



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① N.º de publicación: ES 2 039 155

② Número de solicitud: 9102540

⑤ Int. Cl.⁵: C12N 9/38

C12Q 1/34

G01N 33/535

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **15.11.91**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.93**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.08.93

⑦ Solicitante/es:
**Universitat Autònoma de Barcelona
Bellaterra, Barcelona, ES**

⑦ Inventor/es: **Villaverde Corrales, Antonio P.;**
Valero Barranco, Francisco;
Sola Ferrando, Carles;
Benito Mundet, Antoni;
Lafuente Sancho, Francisco Javier y
Cairo Badillo, Jorge Juan

⑦ Agente: **Ponti Grau, Ignacio**

⑤ Título: **Métodos analíticos y equipos automáticos para la determinación cuantitativa de beta-galactosidasa.**

⑤ Resumen:

Métodos analíticos y equipos automáticos para la determinación cuantitativa de beta-galactosidasa.

Un primer método consiste en analizar la concentración de β -galactosidasa mediante análisis por inyección en flujo (FIA), y se realiza automáticamente mediante un ordenador.

Un segundo método aplicado en procesos fermentativos consiste en analizar la concentración de β -galactosidasa mediante análisis por inyección en flujo (FIA), y se caracteriza por un tratamiento previo de la muestra mediante sonicación, inyectando una concentración y volumen de reactivo conocido en una corriente de muestra sonicada portadora, estando presente otro portador tampón que permite realizar diluciones y homogeneizar la muestra.

El caudal de la muestra es variable en función de la concentración de β -galactosidasa y es controlado por ordenador en función de los valores obtenidos y de parámetros programados de antemano.

Comprende los respectivos equipos para la realización de los métodos citados.

También se refiere a la utilización del método aplicado en procesos fermentativos para la determinación de biomasa.

Se reduce el tiempo de análisis.

DESCRIPCION

La presente invención se refiere a un método analítico automático para la determinación cuantitativa de β - galactosidasa y al equipo correspondiente para llevar a cabo el citado método. Más particularmente, se refiere a un método analítico automático para la determinación en línea de β - galactosidasa en procesos fermentativos en los que intervienen microorganismos y al equipo correspondiente.

También se refiere a la utilización de este último método para la determinación de la biomasa.

Antecedentes de la invención

El auge de las enzimas en las industrias químicas, alimentarias y farmacéuticas ha tenido como consecuencia un aumento en los esfuerzos de automatización de los procesos de producción de estas enzimas. No obstante, las estrictas condiciones de esterilidad a las que son sometidos los procesos fermentativos, han impedido disponer de sensores apropiados para la determinación en línea de la concentración enzimática, restringiendo hasta la fecha su uso.

El enzima β - galactosidasa es usado en la industria alimentaria y láctea para la hidrólisis de la lactosa en la leche desnatada, proporcionando un producto exento de lactosa para pacientes que sufren intolerancia de esta sustancia. También se emplea para la conversión de suero de lactosa en jarabes de glucosa y galactosa, así como para tratar sueros acidificados producidos durante la fabricación del requesón.

El enzima β - galactosidasa es muy usado en el campo de la investigación básica y aplicada sobre la expresión génica, tanto de células procariontas como eucariotas, siendo una herramienta muy útil para estabilizar proteínas recombinantes expresadas en bacterias y como indicador en experimentos de clonaje molecular.

La actividad β - galactosidasa de clones individuales creciendo en placa de Petri se detecta por la aparición de un color azul en la colonia cuando se ha añadido X - gal (5 - bromo - 4 - cloro - 3 - indolil - β - D - galactopiranoside) al medio. En cultivos líquidos, la cuantificación de la actividad enzimática se lleva a cabo mediante el test de Miller, un ensayo manual ("off line") basado en la absorción a 420 nm del producto de una reacción catalizada por el enzima sobre un sustrato cromogénico añadido al ensayo.

Un ejemplo de sustrato es o - nitrofenil - β - D - galactopiranoside (ONPG), el cual en presencia de β - galactosidasa se hidroliza en galactosa y o - nitrofenol. El o - nitrofenol es amarillo y puede medirse por su absorción a 420 nm. Si la concentración de ONPG es suficientemente alta la cantidad de o - nitrofenol producida es proporcional a la cantidad de enzima presente y al tiempo en que el enzima reacciona con el ONPG. La reacción se interrumpe añadiendo una solución concentrada de Na_2CO_3 que cambia el pH a 11, produciéndose la inactivación del enzima β - galactosidasa.

El FIA (Flow injection analysis) o Análisis por Inyección en Flujo constituye una reciente e importante innovación metodológica en Química

Analítica que se caracteriza por un fundamento simple, un utillaje barato, un manejo sencillo y cómodo y una gran capacidad para lograr unos resultados que son sorprendentes dadas sus características: rapidez, exactitud y precisión.

Sus características esenciales son:

- El flujo no es segmentado por burbujas de aire, lo que constituye la diferencia fundamental con los métodos clásicos de CFA (Análisis de flujo en continuo).
- La muestra líquida es inyectada e insertada directamente en el flujo en lugar de ser aspirada por el mismo.
- Se realiza el transporte del "segmento" inyectado a través del sistema. Puede también tener lugar un proceso físico - químico adicional al transporte (reacción química, diálisis, extracción líquido - líquido, etc).
- La dispersión o dilución parcial del analito en este transporte puede ser perfectamente manipulada mediante un control de las características geométricas e hidrodinámicas del sistema. Se produce una mezcla incompleta pero reproducible, que da lugar a un gradiente de concentración variable en el tiempo a lo largo del sistema.
- Un sistema de detección continua proporciona una señal transitoria, que es convenientemente registrada.
- En el momento de la detección de la señal no se ha alcanzado el equilibrio físico (que supondría la homogeneización de una porción del flujo) ni el equilibrio químico (reacción completa). Por ello las técnicas FIA pueden considerarse dentro de los métodos cinéticos de análisis y en su modalidad de medida a tiempo fijo.
- El tiempo de operación debe ser muy reproducible pues las medidas se realizan en condiciones de no estabilidad y, por tanto, pequeñas variaciones del mismo pueden producir graves alteraciones de los resultados.

La técnica FIA se encuentra aplicada actualmente a un gran número de compuestos y campos. Así en Química Clínica se aplican métodos no enzimáticos para la determinación tanto de compuestos orgánicos como inorgánicos, mientras que aplicaciones clínicas de análisis enzimáticos se realizan mediante enzimas en disolución, reactores enzimáticos y electrodos enzimáticos. Otra gran aplicación del FIA es en análisis ambiental para la determinación de contaminantes en aguas de especies catiónicas, aniónicas, demanda química de oxígeno (DQO), contaminantes orgánicos y otras especies contaminantes.

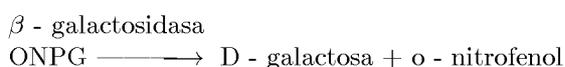
En el artículo "Assay of β - galactosidase activity by Flow Injection Analysis (FIA)" de Cairo J., et al. publicado en la revista *Biotecnology Techniques* Sept/Oct pp. 389 - 392, se describe un

método para la determinación de β - galactosidasa mediante el análisis por inyección en flujo (FIA).

En la figura 1 se representa esquemáticamente dicho método.

La solución a analizar Q_1 con una concentración de β - galactosidasa desconocida es inyectada a través de la válvula automática de inyección en la corriente Q_2 (portador) compuesta por el reactivo ONPG (2 - nitrofenil - β - galactopiranoside) disuelto en tampón Z. Este reactivo se descompone en presencia de luz por lo que el instrumental que lo contenga tiene que estar protegido por la luz.

Esta solución fluye a través de tres metros de tubo, sumergidos en un baño de agua termostaticado, donde se produce la siguiente reacción enzimática catalizada por la β - galactosidasa.



La reacción enzimática se finaliza por la adición al sistema de un tercer canal, Q_3 , conteniendo una solución de carbonato sódico lo que provoca un aumento del pH de la solución por encima de 11 inactivando el enzima. Finalmente la actividad β - galactosidasa es detectada por la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 420 nm en un espectrofotómetro dependiendo ésta de la concentración de o - nitrofenol (de color amarillo) liberado en la reacción, siendo función de la concentración de ONPG empleada y de la concentración de β - galactosidasa presente en la muestra.

En la figura 1 pueden verse la corriente de muestra - Q_1 - , el reactivo ONPG - Q_2 - y la corriente de carbonato sódico - Q_3 - , una bomba multicanal - P - para transportar las distintas corrientes de muestra y reactivos, una válvula de inyección manual (3) a través de la cual se inserta la muestra, un serpentín tubular (4) termostaticado en el que se realiza la reacción, posteriormente a este serpentín se desactiva el enzima, y un dispositivo medidor de absorbancia o espectrofotómetro (5) para la detección del producto. Con la referencia - R - se indican los residuos.

Sin embargo, el método y el equipo descritos son manuales y su rendimiento es limitado. Tampoco puede utilizarse sin más para la determinación de β - galactosidasa en procesos fermentativos en los que intervienen microorganismos.

Descripción de la invención

Con los métodos y equipos de la invención se consiguen resolver los inconvenientes citados proporcionándose otras ventajas y aplicaciones que se describirán.

El método analítico automático para la determinación cuantitativa de β - galactosidasa, objeto de la invención, se basa en el análisis FIA descrito y se caracteriza por el hecho de que el método se realiza automáticamente mediante un ordenador que controla el caudal de la muestra en función de la concentración de β - galactosidasa presente en la muestra obtenida en el análisis y de unos parámetros programados de antemano.

El equipo para la determinación automática

cuantitativa de β - galactosidasa, que comprende una bomba multicanal para transportar las distintas corrientes de muestra y reactivos, una válvula de inyección automática en la que se inserta la muestra, un serpentín tubular termostaticado en el que se realiza la reacción y un dispositivo medidor de absorbancia para la detección del producto, se caracteriza por el hecho de que comprende un ordenador que controla los distintos dispositivos del equipo, recoge los datos del medidor de absorbancia de acuerdo con las características del análisis previamente determinadas y monitoriza la actividad de la β - galactosidasa, y comprende también un registrador para la recogida de los datos.

Se trata pues de un método automático y del equipo correspondiente.

El método analítico automático para la determinación cuantitativa de β - galactosidasa en procesos fermentativos en los que intervienen microorganismos, se basa en el análisis FIA descrito y se caracteriza por el hecho de que consiste en un tratamiento previo de la muestra mediante sonicación, manteniendo el dispositivo de sonicación refrigerado para evitar un aumento de temperatura que desactive el enzima, inyectando una concentración y volumen de reactivo conocido en una corriente de muestra sonicada portadora, estando presente otro portador tampón que permite realizar diluciones y homogeneizar la muestra cuando sea necesario.

Según la realización preferida del citado método, el caudal de la muestra es variable en función de la concentración de β - galactosidasa producida por el microorganismo, siendo el caudal controlado por ordenador en función de los valores que se obtienen en el análisis y de parámetros programados de antemano.

También preferiblemente, en los dos métodos citados, el reactivo utilizado es 2 - nitrofenil - β - galactopiranoside (ONPG), detectándose la actividad enzimática en base al producto D - nitrofenol.

Por otro lado, la temperatura de trabajo preferida está comprendida entre 25°C y 50°C.

También preferentemente, en ambos métodos, la adición de una solución básica se realiza conjuntamente con un detergente para la limpieza de la célula de detección.

El equipo para la determinación automática cuantitativa de β - galactosidasa, en procesos fermentativos en los que intervienen microorganismos, es del tipo que comprende una bomba multicanal para transportar las distintas corrientes de muestra y reactivos, una válvula de inyección automática en la que se inserta la muestra, un serpentín tubular termostaticado en los que se realiza la reacción y un dispositivo medidor de absorbancia para la detección del producto y se caracteriza por el hecho de que comprende un equipo de sonicación en continuo para el tratamiento de la muestra proveniente de un fermentador, un segundo serpentín tubular termostaticado previamente al dispositivo medidor de absorbancia para desactivar el enzima y homogeneizar y estabilizar la mezcla, y un ordenador que controla los distintos dispositivos del equipo, recoge los datos del dispositivo medidor de absorbancia

de acuerdo con las características del análisis previamente determinadas y monitoriza la actividad de la β - galactosidasa y comprende también un registrador para la recogida de los datos.

En caso necesario, el equipo comprende una cámara de dilución donde se produce la mezcla y para la homogeneización de la muestra diluida.

Preferentemente, en los dos equipos descritos, la detección de absorbancia se realiza a 420 nm de longitud de onda y los serpentines termostatizados tubulares tienen un diámetro comprendido entre 0,5 y 1 mm.

También preferentemente, el equipo para la determinación automática cuantitativa de β - galactosidasa, en procesos fermentativos en los que intervienen microorganismos comprende una bomba y una válvula para realizar el paso controlado de la muestra del fermentador al sonicador.

La invención comprende también la utilización del método de determinación automática cuantitativa de β - galactosidasa, en procesos fermentativos en los que intervienen microorganismos, para la determinación de la biomasa. Ello se consigue porque la variación de la línea base del análisis proporciona el nivel de biomasa, debido a que esta línea base de la que parte el pico del análisis por inyección en flujo (FIA), función de la concentración enzimática, aumenta a medida que aumenta la concentración de microorganismo por efecto del crecimiento a medida que transcurre la fermentación.

Breve descripción de los dibujos

Para mejor comprensión de cuanto se ha expuesto se acompañan unos dibujos en los que, esquemáticamente y tan sólo a título de ejemplo no limitativo, se representa un caso práctico de realización.

En dichos dibujos, la figura 1 es un esquema del método analítico para la determinación cuantitativa de β - galactosidasa del estado de la técnica; la figura 2 es un esquema del equipo para la determinación automática cuantitativa de β - galactosidasa, objeto de la invención; la figura 3 es un esquema del método analítico automático para la determinación de β - galactosidasa en procesos fermentativos en los que intervienen microorganismos; la figura 4 es un esquema del equipo correspondiente al método de la figura 3; la figura 5 muestra la variación de la altura del pico de ONPG en función del caudal de dilución utilizado para una misma muestra de β - galactosidasa; la figura 6 muestra dos curvas de calibración para dos caudales de dilución diferentes, indicando en abscisas la concentración de β - galactosidasa y en ordenadas la altura del pico de ONPG; La figura 7 muestra la relación existente entre la densidad óptica de las muestras sonicadas (en abscisas) y de las muestras sin sonicar (en ordenadas) a dos longitudes de onda diferentes; la figura 8 muestra una calibración para distintos caudales de dilución, indicando en abscisas la densidad óptica a 550 nm y en ordenadas la altura de la línea base; y la figura 9 muestra el seguimiento de la biomasa y de la β - galactosidasa, indicándose en abscisas el tiempo y en ordenadas la absorbancia a 550 nm y la concentración de β - galactosidasa en U/ml.

Descripción de ejemplos de realización

La presente descripción está dividida en tres

apartados. En el primero se expone sucintamente el método analítico automático para la determinación cuantitativa de β - galactosidasa, en el segundo el método analítico automático para la determinación de β - galactosidasa en procesos fermentativos en los que intervienen microorganismos y en el tercero la determinación de la biomasa con el mismo método del segundo apartado.

1. - Método analítico automático para la determinación cuantitativa de β - galactosidasa.

En los antecedentes de la invención se ha descrito un método analítico para la determinación cuantitativa de β - galactosidasa basado en el análisis FIA.

Este método está representado en la figura 1.

Según la invención el mismo método se realiza automáticamente mediante un ordenador que controla el caudal de la muestra en función de la concentración de β galactosidasa presente en la muestra obtenida en el análisis y de unos parámetros programados de antemano.

La figura 2 muestra el equipo para realizar el método automático de la invención.

En ella pueden verse una bomba (1) para la muestra, una bomba (2) para el reactivo, una válvula de inyección (3), un esquema FIA (4), un espectrofotómetro (5), un sistema convertidor A/D (6), un ordenador (7), un voltímetro (8) y un registrador (9).

El ordenador (7) controla los distintos dispositivos del equipo, recoge los datos del espectrofotómetro (5) de acuerdo con las características del análisis previamente determinadas y monitoriza la actividad de la β - galactosidasa. El registrador recoge los datos obtenidos.

Este método automático presenta las siguientes características y ventajas en comparación con el test manual.

- El límite de detección es de 25 U/mL.
- La desviación standard relativa es 3 veces menor, 0,954 % frente a 2,4%.
- La automatización del método de análisis es total.
- La velocidad de muestreo es muy elevada, del orden de 55 muestras/hora frente a 12 - 15 muestras/hora en el método manual.

2. - Método analítico automático para la determinación de β - galactosidasa en procesos fermentativos en los que intervienen microorganismos.

En el ejemplo descrito el microorganismo es *Escherichia coli* presente en procesos fermentativos diversos (batch, continuo).

2.1. - Tratamiento previo de la muestra.

De las diferentes estrategias posibles para la liberación al medio de la β - galactosidasa retenida en la célula se utilizó la sonicación. Pruebas realizadas off - line demostraron que con *Escherichia coli*, tres series de sonicación de 20 segundos con un intervalo de parada entre series de 15 segundos, teniendo la muestra refrigerada para evitar un aumento importante de temperatura que desactive el enzima, era suficiente para liberar en el

medio la β - galactosidasa. Para otros microorganismos puede ser necesario modificar el tiempo de exposición de la muestra a la sonicación para obtener la liberación al medio del enzima.

2.2. - Optimización del esquema FIA.

El montaje experimental utilizado (Figura 4) consta de un fermentador (10) del que se toman muestras periódicamente, pasando éstas a través de un equipo de sonicación en continuo (11) previo al equipo de análisis para la determinación de β - galactosidasa. Un ordenador (12) controla toda la secuencia de análisis de acuerdo con los niveles de β - galactosidasa y las limitaciones en cuanto a frecuencia de muestreo.

En la figura pueden verse también una bomba (13) y una válvula de paso (14) para realizar el paso controlado de la muestra del fermentador al sonicador. También pueden verse unas bombas para la muestra (15) y para el reactivo, una cámara de dilución (16) donde se produce la mezcla y para la homogeneización de la muestra diluida, una válvula de inyección (17), un serpentín (18) donde se realiza la reacción, un serpentín (19) para desactivar el enzima y homogeneizar y estabilizar la mezcla, un espectrofotómetro (20) y un registrador (21).

El esquema FIA está representado en la figura 3. En este caso, el portador es la muestra sonicada Q_3 proveniente del sonicador, siendo inyectado en el portador el reactivo específico ONPG Q_1 . La muestra sonicada es diluida antes de entrar en la válvula de inyección por una corriente de agua Q_2 . Para disminuir las oscilaciones de la línea base observadas con muestras reales (presencia de biomasa) se acopla al sistema una cámara de dilución (16) previa a la inyección en la válvula (17) con objeto de homogeneizar la muestra. Esta corriente, Q_2 , tiene un caudal variable en función de la concentración de β - galactosidasa producida por el microorganismo, y que es controlado por el ordenador en función de los valores que se obtienen en el análisis y de unos parámetros programados de antemano.

Una vez la muestra es inyectada pasa a través de 3 metros de tubo (18), termostatzado en un baño a 46°C, que es donde tiene lugar la reacción. Posteriormente se le añade la corriente Q_4 que contiene el carbonato sódico 1M y el SDS 0,5% w/v con los mismos objetivos del método conocido. Finalmente, la solución pasa a través de un serpentín tubular (19) de 1 metro de longitud previo al espectrofotómetro (20) con objeto de homogeneizar la corriente final y evitar oscilaciones no deseadas en el detector.

2.3. - Cuantificación de la actividad enzimática.

En la figura 5 se recoge la variación de la altura de pico de ONPG (en ordenadas) en función del caudal de dilución Q_2 (en abscisas) utilizado para una misma muestra de β - galactosidasa. Esta gráfica proporciona un punto de partida para utilizar el caudal de dilución apropiado para cada concentración enzimática.

En la figura 6 se observan dos curvas de calibración para dos caudales de dilución diferentes. Los círculos corresponden a un caudal de 1,35 ml/min y los triángulos a un caudal de 2,25 ml/min.

A medida que aumentamos el caudal de dilución, se produce una disminución de la señal y por consiguiente un aumento del rango de linealidad, con el inconveniente de perder límite de detección. La optimización del caudal de dilución en función de la última muestra de β - galactosidasa utilizada nos proporciona el análisis óptimo y nos permite seguir automáticamente una fermentación de *Escherichia coli* en que los niveles de β - galactosidasa pueden llegar hasta 4000 U/mL sin necesidad de realizar ninguna modificación del esquema de análisis básico empleado.

No es necesario pues utilizar una mayor concentración de reactivo, o inyectar un mayor volumen del mismo. Únicamente con la variación automática del caudal de dilución se puede conseguir monitorizar "on line" la actividad enzimática producida en una fermentación, ya que sólo se produce un desfase de 3 minutos desde que se extrae la muestra del fermentador hasta que se monitoriza en la pantalla del ordenador, o se archiva en un fichero su actividad, incluyendo la etapa de sonicación.

3. - Determinación "on line" de la biomasa simultáneamente al análisis FIA de β - galactosidasa.

La determinación de la biomasa no es un análisis sencillo de realizar on - line. Actualmente se conocen diferentes técnicas que bien por su complejidad de montaje, sus grandes problemas de operación o su elevado coste, hace que no sean de uso cotidiano en los laboratorios de investigación, y escasamente en procesos industriales.

El método de estimación de biomasa, objeto de la invención, tiene como principal característica su sencillo y operativo modo de empleo, ya que se puede realizar el análisis de la biomasa asociado al análisis de β - galactosidasa.

Un hecho observado durante el análisis de β - galactosidasa de muestras reales de fermentación sonicadas es que la línea base de la que parte el pico FIA es mayor a medida que el microorganismo va creciendo. Se trata, por tanto, de aprovechar el aumento de la línea base para poder estimar la biomasa existente en el reactor.

3.1. Calibración de la biomasa entre muestras sonicadas y sin sonicar.

En la figura 7 se observa que la relación existente entre la densidad óptica de las muestras sonicadas (en abscisas) y sin sonicar (en ordenadas) es lineal a las dos longitudes características del análisis. Los círculos representados en la figura corresponden a 550 nm (longitud habitual de determinación de biomasa) y los cuadrados a 420 nm (longitud habitual de determinación del análisis de β - galactosidasa).

Podría interpretarse que el aumento de la densidad óptica de las muestras sonicadas a altas concentraciones de microorganismo se debe a que la sonicación ha sido incompleta, con lo que además de falsear los resultados de biomasa, se estaría infravalorando la concentración de β - galactosidasa, ya que parte del enzima no habría sido liberada al medio.

No obstante, pruebas realizadas "off - line" demostraron que el tiempo de sonicación al que eran sometidas las muestras era suficiente para liberar todo el enzima, y que un mayor tiempo de expo-

sición no provocaba un descenso de la densidad óptica.

La lectura de la densidad óptica se realiza "off - line" a 550 nm, pero no se observaron problemas al realizarse a 420 nm, longitud de onda empleada para el análisis de β - galactosidasa.

Una calibración D.O. altura de línea base para diferentes caudales de dilución se presenta en la figura 8, en donde los círculos corresponden a un caudal de 1,35 ml/min y los cuadrados a un caudal de 2,25 ml/min.

3.2. Aplicación a un caso concreto; fermentación de *Escherichia coli*.

Estas técnicas desarrolladas y comentadas se pusieron en práctica en un caso real de fermentación *Escherichia coli* para producción de β - galactosidasa. En la figura 9 se recoge el seguimiento efectuado de la biomasa y de la β - galactosidasa y su comparación con las muestras efectuadas "off - line". En abscisas se indica el tiempo y en ordenadas la absorbancia a 550 nm y la concentración de β - galactosidasa en U/ml. Los triángulos corresponden a la β - galactosidasa y los círculos a la biomasa.

Como se observa, el seguimiento es óptimo y la automatización del esquema de análisis y la monitorización de estas dos variables es un hecho consumado que puede ayudar a este tipo de sistemas y a otros similares.

El sistema descrito permite múltiples aplicaciones, que se exponen sucintamente a continuación:

1. Análisis y cuantificación de β - galactosidasa de cualquier muestra natural.
2. Análisis y cuantificación de β - galactosidasa en controles de calidad de productos en cuya elaboración haya intervenido este enzima.
3. Análisis y cuantificación de β - galactosidasa durante procesos catalizados por este enzima.

4. Análisis, monitorización y cuantificación de β - galactosidasa durante su producción por fermentación de microorganismos.

5. Análisis y cuantificación de β - galactosidasa de muestras procedentes de tests bacterianos basados en la expresión de gen *lacZ* completo o no, fusionado con la región operadora de un gen (o con el propio gen), para la detección de sustancias ante las cuales se produzca la inducción. Por ejemplo, el cromotest para la detección de agentes genotóxicos.

6. Análisis, monitorización y cuantificación de la expresión génica durante fermentación o crecimiento de microorganismos en batch, fed - batch o en cultivo continuo, en los cuales la región reguladora o el gen de interés se encuentre fusionado con el gen *lacZ* completo o parcial.

7. Análisis, monitorización y cuantificación de la producción de proteínas recombinantes fusionadas con β - galactosidasa, codificadas en cualquier elemento genético celular, plasmídico o vírico.

8. Análisis, monitorización y cuantificación de la producción de proteínas recombinantes fusionadas con β - galactosidasa completa o truncada, o de β - galactosidasa completa o truncada, siempre que dichas proteínas retengan total o parcialmente la actividad enzimática.

9. Análisis, monitorización y cuantificación de la actividad β - galactosidasa en cultivos expresando proteínas conteniendo segmentos de enzima, fusionadas o no, que no manifiesten la actividad enzimática, siempre que ésta pueda ser recuperada por complementación con productos truncados o no, codificados en el genoma celular, en plásmidos, o en cualquier otro elemento genético.

REIVINDICACIONES

1. Método analítico automático para la determinación cuantitativa de β - galactosidasa, que consiste en analizar la concentración de β - galactosidasa mediante análisis por inyección en flujo (FIA), insertando una solución con una concentración de β - galactosidasa desconocida en una corriente de reactivo portador, que contenga β - D - galactopiranoside y un grupo radical que proporciona color cuando se rompe el enlace por la acción del enzima, siendo dicho reactivo disuelto en tampón y estando protegido generalmente de la acción de la luz, realizándose una reacción que produce D - galactosa más el grupo radical, finalizándose la reacción mediante la adición de una solución básica hasta obtenerse el pH adecuado para la inactivación del enzima, y detectándose la actividad enzimática en base a la intensidad del color, **caracterizado** por el hecho de que el método se realiza automáticamente mediante un ordenador que controla el caudal de la muestra en función de la concentración de β - galactosidasa presente en la muestra obtenida en el análisis y de unos parámetros programados de antemano.

2. Método analítico automático para la determinación cuantitativa de β - galactosidasa en procesos fermentativos en los que intervienen microorganismos, que consiste en analizar la concentración de β - galactosidasa mediante análisis por inyección en flujo (FIA), en la que el reactivo contiene β - D - galactopiranoside y un grupo radical que proporciona color cuando se rompe el enlace por la acción del enzima, siendo dicho reactivo disuelto en tampón y estando protegido generalmente de la acción de la luz, realizándose una reacción que produce D - galactosa más el grupo radical, finalizándose la reacción mediante la adición de una solución básica hasta obtenerse el pH adecuado para la inactivación del enzima, y detectándose la actividad enzimática en base a la intensidad del color, **caracterizado** por el hecho de que consiste en un tratamiento previo de la muestra mediante sonicación, manteniendo el dispositivo de sonicación refrigerado para evitar un aumento de temperatura que desactive el enzima, inyectando una concentración y volumen de reactivo conocido en una corriente de muestra sonificada portadora, estando presente otro portador tampón que permite realizar diluciones y homogeneizar la muestra cuando sea necesario.

3. Método según la reivindicación 2, **caracterizado** por el hecho de que el caudal de la muestra es variable en función de la concentración de β - galactosidasa producida por el microorganismo, siendo el caudal controlado por ordenador en función de los valores que se obtienen en el análisis y de parámetros programados de antemano.

4. Método según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** por el hecho de que el reactivo utilizado es 2 - nitrofenil - β - galactopiranoside (ONPG), detectándose la actividad enzimática en base al producto D - nitrofenol.

5. Método según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** por el hecho de que la tempera-

tura de trabajo está comprendida entre 25°C y 50°C.

6. Método según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** por el hecho de que la adición de una solución básica se realiza conjuntamente con un detergente para la limpieza de la célula de detección.

7. Equipo para la determinación automática cuantitativa de β - galactosidasa, que comprende una bomba multicanal (P) para transportar las distintas corrientes de muestra (Q_1) y reactivos (Q_2), una válvula de inyección automática (3) en la que se inserta la muestra, un serpentín tubular termostatzado (4) en el que se realiza la reacción y un dispositivo medidor de absorbancia (5) para la detección del producto, **caracterizado** por el hecho de que comprende un ordenador (7) que controla los distintos dispositivos del equipo, recoge los datos del medidor de absorbancia (5) de acuerdo con las características del análisis previamente determinadas y monitoriza la actividad de la β - galactosidasa, y comprende también un registrador (9) para la recogida de los datos.

8. Equipo para la determinación automática cuantitativa de β - galactosidasa, en procesos fermentativos en los que intervienen microorganismos, que comprende una bomba multicanal (P) para transportar las distintas corrientes de muestra (Q_3) y reactivos (Q_1), una válvula de inyección automática (17) en la que se inserta la muestra (Q_3), un serpentín tubular termostatzado (18) en los que se realiza la reacción y un dispositivo medidor de absorbancia (20) para la detección del producto, **caracterizado** por el hecho de que comprende un equipo de sonicación (11) en continuo para el tratamiento de la muestra proveniente de un fermentador (10), un segundo serpentín tubular termostatzado (19) previamente al dispositivo medidor de absorbancia (20) para desactivar el enzima y homogeneizar y estabilizar la mezcla, y un ordenador (12) que controla los distintos dispositivos del equipo, recoge los datos del dispositivo medidor de absorbancia (20) de acuerdo con las características del análisis previamente determinadas y monitoriza la actividad de la β - galactosidasa y comprende también un registrador (21) para la recogida de los datos.

9. Equipo según la reivindicación 8, **caracterizado** por el hecho de que comprende una cámara de dilución (16) donde se produce la mezcla y para la homogeneización de la muestra diluida.

10. Equipo según las reivindicaciones 7 y 8, **caracterizado** por el hecho de que la detección de absorbancia se realiza a 420 nm de longitud de onda.

11. Equipo según las reivindicaciones 7 y 8, **caracterizado** por el hecho de que los serpentines termostatzados tubulares (18,19) tienen un diámetro comprendido entre 0,5 y 1 mm.

12. Equipo según la reivindicación 8, **caracterizado** por el hecho de que comprende una bomba (13) y una válvula (14) para realizar el paso controlado de la muestra del fermentador (10) al sonicador (11).

13. Utilización del método de las reivindicaciones 2 a 6 para la determinación de la biomasa, proporcionando la variación de la línea base, el nivel de biomasa, debido a que esta línea base de la que parte el pico del análisis por inyección

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

en flujo (FIA), función de la concentración enzimática, aumenta a medida que aumenta la concentración de microorganismo por efecto del crecimiento a lo largo de la fermentación.

FIG.1

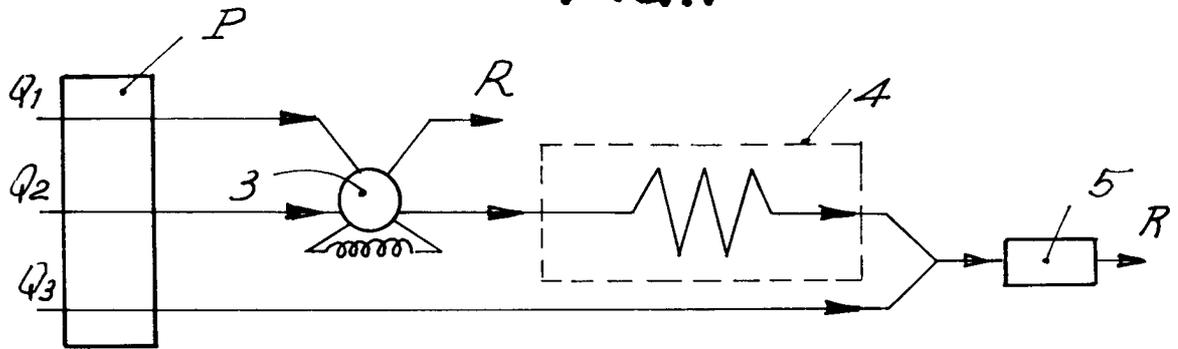


FIG.2

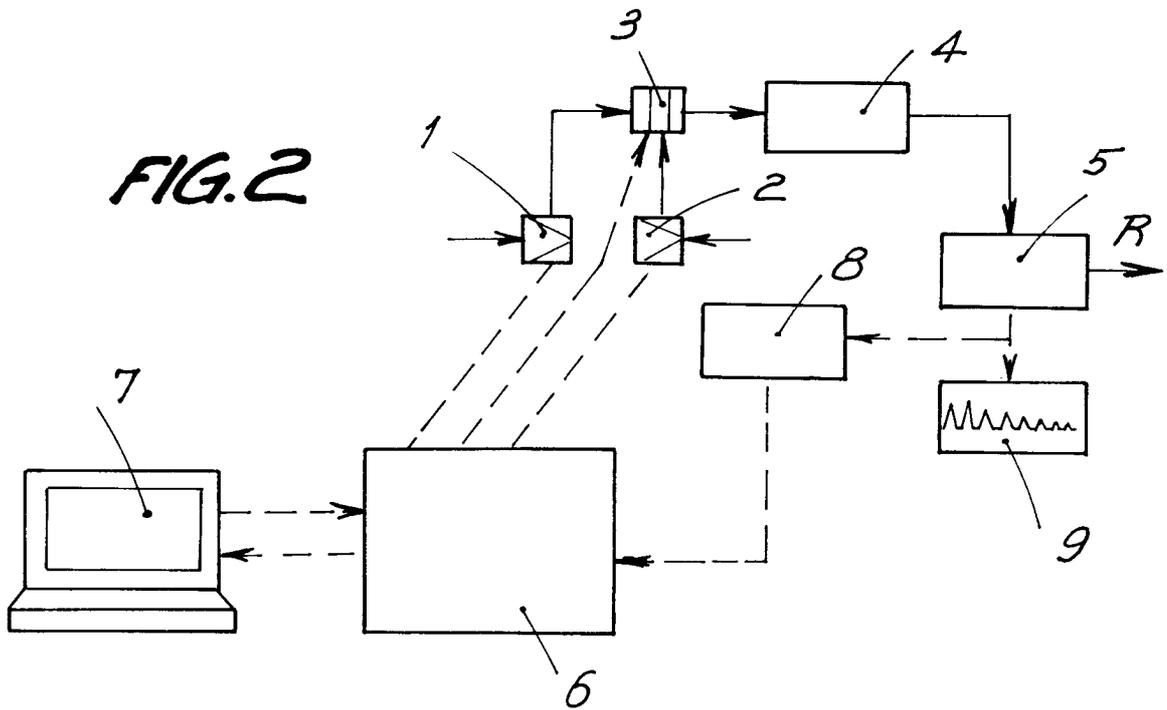


FIG. 3

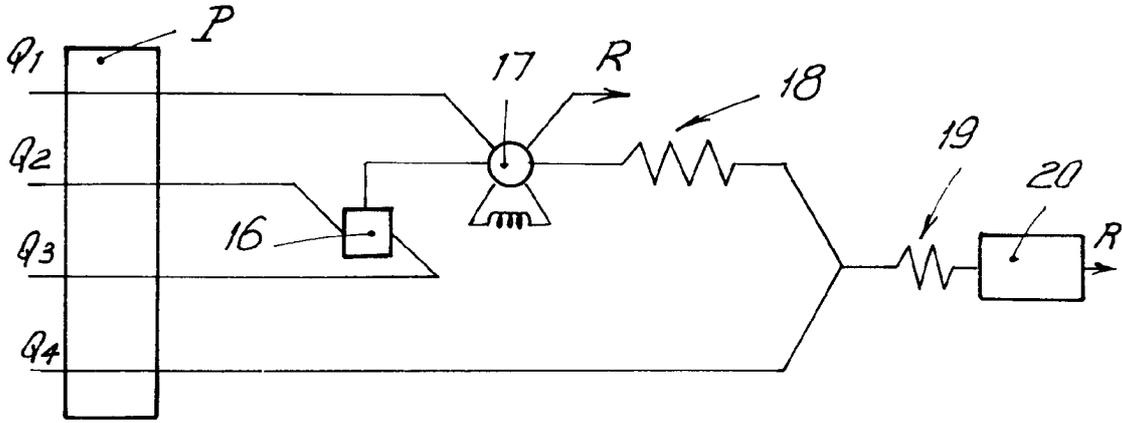
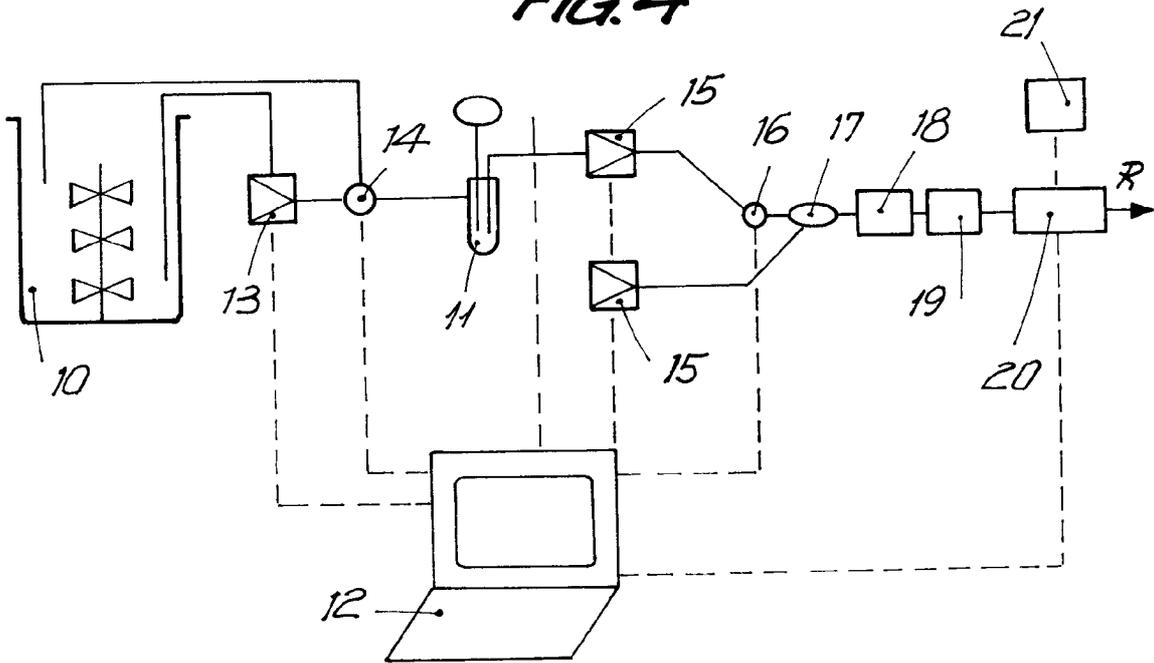


FIG. 4



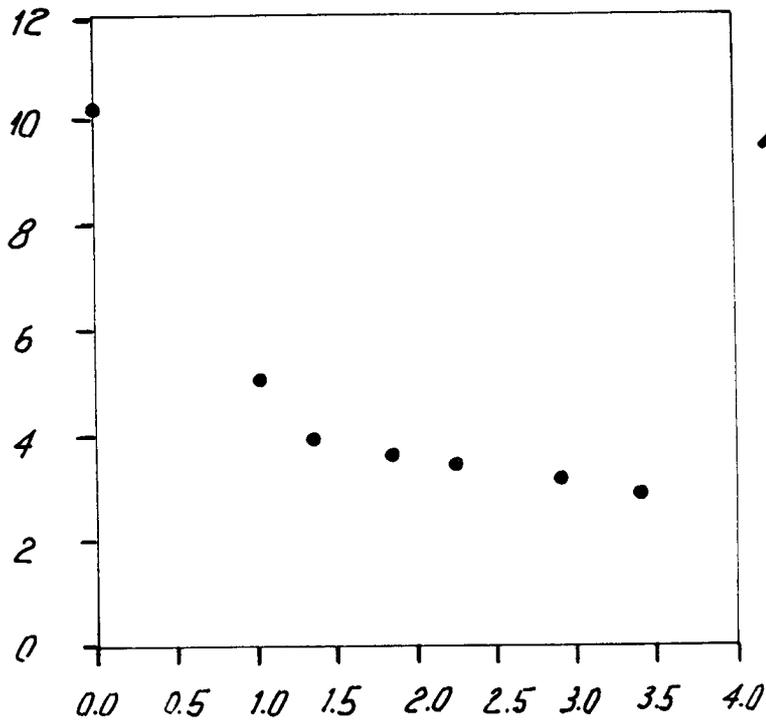


FIG. 5

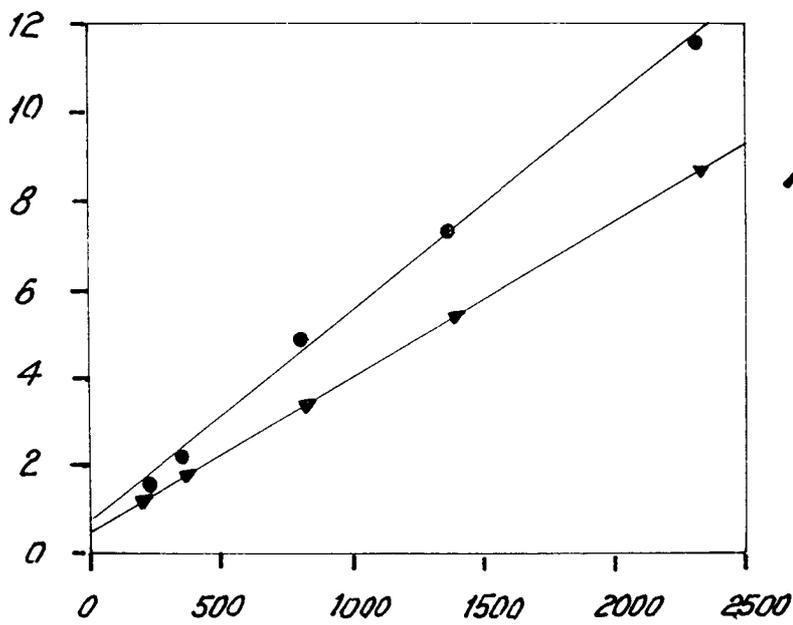


FIG. 6

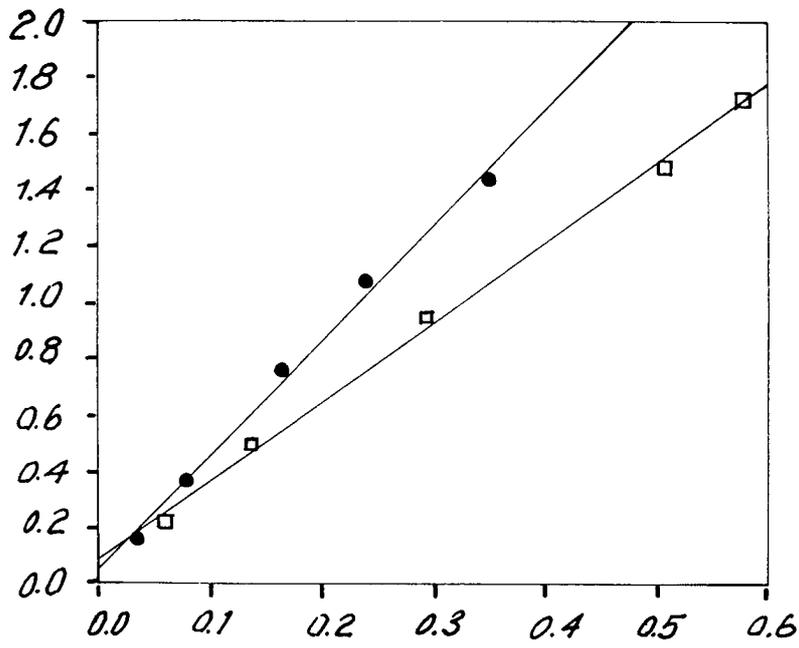


FIG. 7

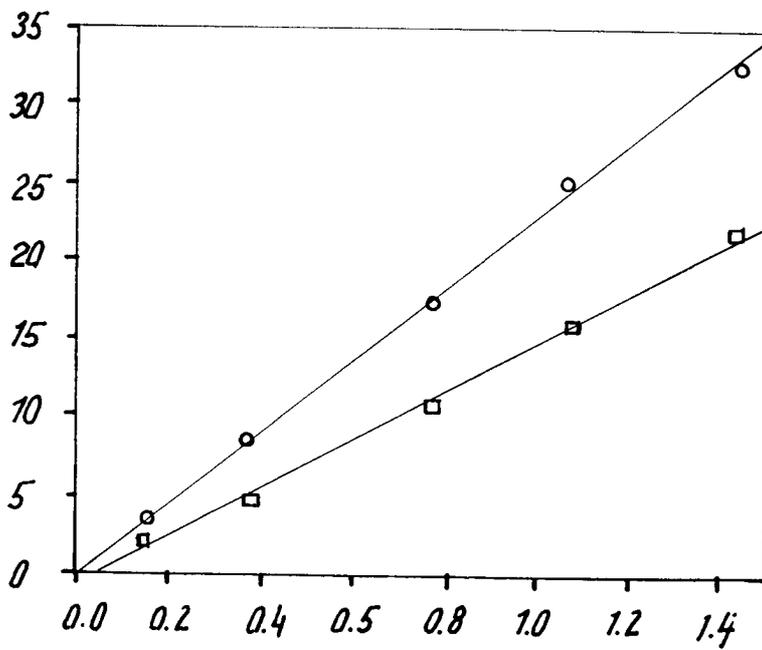
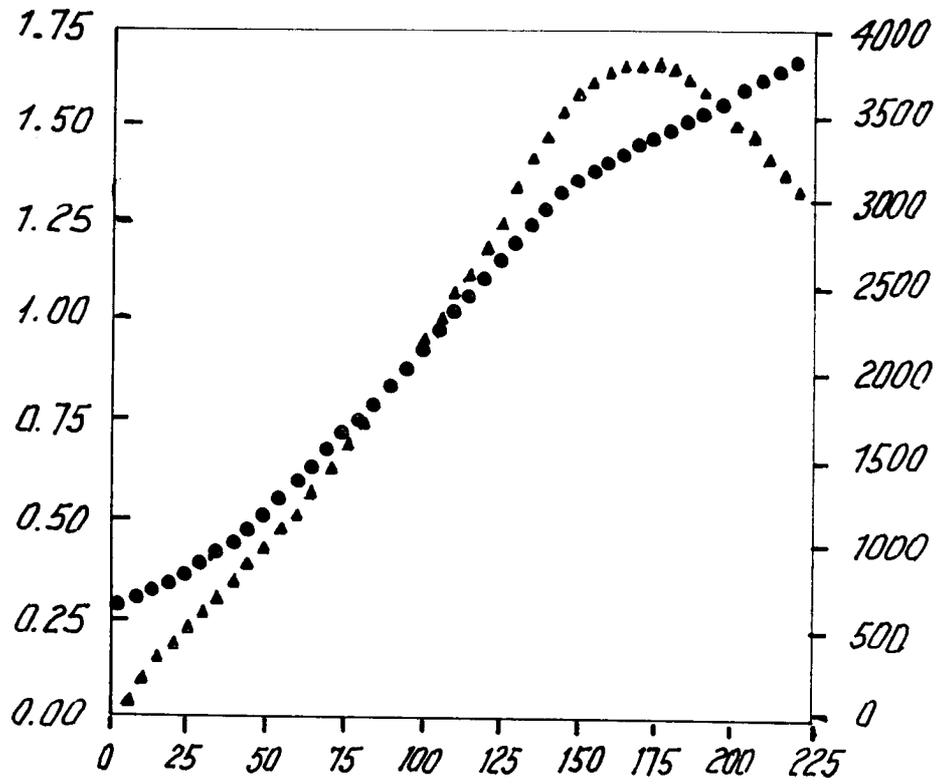


FIG. 8

FIG. 9





INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁵: C12N 9/38, C12Q 1/34, G01N 33/535

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	QUIMICA ANALITICA, Vol. 8, núm. 2, pp. 223-230. M. BLANCO et al. "Diode assay detectors in flow injection analysis".	1-3,7-10 13
A	TECNICAS DE LABORATORIO, 1989, 12(147) pp. 22-27. M. BLANCO et al. "Utilización de programas de gestión en química analítica".	
A	METALURGIA Y ELECTRICIDAD A 180, 44(512), pp. 59-63. JAVIER GUTIERREZ MONREAL et al. "La instrumentación analítica industrial".	
A	EP-A-0413561 (MICROGENICS CORPORATION)	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

22.03.93

Examinador

M. Ybarra Fernández

Página

1/1