

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2015/128512 A1**

(43) Fecha de publicación internacional  
3 de septiembre de 2015 (03.09.2015) **WIPO | PCT**

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:  
*G01N 21/33* (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)  
*G01N 21/64* (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2014/000051
- (22) Fecha de presentación internacional:  
27 de marzo de 2014 (27.03.2014)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:  
P201400165  
28 de febrero de 2014 (28.02.2014) ES
- (71) Solicitante: UNIVERSIDAD DE CANTABRIA [ES/ES];  
Pabellón de Gobierno, Avda. de los Castros s/n, E-39005  
Santander (Cantabria) (ES).
- (72) Inventores: VALIÑO LLAMAZARES, Virginia;  
Departamento Ingeniería Química y Biomolecular,  
E.T.S.I., Industriales y Telecomunicaciones, Avda. de los  
Castros 46, E-39005 Santander (Cantabria) (ES).

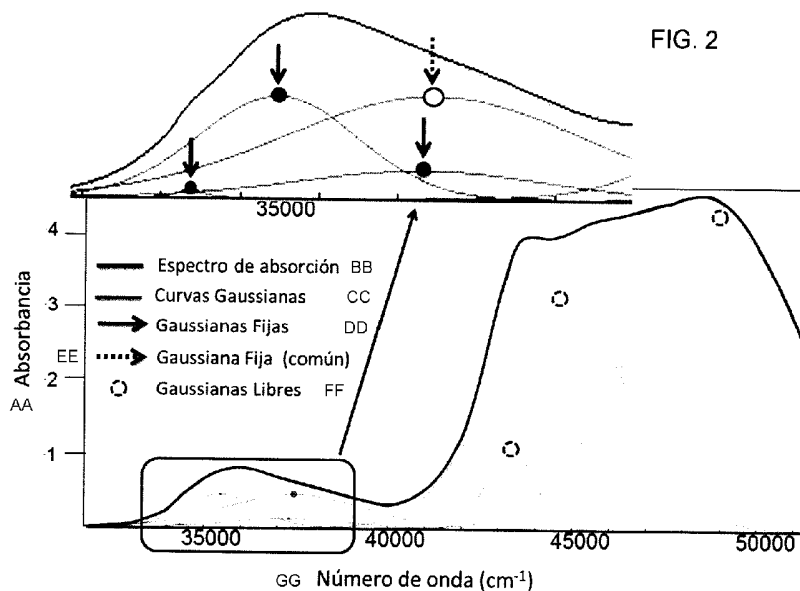
VALIENTE BARROSO, Rafael; Departamento Física Aplicada. Facultad de Ciencias, Avda. de los Castros 48, E-39005 Santander (Cantabria) (ES). SAN ROMÁN SAN EMETERIO, María Fresnedo; Departamento Ingenierías Químicas y Biomolecular E.T.S.I., Industriales y Telecomunicaciones, Avda. de los Castros 46, E-39005 Santander (Cantabria) (ES). IBÁÑES MENDIZÁBAL, Raquel; Departamento Ingenierías Químicas y Biomolecular E.T.S.I., Industriales y Telecomunicaciones, Avda. de los Castros 46, E-39005 Santander (Cantabria) (ES). ORTIZ URIBE, Inmaculada; Departamento Ingenierías Químicas y Biomolecular E.T.S.I., Industriales y Telecomunicaciones, Avda. de los Castros 46, E-39005 Santander (Cantabria) (ES).

- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: SPECTROSCOPIC METHOD FOR DETERMINING PROTEINS IN COMPLEX MEDIA

(54) Título : MÉTODO ESPECTROSCÓPICO PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EN MEDIOS COMPLEJOS



(57) Abstract: The invention relates to a method for the quantitative determination of two proteins with similar characteristics in a sample, based on spectroscopic UV absorption and fluorescence measurements. This method allows the concentration of the proteins to be obtained in a simple and rapid manner, avoiding the destruction of the sample. It can be used in biotechnology or food sectors.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un método de determinación cuantitativa de dos proteínas con características similares en una muestra, basado en medidas espectroscópicas de fluorescencia y absorción en UV. Este método permite obtener la concentración de las proteínas de una forma sencilla y rápida evitando la destrucción de la muestra, y es útil en los sectores biotecnológico o alimentario.

AA Absorbency  
BB Absorption spectrum  
CC Gaussian curves  
DD Gaussians fixed  
EE Gaussian fixed (common)  
FF Gaussians free  
GG Wave number (cm<sup>-1</sup>)

WO 2015/128512 A1



NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**(84) Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*):

ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG,

**Publicada:**

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

## **Método espectroscópico para la determinación de proteínas en medios complejos**

5 La presente invención se refiere a un método de determinación cuantitativa de una mezcla de dos proteínas en una muestra, basado en medidas espectroscópicas de fluorescencia y absorción en la región ultravioleta- visible (UV-Vis). Este método es aplicable principalmente en el sector en el sector alimentario y en procesos biotecnológicos donde la separación y valorización de proteínas precisa su determinación cuantitativa.

10

### **ESTADO DE LA TÉCNICA**

15 En la naturaleza existen moléculas con un alto interés comercial debido a sus propiedades farmacéuticas y nutracéuticas como son las proteínas del suero lácteo. Éstas se encuentran siempre en medios complejos y en muchos casos presentan características similares, por lo que su separación y posterior cuantificación resulta complicada.

Las técnicas para la cuantificación de proteínas pueden dividirse en dos tipos:

- 20
- Técnicas para la determinación de la concentración total de proteínas, tales como los métodos Kjeldahl, Sorensen-Walker, la reacción Folin-Ciocalteu, espectrofotometría UV-Vis, refractometría, técnicas turbidimétricas y nefelométricas, método Bradford, Lowry o de fijación de colorante (BCA).

25

  - Técnicas para la detección individual de proteínas: electroforesis, cromatografía y técnicas de inmunoensayo (ELISA).

30 Aunque existen propuestas en la bibliografía para la determinación de proteínas del suero lácteo tanto de manera total como individual, hasta la fecha ninguna de ellas permite obtener resultados fiables cuando se trata de proteínas con contenidos en aminoácidos similares, así como tamaños y propiedades poco diferenciables que implican la imposibilidad de su medida mediante la lectura simple de los espectros de absorción o en su aislamiento por tamaño.

Los métodos para la determinación de la concentración total de proteínas se basan en aproximaciones del contenido proteico total al de una proteína modelo, la albúmina de suero bovino (BSA), dando valores de concentración que difieren  
5 en muchos casos de la realidad, ya que las proteínas diferenciadas presentan valores distintos de absorbancia para una misma concentración, posiblemente debido a efectos de agregación.

Algunos métodos para la determinación de proteínas en leche han sido descrito  
10 en los siguientes documentos: Rukke, E. O., et al. *Journal of Dairy Science* 93.7 (2010): 2922-2925: *Comparing calibration methods for determination of protein in goat milk by ultraviolet spectroscopy*, donde se determina la concentración proteica total basada en la cuarta derivada de los espectros de absorción; sin embargo, estas medidas se hacen en base a una proteína modelo, difiriendo los  
15 valores de absorción con respecto a las proteínas reales en algunos casos con incertidumbres superiores al 30%. En el artículo publicado por Bogomolov A., and Melenteva A. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 126 (2013): 129–139 titulado *Scatter-based quantitative spectroscopic analysis of milk fat and total protein in the region 400–1100 nm in the presence of fat globule size variability*, se realiza un análisis espectroscópico cuantitativo basado en la  
20 dispersión de grasa y proteína total en la región de 400-1100 nm en presencia de glóbulos de grasa de tamaño variable. De igual modo aproxima el valor de proteína total a estándares cuya concentración puede diferir de la real y, por tanto, de la absorbancia real.

25

Los métodos de determinación de la concentración total de proteínas (Kjeldahl y absorción, fundamentalmente) sólo pueden determinar aproximaciones en la concentración de proteínas cuando se encuentran en mezclas que toman como referencia una proteína modelo.

30

Por otra parte, los métodos para la determinación individual de proteínas son costosos, lentos, destructivos y no aplicables a medios complejos ya que son muy sensibles a las interferencias. Un ejemplo de estas interferencias puede ser

la presencia de sales que forman iones simples mucho más afines a las columnas basadas en intercambio iónico u otras proteínas de características similares que pueden tener bandas de absorción en el mismo rango espectral.

5 Tal y como se acaba de describir se puede concluir que, los métodos disponibles para la medida de proteínas lácteas presentan grandes inconvenientes. Con respecto a las técnicas de determinación individual como son las de inmunoensayo, a pesar de ser muy sensibles, tienen un elevado coste, ya que para su medida es necesario el uso de un kit que no puede ser usado más de  
10 una vez. Por otro lado, los ligandos específicos tienen muchas limitaciones en cuanto al medio en que están presentes, siendo la presencia de tensioactivos, así como de otras proteínas similares una interferencia importante; por otra parte, el color producido por la unión se desvanece con el tiempo.

15 Las técnicas electroforéticas, a pesar de que se ha producido una mejora de las mismas respecto a su velocidad, automatización y reproducibilidad, al estar basadas en el tamaño y movilidad electroforética de las proteínas no permiten distinguir proteínas similares, siguen teniendo limitaciones en la sensibilidad y reproducibilidad, especialmente debido a la interferencia de otras sustancias que  
20 puedan estar presentes en el medio.

Las técnicas cromatográficas (cromatografía líquida) son caras debido al uso de columnas con baja vida útil y presentan el gran inconveniente de la alta generación de residuos. De igual modo, el medio juega un papel importante en  
25 estas medidas no siendo posible la medida en medios con alto contenido salino.

En el caso de los métodos de fluorescencia aplicados hasta el momento, éstos se basaban en ligar la proteína a una sustancia fluorescente pero este proceso es laborioso, destructivo y caro, y en general no tiene en cuenta efectos de  
30 agregación.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención resuelve los inconvenientes que presentan los métodos de cuantificación de proteínas disponibles hasta el momento y presenta un método de medida de dos proteínas de características similares en un medio electrolítico mediante la combinación de las medidas de los espectros de fluorescencia fotoestimulada y de absorción en el rango ultravioleta. Se trata de una medida no destructiva, rápida, fiable, y en la que se reducen los costes de operación significativamente. Además, es un método en el que no se generan residuos.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para la determinación cuantitativa de una mezcla de dos proteínas en una muestra biológica aislada que comprende:

- i. Realizar la calibración de la intensidad y posición de las bandas de fluorescencia y absorción ultravioleta con muestras patrones de concentración de cada una de las proteínas a determinar y de sus muestras en medio electrolítico y con el pH fijado entre 3-9 mediante el empleo de cubetas de cuarzo;
- ii. Medir el espectro de excitación de fluorescencia en la longitud máxima de emisión de la proteína para obtener curvas de intensidad en fluorescencia vs. longitud de onda;
- iii. Determinar la posición del centro de la banda de fluorescencia vs. al número de onda para las proteínas individuales y sus mezclas y realizar el calibrado de la posición en función del porcentaje de una de ellas;
- iv. Medir el espectro de absorción en el rango azul-ultravioleta de las proteínas individuales y sus mezclas para obtener los espectros de absorción en ultravioleta vs. al número de onda;

- 5 v. Determinar la concentración de las proteínas en la muestra mediante el ajuste del perfil a la contribución de gaussianas libres y fijas que describan los perfiles de absorción ultravioleta-visible, coincidiendo en posición y anchura una de las gaussianas fijas para ambas proteínas. El número de gaussianas necesarias para cada proteína se determinará en el proceso de ajuste de los espectros permaneciendo el número constante a lo largo de las mediciones;
- 10 vi. Determinar las curvas de intensidad de absorción dada por la altura de la gaussiana común frente a la concentración en función del porcentaje de proteína y realizar una curva de calibrado pendiente de la recta frente al porcentaje de proteína;
- 15 vii. Medir los espectros de excitación y absorción ultravioleta de la muestra problema;
- viii. Determinar la posición de la banda de excitación y con la recta de calibración el porcentaje de una de las proteínas;
- 20 ix. Determinar la altura de la gaussiana común en los ajustes de la curva de absorción ultravioleta y con el valor de la pendiente de la curva de calibración determinar la concentración total.

25 Una vez obtenidos estos datos se procede al cálculo de la concentración de la muestra teniendo en cuenta que será proporcional a la altura de la gaussiana común.

En el caso de que el método no se cumpla, diluir la mezcla dado que puede estar superando el rango de concentración máxima (1mg/mL).

30

En primer lugar, se realiza el calibrado tanto de la intensidad de la fluorescencia como de la absorción ultravioleta de muestras patrones de concentración de la proteína individual conocida y de mezclas de composición y concentración

fijadas. Se ajusta el pH a un valor fijo entre 3 y 9 (v. Ejemplo) para evitar variaciones en los espectros de la muestra mediante la adición de ácido o base como por ejemplo NaOH o HCl.

5 Para la realización del calibrado es necesario medir los patrones tanto de la intensidad de fluorescencia como de la absorción ultravioleta-visible. Primeramente, se mide la absorción obteniéndose los espectros de absorción vs. al número de onda. Posteriormente, se determina el máximo de emisión de la proteína. Por último, se mide el espectro de excitación de la fluorescencia en  
10 la longitud del máximo de emisión de las proteínas y se obtienen las curvas de intensidad de la fluorescencia vs. al número de onda.

Del espectro de fluorescencia se obtiene el calibrado de la posición de la banda de excitación de la fluorescencia vs. al número de onda frente al porcentaje en  
15 peso de una de las proteínas de la mezcla binaria. Con este calibrado se puede determinar la proporción de cada proteína en la muestra.

De la medida de absorción se puede determinar la concentración total de proteínas en la muestra. Para ello es necesario representar la curva de  
20 absorbancia vs. al número de onda y ajustar el perfil a la contribución de gaussianas libres y fijas que describan el perfil del espectro, coincidiendo en posición y ancho una de las gaussianas fijas para ambas proteínas. En la presente invención se entiende como "gaussianas libres" aquellas curvas a las que no se les ha fijado ni la posición, ni la anchura ni la altura. En la presente  
25 invención se entiende como "gaussianas fijas" aquellas curvas a las que se les ha restringido tanto su posición como anchura, dejando solo libre el valor de la altura, que es proporcional a la intensidad de luz absorbida y, por lo tanto, a la concentración.

30 Para el calibrado de la concentración total se toma como referencia la altura de la gaussiana común (intensidad) para las distintas concentraciones totales tanto de proteína individual como de mezclas de porcentaje conocido. Con los ajustes de estas rectas se obtiene la pendiente de las curvas y este valor es proporcional



al porcentaje de cada proteína, se realiza por tanto una curva patrón de pendiente de absorción ultravioleta frente al porcentaje de concentración de una de las proteínas.

5 Dado que a partir del calibrado en fluorescencia se conoce el porcentaje de cada proteína, se calcula la pendiente de la curva de absorción que se debe tener en cuenta y con este valor se calcula la concentración total mediante la siguiente ecuación:

10  $\text{concentración total} = \text{altura de la gaussiana común} / \text{pendiente correspondiente al \% de proteína de la muestra}$

Normalmente, en los calibrados realizados en el método de la invención se obtienen regresiones superiores a 0,98 y las incertidumbres o errores estadísticos son inferiores al 14%, siendo los promedios menores al 5%.

En el caso de que el método no funcionara, proceder a la dilución de la muestra en el mismo medio electrolítico o en KCl si este no es conocido. Se puede haber rebasado el límite de concentración para el que el método es adecuado (1mg/mL)

El método de la invención es aplicable para determinar cualquier tipo de proteínas con características similares, aunque es especialmente adecuado para determinar la concentración de proteínas lácteas tales como la lactoferrina, albúmina de suero bovino, lactoalbúmina, lactoglobulina, etc.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 **Figura 1.** Muestra la curva intensidad de fluorescencia frente al número de onda (espectro de emisión o fluorescencia) y la determinación de su posición o centro. Se ha empleado una cubeta de cuarzo de 1 cm.

10 **Figura 2.** Muestra el ajuste del espectro de absorción ultravioleta (absorbancia o similar frente al número de onda) mediante 3 gaussianas libres y 4 fijas conocidas del calibrado. Se ha empleado una cubeta de cuarzo de 1 cm.

**Figura 3.** Muestra la curva de calibrado de la posición de la banda de fluorescencia frente al porcentaje de proteína BSA.

15 **Figura 4.** Rectas de calibración altura de la gaussiana vs proteína total para los distintos porcentajes relativos de proteína.

20 **Figura 5.** Muestra la curva de calibrado: pendientes de la rectas de concentración total vs altura gaussiana (Figura 4) frente al porcentaje de proteína BSA.

## EJEMPLOS

25 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del procedimiento de la invención.

### Ejemplo 1

30 A continuación se cita un ejemplo de la aplicación del método a una medida de una muestra de concentración conocida de albúmina de suero bobino (BSA) y lactoferrina (LF) en un medio electrolítico.

- a) Se realiza una dilución para garantizar que la muestra no tenga una concentración total superior a 1g/L y se ajusta el pH a 3.0.
- 5 b) Utilizando una cubeta de cuarzo se mide el espectro de fluorescencia de la muestra problema en función de la longitud de onda 280-500nm con excitación a 277nm y se determina la posición de la banda de emisión o fluorescencia (Figura 1). En la presente muestra la posición del máximo de emisión resulta ser 324,76 nm.
- 10 c) Se introduce la muestra en el espectrofotómetro de absorción óptica y se obtiene el espectro de absorción en la región azul-ultravioleta del espectro.
- 15 d) Mediante un programa informático se ajusta el espectro de absorción como la contribución, en este caso, de tres gaussianas de posición, anchura y altura variables y cuatro gaussianas de posición y anchura conocidas y fijas (las utilizadas para la descripción de las proteínas individuales en el calibrado).
- 20 e) Se ajustan las gaussianas (Figura 2) y se toma el valor de la altura de la gaussiana común a las dos proteínas. En la presente muestra 0,45.
- 25 f) Se introduce el valor de la posición de la curva de fluorescencia en la recta de calibrado "posición frente a porcentaje de BSA" y se obtiene la contribución relativa de cada proteína (Figura 3). En la presente muestra la posición de la curva que se encuentra en 324,76 nm ( $0.0031 \text{ cm}^{-1}$ ) corresponde a un porcentaje de 90,16% de BSA y 9,84% de LF.
- 30 g) Con este valor se escoge la pendiente adecuada de las rectas altura de la gaussiana frente a concentración total de proteína (Figuras 4 y 5) y se determina la concentración de la muestra con la altura de la gaussiana medida. Para la presente muestra, un 90,16% de BSA da una pendiente

de 0,44 y con la altura de la gaussiana común de 0,45 se obtiene la concentración total de la muestra 1,02 g/L.

- 5 h) Por lo tanto, se obtiene que la muestra está formada por 0,92 g/L de BSA y 0,10 g/L de LF.

## REIVINDICACIONES

1. Método para la determinación cuantitativa de una mezcla de dos proteínas en una muestra biológica aislada que comprende:

5

i. realizar un calibrado de la intensidad y posición de las bandas de fluorescencia y de absorción ultravioleta con muestras patrones de concentración de cada una de las proteínas a determinar y de sus muestras en medio electrolítico a pH fijo entre 3 y 9;

10

ii. medir el espectro de excitación de fluorescencia en la longitud máxima de emisión de la proteína para obtener curvas de intensidad en fluorescencia vs. al número de onda;

15

iii. determinar la posición del centro de la banda de fluorescencia vs. el número de onda para las proteínas individuales y sus mezclas y realizar un calibrado de la posición en función del porcentaje de una de ellas;

20

iv. medir el espectro de absorción en la región azul-ultravioleta de las proteínas individuales y sus mezclas para obtener los espectros de absorción en ultravioleta vs. el número de onda;

25

v. determinar la concentración de las proteínas en la muestra mediante el ajuste del perfil a la contribución de gaussianas libres y fijas que lo describen los perfiles de ultravioleta-visible, coincidiendo en posición y ancho una de las gaussianas fijas para ambas proteínas;

30

vi. determinar las curvas de intensidad de absorción dada por la altura de la gaussiana común frente a la concentración en función del porcentaje de proteína y realizar una curva de calibrado pendiente de la recta frente al porcentaje de proteína;

- vii. medir los espectros de excitación y absorción ultravioleta de la muestra problema;
- viii. determinar la posición de la banda de excitación y con la recta de calibración el porcentaje de una de las proteínas.
- ix. determinar la altura de la gaussiana común en los ajustes de la curva de absorción ultravioleta y con el valor de la pendiente de la curva de calibración determinar la concentración total.
2. Método según la reivindicación 1, donde las proteínas a determinar son de origen lácteo.
3. Método según la reivindicación 2, donde las proteínas se seleccionan de entre albúmina de suero, lactoferrina, albúmina de suero bovino, lactoalbúmina, lactoglobulina.

FIGURAS

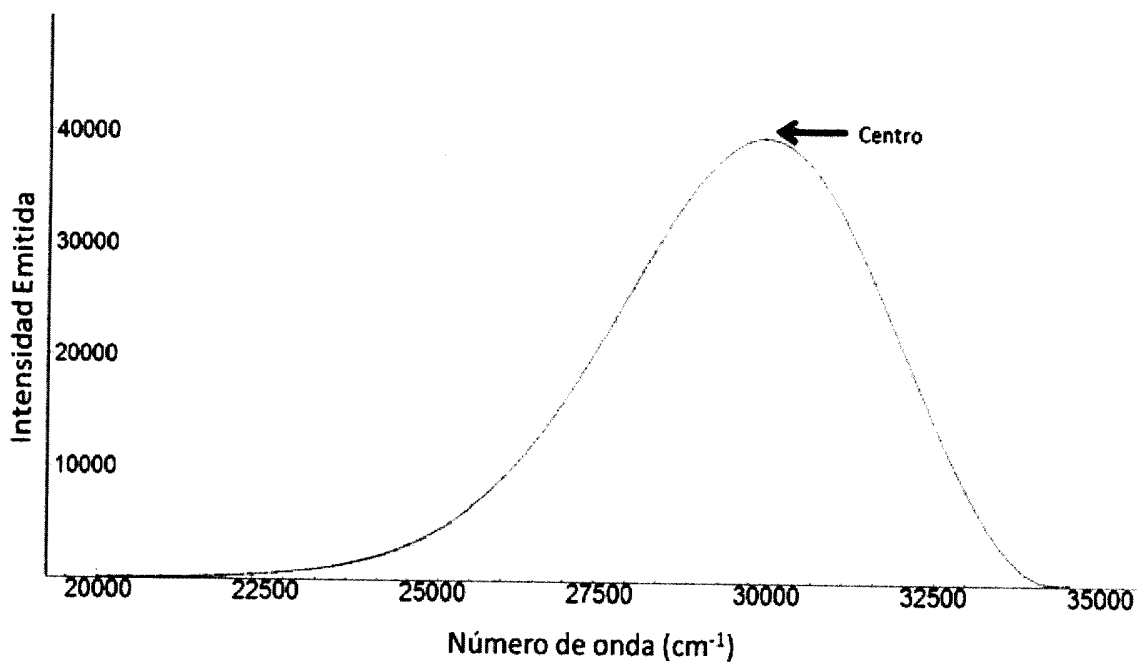


FIG. 1

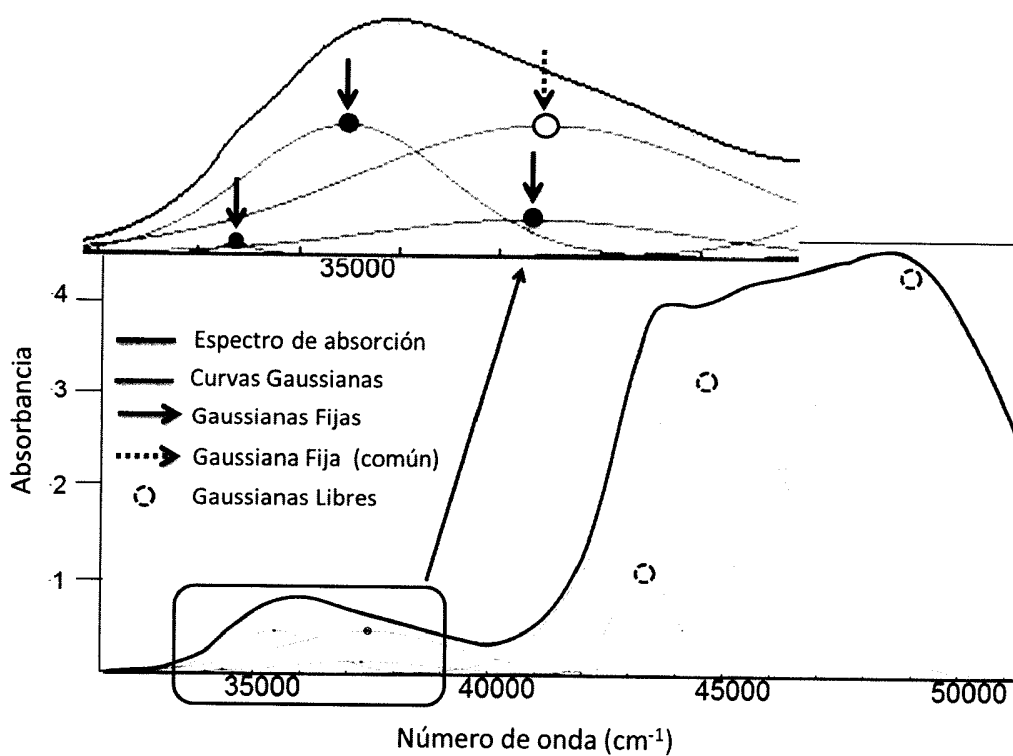


FIG. 2

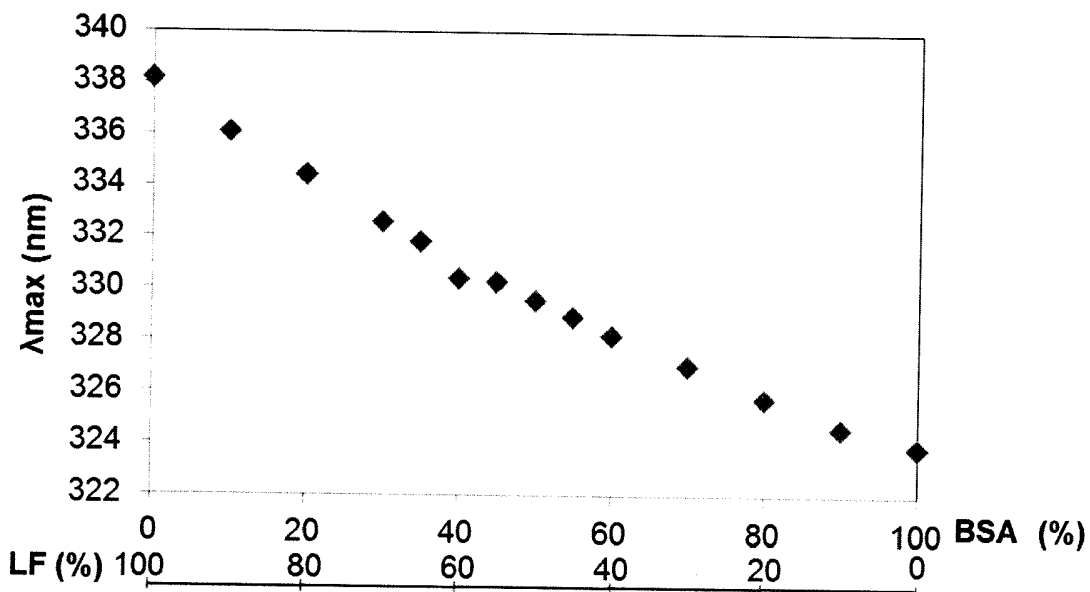


FIG. 3

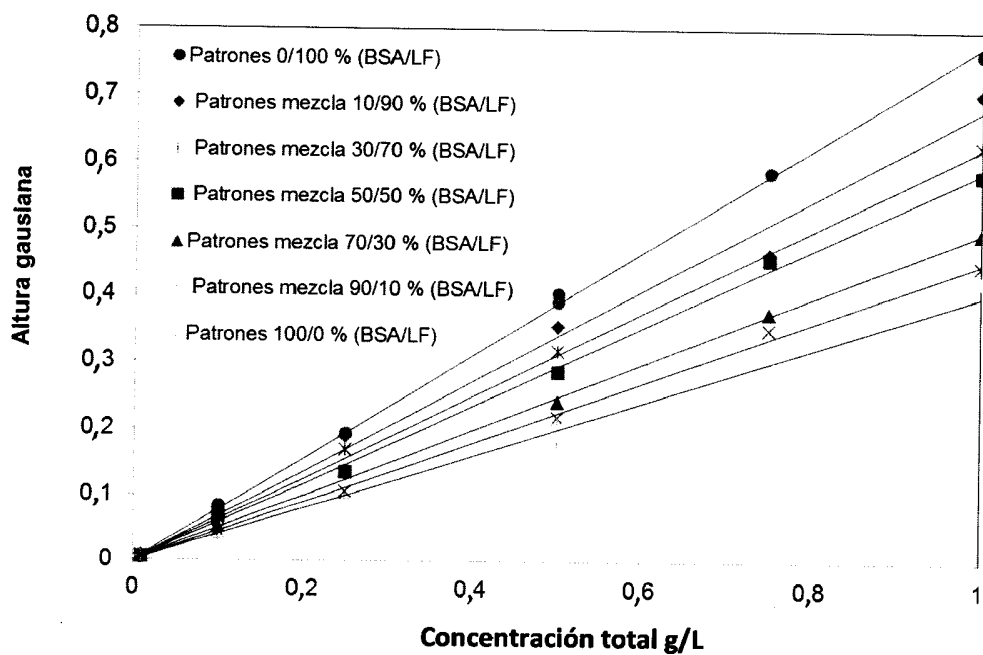


FIG. 4



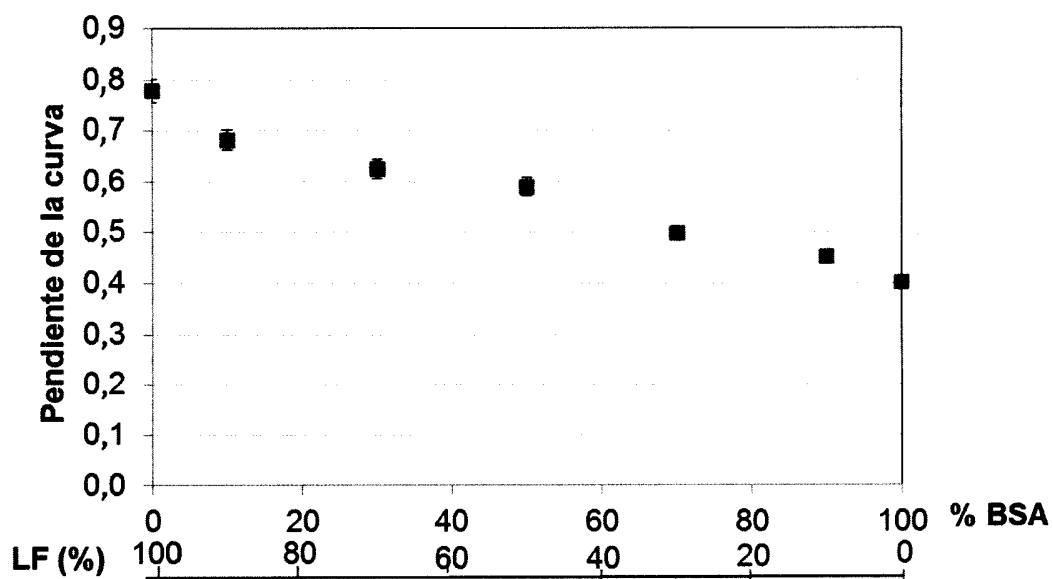


FIG. 5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES2014/000051

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**See extra sheet**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, BIOSIS, HCAPLUS, GOOGLE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KULMYRZAEV, A. et al. "Determination of lactulose and furosine in milk using front-face fluorescence spectroscopy". LAIT. November-December 2002. Vol. 82, N°. 6, pages 725 - 735; the whole document.	1-3
A	RUKKE, E.O. et al. "Comparing calibration methods for determination of protein in goat milk by ultraviolet spectroscopy". JOURNAL OF DAIRY SCIENCES. 01.07.2010. Vol. 93, N°. 7, pages 2922 - 2925; the whole document.	1-3

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search  
29/10/2014

Date of mailing of the international search report  
(31/10/2014)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer  
M. Novoa Sanjurjo

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3498466

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/ES2014/000051

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BALESTRIERI, C. et al. "Second-derivative spectroscopy of proteins. A method for the quantitative determination of aromatic amino acids in proteins". EUR. J. BIOCHEM.01.10.1978. Vol. 90, N°. 3, pages 433 - 440; the whole document.</p>	1-3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/000051

## CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*G01N21/33* (2006.01)

*G01N21/64* (2006.01)

*G01N33/68* (2006.01)

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/000051

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**Ver Hoja Adicional**

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, INVENES, BIOSIS, HCAPLUS, GOOGLE

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	KULMYRZAEV, A. et al. "Determination of lactulose and furosine in milk using front-face fluorescence spectroscopy". LAIT. Noviembre-Diciembre 2002. Vol. 82, N.º. 6, páginas 725 - 735; todo el documento.	1-3
A	RUKKE, E.O. et al. "Comparing calibration methods for determination of protein in goat milk by ultraviolet spectroscopy". JOURNAL OF DAIRY SCIENCES. 01.07.2010. Vol. 93, N.º. 7, páginas 2922 - 2925; todo el documento.	1-3

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&amp;" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.  
29/10/2014

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.  
**31 de octubre de 2014 (31/10/2014)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado  
M. Novoa Sanjurjo  
Nº de teléfono 91 3498466

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/000051

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	<p>BALESTRIERI, C. et al. "Second-derivative spectroscopy of proteins. A method for the quantitative determination of aromatic amino acids in proteins". EUR. J. BIOCHEM.01.10.1978. Vol. 90, Nº. 3, páginas 433 - 440; todo el documento.</p>	1-3

**CLASIFICACIONES DE INVENCION**

*G01N21/33* (2006.01)

*G01N21/64* (2006.01)

*G01N33/68* (2006.01)