 g/Tm de pienso)) se resuspendieron en 20 ml de Tris 200 mM, pH 9,0, que contenía SDS (0%, 0,5%, 1%, 5% o 10% de SDS) en un tubo de centrifuga de 50 ml. La muestra se mezcló bajo agitación cada 15 min y se incubó a diversas temperaturas (20°C, 60°C y 65°C) hasta el desarrollo del color durante hasta cinco horas.

Los resultados para las tres proteasas a 20°C, 60°C y 65°C se muestran en las Tablas VII-IX, a continuación. Sólo se observó una señal despreciable de cada uno de los tres enzimas al incubar a 20°C durante 4,75 h incluso a las concentraciones de SDS más altas, mientras que todas las enzimas produjeron una señal evidente a 60°C y a 65°C.

Tabla VII. Ensayo en el pienso para VERSAZYME a diversas temperaturas y 5% de SDS

Muestra de pienso granulado	VERSAZYME añadido (U/g)	Reacción a 20°C	Reacción a 60°C	Reacción a 65°C
1	0	Negativo	Negativo	Negativo
2	350	Negativo	Positivo	Positivo

Tabla VIII. Ensayo en el pienso para AXTRA XAP 102 TPT a 20°C y concentraciones variables de detergente

Muestra de pienso granulado	AXTRA XAP 102 TPT añadido (g/Tm)	Reacción SDS 0%	Reacción SDS 0,5%	Reacción SDS 1%	Reacción SDS 5%	Reacción SDS 10%
1	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2	250	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Tabla IX. Ensayo en el pienso para RONOZYME PROACT a 20°C y concentración variable de detergente

Muestra de pienso granulado	RONOZYME PROAVT añadido (g/Tm)	Reacción SDS 0%	Reacción SDS 0,5%	Reacción SDS 1%	Reacción SDS 5%	Reacción SDS 10%
1	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2	200	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Ejemplo 7

Ensayo de proteasa en el pienso en tampón libre de fosfato - proteasas no de pienso

5 Con el fin de determinar si el ensayo de proteasa en el pienso es funcional para un amplio espectro de proteasas, se sometieron a ensayo en el ensayo las enzimas pepsina, subtilisina, tripsina, quimotripsina y proteinasa K.

10 Pepsina: Se sometió a ensayo la pepsina con el ensayo de proteasa en el pienso utilizando 100 mg de sustrato PROTAZYME AK e incubando a pH 1,0 en presencia de 0%, 0,1%, 0,5%, 1% y 5% de SDS a 40°C durante 2 horas. Específicamente, se molieron 3,5 g de NC STATE BLISS PELLET MILL TURKEY PELLET a unos polvos finos y se agregaron a un tubo cónico de 50 ml. Se dosificaron 80 mg de pepsina (SIGMA P7124-100G lote n° 049K1003 a razón de 118 U/mg de sólido) en una proporción de enzima a pienso de 0,4%. Las muestras se resuspendieron en 20 ml de dH₂O y se ajustó el pH a 1,2, 3 y 4 con la adición de HCl 12 M. Se añadió SDS a cada pH en una proporción de 0%, 0,1%, 0,5%, 1% y 5% (p/v). A continuación, las muestras se mezclaron vigorosamente y se incubaron a 40°C hasta el desarrollo del color o hasta la incubación máxima de 4 h.

15 Tal como se indica en la Tabla X, a continuación, la pepsina produjo una reacción fuerte a pH 1 y con 0% de SDS. Este resultado demuestra que puede medirse la actividad de la pepsina utilizando este ensayo de proteasa.

Tabla X. Ensayo en el pienso para pepsina a pH 1,0 y concentración variable de detergente

Muestra de pienso	Pepsina (U/mg)	% de SDS	Reacción
1	118	0	Positivo
2	118	0,1	Positivo
3	118	0,5	Negativo
4	118	1	Negativo
5	118	5	Negativo

20 Subtilisina, tripsina y quimotripsina: Se sometieron a ensayo subtilisina, tripsina y quimotripsina con el ensayo de proteasa en el pienso utilizando 100 mg de sustrato PROTAZYME AK. Específicamente, se molieron 3,5 g de NC STATE BLISS PELLET MILL TURKEY PELLET hasta formar unos polvos finos y se agregaron a un tubo cónico de 50 ml. Se añadieron subtilisina (SIGMA P5380-100MG, lote n° 119K1088V a razón de 67.000.000 U/g), quimotripsina (SIGMA C3142-25MG lote n° 041M7012V a razón de 20.000.000 U/g), tripsina (SIGMA T1426-250MG lote n° SLBB9512V a razón de 90.000.000 U/g) y VERAZYME 700,000 U/g al pienso a una concentración final de 350 U/g. Las muestras se resuspendieron en 20 ml de Tris 200 mM, pH 9,0. Se añadió SDS a cada muestra 0%, 0,1%, 1% y 5% de SDS. Se mezclaron las muestras mediante agitación vigorosa y se incubaron a 50°C.

25 Los datos de subtilisina, tripsina y quimotripsina en el ensayo de proteasas en el pienso se muestran en la Tabla XI. Tal como indican los datos, la subtilisina es compatible con el ensayo de proteasas en el pienso. Se observó una señal fuerte con esta proteasa con 1% y 5% de SDS. Tal como se indica en la Tabla XI, la tripsina y la quimotripsina no son compatibles con que el ensayo de proteasa no llegase a producir una señal identificable bajo cualquiera de las condiciones sometidas a ensayo.

30

Tabla XI. Ensayo en piel para diferentes proteasas

Muestra de pienso	Proteasa (U/g)	% de SDS	VERSAZYME de reacción	Subtilisina de reacción	Tripsina de reacción	Quimotripsina de reacción
1	0	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2	350	0,1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

3	350	0,5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4	350	1	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
5	350	5	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo

Proteinasa K: la proteinasa K se sometió a ensayo con el ensayo de proteasas en el pienso a valores elevados de pH utilizando 100 mg de sustrato PROTAZYME AK. Específicamente, se molieron 3,5 g de NC STATE BLISS PELLET MILL TURKEY PELLET hasta formar unos polvos finos y se agregaron a un tubo cónico de 50 ml. Se añadió proteinasa K (FISHER producto nº BP1700-100, lote nº 051308 a razón de 100.000.000 U/g) al pienso a una concentración final de 350 U/g. Las muestras se resuspendieron en 20 ml de Tris-Cl 200 mM, pH 9,0, CAPS 200 mM, pH 10 y pH 11, y KCl-NaOH 200 mM pH 12, o mediante la adición de NaOH para ajustar el pH a 10, 11 y 12. Tras la adición del tampón indicado a las muestras de pienso, se verificó el pH y, en caso necesario, se añadió NaOH con el fin de obtener el pH indicado de cada tampón. Se añadió SDS a las muestras a razón de 0%, 0,1%, 1% y 5% de SDS. A continuación, se mezclaron las muestras mediante agitación vigorosa y se incubaron a 50°C.

Los datos de proteinasa K en el ensayo de proteasas en el pienso se muestran en la Tabla XII. Tal como se indica en la Tabla XII, la proteinasa K era compatible con el ensayo de proteasas en el pienso. El límite superior de concentración de SDS para la proteinasa K se determinó que era 1% de SDS y el pH superior para la proteinasa K era pH 9,0.

Tabla XII. Ensayo en el pienso para proteinasa K

Muestra de pienso	Proteinasa K (U/g)	pH de reacción=9	pH de reacción=10	pH de reacción=11	pH de reacción=12
1	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2	350	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo

Ejemplo 8

Ensayo de proteasas en el pienso en tampón libre de fosfato - sustrato de caseína-azul brillante Remazol insoluble

El ensayo de proteasas en el pienso se sometió a ensayo utilizando un sustrato de caseína insoluble en agua y no el sustrato PROTAZYME AK. El sustrato de caseína insoluble se generó mediante entrecruzamiento de gelatina con caseína, ya que la caseína misma es soluble en solución acuosa. Antes del entrecruzamiento de la gelatina con la caseína, la caseína se marcó con azul brillante Remazol (ABR) de manera que pudo monitorizarse la degradación proteolítica del sustrato de gelatina-CASEÍNA-ABR acabado.

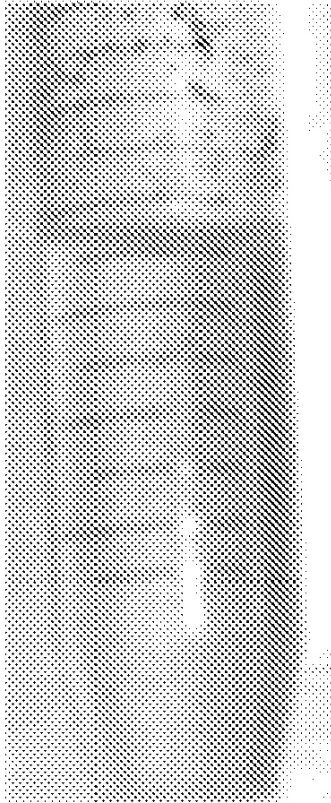
El ensayo de proteasas en el pienso se llevó a cabo generalmente tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria utilizando 100 mg de gelatina-caseína-ABR molido como sustrato para la proteasa VERSAZYME. Específicamente, se introdujeron 3,5 g de pienso en harina en tubos cónicos de 50 ml y se añadieron 20 ml de Tris-Cl 200 mM, pH 9,0, que contenía 5% de SDS a cada muestra. Las muestras analizadas eran "Ctrl (+)" (pienso con 500 U/g de Versazyme añadido después del procesamiento del pienso), "Ctrl (-)" (pienso sin VERSAZYME añadido) y "Muestra" (pienso con 389 U/g de Versazyme añadido antes del procesamiento del pienso). A continuación, se añadió el sustrato de gelatina-caseína-ABR a cada muestra y se mezcló mediante agitación vigorosa. Las muestras se incubaron a 50°C en un baño de agua durante 2 h y se monitorizaron para cambio de color durante el tiempo. Tal como se muestra en la figura 5, se observó una señal fácilmente identificable en las muestras de pienso que contenían VERSAZYME en comparación con el pienso de control sin proteasa añadida.

Estos resultados indican que el ensayo de proteasas en el pienso puede resultar útil con una diversidad de sustratos de proteasa insoluble que contienen un grupo productor de señal, tal como, por ejemplo, un cromóforo, un fluoróforo o un radioisótopo capaz de producir una señal con el corte del sustrato por la proteasa. Los sustratos de proteasa insolubles que contienen un grupo que produce un cambio de color con el corte del sustrato puede resultar útiles con el ensayo de proteasa en el pienso para la inspección visual semicuantitativa y para generar resultados cuantitativos mediante la lectura de la absorbancia con un espectrofotómetro.

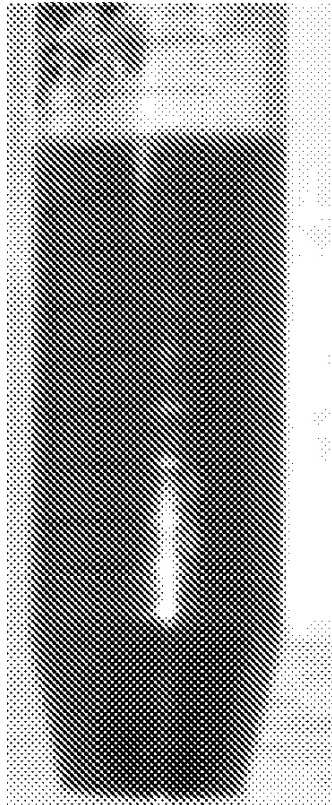
Cualesquiera patentes o publicaciones mencionadas en la presente especificación son indicativos de los niveles de los expertos en la materia a la que se refiere la invención.

REIVINDICACIONES

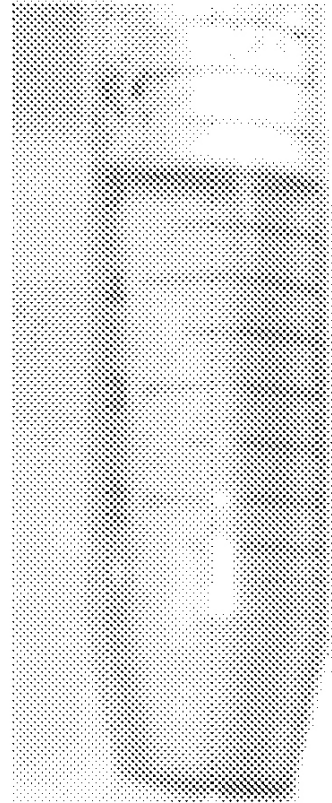
1. Un método para medir actividad de proteasa en una muestra de pienso, que comprende:
 - 5 (a) añadir un sustrato para una proteasa a una muestra de pienso que comprende la actividad de proteasa que debe medirse, en la que el sustrato es insoluble en solución acuosa y comprende un polipéptido unido a un grupo productor de señal de cromóforo, de manera que la señal se produce con el corte del polipéptido por parte de la proteasa, en donde el pienso es un pienso animal y la proteasa es un tipo de proteasa que se añade al pienso animal para mejorar la digestibilidad de las proteínas del pienso, en donde el polipéptido es caseína y en donde el pienso animal es un pienso granulado;
 - 10 (b) incubar el sustrato con la muestra de pienso en un tampón de reacción esencialmente libre de fosfato, que comprende 5% a 15% de dodecilsulfato sódico (SDS) a un pH comprendido entre 6,5 y 10 y a una temperatura de 30°C a 65°C durante un periodo de tiempo comprendido entre 30 minutos y 5 horas, para permitir el corte del polipéptido, de manera que se produce la señal para la medición de la actividad de proteasa, y
 - 15 (c) medir la actividad de proteasa mediante inspección visual de un cambio de color resultante de la señal producida por el cromóforo.
2. Un método para medir actividad de proteasa en una muestra de pienso, que consiste en:
 - 20 (a) añadir un sustrato para una proteasa a una muestra de pienso que comprende la actividad de proteasa que debe medirse, en la que el sustrato es insoluble en solución acuosa y comprende un polipéptido unido a un grupo productor de señal, de manera que la señal se produce con el corte del polipéptido por parte de la proteasa, en donde el pienso es un pienso animal y la proteasa es un tipo de proteasa que se añade al pienso animal para mejorar la digestibilidad de las proteínas del pienso, en donde el polipéptido es caseína y el grupo productor de señal es uno de un cromóforo, un fluoróforo o un radioisótopo, y en donde el pienso animal es un pienso granulado;
 - 25 (b) mezclar el sustrato con la muestra de pienso una o más veces;
 - 30 (c) incubar el sustrato con la muestra de pienso en un tampón de reacción esencialmente libre de fosfato, que comprende 5% a 15% de dodecilsulfato sódico (SDS) a un pH comprendido entre 6,5 y 10 y a una temperatura de 30°C a 65°C durante un periodo de tiempo comprendido entre 30 minutos y 5 horas, para permitir el corte del polipéptido, de manera que se produce la señal para la medición de la actividad de proteasa, y
 - 30 (d) medir cualitativamente, semicuantitativamente o cuantitativamente la actividad de proteasa a partir del nivel de la señal que se produce.
3. Método según la reivindicación 2, en donde el grupo productor de señal es un cromóforo, y en donde la medición se realiza mediante inspección visual de un cambio de color que es resultado de la señal producida por el cromóforo.
4. Método según la reivindicación 1 o 2, en donde el tampón comprende 5% a 10% de dodecilsulfato sódico (SDS).
- 35 5. Método según la reivindicación 1 o 2, en donde el tampón de reacción es un tampón Tris a un pH de 7 a 9.
6. Kit para medir la actividad de proteasa en una muestra de pienso, que comprende:
 - 40 un sustrato para una actividad de proteasa que debe medirse en una muestra del pienso, en donde el sustrato es insoluble en solución acuosa y comprende un polipéptido unido a un grupo productor de señal de cromóforo, de manera que la señal se produce con el corte del polipéptido por parte de la proteasa, en donde el pienso es un pienso animal y la proteasa es un tipo de proteasa que se añade al pienso animal para mejorar la digestibilidad de las proteínas del pienso, en donde el polipéptido es caseína y en donde el pienso animal es un pienso granulado;
 - 45 un tampón de reacción esencialmente libre de fosfato, que comprende 5% a 15% de dodecilsulfato sódico (SDS) en un intervalo de pH de 6,5 a 10 para la actividad de proteasa, y
 - 45 un manual de instrucciones para incubar el sustrato con una muestra de pienso que presenta la actividad de proteasa que debe medirse en el tampón de reacción esencialmente libre de fosfato bajo condiciones que permiten el corte del polipéptido, de manera que se produce la señal para la medición de la actividad de proteasa mediante inspección visual de un cambio de color en la muestra de pienso que es resultado de la señal producida por el cromóforo.
- 50 7. El kit según la reivindicación 6, en donde el tampón comprende 5% a 10% de dodecilsulfato sódico (SDS).
8. El kit según la reivindicación 6, en donde el tampón de reacción es un tampón Tris a un pH de 7 a 9.



**0 U/g VZ
en pienso**



**300 U/g VZ
sin pienso**



**300 U/g VZ
en pienso**

FIG. 1

Ctrl

+VZ

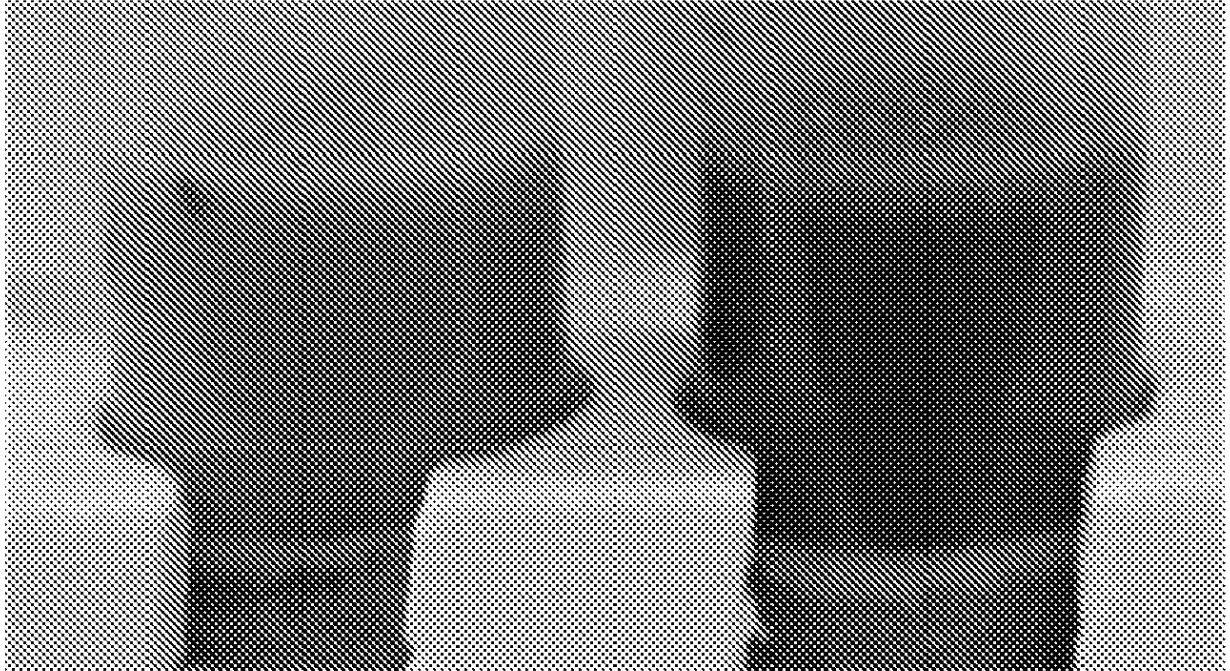


FIG. 2

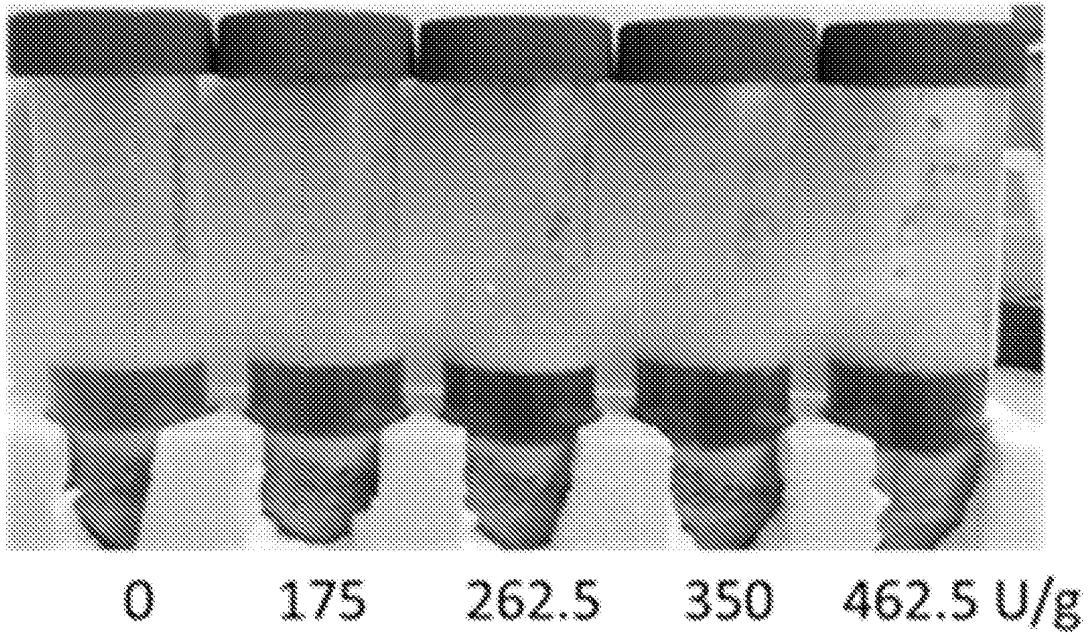


FIG. 3A

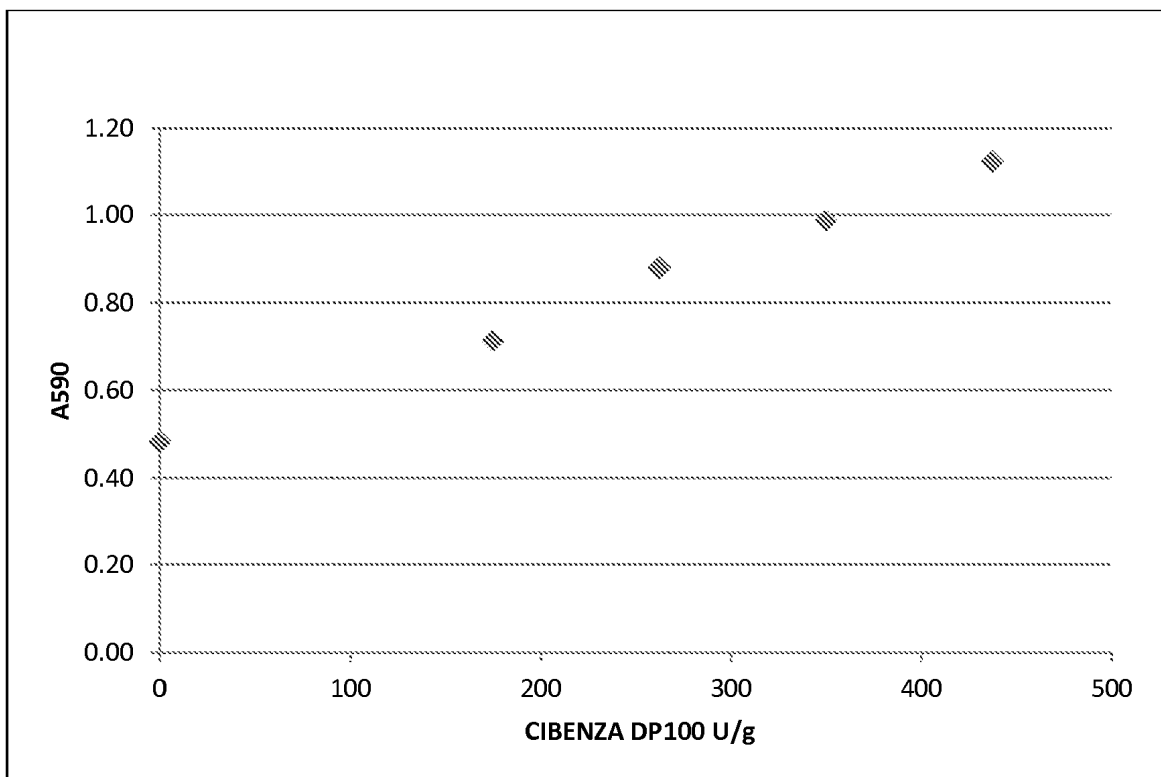


FIG.3B

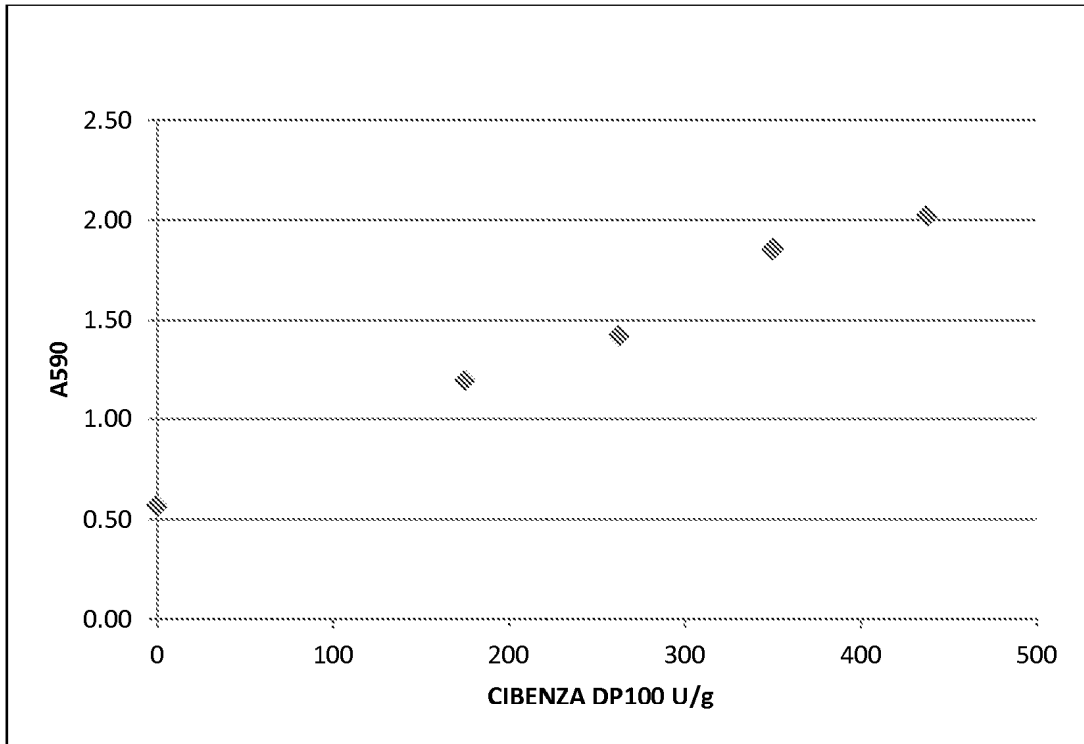


FIG. 3C

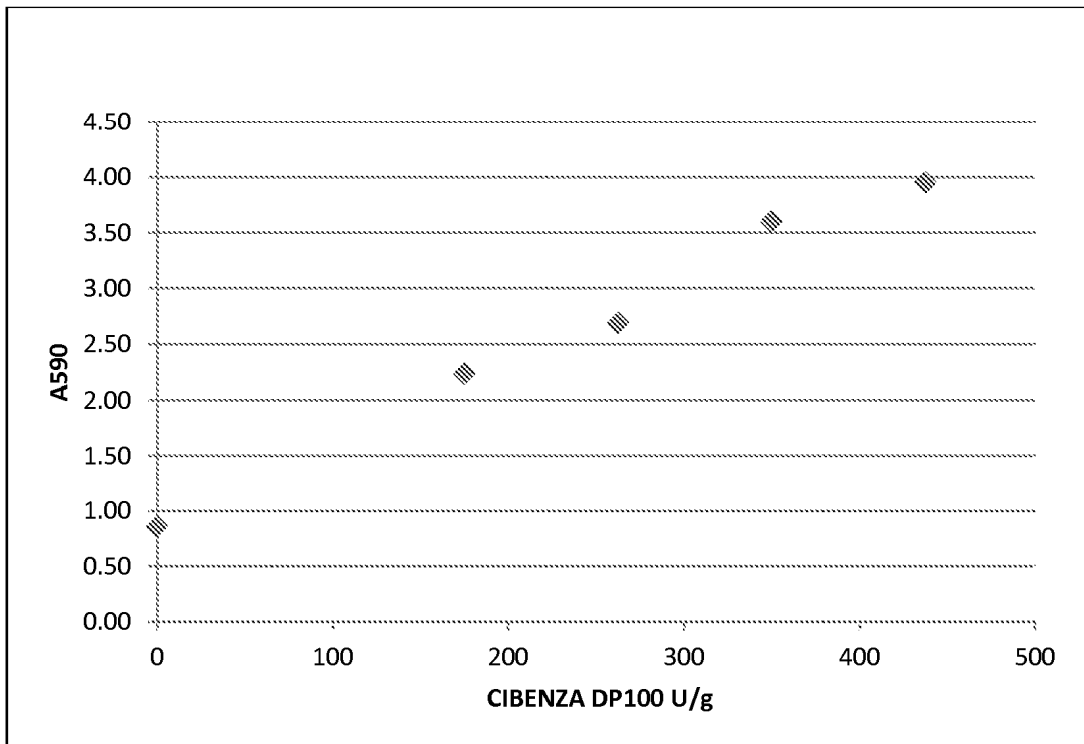


FIG. 3D

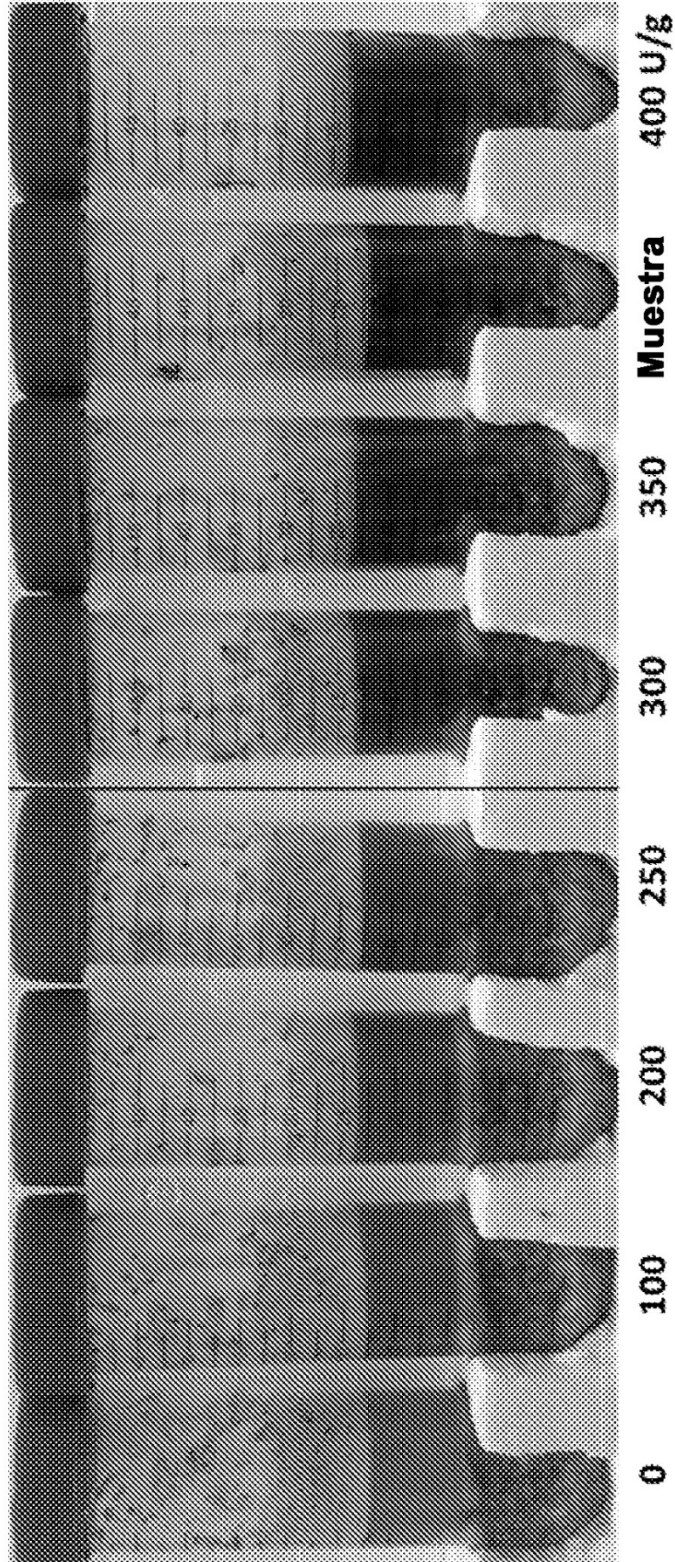
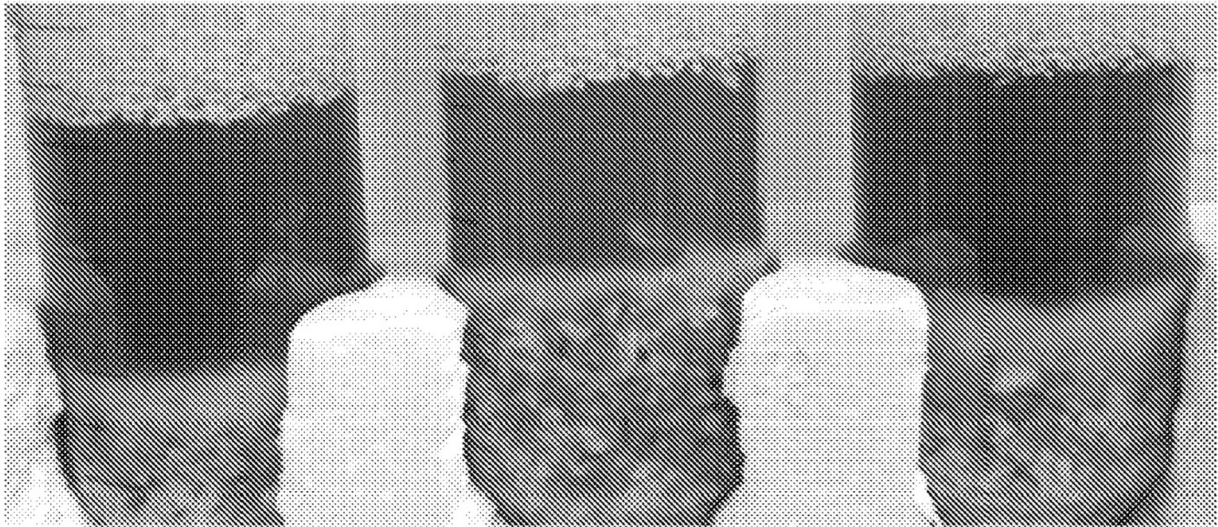


FIG. 4



Ctrl (+)

Ctrl (-)

Muestra

FIG. 5