

Universidad de Granada

Tesis Doctoral



*Importancia de la Proteosa Peptona Nº 3
en la Producción de Pigmento por
Streptococcus agalactiae en el Medio
Granada*

*Fco Enrique Camacho Muñoz
Granada, 2005*

D. MANUEL DE LA ROSA FRAILE, Jefe de Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves,

Certifica:

Que D. Francisco Enrique Camacho Muñoz, licenciado en Farmacia, ha realizado el trabajo de Tesis Doctoral: “Importancia de la Proteosa Peptona Nº 3 en la Producción de Pigmento por *Streptococcus agalactiae* en el Medio Granada”. El que suscribe ha revisado y dirigido el presente trabajo de investigación y está conforme para su lectura y aprobación por el tribunal correspondiente.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expido y firmo el presente certificado en Granada, a 6 de octubre de 2005.

Fco: Manuel de la Rosa Fraile

D. ALFONSO RUIZ-BRAVO LÓPEZ, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada,

Certifica:

Que D. Francisco Enrique Camacho Muñoz, licenciado en Farmacia, ha realizado el trabajo de Tesis Doctoral: “Importancia de la Proteosa Peptona Nº 3 en la Producción de Pigmento por *Streptococcus agalactiae* en el Medio Granada”. El que suscribe ha revisado y dirigido el presente trabajo de investigación y está conforme para su lectura y aprobación por el tribunal correspondiente.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expido y firmo el presente certificado en Granada, a 6 de octubre de 2005.

Fco: Alfonso Ruiz-Bravo López

**A mi mujer,
Carolina**

A mis Padres
A mis hermanos

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas:

Al Dr. Manuel de la Rosa Fraile, Jefe de Servicio de Microbiología por su confianza en mí prestada, así como por la dirección y supervisión que del mismo ha efectuado.

Al Dr. Alfonso Ruiz-Bravo López, Catedrático de Microbiología en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, por las facilidades prestadas y acertados consejos.

A Dr. Antonio Sampedro Martínez por su amistad, generosidad e inestimable ayuda tanto en la realización de esta tesis como de los constantes consejos que de él he recibido y que me ha permitido mejorar en mi trabajo.

A Dr. Javier Rodríguez Granger, amigo y compañero de trabajo sin cuya ayuda y estímulo no lo hubiera logrado.

A todos los adjuntos del servicio por el tiempo dedicado en la enseñanza de la Microbiología, en especial a la Dra. Consuelo Miranda por enseñarme a trabajar con rigor.

Al Dr. Luis Aliaga Martínez por sus acertados consejos como amigo e interés mostrado por este proyecto desde sus inicios.

A mis compañeros de residencia y amigos Concha Fernández, Julio Romero, M^a Fe Bautista, Ruth Yeste, Gabriel Reina, y en especial a Jesús Turiño por su inmensa ayuda en la elaboración de esta tesis.

Por último, expresar mi agradecimiento a todo el Servicio de Microbiología por toda la ayuda prestada desde el primer día y muy especialmente a Inma Sampedro por su confianza y amistad.

Indice

| | |
|---|-----------|
| II. Introducción | 11 |
| I.1. Medios de cultivo | 11 |
| I.1.1. Medios Definidos | 12 |
| I.1.2. Medios Complejos | 13 |
| I.1.3. Componentes de los medios de cultivo | 14 |
| I.1.3.1. Tampones (Buffer) | 14 |
| I.1.3.2. Inhibidores | 17 |
| I.1.3.3. Factores de crecimiento. Suero | 18 |
| I.1.3.4. Extracto de carne | 20 |
| I.1.3.5. Extracto de levadura | 21 |
| I.2. Peptonas | 22 |
| I.2.1. Componentes crudos | 24 |
| I.2.1.1. Tejidos animales | 24 |
| I.2.1.2. Leche | 25 |
| I.2.1.3. Vegetales | 25 |
| I.2.1.4. Otros tejidos | 27 |
| I.2.1.5. Estómago de rumiantes (Oveja) | 29 |
| I.2.1.5.1. Mucinas | 30 |
| I.2.2. Componentes de los tejidos animales | 32 |
| I.2.2.1. Proteínas | 32 |
| I.2.2.2. Nucleoproteínas | 33 |
| I.2.2.3. Glucoproteínas | 33 |
| I.2.2.4. Lipoproteínas | 37 |
| I.2.2.5. Glicolípidos | 37 |
| I.2.2.6. Pool metabólico | 38 |

| | |
|--|----|
| I.3. Enzimas proteolíticos | 39 |
| I.3.1. Endoproteasas | 40 |
| I.3.2. Exoproteasas | 42 |
| I.3.3. Proteínas desnaturalizadas y Proteínas nativas | 43 |
| I.3.4. Enzimas proteolíticos. Endopeptidasas | 43 |
| I.3.5. Condiciones de hidrólisis | 46 |
| I.3.5.1. Hidrólisis no enzimática | 47 |
| I.3.5.2. Hidrólisis enzimática | 48 |
| I.3.6. Fabricación de peptonas | 49 |
| I.4. Influencia de los medios de cultivo sobre la producción de sustancias específicas en microorganismos | 52 |
| I.4.1. Antibióticos y hemolisina | 52 |
| I.4.2. Producción de toxinas | 53 |
| I.4.3. Efecto estropogenina | 54 |
| I.5. Análisis y caracterización de hidrolizados proteicos | 57 |
| I.5.1. Métodos clásicos de análisis de peptonas | 57 |
| I.5.2. Métodos modernos de análisis de peptonas | 64 |
| I.5.3. Cromatografía gel filtración | 65 |
| I.5.3.1. Matriz (Gel Filtración) | 67 |
| I.5.3.2. Eluyentes (Gel Filtración) | 68 |
| I.5.4. Cromatografía fase reversa | 69 |
| I.5.4.1. Matriz (Fase Reversa) | 70 |
| I.5.4.2. Eluyentes (Fase Reversa) | 71 |
| I.5.5. Afinidad a lectinas | 72 |

| | |
|---|----|
| I.6. Generalidades de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 76 |
| I.6.1. Aspectos generales de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 76 |
| I.6.1.1. Nomenclatura | 76 |
| I.6.2. Papel patógeno | 76 |
| I.6.2.1. Infecciones en el adulto | 76 |
| I.6.2.1.1. Infecciones no relacionadas con el embarazo | 76 |
| I.6.2.1.2. Infecciones obstétricas | 77 |
| I.6.2.2. Infección neonatal | 77 |
| I.6.2.2.1. Transmisión en el recién nacido | 77 |
| I.6.2.2.2. Infección neonatal precoz | 78 |
| I.6.2.2.3. Infección neonatal tardía | 79 |
| I.6.2.2.4. Prevención de la infección neonatal por <i>Streptococcus agalactiae</i> | 79 |
| I.6.3. Bacteriología de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 81 |
| I.6.3.1. Características morfológicas y bioquímicas de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 81 |
| I.6.3.2. Requerimiento nutricionales de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 82 |
| I.6.3.3. Identificación de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 83 |
| I.6.4. Medios de cultivo para el aislamiento de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 84 |
| I.7. Pigmento de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 88 |
| I.7.1. Estructura del pigmento | 89 |
| I.7.2. Condiciones de producción del pigmento de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 91 |
| I.7.2.1. Componentes del medio de cultivo que influyen en la producción de pigmento por <i>Streptococcus agalactiae</i> | 91 |
| I.7.2.2. Atmósfera y temperatura de incubación | 94 |
| I.8. Historia de la proteosa peptona Nº 3 | 96 |

| | |
|--|-----|
| I. Objetivos | 98 |
| III. Material y métodos | 99 |
| MM.1. Cepas bacterianas e intensidad de pigmento | 99 |
| MM.2. Inoculación e incubación | 103 |
| MM.3. Método bioautográfico | 103 |
| MM.4. Medio de prueba y base del medio de prueba | 105 |
| MM.4.1. Base del medio de prueba (B) | 105 |
| MM.4.2. Medio de prueba (X) | 106 |
| MM.4.2.1. Hidrolizado péptico de suero (HP.S) | 107 |
| MM.4.2.2. Extracto de levadura (Y) | 109 |
| MM.4.3. Medios de ensayo | 109 |
| MM.4.4. Controles | 110 |
| MM.5. Compuestos químicos. Mezclas complejas. Productos activadores | 112 |
| MM.6. Peptonas. Hidrolizados. Extractos comerciales | 117 |
| MM.7. Fraccionamiento de peptonas | 122 |
| MM.7.1. Ultracentrifugación | 122 |
| MM.7.2. Diálisis | 123 |
| MM.7.3. Extracción con distintos solventes | 123 |
| MM.7.4. Precipitación de glicoproteínas | 124 |
| MM.7.5. Adsorción con lectinas | 125 |
| MM.7.5.1. Concanavalina A | 125 |
| MM.7.5.2. Jacalina | 127 |
| MM.7.5.3. Lectina de <i>Arcocarpus Hipogaea</i> | 128 |
| MM.7.5.4. Lectina de <i>Triticum vulgare</i> | 129 |
| MM.7.6. Determinación de ácido siálico | 129 |
| MM.7.7. Precipitación de ácidos nucleicos | 131 |

| | |
|---|-----|
| MM.8. Hidrólisis de peptonas | 132 |
| MM.8.1. Acción de enzimas proteolíticos sobre primatona de Sheffield y proteosa peptona nº 3 | 132 |
| MM.8.2. Acción del ácido clorhídrico concentrado sobre la primatona de Sheffield y proteosa peptona N°3 | 133 |
| MM.9. Cromatografía de exclusión molecular o gel filtración de la proteosa peptona nº 3 | 134 |
| MM.9.1. Cromatografía de gel filtración de la proteosa peptona N° 3 en Superdex® Peptide | 134 |
| MM.9.1.1. Superdex® peptide. Acetonitrilo-Ácido Trifluoroacético | 135 |
| MM.9.1.2. Superdex® peptide. Agua-Cloruro sódico | 135 |
| MM.9.1.3. Superdex® peptide. Agua-Cloruro de guanidina | 135 |
| MM.9.2. Cromatografía de gel filtración de la proteosa peptona N° 3 en Sephadex® G25 superfine | 136 |
| MM.9.2.1. Cromatografía Sephadex® G25 superfine. Agua | 136 |
| MM.9.2.2. Cromatografía Sephadex® G25 superfine. Agua-Bicarbonato amónico | 136 |
| MM.9.3. Cromatografía de gel filtración de la proteosa peptona N° 3 en Superdex® 30 | 137 |
| MM.9.3.1. Cromatografía Superdex® 30. Agua | 137 |
| MM.9.3.2. Cromatografía Superdex® 30. Agua-Formiato amónico | 137 |
| MM.9.3.3. Cromatografía Superdex® 30. Agua-Bicarbonato amónico | 138 |
| MM.9.3.4. Cromatografía Superdex® 30. Bicarbonato amónico | 138 |
| MM.9.4. Cromatografía gel filtración de la proteosa peptona N° 3 en HiLOAD th Superdex | 138 |
| MM.9.4.1. HiLOAD th Superdex. Agua-Cloruro sódico | 139 |
| MM.9.4.2. HiLOAD th Superdex. Agua-Bicarbonato sódico | 139 |
| MM.9.5. Calibración de columnas de gel filtración | 139 |
| MM.9.5.1. Calibración HiLOAD th Superdex | 139 |
| MM.9.5.2. Calibración Sephadex® G25 | 141 |

| | |
|---|-----|
| MM.10. Cromatografía en fase reversa de la proteosa peptona Nº 3 | 145 |
| MM.10.1. Columna Water Spherisorb® | 145 |
| MM.10.2. Columna Source th | 146 |
| MM.10.3. Columna Vydac® | 146 |
| MM.11. Hidrolizados y extractos producidos en el laboratorio | 148 |
| MM.11.1. Hidrolizados de carne de vacuno | 148 |
| MM.11.1.1. Hidrolizado de carne de vacuno con pepsina | 148 |
| MM.11.1.1.1. Influencia de la acidificación con fosfórico y neutralización con amoníaco en la hidrólisis de carne de vacuno | 149 |
| MM.11.1.1.2. Influencia de una extracción previa con agua en la hidrólisis de carne de vacuno | 150 |
| MM.11.1.1.3. Influencia de una diálisis previa en la hidrólisis de carne de vacuno | 150 |
| MM.11.1.1.4. Influencia de modificaciones en los tiempos de hidrólisis sobre la hidrólisis de carne de vacuno con pepsina | 152 |
| MM.11.1.2. Hidrolizado con pepsina de carne de vacuno previamente desnaturalizada con ácido | 152 |
| MM.11.1.3. Hidrolizado de carne de vacuno con otras enzimas proteolíticas | 152 |
| MM.11.1.4. Hidrolizados de otros tejidos vacunos | 153 |
| MM.11.3. Hidrolizados de colágeno con pépsina | 155 |
| MM.11.4. Hidrolizado de sangre, hemoglobina, suero y albúmina con pepsina | 155 |
| MM.11.5. Hidrolizado de carne de pollo con pepsina | 157 |
| MM.11.6. Hidrolizado de clara de huevo | 157 |
| MM.11.7. Hidrolizados y extractos de estómago e intestino de oveja | 157 |
| MM.11.7.1. Hidrolizado de estómago de oveja con pepsina | 157 |
| MM.11.7.1.1. Hidrolizado de estómago de oveja con pepsina | 157 |
| MM.11.7.1.2. Hidrolizado de estómago de oveja con pepsina desnaturalizado previamente por ebullición | 158 |

| | |
|---|------------|
| MM.11.7.2 Hidrolizado de intestino de oveja con pepsina | 158 |
| MM.11.7.2.1. Hidrolizado con pepsina de intestino de oveja previamente desnaturalizado por ebullición | 158 |
| MM.11.7.3. Extractos de estómago de oveja | 160 |
| MM.11.7.3.1. Extracto ácido de estómago de oveja | 160 |
| MM.11.7.3.2. Extracto acuoso de estómago de oveja a temperatura ambiente | 160 |
| MM.11.7.3.3. Extracto acuoso de estómago de oveja a ebullición | 160 |
| MM.11.7.3.4. Extracto buffer fosfato de estómago de oveja | 161 |
| IV. Resultados y Discusión | 162 |
| RD.1. Medio de prueba | 162 |
| RD.1.1. Desarrollo del medio de prueba | 162 |
| RD.1.2. Acción de la tripsina sobre la proteosa peptona N° 3 y efecto del hidrolizado péptico de suero (HP.S) sobre el medio de prueba: Factor β | 164 |
| RD.2. Medios de ensayo | 166 |
| RD.3. Actividad de los compuestos químicos y mezclas complejas | 168 |
| RD.4. Actividad de peptonas, Hidrolizados y Extractos comerciales | 170 |
| RD.4.1. Peptonas BD-Difco | 170 |
| RD.4.2. Peptonas Oxoid | 172 |
| RD.4.3. Peptonas Organotechnie | 174 |
| RD.4.4. Peptonas Scheffield | 176 |
| RD.4.5. Peptonas de Marcor | 178 |
| RD.4.6. Peptonas de Panreac | 179 |
| RD.4.7. Peptonas diversas | 180 |
| RD.4.8. Hidrolizados no enzimáticos | 181 |
| RD.4.9. Extractos comerciales de tejido | 182 |

| | |
|--|-----|
| RD.5. Fraccionamiento de peptonas | 183 |
| RD.5.1. Ultrafiltración | 183 |
| RD.5.2. Diálisis | 185 |
| RD.5.3. Extracción de primatona de Sheffield y la proteosa peptona N° 3 con solventes | 186 |
| RD.5.4. Repercusión en primatona de Sheffield y la proteosa peptona N° 3 la precipitación de glicoproteínas | 188 |
| RD.5.5. Efecto de la adsorción con lectinas de primatona de Sheffield y la proteosa peptona N° 3 | 189 |
| RD.5.6. Determinación de ácido siálico en la primatona de Sheffield y la proteosa peptona N° 3 | 189 |
| RD.5.7. Influencia de la precipitación de ácidos nucleicos sobre la primatona de Sheffield y la proteosa peptona N° 3 | 189 |
| RD.6. Hidrólisis de peptonas | 191 |
| RD.6.1. Efecto de las enzimas proteolíticas sobre la actividad de primatona Sheffield y proteosa peptona N° 3 | 191 |
| RD.6.1.1. Acción de los enzimas proteolíticos sobre la proteosa peptona N° 3 | 191 |
| RD.6.1.2. Acción de los enzimas proteolíticos sobre la primatona Sheffield | 193 |
| RD.6.2. Efecto del ácido clorhídrico concentrado sobre actividad de la primatona de Sheffield y la proteosa peptona N° 3 | 195 |
| RD.7. Cromatografía de la proteosa peptona N° 3 | 196 |
| RD.7.1. Cromatografía exclusión molecular de la proteosa peptona N° 3 | 196 |
| RD.7.1.1. Cromatografía gel filtración de la PP3. Superdex® Peptide | 196 |
| RD.7.1.1.1. Cromatografía Superdex® Peptide de la PP3. Acetonitrilo-TFA | 196 |
| RD.7.1.1.2. Cromatografía Superdex® Peptide de la PP3. Agua-Cloruro sódico | 199 |
| RD.7.1.1.3. Cromatografía Superdex® Peptide de la PP3. Agua-Cloruro de guanidina | 203 |
| RD.7.1.2. Cromatografía gel filtración de la PP3. Sephadex® G25. | 207 |
| RD.7.1.2.1. Cromatografía Sephadex® G25 de la PP3. Agua | 207 |
| RD.7.1.2.2. Cromatografía Sephadex® G25 de la PP3. Agua-Bicarbonato amónico | 207 |

| | |
|--|------------|
| RD.7.1.3. Cromatografía gel filtración de la PP3. Superdex [®] 30 | 211 |
| RD.7.1.3.1. Cromatografía Superdex [®] 30 de la PP3. Agua | 211 |
| RD.7.1.3.2. Cromatografía Superdex [®] 30 de la PP3. Agua-Formiato amónico | 211 |
| RD.7.1.3.3. Cromatografía Superdex [®] 30 de la PP3. Agua-Bicarbonato amónico | 215 |
| RD.7.1.3.4. Cromatografía Superdex [®] 30 de la PP3. Bicarbonato amónico | 217 |
| RD.7.1.4. Cromatografía gel filtración. HiLOAD th Superdex de la PP3. Hiloal [®] Superdex | 219 |
| RD.7.1.4.1. Cromatografía HiLOAD th Superdex de la PP3. Agua-Cloruro sódico | 219 |
| RD.7.1.4.2. Cromatografía HiLOAD th Superdex de la PP3. Agua-Bicarbonato amónico | 221 |
| RD.8. Cromatografía en fase reversa de la Proteosa Peptona Nº 3 | 227 |
| RD.8.1. Columna Water Spherisorb [®] de la PP3. Agua-Acetonitrilo | 227 |
| RD.8.2. Columna Source th de la PP3. Agua-Acetonitrilo-Ácido Trifluoroacético | 230 |
| RD.8.3. Columna Vydac [®] de la PP3. Agua-Acetonitrilo-Ácido Trifluoroacético | 233 |
| RD.9. Hidrolizados producidos en el laboratorio de carne de vacuno | 236 |
| RD.9.1. Hidrolizados de carne de vacuno con pepsina | 236 |
| RD.9.1.1. Influencia de la acidificación con fosfórico y neutralización con amoniaco en la hidrólisis de carne de vacuno | 236 |
| RD.9.1.2. Influencia de una extracción previa con agua en la hidrólisis de carne de vacuno | 237 |
| RD.9.1.3. Influencia de una diálisis previa en la hidrólisis de carne de vacuno | 238 |
| RD.9.1.4. Influencia de modificaciones en los tiempos de hidrólisis sobre la hidrólisis de carne de vacuno con pepsina | 238 |
| RD.9.2. Hidrolizado de carne de vacuno con pepsina desnaturalizada previamente con ácido | 239 |
| RD.9.3. Hidrolizado de carne de vacuno con diferentes enzimas proteolíticos | 239 |
| RD.9.5. Hidrolizados de otros tejidos vacunos | 240 |

| | |
|---|-----|
| RD.10. Hidrolizados de Colágeno. Sangre. Pollo | 240 |
| RD.10.1. Hidrolizado de colágeno con pepsina | 240 |
| RD.10.2. Hidrolizados de sangre, hemoglobina, suero y albúmina con pepsina | 241 |
| RD.10.3. Hidrolizado de pollo con pepsina | 242 |
| RD.10.4. Hidrolizado de clara de huevo | 242 |
| RD.11. Hidrolizado y extractos de estómago e intestino de oveja | 243 |
| RD.11.1. Hidrolizado de estómago de oveja | 243 |
| RD.11.1.1. Hidrolizado de estómago de oveja con pepsina | 243 |
| RD.11.1.2. Hidrolizado de estómago de oveja con pepsina desnaturalizado previamente con ácido | 245 |
| RD.11.2. Hidrolizado de intestino de oveja | 248 |
| RD.11.2.1. Hidrolizado de intestino de oveja con pepsina | 248 |
| RD.11.3. Extracto de estómago de oveja | 248 |
| RD.11.3.1. Extracto ácido de estómago de oveja | 248 |
| RD.11.3.2. Extracto acuoso de a temperatura ambiente estómago de oveja | 249 |
| RD.11.3.3. Extracto acuoso a ebullición de estómago de oveja | 249 |
| RD.11.3.4. Extracto buffer fosfato de estómago de oveja hidrolizado con pepsina | 249 |
| RD.12. Discusión general | 250 |
| V. Conclusiones | 255 |
| VI. Bibliografía | 256 |

Introducción

I. INTRODUCCIÓN

I.1. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo son una mezcla equilibrada de nutrientes (fuente de carbono, nitrógeno y azufre, y factores de crecimiento) que en concentraciones adecuadas y condiciones físicas óptimas permiten un buen crecimiento de los microorganismos (**Meynell and Meynell 1970**).

Los medios de cultivo pueden ser definidos, o bien complejos en función de que se conozca o no la composición química de los nutrientes que los componen. Además los medios de cultivo pueden clasificarse también, en selectivos (medio que sólo permite el crecimiento de un grupo de microorganismos e inhibe el de otros), diferenciales (medio que permite revelar características fisiológicas de los microorganismos) y enriquecidos (medio que tiene un gran exceso de nutrientes y se utiliza para microorganismos que tienen grandes exigencias nutricionales) (**Meynell and Meynell 1970**).

La efectividad de un medio de cultivo depende de muchos factores: el tipo de microorganismo, los requerimientos nutricionales, las interacciones de cada ingrediente en el medio, las condiciones ambientales (temperatura, humedad, atmósfera) y la presencia de factores tóxicos que pueden inhibir el crecimiento bacteriano (**Bridson 1978**).

I.1.1. MEDIOS DEFINIDOS

El diseño de un medio de cultivo definido viene determinado por el conocimiento exacto de la mezcla de nutrientes orgánicos y sustancias definidas (p.e., buffer, etc.) que van a ser utilizados. De manera habitual estos componentes van actuar en el medio de cultivo como fuente de energía, material biosintético, estabilizador de pH, agente selectivo o indicador de metabolismo (**Bridson 1978**).

Los componentes utilizados en la formulación de un medio de cultivo para un microorganismo heterótrofo no exigente son: la fuente de nitrógeno y de carbono, vitaminas, sales inorgánicas y buffer. Especies más exigentes podrían crecer en esos medios si se la añaden los factores de crecimiento apropiados (**Meynell and Meynell 1970**).

En todo diseño de un medio de cultivo, es necesario conocer los requerimientos nutricionales del microorganismo a estudiar. Una manera sencilla de conocer los requerimientos nutricionales de vitaminas o aminoácidos de un determinado microorganismo, sería suplementar el medio con componentes puros de estos nutrientes o bien con mezclas que incluyan la mayoría de los compuestos necesarios para la biosíntesis (**Meynell and Meynell 1970; Bridson 1978**).

Existen determinados componentes de los medios como son los ácidos grasos, cuyo requerimientos se encuentran en un estrecho margen de concentración, de manera que pequeñas variaciones en la concentración pueden estimular el crecimiento o inhibirlo (**Bridson 1978**).

I.1.2. MEDIOS COMPLEJOS

La mayoría de los medios de cultivo utilizados en bacteriología son medios complejos debido a que suelen contener sustancias procedentes de la hidrólisis de tejidos animales, vegetales, etc. Estos hidrolizados aportan al medio un alto valor nutritivo, cuyo origen y forma de obtención, va determinar el contenido en aminoácidos, pequeños péptidos, vitaminas, factores de crecimiento, hidratos de carbono, etc. (**Meynell and Meynell 1970; Cote and Gherna 1994; Prescott et al 1999**).

Los medios de cultivo complejos se usan para el cultivo de bacterias quimioorganotróficas, básicamente suelen contener una base de nitrógeno que aporta todos los aminoácidos (las peptonas en concentraciones 1-2% p/v son usualmente la fuente más utilizada), también se incorpora al medio carbohidratos de forma directa (p.e., 0.2% p/v) o bien añadiendo digestos proteicos de vegetales y el medio se complementa con la adición de extracto de levadura o carne. La fuente de energía usualmente suele ser mezcla de aminoácidos procedentes de las peptonas o bien los carbohidratos añadidos al medio. En cuanto a los minerales o iones inorgánicos en general no es necesario que se suplementen ya que las peptonas y extractos suelen contenerlos, sin embargo, puede añadirse magnesio, manganeso y/o hierro, minerales implicados en el crecimiento, pigmentación y hemólisis bacteriana (**Bridson and Brecker 1970**).

Los microorganismos exigentes, además de los nutrientes antes mencionados requieren la incorporación de factores de crecimiento, así como un ambiente adecuado (bajo potencial redox, alto CO₂ o ausencia de O₂) (**Bridson and Brecker 1970**).

Por lo tanto, los principales componentes de un medio de cultivo complejo común son: proteínas (peptonas, hidrolizados o extractos), hidratos de carbono, buffer, suplementos, iones y minerales esenciales.

I.1.3. COMPONENTES DE MEDIOS

I.1.3.1. Tampones (buffer)

Van Slyke define un buffer como una sustancia cuya presencia en una solución incrementa la cantidad de álcali o ácido que se debe añadir para incrementar en una unidad de pH dicha solución (**Van Slyke 1922**).

En los medios de cultivo los buffer o agentes tampón, están sometidos a interacciones bioquímicas debido a los productos del metabolismo bacteriano, además hay que tener en cuenta que pueden reaccionar con otros compuestos del medio e incluso servir de nutrientes para los microorganismos. Sin embargo, son compuestos que resisten fluctuaciones de pH. El buffer ideal debe ser soluble, no debe de afectarse con otros factores distintos del pH, no ser tóxico, no interferir con los procesos y las membranas biológicas, y ser efectivo dentro del rango de pH del metabolismo bacteriano para el cual el medio ha sido diseñado (**Cote and Gherna 1994**).

El empleo de compuestos tampón a un valor específico pK es especialmente necesario cuando se adiciona a los medios carbohidratos fermentables como fuente de carbono y energía (**Bridson 1998**). El valor de pH es muy importante en el transporte de péptidos, ya que para que el transporte sea adecuado es necesario que el grupo α -amino terminal este libre y protonado. Normalmente a un pH 7 cualquier péptido presentará una mezcla equivalente de la forma protonada (NH_3^+) y la forma no protonada (NH_2). El porcentaje de ambas formas puede variar de manera significativa en rangos de pH 7.2-5.8 e influir en la nutrición bacteriana (**Payne 1977**).

El uso de buffer basados en sales inorgánicas y orgánicas está limitado por la posibilidad que estos buffer catiónicos y aniónicos tienen de interferir con procesos biológicos. Un efecto colateral de estos compuestos es su capacidad quelante a cationes divalentes sobre todo los buffers fosfato, esta unión firme de los cationes esenciales los hace inaccesibles a los microorganismos (**Cote and Gherna 1994; Bridson 1998**).

El efecto de esta unión de los agentes quelantes a los metales puede reducir el crecimiento o impedirlo, a menos que se hayan suplementado estos cationes en la fórmula del medio. La opacidad del medio después de su calentamiento o permanencia a 50 °C durante varias horas, se debe comúnmente a la reacción de los fosfatos con metales. Estos precipitados de fosfatos pueden unirse al hierro y reducir la cantidad disponible de este metal (**Bridson 1998**).

Otro ejemplo de buffer inorgánico que interfiere en los procesos biológicos es el buffer Tris capaz de reaccionar con aminas primarias comportándose como inhibidor, e incluso tiene la capacidad de penetrar en las membranas biológicas alterándolas (**Cote and Gherna 1994**).

En 1966, Good (**Harris and Angal 1989**) desarrolló una serie de nuevos buffers biológicos zwitterionic para su uso en rango de pH fisiológico. Los buffer zwitterionic son compuestos con carga positiva (NH_3^+) y carga negativa (COO^-) como consecuencia de la transferencia del protón del ácido carboxílico o ácido sulfónico al grupo amino lo que hace que sean compuestos neutros que puedan actuar como ácido o base débil. Los buffer de Good se caracterizan por tener un comportamiento de buffers ideal: alta solubilidad en agua y mínima en otros disolventes, baja interacción con los procesos biológicos, mínima penetración de membranas biológicas, mínima interacción con cationes minerales, estabilidad enzimática e hidrolítica, ser no tóxico, no absorben entre 240-700 nm con lo cual se pueden utilizar en

espectroscopia sin que interfirieran y presentar un pK (6,19-9,55) con poca dependencia de la temperatura, la concentración y la fuerza iónica.

Algunos ejemplos de buffer de Good se muestran en la **tabla I.1.3.1**.

| Buffers de Good | pH | pK_a 20 °C |
|---|-----------|-----------------------------|
| Ácido 4-morfolinopropanosulfónico (MOPS) | 6.2-8.1 | 7.15 |
| Ácido N -(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico (ACES) | 5.9-7.8 | 6.9 |
| Ácido N -(2-acetamido) iminodiacético (ADA) | 5.6-7.5 | 6.6 |
| Ácido N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-(2-etanosulfónico) (HEPES) | 6.6-8.5 | 7.55 |
| Ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES) | 5.6-6.8 | 6.15 |
| Ácido 1-4-piperazindietanosulfónico (PIPES) | 6-8 | 6.8 |
| Clorhidrato Tris (hidroximetil)aminometano (TRIS HCl) | 7-9 | 8.3 |
| Ácido N-[Tris(hidroxietil)metil]-2-aminoetanosulfónico (TES) | 6.5-8.4 | 7.5 |

I.1.3.1. Tabla 1. Buffer de Good

Los buffers que se utilizan en los medios de cultivo bacterianos pueden ser sintéticos o naturales. Ejemplos de agentes tampón que se pueden añadir a los medios de cultivo son las sales inorgánicas (fosfatos, etc.), las sales orgánicas (acetatos, citratos, etc.), los compuestos zwitterionic y aminoácidos específicos. En el medio Granada se utilizan como buffers el MOPS y monofosfato disódico. El MOPS es un buffer de Good muy utilizado en estudios biológicos de transporte de electrones y fosforilaciones. No interfiere en los ensayos de determinación de nitrógeno proteico (p.e., Biuret, Folin, etc.). Un inconveniente de este buffer es que no se puede autoclavar en presencia de glucosa.

I.1.3.2. Inhibidores

Los primeros inhibidores del crecimiento bacteriano que se utilizaron en los medios de cultivo para seleccionar los microorganismos e inhibir el desarrollo de microflora contaminante, fueron colorantes naturales (cristal violeta, fuchsina básica, etc.) que más tarde se sustituyeron por colorantes sintéticos. Sin embargo, con el tiempo se han usado otros agentes selectivos como los antibióticos y otros inhibidores químicos que han desplazado a los colorantes de las fórmulas de los medios de cultivo (**Bridson 1998**).

Para que un antibiótico pueda añadirse a un medio de cultivo como agente selectivo debe ser estable al calor o añadirse por filtración estéril después de la esterilización, ser soluble, tener un amplio espectro de acción y no ser tóxico para el microorganismo que queremos seleccionar (**Bridson 1998**).

Los medios de cultivo diseñados para la recuperación de *Streptococcus agalactiae* (EGB) de muestras contaminadas suelen contener 2 o más inhibidores para evitar el crecimiento de bacterias Gram negativas y estafilococos. Inicialmente, se desarrollaron diferentes medios como agar CNA de Ellner que contenía colistina y ácido nalidíxico y el caldo Todd-Hewitt-sangre preparado por Baker y col. que incorporaba ácido nalidíxico y gentamicina. Sin embargo, son medios poco apropiados ya que permiten el crecimiento bacteriano sobre todo de estafilococos y además la gentamicina a la concentración utilizada de 8 µg/ml inhibe a determinadas cepas EGB (**Gray et al 1979**).

Por todo ello, Gray (**Gray et al 1979**) estudió diferentes combinaciones de inhibidores, comprobando que el uso de cristal violeta utilizado como un inhibidor simple y económico del crecimiento de estafilococos, polimixina o colistina complementado con ácido nalidíxico (15 µg/ml) para ampliar el espectro de Gram negativos aumentaba la sensibilidad y selectividad del medio.

Más tarde, De la Rosa y col comprobaron que en el medio Granada el *Streptococcus agalactiae* es resistente a polimixina B, ácido nalidíxico, ácido pipemídico, trimetoprim y aminoglucósidos. También observaron que el ácido nalidíxico y el pipemídico a bajas concentraciones en el medio Granada disminuye el crecimiento de EGB, sin embargo, el trimetoprim estimulaba la producción de pigmento (**De la Rosa et al 1983**).

En 1992, De la Rosa diseñó un nuevo medio en el cual incorporó como inhibidores, cristal violeta (inhibidor de estafilococos), sulfato de colistina (inhibidor de Gram negativos), metronidazol (inhibidor de anaerobios) y metotrexato en sustitución del trimetoprim para aumentar la intensidad de pigmento (**De la Rosa et al 1992a**).

I.1.3.3. Factores de crecimiento. Suero

La sangre completa, es uno de los aditivos proteicos más usados en medios bacteriológicos, favorece el crecimiento y presenta una función diferencial: el origen de la misma puede afectar no solo al crecimiento de los microorganismos sino también a las características de estos (**Bridson 1978**).

Sin embargo, la mayor parte de las formulaciones no suelen incorporar sangre entera sino suero de diferentes especies animales, con la misma finalidad anterior (**De la Rosa et al 1983; Karayiannis and Hobson 1981; Levy et al 1983**).

Parece no existir una función única del suero en los distintos medios de cultivo, en algunos microorganismos mejora el crecimiento como en los *Mycoplasmas* (**Meynell and Meynell 1970**), *Chlamydia trachomatis* (**Karayianis and Hobson 1981**) y *Leptospira* (**Ellinghausen 1983**).

Su ausencia impide el crecimiento bacteriano, esto puede atribuirse a sus características nutricionales o bien a su carácter protector ya que se ha comprobado que el suero completo o albúmina de suero es capaz de absorber ácidos grasos, eliminando su efecto inhibitorio del crecimiento, incluso favorece en algunos casos funciones específicas de los microorganismos (esporulación, formación de cápsula, etc.); otros agentes que absorben ácidos grasos son el almidón soluble, charcoal y las resinas aniónicas (**Meynell and Meynell 1970; Bridson 1978; Bridson and Brecker 1970**).

Además de las funciones mencionadas del suero tenemos que destacar su función como coadyuvante en la producción de pigmento por *Streptococcus agalactiae* en el medio Granada (**De la Rosa et al 1983; De la Rosa et al 1990**). El componente del suero que incrementa la pigmentación ha sido identificado como la amilasa (**Rosa-Fraile et al 1996**).

En los medios de cultivo que contienen glucosa y almidón, el aumento de pigmentación por parte del suero esta causado por la aparición de malto-oligosacáridos como consecuencia de la hidrólisis del almidón por parte de la amilasa ya que estos pueden remplazar la actividad intensificadora de la pigmentación de la amilasa. El mecanismo por el cual estos oligosacáridos incrementan la pigmentación no está claro pero solo es observada en presencia de glucosa (**Rosa-Fraile et al 1996**).

Otros factores de crecimiento utilizados son vitaminas, nicotinamida-adeninucleótido (NAD^+), su forma reducida (NADH), el glutati3n, concentrado de factores de crecimiento como vitox[®] Oxoid (vitamina B12, L-glutamina, Adenina, guanina, L-cistina, cisterna, nitrato f3rrico, NAD, tiamina, etc) y el isoVitaleX (factores X y V) (BD-Difco) (**Bridson 1998; Difco 1998**).

I.1.3.4. Extracto de carne

El extracto de carne constituye una soluci3n acuosa de p3ptidos, amino3cidos, fracciones de 3cidos nucleicos, 3cidos org3nicos, minerales, vitaminas, sales y otros nutrientes. Probablemente fue durante mucho tiempo el primer nutriente utilizado como fuente de carbono y nitr3geno para del dise1no de medios de cultivo. El extracto de carne comercial se obtiene de carne de vaca, la cual es hervida durante un periodo de tiempo, obteni3ndose un extracto acuoso que normalmente es suplementado con digestos de prote3nas para incrementar el contenido de nitr3geno amino mejorando el desarrollo bacteriano (**Bridson 1978**).

El extracto de carne concentrado es rico en hidratos de carbono y fosfatos con lo cual puede interaccionar y sufrir reacciones de Maillard conduciendo a un oscurecimiento del producto como consecuencia de la aparici3n de compuestos pardos. Su contenido en tiamina es bajo y tiene una alta proporci3n de 3cidos org3nicos lo que le hace que sea una adecuada fuente de carbono para organismos quimioorganotr3ficos. Su alto contenido en fosfatos le permite actuar como buffer regulando los valores del pH (**Bridson 1978**).

I.1.3.5. Extracto de levadura

El extracto de levadura consiste en una solución concentrada de hidrolizado proteico de células de *Saccharomyces cerevisiae*, producido por una reacción autolítica o plasmolítica de dichas células. Es una buena fuente de aminoácidos, carbohidratos y vitaminas especialmente del complejo hidrosoluble B y tiene un bajo contenido en sales. Los carbohidratos principales son glucógeno y trehalosa aunque por hidrólisis enzimática durante el proceso estos carbohidratos pueden fraccionarse en moléculas de glucosa (**Bridson 1978**).

Dependiendo del origen del extracto de levadura el crecimiento bacteriano se ve influenciado; así el extracto obtenido de levadura de cerveza además de conducir a un preparado marrón oscuro, contiene resinas de lúpulo que inhiben el crecimiento de los microorganismos. Sin embargo, el extracto obtenido de levadura de panadero es más claro y está libre de resinas (**Bridson and Brecker 1970**).

Por otra parte hay que señalar que el extracto de levadura cuando se adiciona en determinados medios diseñados para la producción de pigmento por *Streptococcus agalactiae* tiene la capacidad de incrementar de manera débil la producción de pigmento (**García Peña 2003**).

I.2. PEPTONAS

El término “peptona” apareció por primera vez en unos trabajos publicados por el bacteriólogo Nageli 1880-1882, el cual estableció que los organismos quimioorganotrofos se desarrollaban mejor en medios de cultivo que contenían proteínas parcialmente digeridas, aunque el primero que experimento la hidrólisis ácida de proteínas fue Braconnot en 1820 (**Bridson 1998**).

Hoy en día, se define una peptona como el producto soluble en agua de una digestión enzimática de cualquier fuente proteica cuya composición es una mezcla de polipéptidos, oligopéptidos y aminoácidos junto con otros compuestos solubles que varía según la materia prima de partida, el tipo de enzima utilizado y las condiciones de hidrólisis utilizadas.

Un amplia variedad de fuentes de proteínas pueden ser usada para la obtención de hidrolizados proteicos o peptonas incluyendo proteínas animales (carne, pescado, albúmina de huevo, gelatina, caseína), vegetales (soja, algodón, patata, trigo, etc.) y de microorganismos (bacterias, levaduras, algas) (**Bridson 1978**).

Pocas bacterias son capaces de asimilar proteínas desnaturalizadas como fuente de nitrógeno ya que este proceso depende de la presencia de enzimas proteolíticas (peptidasas), extracelulares, y no todos los microorganismos las poseen. El uso de aminoácidos libres en los medios de cultivo tampoco es útil ya que son fácilmente degradados e incluso las formas D-estereoisómeros pueden bloquear el transporte de aminoácidos L-estereoisómeros. Por todo ello, la proteína hidrolizada o infusiones/extractos acuosos de materiales ricos en proteína suelen ser los más utilizados en los medios de cultivo, su incorporación proporciona una fuente fácilmente disponible de nitrógeno y carbono, en forma de dipéptidos y oligopéptidos (**Bridson and Brecker 1970; Payne 1976; Bridson 1978; Bridson 1998**).

El transporte de dipéptidos y oligopéptidos al interior bacteriano es todavía poco conocido aunque se ha descrito diferentes modelos teóricos (difusión pasiva, difusión facilitada, translocación y transporte activo). En la década de los setenta, Payne y otros investigadores demostraron que el transporte de dipéptidos y oligopéptidos se realiza mediante permeasas bacterianas específicas. Este transporte de péptidos requiere de una especificidad estructural; en primer lugar es muy importante que el grupo α -amino terminal del péptido esté libre y protonado, sea un L-estereoisómeros aunque en tripéptidos la presencia de D-estereoisómeros en el C-terminal no impide el transporte del oligopéptido, y por último el grupo α -carboxi terminal debe estar libre en dipéptidos pero no es necesario que lo esté en oligopéptidos donde puede estar ausente o sustituido. En cuanto a las cadenas laterales no requieren especificidad, aunque su naturaleza puede afectar a la orientación que el péptido debe adquirir para unirse a la enzima transportadora alterando la afinidad del transporte y al porcentaje de asimilación. El transporte de oligopéptidos largos está limitado, siendo el máximo tamaño establecido por el volumen hidrodinámico de un tetrapéptido (**Payne 1977**).

La hidrólisis de estos péptidos está estrechamente relacionada con el transporte de los mismos, pudiendo ocurrir extracelularmente mediante enzimas proteolíticos localizados en la pared celular, o bien en el espacio periplásmico durante el transporte o incluso intracelularmente.

Otras ventajas derivadas de la utilización de los hidrolizados son su solubilidad total, estabilidad al calor y una gran resistencia a la precipitación frente a muchos agentes, como el pH y los iones metálicos (**Fox et al 1982**).

Los hidrolizados de plantas generan alta fermentación de carbohidratos, lo cual limita su uso en medios utilizados para test de fermentación (**Cote and Gherna 1994; Bridson 1998**).

La digestión enzimática es la que mejor conserva el contenido nutricional de la fuente de proteína original. Las peptonas y los hidrolizados generalmente se utilizan a concentraciones de 0.5 a 1% en los medios de cultivo (**Cote and Gherna 1994; Bridson 1998**).

I.2.1. COMPONENTES CRUDOS

I.2.1.1. Tejidos animales

La **carne fresca**, como el músculo o las vísceras (hígado, riñón o corazón), picada y libre de grasa y tendones, es la fuente proteica más utilizada para obtener peptonas de alta calidad nutricional. El secado de esta carne debe realizarse a bajas temperaturas (< 50 °C) para evitar el recalentamiento que conlleva a una caramelización de azúcares (reacción de Maillard) y la inactivación de vitaminas del grupo B principalmente tiamina. Dependiendo del material de partida el contenido de glucógeno y bases orgánicas como la creatina y creatinina varía considerablemente (p.e., el músculo tiene poco glucógeno y creatina más que creatinina; el hígado tiene elevada proporción de glucógeno). Además la carne fresca tiene un alto contenido en aminoácidos, vitaminas de grupo B, minerales y ácidos orgánicos (**Bridson and Brecker 1970; Bridson 1978**).

Las **proteínas de pescado** tienen el inconveniente que contienen una alta proporción de grasas insaturadas que tienden a oxidarse rápidamente dando enranciamiento y mal olor, para evitarlo se suele reducir su contenido extrayéndola con disolventes (**Bridson and Brecker 1970; Bridson 1978**).

I.2.1.2. Leche

Las proteínas de la leche que comúnmente se utilizan para obtener peptonas son la **caseína** y la **lactoalbúmina**. La calidad proteica de este tipo de proteínas es muy semejante a las obtenidas de carne fresca (**Bridson 1978; Bridson and Brecker 1970**).

Las caseínas son fosfoproteínas que representan el 80% de las proteínas de la leche. La precipitación de la caseína de la leche puede realizarse de diferentes formas, por fermentación de la lactosa de la leche desnatada o adicionando ácido hasta reducir el pH 4.6. Posteriormente separar y lavar el cuajo antes de secarlo. Otra alternativa sería dispersar el suero en álcali hasta alcanzar pH 7 y pulverizar obteniéndose también la caseína. El suero proteico después de separarse del cuajo es desnaturado por calor (76 °C) y precipitado a pH 4.8-5.3 obteniéndose lactoalbúmina (**Bridson 1978**).

Las proteínas del suero poseen un valor nutricional mayor que la caseína, pero tienen el inconveniente de contener altas proporciones de lactosa que puede interferir si se utilizan como peptona (**Bridson 1978; Bridson and Brecker 1970**).

I.2.1.3. Vegetales

La **soja**, el **cacahuete**, el **algodón** y las **semillas de girasol** son principalmente cultivados por su alto contenido en aceite. Una vez extraído el aceite por presión, nos queda un residuo con un contenido en proteínas del 40%. La digestión del vegetal crudo conduce a una peptona con un alto contenido en carbohidratos fermentables (**Bridson 1978**).

El **extracto de malta** es un extracto soluble en agua de cebada de malta que se obtiene por secado y molido del grano de cebada germinado y posterior extracción con agua caliente lo que permite conservar el nitrógeno y los carbohidratos constitutivos. Los constituyentes principales de este extracto son los carbohidratos (90%), (principalmente glucosa, fructosa, maltosa) y compuestos nitrogenados (4%), en menor proporción incluye lípidos, compuestos sulfurados e inorgánicos. Es un extracto muy utilizado para el cultivo de hongos filamentosos y levaduras (**Bridson 1978**).

El **extracto de patata** se prepara a partir de patata cortada y pelada por cocción al vapor y posterior filtrado. También se puede obtener un concentrado de patata por extracción con etanol. Es muy útil como suplemento de medio para estimular el crecimiento de *Clostridium butyricum*, también se utiliza para el desarrollo de hongos y levaduras (**Bridson 1978**).

El **extracto de soja** se obtiene mediante hidrólisis enzimática de la harina de soja. Se caracteriza por su alto contenido de carbohidratos y vitaminas, por lo que su empleo permite el crecimiento abundante de bacterias exigentes y de hongos (**Bridson 1998**).

El **trigo** también se utiliza como producto crudo para la obtención mediante hidrólisis enzimática controlada de una peptona de alta calidad como fuente de nitrógeno útil para medios de cultivo microbiológicos.

El inconveniente principal de las peptonas obtenidas de proteínas vegetales es que pueden presentar un bajo contenido en lisina dependiendo de la temperatura del proceso sobre todo cuando se realiza hidrólisis no enzimática.

I.2.1.4. Otros tejidos

El tejido conectivo de los vertebrados está compuesto por unas células especializadas y una matriz extracelular que contiene numerosas y complejas proteínas e hidratos de carbono. El componente mayoritario de este tejido conectivo es la familia de proteínas fibrosas denominadas colectivamente como **colágeno**. Las distintas proteínas colagenosas tienen funciones y estructuras diferentes. La molécula base de colágeno, recibe el nombre de tropocolágeno, está compuesta por tres hélices polipeptídicas levógiras enrolladas entre si formando una hélice dextrógira. Esto permite que el colágeno exhiba propiedades mecánicas y forme parte de piel, huesos, cartílago, tendones, etc (**Stryer 1995**).

Las moléculas de colágeno procedentes de cualquier especie tienen una composición de aminoácidos característica. Una tercera parte de los residuos de esta molécula son glicina y una cuarta parte son prolina. Más aún, muchos residuos de prolina y lisina están modificados covalentemente, apareciendo 4-hidroxiprolina y 5-hidroxilisina. Algunos residuos de la hidroxilisina de las moléculas de colágeno poseen carbohidratos unidos covalentemente, haciendo que el colágeno se convierta en una glicoproteína. La unidad de hidratos de carbono más frecuente es un disacárido formado por un residuo de glucosa que está unido por un enlace glicosídico (α -1,2) a un residuo de galactosa. El residuo de galactosa está unido al grupo hidroxilo de la hidroxilisina por un enlace glicosídico β . La función de los hidratos de carbono en la molécula de colágeno es todavía desconocida (**Stryer 1995**).

Existen diferentes tipos de colágeno según la localización, los más comunes son cuatro: El tipo I presente en tendones, ligamentos y hueso; el tipo II que representa el 50% de la proteína del cartílago; el tipos III forma parte de estructuras como el intestino, arterias, útero, etc.; y el tipo IV forma la lamina basal del epitelio.

El colágeno es insoluble, por hidrólisis parcial del mismo se obtiene la **gelatina**, una proteína soluble que carece de los principales aminoácidos (valina, tiroxina y triptófano) y tiene pocos aminoácidos azufrados. Sin embargo tiene un alto contenido en prolina y hidroxiprolina. El extracto de colágeno es muy utilizado en los medios de cultivo como fuente de nitrógeno y aminoácidos, también se emplea para demostrar actividad proteasa por determinadas bacterias. La forma de obtención es muy sencilla, bien por vapor, ácidos o enzimas conduce a una peptona con pobres efectos promotores del crecimiento bacteriano debido a su déficit de aminoácidos (**Bridson 1978**).

La **queratina** contenida en la lana, pelo, uñas, plumas, etc., presenta un alto contenido en prolina y cisteína pero es deficiente en lisina. Esta proteína es resistente a la hidrólisis enzimática debido a la concentración de puentes disulfuro que presenta. Por ello previo a la hidrólisis se deben de romper los puentes por calor o reducción química (**Bridson 1978**).

La **hemoglobina** es una heteroproteína formado por 4 cadenas polipeptídicas (globinas) a las que se le une un grupo hemo, presente en los glóbulos rojos de la sangre de los mamíferos. Su función es la de transportar oxígeno desde los pulmones hasta los distintos tejidos del organismo. En los medios de cultivo la hemoglobina aporta a los medios factores como la hemina (factor X), Fe^{++} y aminoácidos que estimulan el crecimiento de microorganismos exigentes (*Haemophilus spp.*, *Neisseria spp.*).

I.2.1.5. Estómago de rumiantes (oveja)

El estómago de los rumiantes como la oveja está compuesto y consta de cuatro compartimentos o divisiones denominados: rumen, retículo, omaso, y abomaso. El tamaño relativo de los compartimentos varía con la edad del animal; a la edad de un año y medio los cuatro compartimentos han alcanzado sus tamaños relativos permanentes, teniendo el rumen el 80% de la capacidad estomacal, el retículo el 5%, el omaso del 7 al 8% y el abomaso del 8 al 7%.

El retículo y rumen son los primeros estómagos de los rumiantes y comparten una población densa de microorganismos (bacteria, protozoos y hongos) realiza la fermentación previa de los alimentos. La mucosa del rumen es aglandular, está tapizada con epitelio estratificado escamoso similar al de la piel y cubierto de papilas que realiza una absorción eficiente de ácidos grasos volátiles, así como también de ácido láctico, electrolitos y agua. La mucosa del retículo también es aglandular y forma repliegues que se asemejan a panales de abejas (**Cunningham 2003**).

El tercer estómago u omaso es un órgano pequeño que tiene una alta capacidad de absorción, su mucosa se caracteriza por presentar numeroso pliegues o láminas, insertas en la pared, recubiertas por papilas con tejido cornificado, es decir, células secas queratinizadas similares a la piel cuya función es de protección. Permite el reciclaje de agua y minerales tales como sodio y fósforo que pueden retornar al rumen a través de la saliva. El omaso no es esencial, sin embargo es un órgano de transición entre el rumen y el abomaso, que tienen modos muy diferentes de digestión (**Cunningham 2003**).

El cuarto compartimiento es el abomaso, verdadero estómago y único órgano glandular de los rumiantes compuesto por células especializadas en la función de secreción y elaboración de sustancias (enzimas, mucina, hormonas, etc.), en el cual las partículas no-fermentadas de alimentos, algunos productos finales de la fermentación microbiana y los microbios que crecieron en el rumen son finalmente digeridos. Está dividido en dos partes por una constricción, cada porción tiene una mucosa diferente compuesta por las glándulas fúndicas y pilóricas respectivamente. Las funciones de la glándula fúndica es la producción de pepsinógeno, clorhídrico y mucina mientras que la glándula pilórica es productora de moco. Los rumiantes secretan grandes cantidades de lisozima en el lumen del estómago verdadero (abomaso), un mecanismo que aparece haber evolucionado para facilitar la digestión de bacterias que vienen de las cavidades estomacales fermentativas (**Cunningham 2003**).

El estómago y otras vísceras animales se pueden utilizar como producto crudo para la elaboración de peptonas y para la obtención de enzimas proteolíticos bien del estómago (pepsina, tripsina, quimotripsina, etc.), o del páncreas (amilasa, lipasa). Esta última aplicación actualmente no se realiza ya que los enzimas proteolíticos se obtienen mediante síntesis (**Demartino 1989**).

I.2.1.5.1. Mucinas

La familia de las mucinas son un ejemplo muy típico de proteínas glicosiladas con uniones O-glicosil α 1-3 N-acetilgalactosamina y L-serina o L-treonina, que forman parte de la mayoría de los estómagos de mamíferos.

Las mucinas secretadas se caracterizan por ser moléculas con un alto contenido en serina, treonina y prolina, de gran tamaño con un peso molecular de $5-40 \times 10^6$ Da, alta proporción de enlaces O-glicosil con carbohidratos (50-80%) y por su habilidad para formar un gel viscoso y a la vez elástico. Forman parte dinámica e interactiva del biofilm protector de la mucosa en la superficie de células epiteliales del tracto gastrointestinal, respiratorio y genital, donde además de lubricar proporcionan una barrera frente a sustancias nocivas e intervienen en las interacciones proteicas con la superficie celular. También forman parte importante de la saliva donde su principal función es la de lubricar.

Las mucinas asociadas a membrana comparten las mismas propiedades estructurales anteriores, sin embargo, no forman geles y además su función principal es activar componentes de la membrana.

La glicosilación de los residuos de serina y treonina de las mucinas depende del tejido donde se originen, este proceso tiene una gran importancia, dependiendo del oligosacárido que se una la función de la mucina será diferente. Además de estas uniones O-glicosil también pueden presentarse uniones N-glicosil, no es habitual en este caso la función de la mucina se localiza en el interior celular (p.e. aparato de Golgi).

El responsable de la identidad química y biológica de la mucina, viene determinada por el oligosacárido presente en la periferia de la glicoproteína. En el caso de la mucina gastrointestinal son residuos de ácido siálico (N-acetilneuraminato) que es un azúcar derivado de la manosa compuesto de 9 carbonos con un grupo carboxilato, y ésteres de sulfato que proporcionan carga negativa a la mucina. El ácido siálico se puede unir al oligosacárido en las posiciones α -2,3 y α -2,6 e incluso en la posición α -2,8 en este caso como di-, tri- o polisiálico.

I.2.2. COMPONENTES DE LOS TEJIDOS ANIMALES

I.2.2.1. Proteínas

Las proteínas en medios de cultivo bacterianos pueden ejercer una función nutritiva, protectora (absorción de tóxicos) e indicadora de alguna actividad biológica. Pero tienen una desventaja y es que cuando se adicionan a un medio hay que tener en cuenta que pueden desnaturalizarse. Este proceso se produce por calor o cambios de pH, perdiendo la solubilidad y coagulando (**Bridson 1978**).

Algunos medios de cultivo incorporan proteínas completas en su formulación, como el medio Lowenstein-Jensen (incorpora huevo para el cultivo de micobacterias), otros medios utilizan la proteína como sustrato indicador para detectar enzimas proteolíticas (gelatina-gelatinasa, yema de huevo-lipasa) (**Bridson 1978**).

Las proteínas simples, también llamadas holoproteínas son aquellas formadas exclusivamente por cadenas de péptidos. Las proteínas simples más comunes que nos podemos encontrar en un tejido animal se pueden dividir según su conformación en:

- **Proteínas fibrosas:** formadas por cadenas polipeptídicas ordenadas de forma paralela e insolubles en agua. En general forman parte del tejido conjuntivo, tendones, hueso, músculo, pelo y uñas (miosina, escleroproteínas, colágeno, elastina, fibrinógeno, etc.).
- **Proteínas globulares:** con forma esférica, formadas por cadenas polipeptídicas que se doblan en forma globular y solubles en agua. Entre ellas están enzimas, hormonas, proteínas con función transportadora de otras sustancias (albúmina, hemoglobina, mioglobina, enzimas y hormonas proteicas).

Además de las holoproteínas, en un tejido animal nos podemos encontrar las heteroproteínas se caracterizan porque, además de la cadena peptídica, entran en su constitución unos compuestos que reciben el nombre de grupos prostéticos. Teniendo en cuenta la naturaleza del grupo prostético, existen diferentes clases de heteroproteínas (nucleoproteínas, glucoproteínas y lipoproteínas (**Berenyi and Gergely 1974**).

I.2.2.2. Nucleoproteínas

Las nucleoproteínas son heteroproteínas compuestas por proteínas simples (histonas, protamina) más ácidos nucleicos (ARN o ADN), los cuales están compuestos por el ácido fosfórico, una pentosa (ribosa y desoxirribosa) y una base nitrogenada (adenina, guanina, citosina, timina y uracilo). Las nucleoproteínas que se encuentran en citoplasma celular están formadas por ácido ribonucleico (ribonucleoproteínas) y las que se encuentran en el núcleo están formadas por ácido desoxiribonucleico (desoxiribonucleoproteína) (**Berenyi and Gergely 1974**).

I.2.2.3. Glucoproteínas

Los carbohidratos se consideran sustancias de reserva, compuestos que almacenan energía y compuestos que actúan como soporte de estructuras, ausentes de “inteligencia biológica”. Sin embargo, el estudio químico y bioquímico de las glucoproteínas que no son más que azúcares unidos covalentemente con proteínas, ha permitido conocer un gran número de funciones biológicas, estabilizan la estructura tridimensional de las proteínas protegiéndolas de ataques proteolíticos; forman parte de las membranas celulares donde controlan la permeabilidad de las membranas e intervienen en el metabolismo y división celular y múltiples funciones biológicas; son receptores de hormonas, proteínas y de microorganismos; intervienen en el reconocimiento y adhesión célula-célula; son epítopos de antígenos

titulares; forman parte de secreciones gástricas (mucina del estómago) y mucosas, y son componente de estructuras como los tendones (tendomucoide) y ligamentos, formando parte de los huesos (oseomucoide) y del cartílago (condromucoide) (**Debray 1995**).

Las glicoproteínas resultan del acoplamiento covalente de carbohidratos [azúcares neutros, amino azúcares (N-acetil-D-glucosamina y N-acetil-D-galactosamina), ácidos urónicos y ácidos siálicos] con proteínas (**Debray 1995; Spik 1995; Walker 2002**).

Los glucoconjugados se pueden dividir según la unión covalente entre el azúcar y la proteína en dos clases:

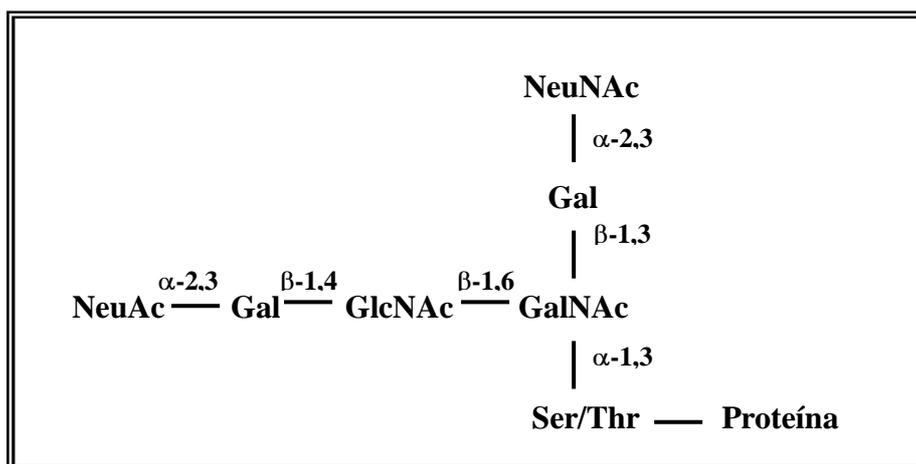
A- O-glicosil Ligando (I.2.2.3. Figura 1), dentro de esta clase existen muchos tipos de combinaciones azúcar-proteína :

- Forma típicamente predominante es la unión α 1-3 N-acetilgalactosamina y L-serina o L-treonina. Este tipo de unión es típicamente encontrado en mucinas.
- Unión β 1-3 entre D-xilosa y L-serina (tipo proteoglicano).
- Unión β 1-5 entre D-galactosa y 5-hidroxi-L-lisina característico de colágeno.
- Unión β 1-4 entre L-arabinofuranosa y 4-hidroxi-L-prolina observado en plantas
- Unión β 1-3 N-acetilglucosamina y L-serina típico de glicoproteínas citosólicas, nucleares y de virus.

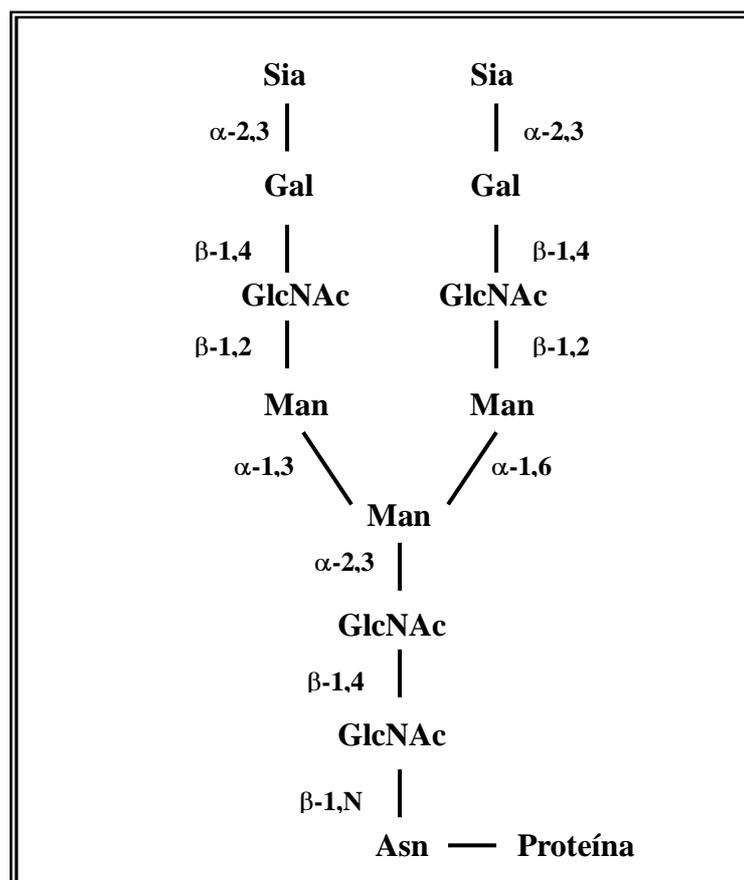
B- N-glicosil Ligando (I.2.2.3. Figura 2), en este caso la unión se produce entre N-acetilglucosamina y asparagina mediante un enlace β 1-N. Aunque actualmente se conoce que N-acetilgalactosamina, glucosa y L-ramnosa también se puede unir a la asparagina.

La estructura de una glicoproteína se divide pues en tres partes:

- Núcleo: Puede ser N-glicosil u O-glicosil
- Columna: Formada por residuos de D-galactosa y N-acetil-D-glucosamina que pueden encontrarse en forma lineal o en rama.
- Periferia: Es la responsable de la identidad química y biológica y pueden se diferentes combinaciones de N-acetilglucosamina, D-manosa, D-galactosa, ácido siálico y L-fucosa.



I.2.2.3. **Figura 1.** Glicoproteína tipo O-glicosil



I.2.2.3. Figura 1. Glicoproteína tipo N-glicosil

Abreviatura de azúcares:

| | |
|---------------|-----------------------|
| Fuc | Fucosa |
| Gal | Galactosa |
| GalNAc | N-acetilgalactosamina |
| GlcNAc | N-acetilglucosamina |
| Man | Manosa |
| Sia | Ácido siálico |

I.2.2.4. Lipoproteínas

Las lipoproteínas se presentan como agregados solubles de proteínas con lípidos (triglicéridos, ésteres de colesterol), fosfolípidos o glucolípidos, esta unión lípido-proteína puede ser covalente o no covalente. Las lipoproteínas mejor conocidas llamadas lipoproteínas plasmáticas son agregados esféricos que presentan uniones no covalentes, están especializadas en el transporte de lípidos por sangre y se dividen en varios grupos según su densidad (VLDL, HDL, LDL)

Las lipoproteínas de unión covalente forman parte fundamental de la membrana de las células, mitocondrias, microsomas, y otras organelas (Davis and Vance 1996).

I.2.2.5. Glicolípidos

Los glicolípidos son componentes estructurales de las membranas plasmáticas, que se encuentran localizados en su monocapa externa. Los glicolípidos son lípidos complejos en los cuales las cadenas de carbohidratos están unidas a la ceramida (esfingosina N-acilada y un ácido graso). La estructura presenta una región altamente hidrofóbica y otra hidrofílica. Pueden ser galactosilceramidas, ceramidas que contienen residuos D-galactosa en el grupo hidroxilo terminal; o glucosilceramidas, ceramidas que contienen D-glucosa. Según sus cadenas oligosacáridicas centrales, los glicolípidos se pueden dividir en cuatro tipos que se denominan series: ganglio, globo, lacto y neolacto. Las diversas sustituciones de los azúcares de estas estructuras determinan una amplia variedad de glicolípidos, por ejemplo, los globósidos y gangliósidos contienen N-acetilgalactosamina. Los glicolípidos más complejos conocidos son los gangliósidos, que resultan de la adición de ácido siálico a la serie ganglio.

I.2.2.6. Pool Metabólico

Las proteínas conjugadas (fosfoproteínas, cromoproteínas, nucleoproteínas, glucoproteínas, lipoproteínas, metaloproteínas, etc.) en el proceso proteolítico del tejido animal se separan en proteínas simples, que a su vez se desdoblan en péptidos, polipéptidos, y distintos subproductos derivados del grupo prostético (ácido fosfórico, porfirinas, nucleótidos, nucleósidos, hidratos de carbono, lípidos, coenzimas, sales, oligoelementos etc.) obteniéndose así la “peptona”.

A la mezcla de nutriente obtenida por la digestión enzimática del tejido se conocen como “pool metabólico”. La composición y la constancia de calidad de una peptona y por tanto su pool metabólico y con ello su utilidad bacteriológica, depende esencialmente de la calidad de la materia prima y del modo de digestión enzimática al cual se somete el material de partida. El grado de desdoblamiento de las proteínas viene determinado por las enzimas proteolíticas.

I.3. ENZIMAS PROTEOLITICAS

Las enzimas proteolíticas o proteasas son un grupo de enzimas que catalizan la ruptura de las uniones peptídicas de las proteínas. Estas enzimas se clasifican en función del punto por el cual cortan la cadena peptídica en endopeptidasas o proteinasas y exopeptidasas o peptidasas (**Beynom and Bond 1989; Walker 2002**).

Las proteasas en los microorganismos son utilizadas para degradar las proteínas y obtener nutriente para su crecimiento. La degradación es iniciada por endopeptidasas secretadas por los microorganismos seguida de una nueva hidrólisis por exopeptidasas extra o intracelulares (**Beynom and Bond 1989**).

Las proteasas se encuentran en todas las formas de vida, humanas, plantas (papaína, bromelina), animales (tripsina, quimotripsina, pepsina) bacterias, hongos (proteinasas K, pronasa, termolisina) y virus, siendo las proteasas microbianas actualmente muy utilizadas en aplicaciones en la industria alimentaría, farmacéutica y biotecnológicas (**Beynom and Bond 1989**).

Esta actividad proteolítica de las proteasas juega un importante papel en muchos procesos fisiológicos humanos, en la regulación de enzimas y hormonas, en la cascada de reacciones de la coagulación sanguínea, en el desarrollo embrionario, en procesos catabólicos y anabólicos, etc (**Beynom and Bond 1989**).

I.3.1. ENDOPROTEASAS

Este grupo de enzimas actúan en el interior de la cadena polipeptídica lejos del grupo amino o carboxilo terminal. Según Hartley en 1960 (**Barrett and Salvesen 1986**), las endoproteasas se pueden dividir en 4 subclases teniendo en cuenta su mecanismo catalítico o sustrato específico: serina-, cisteína-, aspartico- y metallo-endopeptidasas.

La serina-endopeptidasa incluye dos familias distintas; **la familia quimotripsina** la cual incluye las enzimas de mamíferos como la quimotripsina, tripsina, elastasa; **la familia subtilisina** que incluye las enzimas bacterianas (**Barrett and Salvesen 1986**).

La cisteína-endoproteasa incluye proteasas de plantas (papaína, actinidina o bromelina), varias catepsinas lisosómicas de mamíferos, calpains citosólicas y varias proteasas de parásitos (**Barrett and Salvesen 1986**).

La serina-endopeptidasa y cisteína-endoproteasa forman complejos enzimáticos covalentes con sus sustratos.

La aspártico-endoproteasa incluye la **familia pepsina** en la que se incluye enzimas digestivos como la pepsina y quimosina, catepsina lisosomal D y determinadas proteasas de hongos y la **familia viral** que comprende las proteinasas virales (**Beynom and Bond 1989**).

La metallo-proteasas carboxipeptidasa A y B son muy parecidas tanto en estructura como en zona catalítica a las exopeptidasas. La carboxipeptidasa A, tiene como preferencia C-terminal aromático o alifático de cadenas de hidrofóbicas mientras que la acción de la carboxipeptidasa B es directamente sobre residuos de arginina y lisina. Este tipo de proteasas presenta en la zona catalítica un metal que habitualmente es el zinc (**Beynom and Bond 1989**).

La termolisina es la única metallo-endoropeptidasa de estructura y mecanismo de acción conocido. La aspártico-endoropeptidasa y metallo-endoropeptidasas no forman complejos enzimáticos covalentes con sus sustratos.

| Enzimas proteolíticos | Familia | Acción proteolítica preferente (-P ₁ -P ₁ '-) |
|-----------------------|---------------------------|---|
| Pepsina | Aspártico-endoropeptidasa | P ₁ = Aminoácidos hidrofóbicos |
| Tripsina | Serina-endoropeptidasa | P ₁ = Arg, Lys |
| Papaína | Cisteína-endoropeptidasa | P ₁ = Arg, Lys |
| Bromelina | Cisteína-endoropeptidasa | P ₁ = No específico, Lys, Ala |
| Ficina | Cisteína-endoropeptidasa | P ₁ = Arg, Lys |
| Pronasa | Exo- y Endoproteasas | P ₁ = No específico |
| Termolisina | Metallo-endoropeptidasa | P ₁ = Leu, Phe, Va, Met y Ala |

P₁: Residuo aminoácido N-terminal; P₁': Residuo aminoácido C-terminal

I.3.1. Tabla 1. Endoproteasas

En 1967, Scheter y Berger (**Harris and Angal 1989**) introdujeron un sistema de nomenclatura para describir las interacciones de las proteasas y sustratos. Por consenso, se decidió llamar al residuo aminoácido "P" (de péptido). El residuo aminoácido terminal de la cadena se enumera como P₁, P₂, P₃ y al residuo carboxilo terminal de la cadena como P₁', P₂', P₃' por estos residuos la proteasa rompe la unión peptídica.

I.3.2. EXOPROTEASAS

Las exoproteasas actúan en la zona final de la cadena polipeptídica rompiendo bien el grupo amino terminal, produciendo la liberación de un único aminoácido (aminopeptidasas), de dos aminoácidos (dipeptidasas) o de tres aminoácidos (tripeptidasas) o bien rompiendo el grupo carboxilo terminal liberando igualmente un único aminoácido (carboxipeptidasas) o dos aminoácidos (peptidil-dipeptidasas). También existen un grupo de exopeptidasas que son específicas de dipéptido (dipeptidasas) y las omega-peptidasas que eliminan residuos terminales sustituyéndolos por isopéptidos (**Barrett and Salvesen 1986; Beynom and Bond 1989**).

| Enzimas proteolíticos | Familia | Acción proteolítica preferente (-P ₁ -P' ₁ -) |
|------------------------|-----------------------|---|
| Aminopeptidasas M | Serina-exopeptidasa | P' ₁ , P ₁ = No específico |
| Carboxipeptidasa A | Metallo-exopeptidasa | P' ₁ = No Arg, lys, Pro |
| Carboxipeptidasa B | Metallo-exopeptidasa | P' ₁ = Aminoácidos básicos |
| Carboxipeptidasa P | Serina-exopeptidasa | P' ₁ = No Lys, Arg, ornitina |
| Catepsina | Cisteina-exopeptidasa | P ₁ = Phe, Leu, Tyr P' ₁ = Gly, Pro |
| Leucina aminopeptidasa | Metallo-exopeptidasa | P ₁ , P' ₁ = No Lys, Arg P' ₁ = No Pro, Hys |

P₁: Residuo aminoácido N-terminal; P'₁: Residuo aminoácido C-terminal

I.3.2. Tabla 1. Exoproteasas

I.3.3. PROTEINAS DESNATURALIZADAS Y PROTEÍNAS NATIVAS

El proceso de proteólisis es el paso final de una gran variedad de proteínas y ocurre de muchas maneras diferentes y es producido por muy diversas proteasas. El grado de digestión final va a depender del estado físico del sustrato de partida (**Beynom and Bond 1989**).

Los dominios compactos de las proteínas son generalmente resistentes a la proteólisis, en cambio las regiones flexibles superficiales se pueden adaptar al sitio activo de la proteasa. Por lo tanto, la degradación será más o menos completa en las proteínas desnaturalizadas donde la proteína ha perdido la estructura de orden superior (secundarias, terciarias y cuaternarias) que dando únicamente la cadena peptídica, en cambio en las proteínas nativas donde la estructura no ha sufrido ningún cambio la proteólisis estará limitada (**Walker 2002**).

Sin embargo, existen determinadas enzimas proteolíticas (proteínasa K, termolisina) que tienen la capacidad de degradar proteínas nativas, sin necesidad de desnaturalizarlas (**Walker 2002**).

La desnaturalización proteica puede realizarse por calor, con solución de ácido tricloroacético 5%, aumentando la fuerza iónica con sulfato amónico, urea o con Clorhidrato de guanidina (**Walker 2002**).

I.3.4. ENZIMAS PROTEOLITICOS. ENDOPEPTIDASAS

Tripsina: Es una serina-endopeptidasa que ataca la uniones peptídicas entre grupos carboxílicos de lisina o arginina y los grupos ester y amino de cualquier otro aminoácido básico.

Las condiciones óptimas para su uso son a un pH 8.5-8.8, pero debido a su gran tendencia a la autólisis no permanece activa a pH elevados durante largo periodos de tiempo. La autólisis es retardada considerablemente en presencia de iones Ca^{2+} (20 mM).

Su temperatura óptima es 42 °C. El tiempo de hidrólisis varía y depende de la proporción de sustrato proteico/enzima. La proporción enzima/sustrato proteico es 1:100. Es estable a 4 °C en forma liofilizada. Se obtiene activando su precursor el tripsinógeno que se fabrica en las células β del páncreas bovino (**Beynom and Bond 1989**).

El enzima no se inactiva por reductores ni por oxidantes, aunque sí por algunas proteínas de soja, judías, trigo, ovomucoide (**Bridson 1978; Bridson and Brecker 1970**).

Pepsina: Es una aspártico-endopeptidasa cuyas condiciones óptimas de hidrólisis es a pH 2-4, sin embargo se desnaturaliza por encima de pH 6. Su temperatura óptima es de 42 °C. La máxima actividad catalítica se obtiene a pH 1.8, pero a este pH es parcialmente inestable debido a su autodigestión. En cierto modo presenta amplia especificidad, produce la ruptura de las uniones adyacentes a residuos hidrofóbicos o aromáticos, leucina, metionina, triptófano y fenilalanina. Se obtiene por activación de su precursor el pepsinógeno que se obtiene de mucosa gástrica de cerdo y es estable a 4 °C (**Bridson 1978; Beynom and Bond 1989**).

Papaína: Es una cisteína-endopeptidasa obtenida del látex de la *Carica papaya* y como tal se inhibe por todos aquellos agentes modificadores de grupos sulfhídrido (oxidantes, metales pesados, alquilantes), por lo que para su actividad se requiere la protección de su centro activo mediante la adición de agentes reductores como cisterna, sulfuro de hidrógeno, β -mercaptoetanol o ditioneitol.

Presenta una marcada estabilidad a elevadas temperaturas comparada con otros enzimas proteolíticas, de modo que puede realizarse la digestión a 70 °C (**Bridson and Brecker 1970**). La máxima actividad enzimática se encuentra en el rango de pH 6-7.

Posee una amplia acción hidrolítica similar a la pepsina favoreciendo la ruptura de las uniones contiguas a arginina y lisina. También es estable a 4 °C (**Bridson 1978**).

Bromelina: Es un cisteína-endoproteasa que se obtiene de *Ananas comosus*, la digestión enzimática óptima se realiza a una temperatura de 37 °C y a un pH de 6. Las uniones peptídicas a las cuales produce ruptura son aquellas adyacentes a lisina, alanina y tiroxina.

Ficina: Se obtiene del látex de árboles tropicales del género *Picus*. Su actividad óptima es a pH 5.5 aunque es estable en el rango entre 3.5 y 9. La temperatura óptima para su actividad proteolítica es de 63 °C aunque señalar que se inactiva a 80 °C. Su acción hidrolítica es similar a la papaína. La autólisis es retardada considerablemente en presencia de iones Ca^{2+} (20 mM).

Proteasas microbianas: Aunque de momento no son de uso frecuente en la producción industrial de hidrolizados proteicos, poco a poco, sobre todo en las últimas décadas están adquiriendo importancia en la producción industrial de peptonas. Son enzimas extracelulares y se clasifican en ácidas, neutras y básicas. Las proteasas ácidas se obtienen de hongos, son activas a pH 2-5 y son similares a la pepsina, las proteasas neutras se obtiene de bacterias y hongos su pH óptimo oscila 7-9 para su estabilidad debe añadirse inones Ca^{2+} (20 mM CaCl_2), los péptidos que hidrolizan son adyacentes residuos hidrofóbicos (ej. fenilalanina, leucina) y las proteasas básicas también se obtienen de bacterias y hongos tienen una acción similar a la tripsina y su actividad máxima ocurre en el rango de pH 9-11 (**Bridson 1978; Bridson and Brecker 1970**). Algunos ejemplos de proteasas microbianas son:

Termolisina: Es una metalo endopeptidasa básica ya que su pH óptimo de hidrólisis es 7-9, a una temperatura de 37 °C. Se obtiene de *Bacillus thermoproteolyticus*.

Rompe uniones peptídicas adyacentes a leucina, fenilalanina, valina, metionina y alanina siempre que estén unidas a prolina. La autólisis es retardada considerablemente en presencia de iones Ca^{2+} (2 mM CaCl_2).

Proteinasa K: Es una serina endoproteasa que se obtiene del hongo *Tritirachium album*. Es una enzima extraordinariamente estable, para su actividad requiere iones Ca^{2+} (2.5-5 mM CaCl_2). Tiene una especificidad bastante amplia pero con preferencia sobre los enlaces peptídicos unidos al C-terminal de aminoácidos aromáticos y alifáticos especialmente la alanina.

Su pH óptimo de hidrólisis es de 9, y una temperatura de 30 °C. Debido a su especificidad, alta actividad y capacidad para digerir proteínas nativas, es muy utilizada en la purificación de ácidos nucleicos donde es necesario una inactivación y degradación de proteínas.

Pronasa: Es un grupo de enzimas proteolíticas producidos por *Streptomyces griseus*. Contiene: cinco serina-endoproteasas, dos metallo-endopeptidasas (Zn^{2+}), dos Zn^{2+} -leucina aminopeptidasa y una Zn^{2+} carboxipeptidasa. Las serina-endopeptidasas son utilizadas como alternativa la proteinasa K. Su actividad óptima de hidrólisis es a una temperatura de 37 °C y a un pH 7-8. Es necesario iones Ca^{2+} que retardan considerablemente la autólisis. Al ser una mezcla de exo y endoproteasas, la pronasa tiene una amplia especificidad, rompiendo prácticamente todos los enlaces peptídicos.

I.3.5. CONDICIONES DE HIDRÓLISIS

Los hidrolizados proteicos se obtienen mediante la ruptura de los enlaces peptídicos, produciéndose péptidos y eventualmente aminoácidos; esta degradación o hidrólisis se puede llevar a cabo adicionado ácidos y bases fuertes, sin embargo, cada vez son más los procesos basados en el uso de proteasas, lo que se conoce como hidrólisis enzimática (**Bridson 1998**).

I.3.5.1. Hidrólisis no enzimática

La **HIDRÓLISIS ÁCIDA** se lleva a cabo a altas temperaturas usando ácidos inorgánicos (ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, etc.) con lo cual es una hidrólisis inespecífica, ya que estos atacan todas las uniones peptídicas degradando proteínas y polipéptidos a pequeños péptidos y aminoácidos.

Los datos analíticos (nitrógeno total o nitrógeno soluble, nitrógeno amínico y análisis de los aminoácidos) de estos hidrolizados muestran un elevado contenido en nitrógeno amínico en comparación con los digestos enzimáticos. Además suelen presentar un alto contenido de sales (30-40%) ya que estos ácidos deben de neutralizarse. Por otra parte, y debido a las condiciones de reacción tan severas, se produce una completa destrucción del triptófano, pérdida severa de cistina y pérdidas menores de serina y treonina; así como la conversión en sus formas ácidas de la asparagina y glutamina. Cualquier vitamina es destruida y pueden ocurrir reacciones entre carbohidratos y aminoácidos (Reacción de Maillard) dando un producto oscuro frecuentemente tóxico para los microorganismos (**Bridson 1998; Bridson and Brecker 1970**).

La **HIDRÓLISIS ALCALINA** se utiliza en algunos casos para prevenir la destrucción de triptófano pero se produce una pérdida parcial o destrucción completa de cisteína, cistina y arginina (**Bridson 1978**).

Ambos tratamientos alteran las propiedades nutricionales de los hidrolizados al provocar la destrucción de las vitaminas (**Bridson 1978**).

I.3.5.2. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática es un proceso muy eficiente, que puede llevarse a cabo en condiciones suaves de temperatura, pH y presión, con lo cual la calidad nutricional de los aminoácidos se mantiene prácticamente inalterada, puesto que no tiene lugar la destrucción o modificación de ciertos restos aminoacídicos, como ocurre en el caso de la hidrólisis química (**Bridson 1978**).

La digestión enzimática no conlleva a una hidrólisis total de las proteínas en aminoácidos sino que se obtiene hidrolizados parciales que generalmente originan mejor crecimiento que los hidrolizados completos o mezclas de aminoácidos y que contienen polipéptidos de una longitud de cadena variable dependiendo de la frecuencia de la unión aminoacídica específicos llamados en función de su peso molecular de mayor a menor como proteasas primarias, proteasas secundarias, peptonas, péptidos y aminoácidos.

Los productos de la digestión de un tejido, comúnmente llamados “peptonas”, son una mezcla mal definida de polipéptidos, oligopéptidos, aminoácidos, bases nitrogenadas orgánicas, sales y elementos traza. Si el contenido en polipéptidos largos ($MW > 6000$) es elevado el término utilizado para definir a estos hidrolizados es el de “proteosa peptona”. Aunque tales peptonas son de composición no definida, controlando el proceso de digestión es posible estandarizar los productos, de tal forma que las características finales sean reproducibles (**Bridson 1978; Bridson 1998**).

I.3.6. FABRICACIÓN DE PEPTONAS

Entre los sustratos empleados para la elaboración de hidrolizados se encuentran: carne, pescado, gelatina, leche, queratina, proteínas de soja, microorganismos (algas, bacterias y levaduras), albúmina de huevo, semilla de girasol, etc. (**Bridson and Brecker 1970; Bridson 1978; Bridson 1998**).

La elección de la fuente proteica es de crucial importancia ya que la calidad del hidrolizado no será mayor que la de la proteína de origen (**Bridson 1978**).

En general, las proteínas de carne proporcionan peptonas de muy alta calidad; las proteínas de pescado debido a su alto contenido en ácidos grasos insaturados se oxidan rápidamente produciendo enranciamiento.

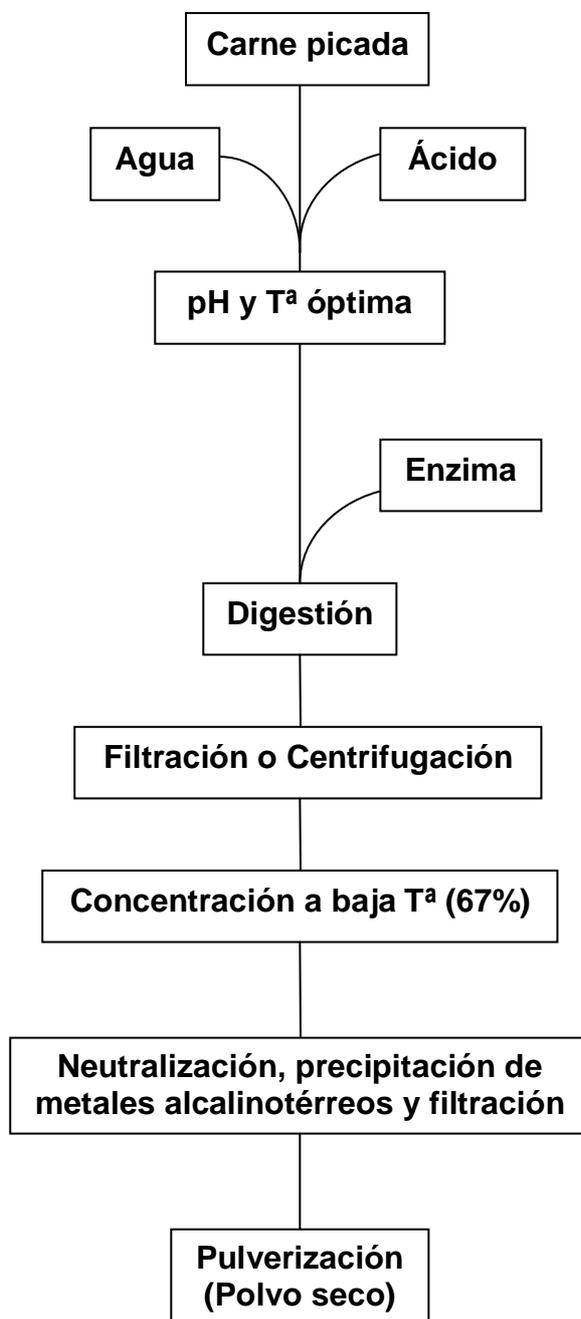
Las proteínas de la leche (caseína, lactoalbúmina) proporcionan peptonas de alta calidad aunque ésta puede variar según su origen y proceso de obtención debiendo emplearse aquellas que poseen menor contenido en lactosa (**Bridson and Brecker 1970; Bridson 1978**); la gelatina, proteína extraída del colágeno, presenta un elevado contenido en prolina y hidroxiprolina y poco o ningún contenido en aminoácidos azufrados; para la mayoría de los microorganismos las peptonas de gelatina muestran poca estimulación del crecimiento (**Bridson and Brecker 1970**).

La calidad del residuo proteico de harina de soja, semilla de algodón y semilla de girasol varía de acuerdo al proceso y a las temperaturas empleadas para su obtención, aunque en general, las peptonas obtenidas de vegetales suelen presentar bajo contenido en lisina (**Bridson and Brecker 1970**).

No solamente es importante en la elección de un hidrolizado proteico la fuente proteica sino también el procedimiento de hidrólisis empleado y el enzima (en la hidrólisis enzimática), ya que por ejemplo en la hidrólisis ácida algunos aminoácidos se destruyen completa (triptófano. cisteína) o parcialmente (serina, treonina) durante el proceso, no encontrarse disponibles (**Bridson 1978**).

Una determinada peptona no puede satisfacer todos los propósitos microbiológicos, por lo que cada una de ellas es particularmente útil para un propósito especial y posee características singulares que las diferencia de las demás; ligeras modificaciones o cambios en los métodos de obtención pueden llevar a productos que poseen muy diferentes propiedades nutricionales (**Difco 1998**).

DiaGrama general de fabricación de peptonas (**Bridson 1998**):



I.4. INFLUENCIA DE LOS MEDIOS DE CULTIVO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE SUSTANCIAS ESPECÍFICAS EN MICROORGANISMOS

I.4.1. ANTIBIÓTICOS Y HEMÓLISINA

En la década de los 30, Hinton y Orr (**Lorian 1996**), observaron que α -hemolisina producida por *Staphylococcus aureus* se inhibía con estreptomycin y bacitracina a bajas concentraciones. Esto fue confirmado más tarde por Kobayashi (**Lorian 1996**) usando otros antibióticos (lincomicina, cloranfenicol y eritromicina). En contraste, vancomicina y metilicina incrementan la producción de α -hemolisina.

La síntesis de estreptolisina O y S de *Streptococcus pyogenes* es otro ejemplo de cómo se inhibe su formación cuando al medio de cultivo se añade clindamicina o lincosamida a concentraciones sub-inhedorias (**Lorian 1996**).

De manera normal los antibióticos se adicionan a los medios de cultivo para interferir en el crecimiento de los microorganismos pero cuando se incorporan a bajas concentraciones, los antibióticos influyen en la biosíntesis de determinadas enzimas y toxinas (**Lorian 1996**).

Un ejemplo de esto es la azitromicina, así como otros antibióticos de su familia (eritromicina, roxitromicina), capaz de inhibir la producción de exotoxina A y determinados factores de virulencia producidos por *Pseudomonas aeruginosa* sin afectar el crecimiento ni la producción de proteínas totales. De manera parecida las lincosamidas, inhibe la biosíntesis de toxinas de determinadas bacterias sin influir en biosíntesis ribosomal de otras proteínas (**Lorian 1996**).

Sin embargo, en bacterias Gram negativas el efecto de los antibióticos en la expresión de enzimas es más complejo. En este caso, los antibióticos estimulan la síntesis de toxinas. Así las lincosamidas y tetraciclinas a bajas concentraciones estimulan la producción de enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae* (Lorian 1996).

Algo parecido ocurre con la polimixina en *E. coli*, la cual incrementa la producción de verotoxina y toxina Shiga (Karmali et al 1985; Yokohama et al 2000).

I.4.2. PRODUCCIÓN DE TOXINAS

De manera similar a lo observado con la hemolisina de *Staphylococcus aureus*, la producción de otras toxinas por determinadas bacterias se ven influenciadas por la concentración antibiótica utilizada en los medios de cultivo (Lorian 1996).

La enterotoxina y citotoxina de *Clostridium difficile* responsables de colitis pseudomembranosa asociada a antibióticos, se favorece su biosíntesis incorporando al medio de cultivo nivel bajos de clindamicina u otros antibióticos (bacitracina, metronidazol, vancomicina, etc.) (Lorian 1996).

De igual forma, la producción de exotoxina A y elastasa por *Pseudomonas aeruginosa* se ve influida en presencia y ausencia de 1/12 de la concentración mínima bactericida de carbenicilina y gentamicina. Ambos antibióticos inhiben la síntesis de exotoxina A pero solo la gentamicina es capaz de inhibir la síntesis de elastasa (Lorian 1996).

Además de los antibióticos, los péptidos añadidos en los medios de cultivo también estimulan la producción de toxinas. De hecho algunas peptonas se desarrollaron para la obtención de toxinas. El mecanismo por el cual los péptidos estimulan dicha biosíntesis son desconocidos aunque parece claro que la estructura del péptido *per se* no es esencial ya que su función es fundamentalmente como fuente de aminoácidos.

La síntesis de toxina tetánica en *Clostridium tetani* es dependiente de péptidos de histidina y su omisión del medio evita su producción aunque no su crecimiento. En contraste, la histidina libre no estimula la producción de toxina. Algo parecido ocurre con la toxina a de *Staphylococcus spp.* y con la producción de toxina de *C. perfringens* (Difco 1998).

En la producción de toxina por *Corynebacterium diphtheriae* el caldo de ternera con azúcar libre no favorece la formación de toxina a menos que se combine con ciertas sustancias (péptidos) encontrados en determinadas peptonas (peptona de witte's, proteosa peptona, Bacto peptona, proteosa peptona N° 2 y 3) (Gibbs and Rettger 1927). La incorporación al medio de determinados aminoácidos como la cisteína y el triptófano en cantidades que no excedan de 0.5% parece favorecer la biosíntesis de toxina (Gibbs and Rettger1927).

I.4.3. EFECTO ESTREPOGENINA

Woolley en 1941 (Payne 1976) definió el término estreptogenina a un material presente en el extracto de hígado que era necesario para el crecimiento de *Streptococcus pyogenes*. Este fenómeno de estimulación del crecimiento, también fue observado por Pollack y Lindner (Payne 1976) en el hidrolizado parcial de caseína para *Lactobacillus casei* y más tarde por Smith (Payne 1976) en el extracto de levadura para *Streptococcus lactis*.

Woolley y colaboradores perseguían con sus estudios la esperanza de que la molécula de estropogenina fuese una sustancia específica que estimulaba el crecimiento, distinta de una vitamina u hormona. Ellos intentaron aislar la molécula de hidrolizados proteicos ya que pensaban que el principio activo tenía naturaleza peptídica incluso llegaron a sintetizar pépticos definidos. Retrospectivamente se puede ver que los estudios de Woolley proporcionaban información muy útil con relación a la utilización de péptidos pero fallaban en la explicación de porque los péptidos eran nutricionalmente superiores sobre mezclas equivalentes de aminoácidos.

En los años 50, tal información fue proporcionada por Snell y colaboradores (**Payne 1976**). Ellos observaron que el crecimiento de los microorganismos exigentes que usaban en sus experiencias, estaba condicionado por la interacción existente entre los constituyentes de los medios complejos que utilizaban. Así por ejemplo, comprobaron que *L. casei* crecía adecuadamente en medios con péptidos que contenían alanina, sin embargo, la alanina libre no estimulaba el crecimiento no por que fuera inefectiva sino porque otros aminoácidos que contenía el medio antagonizaban la utilización de la alanina u otros péptidos.

Una cosa parecido observó Kihara (**Payne 1976**) con *Enterococcus faecalis*, en medios ricos en vitamina B₆ (induce la formación de tiroxina descarboxilasa), los péptidos de tiroxina estimulan el crecimiento mucho mejor que la tiroxina libre a pesar de que ambos son nutricionalmente equivalentes en un medios pobre en tiroxina.

Mas tarde, Prescott (**Payne 1976**) demostró la relación entre hidrolizado de proteínas y estimulación del crecimiento o lo que es lo mismo actividad estropogenina. En un medio basal con péptidos de serina o con péptidos de histidina, estos estimulan el crecimiento. Sin embargo, si el medio contiene un exceso de serina libre, solo el medio con péptidos de histidina tienen actividad estropogenina y viceversa, si

el medio tiene un exceso de histidina libre solo los péptidos de serina estimulan el crecimiento.

Por lo tanto la actividad estropogenina de un péptido depende de la composición del medio de cultivo. Esta conclusión fue confirmada por Kihara y Snell (**Guirard and Snell 1962**) que demostraron que el medio base usado por Pollack y Lindner era limitante en varios aminoácidos (glutamato, cisterna y serina). La incorporación al medio de los péptidos que los contengan, permite eliminar los requerimientos de estrepogenina.

Por consiguiente, el requerimiento de un microorganismo para un péptido particular está causado por la disponibilidad limitada de más de un aminoácido libre resultado de un múltiple desequilibrio del medio de cultivo. Por lo tanto, la actividad estrepogenina de un péptido se considerará ventajosa cuando este aporte los aminoácidos limitantes del crecimiento de manera más efectiva que la mezcla de aminoácidos libres. Esto indica que los péptidos que poseen actividad estrepogenina no juegan un importante papel en el metabolismo bacteriano como pensaba Woolley sino que son una adecuada fuente de aminoácidos limitantes (**Guirard and Snell 1962; Payne 1976**).

I.5. ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROLIZADOS PROTEICOS

I.5.1. MÉTODOS CLÁSICOS DE ANALISIS DE PEPTONAS

El análisis completo de un hidrolizado proteico es difícil debido a la naturaleza heterogénea de sus componentes. La digestión enzimática no conlleva a una hidrólisis total de las proteínas en aminoácidos sino que se obtiene hidrolizados parciales que contienen polipéptidos de una longitud de cadena variable que según su peso molecular se dividen en proteasas (> 6000 Da) que pueden ser primarias o secundarias, peptonas (250-5000 Da), péptidos (< 250) y aminoácidos. Por lo tanto, que a un hidrolizado se le llame “peptonas” o “proteasas peptonas” dependerá de la proporción que tenga de polipéptidos largos (> 6000 Da).

La determinación del contenido en nitrógeno o lo que es lo mismo el contenido en proteína de proteasas (primarias y secundarias), peptonas y aminoácidos se puede realizar mediante diferentes métodos (método de Biuret, método de Lowry, método de Kjeldahl, métodos espectrofotométricos en la región U.V.), junto con la determinación del nitrógeno amínico (método modificado de Sorensen) y un análisis de los aminoácidos nos permite caracterizar parcialmente a dicho hidrolizado. Dependiendo del sustrato proteico, del enzima, de la proporción enzima/sustrato y del tiempo de hidrólisis usado, los componentes del hidrolizado se encontrarán en diferentes relaciones cualitativas y cuantitativas (**Briston and Brecker 1970; Bridson 1978; Bridson 1998**).

Por consiguiente, en el análisis clásico de un hidrolizado se determinan los siguientes parámetros (**Bridson and Brecker 1970**):

- **Nitrógeno total:** Se determina el contenido de nitrógeno por cualquiera de los métodos que se describen más adelante aunque lo habitual es utilizar el método de Kjeldahl.

- **Nitrógeno total proteosa:** Se precipita una solución de peptona (2% w/w) por saturación con sulfato de zinc. El precipitado es filtrado y lavado varias veces con sulfato de zinc a saturación para eliminar el nitrógeno no proteico. El material insoluble se solubiliza y se determina el contenido en nitrógeno.

- **Nitrógeno proteosa primaria:** La peptona se precipita con la mitad de sulfato de zinc a saturación. Es decir, volúmenes iguales de solución peptona se mezclan sulfato de zinc a saturación, posteriormente dicha solución se deja toda la noche a temperatura ambiente. El precipitado se centrifuga y se lava varias veces con sulfato de zinc a saturación igual que antes. El precipitado se solubiliza y se determina el nitrógeno. El Nitrógeno proteosa secundaria se obtiene por diferencia aritmética entre el nitrógeno total de la proteasa y el nitrógeno de la proteasa primaria.

- **Nitrógeno peptona:** Se mezcla inicialmente a partes iguales una solución fría de al 20% con una solución de peptona (un exceso ácido tánico puede disolver el complejo ácido tánico-proteína). Para mejorar la precipitación se guarda la solución 4 °C 30 minutos, seguidamente se centrifuga y se lava dos veces con una solución de ácido tánico 5%.

- **Nitrógeno aminoácido libre:** Un solución de peptona 2% se precipita lentamente y en agitación con una solución acuosa de ácido fosfo-tungstico 5%. La disolución se deja a temperatura ambiente 30 min. Se filtra por tierra diatomeas y se lava con una solución de fosfo-tungstico 1%.

- **Amoniaco libre:** Se alcaliniza la solución de peptona y el amoniaco liberado se bloquea con ácido bórico, determinándose posteriormente por titulación.

- **Nitrógeno amínico:** Es el valor más significativo desde el punto de vista nutricional ya que mide el incremento de grupos amino libre. Se determina por el método de Sorensen o titulación con formol, consiste en añadir a una solución de peptona un exceso de formaldehído 40% que va a reaccionar con los grupo amino de los polipéptidos y aminoácidos produciendo un incremento de acidez el cual es titulado con una solución de álcali.

Por lo tanto el **grado de hidrólisis** (D_H) que se define como la razón entre nitrógeno amínico (n° de enlaces peptídicos hidrolizados) y nitrógeno total (n° total de enlaces peptidicos) expresado en tanto por ciento, nos permite el seguimiento, control y caracterización de la hidrólisis de un tejido. A partir del grado de hidrólisis se puede conocer la longitud aproximada de las cadenas de aminoácido de cualquier hidrolizado (ej: Hidrolizado ácido de caseína $D_H = 22\%$, si $100/22 = 4.55$ es la longitud media de las cadenas de aminoácido en dicho hidrolizado) (**Oxoid manual 1998**).

Los métodos para determinar el nitrógeno proteico son los siguientes:

El **método de Biuret (Hung 1984)** consiste en una reacción coloreada específica de las proteínas y péptidos utilizada para establecer el contenido en nitrógeno total de un hidrolizado. El reactivo de Biuret es una solución de sulfato de cobre y NaOH, esta solución alcalina cuando se adiciona a una solución proteica el cobre (Cu) reacciona con los enlaces peptídicos (CO-NH) de las proteínas dando lugar a un complejo de color violeta (Biuret) cuyo máximo de absorción de 540-560 nm, a partir del cual se puede calcular el contenido en proteínas. Con este método se puede determinar un contenido en nitrógeno entre 1-6 mg/ml.

Una alternativa al método anterior es el **método del ácido bicinchonínico**, en este caso el complejo proteína-cobre reacciona con el ácido bicinchonínico dando un color morado con un máximo de absorción a 562 nm. La sensibilidad en este caso es 0.1-1.2 proteína/ml (**Hung 1984**).

Otro método utilizado son los **colorantes orgánicos**, que en condiciones apropiadas reaccionan con los grupos ácidos y básicos de las proteínas formando precipitados coloreados (**Hung et al 1984**).

Este sistema se hizo popular gracias a Bradford, este utilizó como colorante Azul brillante Coomassie G-250. La unión del colorante con la proteína causa un cambio en el máximo de absorción del colorante de 465 nm (rojo) a 595 nm (azul). El proceso es muy sensible, con un rango de detección de 0.2-1.4 mg de proteína/ml.

El **método de Lowry** aumenta la sensibilidad de la reacción de Biuret ya que el complejo proteína-Cu se hace reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu, dando una coloración azul, con un máximo de absorción a 650 nm. Esta coloración se atribuye a la reducción del ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico a azul de heteropolimolibdeno de composición no definida, por medio de los residuos tirosilos, triptofanilos, y en menor grado, cisteinilos e histidilos de las proteínas que forman el complejo con el Cu^{2+} . En este caso el rango de sensibilidad es 0.1-1 mg/ml (**Hung et al 1984**).

El **método de Kjeldahl-Arnold-Gunning (A.O.A.C. 1995)** consiste en la determinación del contenido en nitrógeno de sustancias orgánicas e inorgánicas. Este método se puede resumir en tres etapas:

- **Digestión:** Descomponer el nitrógeno de la muestra utilizando una solución ácida concentrada. Esto se consigue hirviendo la muestra homogénea con ácido sulfúrico concentrado obteniendo como resultado final una solución de sulfato amónico.

- **Destilación:** Se añade un exceso de base (NaOH) a la solución anterior convirtiendo el $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ en NH_3 , se hierve y el gas de NH_3 se condensa en una solución ácida standard (HCl, H_2SO_4) o una solución de ácido bórico (H_3BO_3) de captura.

- **Titulación:** Se cuantifica la cantidad de amoníaco en esa solución.

Si lo que queremos es determinar el % de proteína debemos multiplicar el % de nitrógeno por un factor que dependerá de la fuente proteica utilizada y que viene determinado por la Association of Official Analytical Chemists Internacional (AOAC) (Leche → 6.38; Carne → 6.25; Arroz → 5.95; Trigo → 5.70).

Esta medidas junto con otros datos obtenidos como son las cenizas residuales, contenido en cloruros, fósforo, humedad, pH, contenido en metal, contenido en lípidos, etc., se puede caracterizar una peptona aunque la proporción de polipéptidos, péptidos y aminoácidos no se conozca (**Bridson and Brecker 1970; Bridson 1978**).

Además de los análisis químicos, las peptonas son sometidas también a revisiones bacteriológicas.

Los test biológicos son llevados a cabo para detectar:

- Ausencia de actividad inhibitoria
- Promoción de crecimiento
- Reactividad, por ejemplo, ausencia de carbohidratos fermentables, producción de indol por microorganismos formadores de triptofanasa, producción de sulfhídrico.

Para la evaluación microbiológica se debe seleccionar microorganismos controles que sean positivos a los tests específicos. Suele utilizarse una solución de hidrolizado 1-2% ajustado a un pH determinado, esterilizada, inoculada e incubada de acuerdo con el proceso standard del test a realizar.

Los resultados de los análisis biológicos son comparados con los resultados del análisis químico teniendo en cuenta que los primeros tienen prioridad sobre los segundos, es decir, si el análisis biológico es inaceptable o aceptable el hidrolizado es rechazado o aceptado respectivamente independientemente de los resultados del análisis químico.

El análisis típico de la proteosa peptona N° 3 (Difco 1998) se muestra en I.5.1.Tabla 1:

| ANÁLISIS TÍPICO | | | |
|------------------------------------|-------|-------------------|----------------------|
| Características físicas | | | |
| Cenizas (%) | | 10.5 | |
| Claridad, 1% solución (NTU) | | 2.2 | |
| P. Seco (%) | | 4.0 | |
| Filtrabilidad (g/cm ²) | | 0.5 | |
| pH (1% solución) | | 7.2 | |
| Carbohidratos (%) | | | |
| Total | | 1.4 | |
| Contenido en Nitrógeno (%) | | | |
| Nitrógeno Total (NT) | | 13.2 | (Método de Kjeldahl) |
| Nitrógeno amínico (NA) | | 3.5 | (Método de Sorensen) |
| NA/NT | | 26.5 | |
| Inorgánicos (%) | | | |
| Calcio | 0.023 | Hierro | 0.002 |
| Zinc | 0.007 | Zinc | 0.007 |
| Magnesio | 0.027 | Sulfuro | 0.975 |
| Potasio | 0.982 | Plomo | <0.001 |
| Sodio | 3.815 | Manganeso | <0.001 |
| Cloro | 3.581 | Estaño | <0.001 |
| Sulfato | 0.975 | Cobre | <0.001 |
| Fosfato | 1.47 | Cobalto | <0.001 |
| Aminoácidos (%) | | | |
| Alanina | 5.99 | Arginina | 5.49 |
| Ácido aspártico | 6.92 | Cistina | 1.12 |
| Ácido glutámico | 12.38 | Glicina | 9.26 |
| Histidina | 1.74 | Isoleucina | 2.65 |
| Leucina | 5.70 | Lisina | 5.02 |
| Metionina | 1.86 | Fenilalanina | 2.72 |
| Prolina | 4.94 | Serina | 3.65 |
| Treonina | 3.32 | Triptófano | 0.59 |
| Tiroxina | 1.99 | Valina | 3.62 |
| Vitaminas (µg/g) | | | |
| Biotina | 0.4 | PABA | <0.5 |
| Cloruro de Clonina | 37000 | Ácido pantoténico | 20.0 |
| Cianocobalamina | <0.1 | Piridoxina | 1.3 |
| Ácido Fólico | 0.3 | Riboflavina | 6.8 |
| Inositol | 89000 | Tiamina | 0.1 |
| Ácido nicotínico | 124.2 | Timidina | 659.6 |

I.5.1. Tabla 1.

I.5.2. MÉTODOS MODERNOS DE ANÁLISIS DE PEPTONAS

La distribución molecular de los péptidos de un hidrolizado es útil para establecer el índice de hidrólisis de un determinado hidrolizado, este perfil de distribución se puede obtener utilizando métodos cromatográficos o electroforéticos (**Carr 2002**).

A finales de los 60, Ziska (**Ziska 1967**) describió un método de fraccionamiento de peptonas basado en las propiedades del gel filtración como se describe en el apartado I.5.3 utilizando una columna (144 x 2.2 cm) de Sephadex G25 y usando como eluyente ácido acético 0.2 M. El peso molecular (PM) que obtuvo tras el fraccionamiento le permitió dividir las peptonas en dos grupos:

- Peptonas con > 30% péptidos 1500-5000 Da

- Peptonas con > 45% péptidos 250-1000 Da

Otros métodos de fraccionamiento de peptonas utilizados han sido la cromatografía en papel, la cromatografía bidimensional y la electroforesis de alto voltaje (**Bridson 1978; Bridson 1998**).

La cromatografía en gel con columnas de Sephadex y la electroforesis en gel han sido las técnicas más utilizadas para la caracterización de hidrolizados y proteínas a pesar de las limitaciones de esta última técnica para separar péptidos de bajo peso molecular (**Carr 2002**).

I.5.3. CROMATOGRAFÍA GEL FILTRACIÓN

La cromatografía gel filtración es una forma de cromatografía de partición utilizada en gran medida para la separación de moléculas en base a sus diferentes pesos moleculares. De una manera ideal en gel filtración, solo los efectos estéricos contribuyen al comportamiento de elución de las moléculas de soluto. Las moléculas grandes nunca penetran en la fase estacionaria, por lo que su desplazamiento a través de la columna es rápido siendo las primeras que eluyen. Mientras que las moléculas intermedias o pequeñas, si pueden atravesar los poros del gel, siendo su movimiento más lento. Por lo tanto las moléculas en gel filtración fluyen en orden decreciente según su tamaño molecular (**Gel filtración 1997**).

El comportamiento del soluto en gel filtración es típicamente expresado mediante los diaGramas de elución. De manera que a partir de estos podemos obtener el volumen de elución (V_e) de un soluto, volumen de disolvente entre el punto de inyección y el pico máximo de un soluto. Este es muy utilizado para caracterizar el comportamiento de las moléculas de soluto en el gel. En el caso de moléculas grandes que son excluidas de la fase estacionaria, el volumen de elución es igual al volumen de exclusión (V_0) que es el volumen de la fase móvil. El V_e de una molécula particular es dependiente de la fracción de fase estacionaria disponible para difundir, esto viene representado por la constante de distribución K_d que representa la fracción de fase estacionaria que esta libre para que las moléculas de soluto difundan.

Por lo tanto V_e de un soluto es igual a:

$$V_e (\text{solute}) = V_0 + K_d \times (V_s)$$

V_s representa el volumen de solvente dentro de la fase estacionaria, este valor es difícil de obtener por lo que es sustituido por $V_t - V_0$ donde V_t representa el volumen total de partículas y se puede medir determinando el V_e de una molécula pequeña como la acetona.

$$K_d = K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$$

K_{av} no es un verdadero coeficiente de distribución, sin embargo, es directamente proporcional a K_d y es independiente de la naturaleza del soluto y de su concentración (**Preneta 1989**).

El objetivo en gel filtración es obtener la mayor resolución posible de las moléculas de soluto. Por tanto, la elección de la columna así como el flujo de elución son muy importante en gel filtración, cuanto mayor sea la columna y menor el flujo mayor será la resolución. El principal inconveniente es el tiempo de separación y la dilución de la muestra. Columnas de una longitud de 100 cm y un diámetro de 1-2.5 cm son las más utilizadas.

La cromatografía gel filtración no se utiliza como primer paso en la purificación de proteínas debido a su baja capacidad, pero es frecuentemente usada como uno de los pasos finales o para evaluar la pureza de una preparación. Otras aplicaciones de la cromatografía en gel filtración en los laboratorios y en la industria, es su utilización para el fraccionamiento y separación de moléculas, determinación de peso moleculares y polímeros, determinación de constantes de equilibrio, separación de células y partículas, etc. (**Gel filtración 1997**).

I.5.3.1. Matriz (Gel Filtración)

Un gel es un sistema heterogéneo en el cual una fase líquida continua, usualmente agua, esta contenida dentro de los poros de una fase estacionaria. El material ideal de la matriz en gel filtración debe ser inerte con respecto a las moléculas que queremos separar. Sin embargo pueden ocurrir interacciones del material empaquetado con las moléculas biológicas con lo cual la molécula eluiría más tarde de lo que se esperaría por su peso molecular. Otras interacciones de naturaleza iónica pueden ser eliminadas incrementando la fuerza iónica del buffer utilizado.

La matriz o gel más utilizado esta formado por enlaces cruzados de poliacrilamida con agarosa, dextrano o combinaciones de estos. Una de los primeros geles utilizados en análisis de peptonas fue Sephadex (Farmacia), cuya matriz esta formada por conexiones cruzadas de dextrano y epíclorohidrina. El gran número de grupos hidroxilo que presenta hace que sea una matriz extremadamente hidrófila. Los diferentes G-tipos de Sephadex (G10, G15, G25, G50 etc.) se diferencian en el grado de conexiones cruzadas, en su capacidad de hinchamiento lo cual conlleva a obtener un grado de fraccionamiento diferente según el G-tipo utilizado. Sephadex G-25 tiene un rango de fraccionamiento que va desde 1000 a 5000 Da (**Gel filtración 1997**).

Existen diferentes geles en el mercado según el rango de fraccionamiento, la resolución (partículas pequeñas (calidad fine y superfine) normalmente mejoran la resolución porque las moléculas difunden lentamente) y la estabilidad (pH, temperatura y disolvente orgánico). En la tabla (I.5.3.1. **Tabla 1**) se incluyen los geles comerciales más utilizados:

| Gel | Matrix | Rango de fraccionamiento |
|------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| Sephadex (Pharmacia) | Dextrano/epiclorohidrina | 700-250.000 Da |
| Superdex (Pharmacia) | Agarosa/dextrano | 3.000-600.000 Da |
| Sephacryl (Pharmacia) | Dextrano/Bisacrilamida | 1.000-8x10 ⁶ Da |
| Sepharose (Pharmacia) | Agarosa | 10.000-4x10 ⁷ Da |
| Sepharose CL (Pharmacia) | Agarosa/Dibromopropanol | |
| Ultrogel A (Ciphergen) | Agarosa | 10.000-1x10 ⁷ Da |
| Biogel A (Bio-Rad) | Agarosa | 50.000-1x10 ⁷ Da |
| Biogel P (Bio-Rad) | Poliacrilamida | 100-500.000 Da |

I.5.3.1. **Tabla 1.** Tipos de matrices en gel filtración

I.5.3.2. Eluyentes (Gel Filtración)

La composición del eluyente no es importante en los mecanismos de separación con lo cual se puede utilizar cualquiera siempre que no existan interacciones entre la muestra y la matriz del gel. El más utilizado es el agua junto con un buffer (fosfato sódico, cloruro sódico, bicarbonato amónico, etc.) que controle el pH y la fuerza iónica para eliminar las interacciones de naturaleza iónica no específica entre la matriz del gel y las moléculas a separar.

También se puede utilizar otros eluyentes como disolventes orgánicos polares como el acetonitrilo (20-30%) con TFA (0.1%) o el ácido fórmico al 70% si existen interacciones de naturaleza muy hidrofóbica y además queremos liofilizar o evaporar la muestra (**Gel filtración 1997**).

Algunas proteínas demuestran comportamiento anómalo en gel filtración. Generalmente las proteínas largas y delgadas eluyen antes que las proteínas globulares del mismo tamaño. Agentes desnaturalizantes como la urea o el clorhidrato de guanidina, que en cromatografía se utiliza como agente caotrópico, minimizan los efectos de la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas por transformación al azar de la configuración en espiral y por tanto permite una correcta evaluación de su peso molecular (**Walker 2002**).

I.5.4. CROMATOGRAFÍA EN FASE REVERSA

La cromatografía de adsorción o fase reversa es una técnica reciente, muy utilizada para la separación, purificación, y análisis de péptidos, proteínas y digestos enzimáticos ya que presenta una alta resolución capaz de separar polipéptidos que se diferencian solo en un aminoácido. Este tipo de cromatografía esta basada en las interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de soluto y los ligandos n-alkil hidrocarburos o aromáticos que están inmovilizados sobre la matriz de la columna. Estas interacciones que ocurren entre ambas fases, va a depender de las propiedades de la matriz, de la hidrofobicidad del soluto, de la composición de la fase móvil y la temperatura (**Reversed Phase Chromatography 1996**).

En la cromatografía en fase reversa de manera general se utiliza elución en gradiente. Inicialmente, las condiciones de la cromatografía son diseñadas para favorecer la adsorción de las moléculas de soluto presentes en la fase móvil sobre la fase estacionaria.

Posteriormente, la composición de la fase móvil es modificada favoreciendo la desorción del soluto de la fase estacionaria a la fase móvil. La desorción y elución en cromatografía en fase reversa viene determinado por la fase móvil, que contiene disolventes orgánicos que reducen su polaridad y contraiones que bajan el pH de elución e incrementan la hidrofobicidad de los solutos. La polaridad de la fase móvil inicialmente debe de ser alta favoreciendo la adsorción para luego ir disminuyendo a medida que se va realizando el gradiente de elución y favoreciendo la desorción (**Reversed Phase Chromatography 1996**)

I.5.4.1. Matriz (Fase Reversa)

Los principales parámetros del gel en fase reversa son la composición química de la matriz, tamaño de partícula, el tipo de ligando inmovilizado y el tamaño de poro de partícula.

Existen diferentes columnas utilizadas en fase reversa como se muestran en la tabla (**I.5.4.1. Tabla 1**), que se pueden dividir según sea la base de la matriz en 2 tipos; matriz de sílica o matriz polimérica. La matriz de sílica fue el primer polímero usado es químicamente estable a bajo pH y tiene un tamaño de partícula que va $<5 \mu\text{m}$ a casi $30 \mu\text{m}$ con un tamaño de poro de $50\text{-}100 \text{ \AA}$ o 300 \AA . Dentro de las matrices poliméricas la más utilizada es de poliestireno/divinilbenceno. Normalmente a la superficie de la matriz suelen unirse ligandos de tipo n-alkil hidrocarburos lineales (Octil- u Octadecil-) cuya longitud (2, 8, 18 carbonos) es proporcional a la hidrofobicidad de la matriz y por lo tanto aumentan la selectividad de la columna. El inconveniente de las matrices de sílica es que se inestabilizan a pH alcalinos mientras que las matrices poliméricas pueden utilizarse en rangos de pH 1-12, en cambio, tiene el inconveniente que forman matrices robustas (**Reversed Phase Chromatography 1996**).

| Nombre comercial | Matriz/ligando | Tamaño de partícula |
|---|-----------------------------|-----------------------------------|
| SPHERISORB[®] (DS Water) | Silica /Octadecilsulfónico | 5 μm |
| SOURCETH (Pharmacia Biotech) | Poliestireno/divinilbenceno | 15 μm |
| VYDAC[®] (Grade & Co) | Silica/Octadecil- | 5 μm -25 μm |

I.5.4.1. Tabla 1. Columnas comerciales en fase reversa

I.5.4.2. Eluyentes (Fase Reversa)

La elución de polipéptidos en cromatografía en fase reversa se logra usando elución en gradiente. Inicialmente se utiliza como eluyente una fase móvil acuosa (A) con baja concentración en disolvente orgánico y posteriormente se utiliza un gradiente de disolvente orgánico como fase móvil (B) para disminuir la polaridad y favorecer la desorción permitiendo controlar el tiempo de retención de las moléculas de la muestra. Los disolventes orgánicos más utilizados son el acetonitrilo y el metanol, aunque el isopropanol también se utiliza está limitado por su viscosidad. Son disolventes transparentes al ultravioleta-visible (UV) aunque el acetonitrilo absorbe a longitudes de onda bajas. El inconveniente principal del acetonitrilo es su capacidad de desnaturalizar las proteínas. Otra manera de controlar el tiempo de retención es incorporando contraiones que conducen a un incremento de la hidrofobicidad, el más utilizado son el ácido trifluoroacético y ácido pentafluorobutírico a rango 0.01%-0.1%, son volátiles, permiten que las proteínas sean solubles en el disolvente orgánico y estabilizan las columnas de sílice al disminuir el

pH. El inconveniente de trabajar a pH ácido es que algunos polipéptidos se desnaturalizan (**Reversed Phase Chromatography 1996**).

I.5.5. AFINIDAD A LECTINAS

Las lectinas constituyen un interesante grupo de proteínas unidas a carbohidratos que son producidas por hongos, plantas y animales. Las lectinas fueron originalmente reconocidas por su habilidad de aglutinar diferentes tipos de eritrocitos humanos ya que se unen a receptores específicos de la superficie, razón por la cual son llamadas aglutininas (**Debray 1995**).

Las lectinas están compuestas de una o más subunidades formando un estructura tetramérica. Si las subunidades son idénticas la lectina tiene múltiples zonas de unión a un monosacárido específico. Sin embargo, si presenta dos subunidades funcionalmente distintas puede unirse a dos o más monosacáridos diferentes. Cada lectina se une de forma específica y reversible (no covalente) a ciertas secuencias de azúcares en oligosacáridos y glucoconjugados. Las interacciones de las lectinas con el grupo glicano son complejas, poco conocidas y se ven afectadas por cambios estructurales en la zona de unión. Las lectinas se clasifican en grupos específicos de acuerdo al monosacárido u oligosacárido que es más efectivo inhibidor de la hemaglutinación o según el polisacárido o glicoproteína que precipitan. En la tabla (**I.5.5. Tabla 1**) se presentan algunas lectinas utilizadas comúnmente de acuerdo con su monosacárido específico (**Debray 1995; Spik 1995; Walker 2002**).

Una aplicación muy utilizada de las lectinas es el fraccionamiento o purificación de glicoproteínas, glicopéptidos u oligosacáridos por cromatografía de afinidad en gel de agarosa y posterior detección por electroforesis en gel de poliacrilamida (**Debray 1995; Spik 1995**).

| Lectina | Azúcar específico |
|---|--|
| Concanavalina A (<i>Lens culinaris</i>) | α -D-manosa α -D-glucosa |
| Jacalina (<i>Artocarpus integrifolia</i>) Lectina de <i>Arachis hypogaea</i> Lectina de <i>Ricinus communis</i> Lectina de <i>Glycine max</i> | β -D-galactosa N-acetil- β -D-galactosamina |
| Lectina de <i>Triticum vulgare</i> | N-acetil- β -D-glucosamina N-acetilneurámínico |
| Lectina de <i>Griffonia simplicifolia</i> Lectina de <i>Dolichos biflorus</i> | α -D-galactosa N-acetil- α -D-galactosamina |
| Lectina de <i>Lotus tetragonolobus</i> | α -L-fucose |
| Lectina de <i>Limulus polyphemus</i> | Ácido α -N-acetilneuramínico |

I.5.5. Tabla 1. Clasificación de Lectinas

La cromatografía de afinidad de lectina, combina simplicidad con una alta resolución y se basa en la capacidad de la lectina de unirse a un monosacárido específico de forma reversible. Básicamente, consiste en inmovilizar la lectina en una matriz insoluble (sepharosa 4B, agarosa o ultragel).

El método más utilizado consiste en asociar la lectina a agarosa activada con CNBr. El proceso consiste en lavar la agarosa con agua destilada fría y transferirla a un recipiente enfriado en una bañera de hielo. Seguidamente se mezcla la agarosa con una solución helada de carbonato potásico. La activación se produce al añadir una solución de CNBr-Acetonitrilo. Una vez activada la agarosa se transfiere a un recipiente y se añade la solución de lectina (0.25 g de lectina disuelta en

0.5 M NaCl, 0.2 M NaHCO₃, 0.2 M monosacárido a fin a la lectina, pH 8.5).

Toda la mezcla se almacena a 4 °C 24h, a continuación la mezcla se filtra y se lava varias veces con agua destilada y una solución de NaHCO₃ 0.2 M (**Debray 1995**).

Por ultimo, los grupos iminocarbono que no han reaccionado son bloqueados con una solución de glicina 1M. Para terminar se vuelve a filtrar, se lava el gel con agua destilada fría y se equilibra con un buffer de azida sódica al 0.02% como conservante.

Posteriormente se equilibra dicha matrix con un buffer de equilibrado a temperatura ambiente que debe incluir un metal divalente (MnCl₂, CaCl₂ o MgCl₂) apropiado para que la unión de la lectina con el carbohidrato sea eficiente ya que este provoca una transformación de la estructura tridimensional de la misma favoreciendo la unión lectina-azúcar (**Debray 1995**). Una vez inyectada la muestra y realizada la cromatografía nos encontramos con cuatro perfiles de elución (**Walker 2002**):

- Elución de oligosacáridos u oligopéptidos con el volumen de exclusión de la columna lo que refleja que no ha existido interacción entre la lectina inmovilizada y el carbohidrato.
- Otros sacáridos interaccionan débilmente con la lectina inmovilizada y son eluidos de la columna con el buffer de equilibrado.
- Un perfil de elución definido, obtenido con el buffer que contiene la solución de azúcar o análogo por el cual la lectina tiene afinidad (melobiosa, metil α -D-manósido), desplazando al oligosacárido o al oligopéptido por competitividad.
- Por último, un perfil de unión muy fuerte, caracterizado por un ancho pico que contiene el monosacárido competitivo

Las lectinas utilizadas habitualmente en cromatografía de afinidad son la concanavalina A (Con A), la jacalina, la lectina de *Arachis hypogaea* y la lectina *Triticum vulgare*. La utilización de una u otra lectina va a depender del glicoconjugado a separar:

- N-glicosilproteína utilizaremos concanavalina A
- O-glicosilproteína utilizaremos jabalina, lectina de *Arachis hypogaea* y lectina *Triticum vulgare*

Y de la especificidad de la lectina, la concanavalina A tiene afinidad por la α -D-manosa y α -D-glucosa, la jacalina y *Arachis hypogaea* la tienen por el galactosil (β -1,3) N-acetilgalactosamina) y la lectina *Triticum vulgare* N-acetil- β -D-glucosamina (**Debray 1995; Spik 1995**).

I.6. GENERALIDADES DE *Streptococcus agalactiae*

I.6.1. ASPECTOS GENERALES DE *Streptococcus agalactiae*

I.6.1.1. Nomenclatura

El término “*Estreptococo* grupo B” se emplea para designar a *Streptococcus agalactiae* o EGB (grupo B de Lancefield), una especie bacteriana perteneciente al género *Streptococcus*. La denominación de especie fue dada por Lehmann y Neuman en 1896 y desde 1954 es la aceptada oficialmente (**Hardie 1986**), desapareciendo otros sinónimos que hasta entonces habían venido utilizándose como *Streptococcus nocardii*, *Streptococcus mastitis contagioseae*, *Streptococcus mastitis sporadicae*, *Streptococcus agalactiae contagiosae*, *Streptococcus mastitidis*. (**Jelinkova and Motlova 1985**).

Indicar que el termino *Streptococcus agalactiae* y las siglas EGB se utilizaran indistintamente a lo largo de este trabajo.

I.6.2. PAPEL PATÓGENO

I.6.2.1. Infección en el adulto

I.6.2.1.1. Infecciones no relacionadas con el embarazo

Las infecciones por EGB ocurren generalmente en adultos con patología predisponente: infección por VIH, diabetes mellitus, hepatopatía crónica, insuficiencia renal crónica, y pacientes inmunocomprometidos en general. En estos individuos EGB esta implicado en bacteriemias, neumonías, artritis, osteomielitis, infecciones en piel y tejidos blandos, meningitis e infecciones de vías urinarias (**Bayer et al 1976; Lerner 1977; Verghese et al 1986; Bey et al 1992; Wood and Edwards 1994; Colford et al 1995; Domingo et al 1997; Schuchat 1998**).

I.6.2.1.2. Infecciones obstétricas

En mujeres embarazadas EGB puede producir bacteriemia posparto o postaborto, endometritis, corioamnionitis, infecciones asociadas a cesáreas e infecciones del tracto urinario (**Baker 1980; Pass et al 1982; Yancey et al 1994; Bosch et al 1995**).

Durante el embarazo la frecuencia de infecciones del tracto urinario por EGB parece ser más alta y se ha asociado a mayor incidencia de parto prematuro, rotura prematura de membrana y aborto (**Wood and Dillon 1981; Moller et al 1984**).

I.6.2.2. Infección neonatal

I. 6.2.2.1. Transmisión al recién nacido

El principal nicho ecológico del EGB en el hombre es el tracto gastrointestinal distal desde donde pasa a colonizar la vagina (**Dillon et al 1982**). La tasa de colonización es similar en hombre y mujeres (**Bliss et al 2002**) y varía según la técnica de cultivo, lugar anatómico estudiado, edad, prácticas sexuales y grupo étnicos oscilando entre el 5-40% (**Anthony 1985, Regan et al 1991**). En España la tasa de colonización en embarazadas se sitúa entre el 11-18% (**Andreu et al 1987; Cueto et al 1998; Mazón et al 2000**).

La colonización es intermitente y cultivos con anterioridad a 5 semanas no son fiables para predecir el estado de portador (**Yancey et al 1996**).

La transmisión de la madre al recién nacido sucede principalmente al comienzo del parto o tras la rotura de membrana. La frecuencia de colonización en los recién nacidos de madres colonizadas es del orden del 50% (**Baker and Barret 1973; Pass et al 1979**) y una alta intensidad de colonización de la madre incrementa la frecuencia de transmisión

(**Ancona et al 1980**). Entre 1-2% de los recién nacidos de las madres colonizadas desarrollaran infección por EGB (en ausencia de prevención) (**Boyer et al 1983**).

Actualmente se considera que no ocurre transmisión madre-recién nacido en las cesáreas programadas si no se ha iniciado el trabajo del parto o no hay rotura de membrana (**Schrag et al 2002**).

Además de la transmisión intraparto el recién nacido puede colonizarse durante su estancia posparto en el hospital o incluso después de la salida de este aunque esta transmisión no parece ser frecuente (**Edwards and Baker 2001**).

I.6.2.2. Infección neonatal precoz

Aproximadamente el 80% de las infecciones en niños ocurren en el primer día de vida (**Schuchat 1998**). Se incluyen las infecciones adquiridas in útero y aquellas que se presentan hasta los siete días del nacimiento. La incidencia de enfermedad es de 0,7-3,7 por cada mil niños nacidos año siendo mayor esta incidencia en niños con bajo peso al nacer (**Pass et al 1979; Dillon et al 1987**).

Los signos y síntomas que se presentan generalmente son de compromiso respiratorio indistinguibles del síndrome de distrés respiratorio idiopático. Las principales manifestaciones clínicas son: bacteriemia, neumonía y meningitis, situándose la tasa de mortalidad entre el 5-20%, siendo mayor en niños inmaduros y en los que presentan síntomas en el momento del nacimiento (**Schuchat 1990; Yagupsky et al 1991; Weisman et al 1992; Baker 1997**).

Los factores de riesgo asociados a este tipo de infección son parto pretérmino con inmadurez y bajo peso, embarazo gemelar, elevada colonización materna, rotura prolongada de membranas, fiebre intraparto y carencia de anticuerpos tipo-específicos (**Baker and Barrett 1973; Franciosi et al 1973; Pass 1980; Fischer et al 1983**).

I.6.2.2.3. Infección neonatal tardía

Principalmente afecta a niños nacidos a término entre 7 días y 3 meses de edad, con una media de comienzo de 24 días y una incidencia de 0,5-1,8 por cada mil nacidos año (**Baker 1997; Schuchat 1998**).

Alrededor del 50% de las madres de niños con infección neonatal tardía son portadoras del mismo serotipo causante de la infección en sus hijos. En el resto la fuente de la infección no está clara pudiendo tener origen nosocomial o en la comunidad, aunque los factores de riesgo no son conocidos (**Schuchat 1998**). En aquellos niños con infección tardía cuyas madres tienen el mismo serotipo, el mecanismo preciso de transmisión aparente de madre-hijo tampoco está claro (**Schuchat 1998**). Entre los antecedentes maternos no suele encontrarse complicaciones obstétricas por EGB (**Ferrieri 1985b**).

La mortalidad es significativamente menor que la enfermedad precoz. La manifestación clínica más frecuente es la meningitis purulenta con o sin bacteriemia detectable. Conforme la edad de presentación es mayor, la infección tiende a manifestarse como un cuadro localizado en órganos diana determinados como sistema nervioso central, hueso y articulaciones (**Howard and McCracken 1974; Baker 1997; Edward and Baker 2002**).

I.6.2.2.4. Prevención de infección neonatal por *Streptococcus agalactiae*

La utilización de quimioprofilaxis para prevenir la infección neonatal precoz por EGB fue sugerida en los años setenta (**Franciosi 1973**). Posteriormente se demostró que la administración de ampicilina I.V. desde el momento del ingreso hospitalario para dar a luz hasta el final del parto interrumpía la transmisión de EGB al recién nacido (**Boyer et al 1983; Lim et al 1986**).

Pocos años más tarde se documentó que la profilaxis con ampicilina intraparto además de reducir la transmisión, protegía al recién nacido de la infección neonatal precoz (**Boyer et al 1986; CDC 1996; Schrang et al 2002; SEGO 2003**).

Respecto a la duración de la profilaxis frente a la infección de EGB, la práctica admitida es que debe ser de un mínimo de 4 horas con penicilina (5 mU IV dosis inicial continuada con 2.5 mU IV cada 4 horas hasta el final del parto) ya que se conoce que la transmisión se interrumpe cuando la duración es de más de 2 horas (**Cueto et al 1998**) señalar que menos de 1 hora no es efectiva (**Boyer et al 1983**).

La administración intraparto de antibióticos no parece alterar el curso ni retrasar la aparición de síntomas en el recién nacido infectado intrauterino (**Bromberger et al 2000**).

I.6.3. BACTERIOLOGÍA DE *Streptococcus agalactiae*

I.6.3.1. Características morfológicas y bioquímicas de *Streptococcus agalactiae*

EGB son cocos Gram positivos, de 0.6-1.2 μm diámetro, no esporulados, anaerobios facultativos, que crecen formando cadenas cuya longitud está en relación inversa a la riqueza del medio de cultivo (**Hardie 1986**). En agar sangre, tras 18-24h de incubación forman colonias de 3-4 mm de diámetro, lisas, de bordes enteros, rodeadas de halo de β -hemólisis, aunque alrededor del 2-3% de cepas son no hemolíticas (**Ruoff et al 1999**).

Catalasa y oxidasa negativa, es capaz de hidrolizar el hipurato sódico, es resistente a la bacitracina (92-98%) lo que permite diferenciarlo de *Streptococcus pyogenes* (grupo A de Lancefield), aunque algunas cepas ocasionalmente son susceptibles (**Pollock and Dahlgren 1974**). Son resistentes a un disco de 2 μg de metotrexato en medios libres de producto finales de la vía del folato, permitiendo este método diferenciarlo de otros estreptococos β -hemolíticos (**Coll 1985**). Otro criterio utilizado en la identificación presuntiva de EGB, es la resistencia al trimetoprim-sulfametoxazol, debido a la capacidad de utilizar la timidina presente en los medios de cultivo, anulando el bloqueo que este antibiótico produce en la vía del folato (**Gunn 1976; Coll et al 1985; Facklam and Washington 1991**). Fermentan la glucosa, maltosa, sacarosa, trehalosa y glicerol, aunque algunas cepas no son capaces de fermentar la trehalosa y el glicerol (**Henrichsen 1985; Hardie 1986**).

La mayoría de las cepas de *Streptococcus agalactiae*, hemolíticas o no, producen una proteína extracelular termoestable conocida como factor CAMP que aumenta la actividad hemolítica de la β -hemolisina (esfingomielinasa C) de *Staphylococcus aureus* para lisar hematíes de carnero.

La prueba de CAMP fue descrita en 1944 por Chrostie, Atkins y Munich-Petersen. La detección del factor CAMP permite la identificación presuntiva de EGB, aunque no es totalmente específica, pues también puede producirlo cepas de *Streptococcus* de los grupos C, F y G (McFaddin 1980).

Un pequeño número de cepas de EGB son CAMP negativo, las cepas no hemolíticas habitualmente dan esta reacción positiva, por lo tanto no existe relación entre ese factor y la hemolisina estreptocócica (Marchlewicz and Duncan 1980; Ferrieri 1985; Henrichsen 1985).

Casi la totalidad de las cepas de EGB producen el enzima β -glucuronidasa, aunque entre el 4% y 16% de las cepas de *S. pyogenes* también producen este enzima, esta propiedad permite diferenciar EGB de *Enterococcus spp.* que no producen β -glucuronidasa (Röd et al 1974)

I.6.3.2. Requerimientos nutricionales de *Streptococcus agalactiae*

Los EGB son microorganismos quimioheterótrofos con pocos requerimientos nutricionales. Durante su crecimiento la mayoría de las cepas requieren fenilalanina, tiroxina, triptófano, cistina e histidina las necesidades de glicina varían de unas cepas a otras (Milligan et al 1978). Aunque pueden desarrollarse en medios de cultivo relativamente simples, el enriquecimiento con sangre, suero o glucosa favorece su crecimiento (Milligan et al 1978; Facklam and Washington 1991; Ruoff et al 1999).

I.6.3.3. Identificación de *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae está bien definido bioquímicamente por lo que casi siempre es posible una identificación presuntiva basándose en ciertas características de crecimiento y pruebas bioquímicas, como son: la resistencia a la bacitracina, resistencia al trimetoprim-sulfametoxazol (92-98% de las cepas), hidrólisis del hipurato sódico (99% de las cepas), no hidrolizan la bilis en presencia de esculina, reacción de CAMP (98-100% de las cepas son CAMP positivas) y la característica específica de producir un pigmento naranja en determinados medios con unas condiciones adecuadas (**Facklam et al 1974; McFaddin 1980; Ross 1984; Facklam and Washington 1991; McFaddin 2000**).

La identificación definitiva requiere la detección del antígeno específico de grupo (carbohidrato de la pared celular), común a todas las cepas de grupo B (**Facklam et al 1974; Ross 1984; Facklam and Washington 1991**).

Junto con el antígeno polisacárido de grupo unido a la capa de peptidoglicano, que lo caracteriza como grupo B de Lancefield, EGB posee otros antígenos carbohidratos tipo-específicos capsulares que permiten clasificarlos en serotipos; Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII y VIII, un antígeno polisacárido menos específico de tipo (Iabc), común del serotipo I, y antígenos proteicos (c, X, R) (**Lancefield et al 1975; Ross 1984; Christensen and Christensen 1985; Benedi and Hervas 1992; Von Hunolstein et al 1993; Kogan et al 1995; Kogan et al 1996**).

I.6.4. MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE *Streptococcus agalactiae*

Se han empleado una gran variedad de medios de cultivo para el aislamiento de EGB, desde medios relativamente simples, a medios enriquecidos, medios selectivos que reducen al mínimo la proliferación de otros microorganismos presentes en muestras clínicas e incluso medios selectivos y diferenciales que al mismo tiempo que inhiben el crecimiento de microorganismos acompañantes permiten una identificación del EGB (**De la Rosa et al 1983**).

El empleo de medios selectivos conlleva una mayor tasa de recuperación de EGB en muestras clínicas, siendo su empleo necesario sobretodo en estudios epidemiológicos (**Baker and Barret 1973a; Mason et al 1976; Gray et al 1979; Persson and Forsgren 1987**).

Aunque los medios selectivos facilitan el aislamiento, no aceleran la identificación, que se tiene que realizar posteriormente. Baker y col. en 1973 propusieron utilizar el medio Todd-Hewitt adicionando al mismo 8 µg/ml de sulfato de gentamicina y 15 µg/ml de ácido nalidíxico como sustancias selectivas (**Baker and Barret 1973a**). Posteriormente, se han empleado concentraciones menores de gentamicina (**Easmon et al 1983**) ya que a esas concentraciones la gentamicina inhibe el crecimiento de algunas cepas de EGB (**Gray et al 1979; Santos and Hill 1984**).

Otras combinaciones de antibióticos utilizadas en medios selectivos son: colistina y ácido nalidíxico (**Fenton and Harper 1979**), polimixina, ácido nalidíxico y cristal violeta (**Gray et al 1979**), trimetoprim-sulfametoxazol (**Gunn et al 1977**), cristal violeta, colistina y metronidazol (**De la Rosa et al 1990a**).

En 1977, Islam desarrolló un medio de cultivo cuya composición es la siguiente:

| | | |
|---|--|---------|
| - | Proteosa peptona N° 3 (BD/Difco) | 2.3 % |
| - | Almidón soluble | 5 % |
| - | Agar N° 1 (Oxoid) | 1 % |
| - | Suero de Caballo | 5 % |
| - | Na ₂ HPO ₄ | 0.04 M |
| - | Na ₂ H ₂ PO ₄ | 0.012 M |

A un pH final de 7.4 que permitía la detección de EGB en base a la producción de un pigmento anaranjado característico (**Islam 1977**).

Como consecuencia de que en muestras clínicas el EGB suele ir acompañado microbiota comensal, para evitar su sobrecrecimiento en el medio, Waikins (**Waikins 1982**) propuso la adición al medio Islam de neomicina, nalidíxico y metronidazol, con la finalidad de hacerlo más selectivo.

En 1983, de la Rosa y col. basándose en la formulación del medio descrita por Islam diseñaron un medio de cultivo selectivo y diferencial (Medio Granada), utilizando altas concentraciones de almidón como agente gelificante y un inhibidor de la ruta del ácido fólico (trimetoprim) como factor activador de la producción de pigmento. El medio contenía:

| | | |
|---|---|----------|
| - | Proteosa peptona N° 3 (212220 BD/Difco) | 3.8 % |
| - | Almidón soluble (1252 Merk) | 15 % |
| - | NaCl | 0.3 % |
| - | Suero de Caballo (SR 0035 Oxoid) | 10 % |
| - | Trimetoprim (Lactato) | 15 µg/ml |
| - | Buffer fosfato | 0.06 M |

Para un pH final de 7.4

Con esta nueva formulación las colonias de EGB eran más fáciles de diferenciar que en el medio Islam debido a que las colonias aparecían más pigmentadas por el incremento del almidón y del suero. La modificación y el hallazgo más importante del medio Granada, es la incorporación de trimetoprim, un inhibidor de la vía del folato que favorece la formación de pigmento por este microorganismo (**De la Rosa et al 1983; De la Rosa et al 1990a**).

En 1992 de la Rosa y col. diseñaron un nuevo medio de cultivo: New Granada Medium (NGM), selectivo y diferencial, para la detección rápida de EGB β -hemolíticos y que incorpora en su fórmula metotrexato (antagonista del folato) como factor activador de la producción de pigmento por EGB, glucosa y buffer ácido 3-morfolinopropanosulfónico (MOPS) (**De la Rosa et al 1992a**).

El NGM como medio semisólido en tubo puede utilizarse también como medio de transporte de muestras clínicas, el pigmento puede observarse tras 8-12 horas de incubación a 37 °C en aerobiosis, permitiendo identificar de forma más rápida a mujeres candidatas a profilaxis intraparto o a neonatos que puedan desarrollar infección (**De la Rosa et al 1992a**).

La formulación de este medio es:

| | | |
|---|---|---------|
| - | Proteosa peptona N° 3 (212220 BD/Difco) | 2.5 % |
| - | Almidón soluble (Merck 1252) | 15 % |
| - | Na ₂ HPO ₄ | 0.06 M |
| - | Suero de Caballo (SR 0035 Oxoid) | 5 % |
| - | MOPS (sal hemisódica) | 0.05 M |
| - | Glucosa | 0.25 % |
| - | MgSO ₄ | 0.2 % |
| - | Piruvato sódico | 0.1 % |
| - | Metotrexato | 6 µg/ml |

Para un pH final de 7.4, además se le adicionó 10 $\mu\text{g/ml}$ de metronidazol, 0.2 $\mu\text{g/ml}$ de cristal violeta y 5 $\mu\text{g/ml}$ de colistina para hacer selectivo el medio de cultivo (**De la Rosa et al 1990a; De la Rosa et al 1992a; Rosa-Fraile et al 1999b**).

I.7. PIGMENTO DE *Streptococcus agalactiae*

La primera descripción de *estreptococos* pigmentados data de 1919 a cargo de Orla Jensen (**Fallon 1974**); dos décadas después Lancefield describe una cepa de EGB capaz de formar pigmento de coloración amarillenta (**Fallon 1974**). No es hasta 1975 cuando la pigmentación del EGB adquiere gran importancia al tratarse de una característica que puede utilizarse para su identificación en los laboratorios de microbiología (**Fallon 1974; Flandrois and Fleurette 1975; Islam 1977; De la Rosa et al 1983**).

La producción de pigmento se ha relacionado con la capacidad del EGB de producir hemolisina, de manera que cepas no hemolíticas no producen pigmento (**Noble et al 1983**). La relación entre pigmento y hemolisina ha sido estudiada y se ha comprobado que la formación y liberación de hemolisina y pigmento son procesos metabólicamente activos y que necesitan de transportadores naturales (**Marchlewicz and Duncan 1980; Tapsall 1986; Tapsall 1987**).

En 1991 Wennerstrom describió la estrecha relación entre los genes implicados en la producción de hemolisina y pigmento (**Wennerstrom et al 1991**), esto ha sido confirmado con los estudios de B. Spellerberg que muestra como genes idénticos participan en la producción de hemolisina y pigmento (**Spellerberg et al 1999; Spellerberg et al 2000**).

La hemolisina, con demostrada acción citolítica sobre diversos tipos celulares, se ha descrito como factor de virulencia (**Nemergut 1983; Wennerstrom et al 1985; Rubens et al 1990**).

El posible papel del pigmento en la patogénesis del EGB se ha sugerido también en los estudios de Nemergut y de Wennerstrom (**Nemergut 1983; Wennerstrom et al 1985**). Pese a todo esto, la naturaleza y función del pigmento producido por EGB es todavía una incógnita.

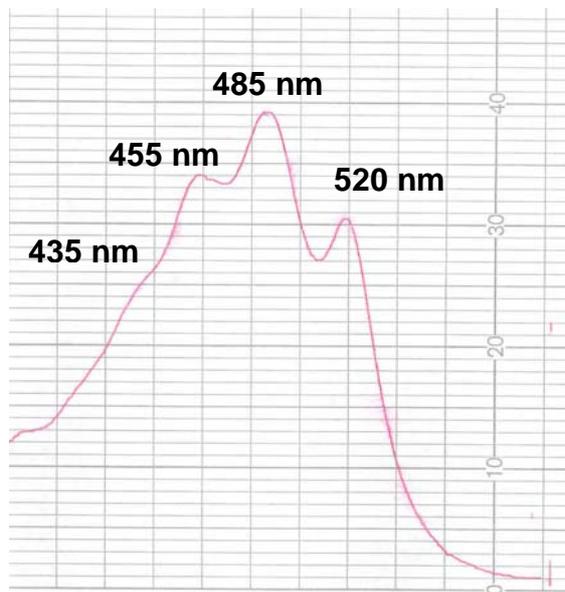
I.7.1. ESTRUCTURA DEL PIGMENTO

La naturaleza del pigmento de EGB ha sido objeto de estudio desde los años 70, así Merritt y Jacobs describieron el espectro del pigmento en forma de cuatro máximos a 435 nm, 455 nm, 485 nm y 525 nm respectivamente. Por comparación de este espectro con el del β -caroteno, estos autores sugirieron una posible naturaleza carotinoide al pigmento de EGB. Estos mismos autores describieron la presencia del pigmento en fracciones membranosas obtenidas después de someter las células a un proceso de sonicación y ultracentrifugación (**Merritt and Jacobs 1978**).

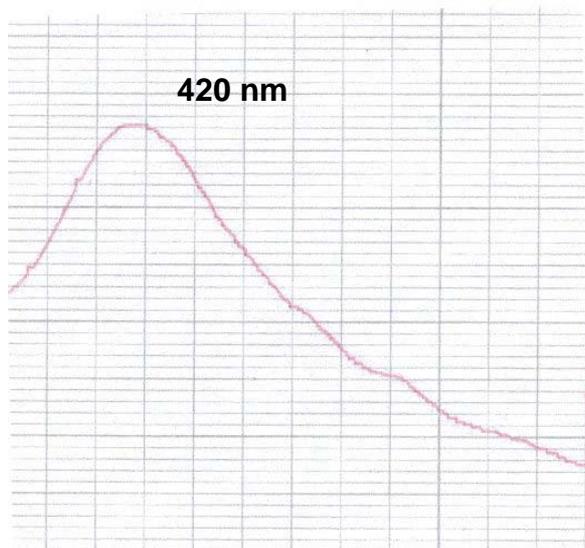
No es hasta mediados de los 80 cuando J. W. Tapsall describe dos tipos de pigmentos de EGB, un primer tipo que relaciona con la aparición de un máximo de absorción a 420 nm (**I.7.1. Figura 1**), y un segundo pigmento que coincide con el descrito por Merritt en 1978, que presenta cuatro máximos de absorción a 435 nm, 455 nm, 485 nm y 520 nm (**I.7.1. Figura 2**) (**Tapsall 1986**).

Sin embargo, en estudios posteriores se ha demostrado que solo existe un único tipo de pigmento que puede adoptar dos tipos de conformaciones dependiendo de si está o no unido a un maltopolisacárido, presentando estas conformaciones espectros U.V.-visible completamente diferentes (**Rodríguez-Granger 2003**).

El pigmento se localiza en zonas externas de la bacteria, cuyas características de solubilidad, procedimiento de extracción y purificación y cambios en el espectro U.V.-visible dependiendo del pH, así como los espectros de resonancia magnética nuclear no muestran semejanza con los carotenos aunque debe ser una sustancia muy relacionada ya que presenta un alto número de dobles enlaces conjugados que pueden explicar los tres máximos de absorción análogos a los que presentan los carotenos (**I.7.1. Figura 3**) (**Rodríguez-Granger 2003**).



I.7.1. Figura 1.



I.7.1. Figura 2.

I.7.2. CONDICIONES DE PRODUCCIÓN DEL PIGMENTO DE *Streptococcus agalactiae*

Entre los factores que influyen la producción de pigmento por cepas EGB caben destacar: algunos componentes del medio, la atmósfera y la temperatura de incubación.

I.7.2.1. Componentes del medio de cultivo que influyen en la producción del pigmento por *Streptococcus agalactiae*

Almidón

Desde 1923 Durand y Giraud (**Fallon 1974**) apuntaron la importancia del almidón en los medios de cultivo destinados a la producción de pigmento por EGB, por lo que este componente se ha ido incorporando a las diferentes formulaciones de medios descritas (**Islam 1977; De la Rosa et al 1983; De la Rosa et al 1992a**).

Aunque la incorporación de almidón en el medio de cultivo no es esencial para la producción de pigmento (**Merritt and Jacobs 1976**), su presencia además de promover el crecimiento tiene un efecto activador en su producción (**De la Rosa et al 1990a**).

El tipo de almidón, su concentración, así como el grado de hidrólisis puede influir en su actuación como activador o molécula estabilizadora del pigmento (**De la Rosa et al 1983**).

La incorporación de otros azúcares como polisacáridos (Glucógeno, metil-celulosa, etc), dextrinas, oligosacáridos (maltooligosacáridos, maltotriosa, etc.), di- y monosacáridos (D-fructosa, D-manosa, etc), en sustitución del almidón en el medio Granada no permite visualizar la característica pigmentación naranja de *Streptococcus agalactiae* (**Carazo 1993**).

Glucosa

El crecimiento de los microorganismos en los medios de cultivo se ve favorecido por la adición de glucosa, pero el pH baja rápidamente y cesa el crecimiento. Esta caída de pH se debe a una acumulación de ácido láctico, procedente de la fermentación de los azúcares, especialmente la glucosa (**McCarty 1984**).

Esta propiedad inhibitoria de la glucosa había sido observada anteriormente por Merritt y Jacobs, al relatar que la adición de glucosa al agar sangre a concentraciones relativamente bajas (0.04%) aumentaba significativamente el metabolismo estreptocócico y la reactividad de CAMP y que a concentraciones de glucosa de 0.64% inhibían totalmente el desarrollo de esta reacción (**Merritt and Jacobs 1978**).

Griffiths confirmó la influencia de la concentración de la glucosa en el crecimiento de EGB en medios de cultivo, observando así mismo que la producción de pigmento y la producción de hemolisina igualmente están relacionadas con la cantidad de glucosa (**Griffiths 1989**). Con concentraciones relativamente elevadas 4 g/l, la producción de pigmento por EGB disminuye o casi se inhibe por completo, mientras que concentraciones 0,4 g/l incrementa su formación en la mayoría de los EGB humanos (**Schauf et al 1985**).

La formación de pigmento se inhibe en presencia de inhibidores metabólicos como el iodoacetato sódico (bloquea la glicólisis al inhibir la gliceroaldehído 3-fosfato deshidrogenasa al reaccionar con el grupo sulfhidrilo de la cisteína presente en su centro activo), lo que sugiere que la producción y liberación de pigmento será un proceso metabólicamente activo y la glucosa actuara como fuente energética (**Tapsall 1986**).

La glucosa debe añadirse al medio de cultivo después de autoclavar debido a que el ácido 4-morfolinopropanosulfónico (MOPS), incorporado en el medio como buffer de Good para controlar las fluctuaciones de pH, no es estable al calor en presencia de la glucosa.

Hidrolizados proteicos

La elección de la fuente proteica es de gran importancia porque su eliminación del medio se traduce en ausencia de crecimiento de EGB. Una determinada peptona no puede satisfacer todos los propósitos microbiológicos, por lo que cada una de ellas es particularmente útil para un propósito especial y posee unas características singulares que las diferencia de las demás. En la producción del EGB también influye el tipo de peptona utilizada, la que más se ha utilizado en los medios de cultivo es la proteosa peptona N° 3 (BD Difco) ya que potencia la producción de pigmento como el crecimiento (**Islam 1977; De la Rosa et al 1983**), aunque existen otros hidrolizados proteicos como la proteosa peptona, proteosa peptona N° 2 y la pentamina (BD Difco) que también activan la pigmentación (**Carazo 1993**). Sin embargo otros hidrolizados proteicos aunque apoyan el crecimiento de EGB no potencian la producción de pigmento (**Carazo 1993**).

Uno de los factores presentes en la proteosa peptona N° 3 (**PP3**), que favorece la producción de pigmento por EGB, es el péptido activo (**Factor α**) presente en la secuencia de la albúmina humana y bovina de donde se libera por hidrólisis péptica lo que sugiere que la **PP3** se fabrique con digestos pépticos de proteínas que contengan albúmina o que contengan la secuencia del péptido Ile-Ala-Arg-Arg-His-Pro-Tyr-Phe. El porque este péptido causa un aumento en la pigmentación no está claro (**Rosa-Fraile et al 1999a**).

Además del péptido activo, la proteosa peptona presenta otro factor que hemos llamado **Factor β** que también intervienen en el aumento de la intensidad de pigmento por EGB, esta hipótesis se confirmó al tripsinizar una solución de **PP3** (apartado R.1.2). La hidrólisis de la solución conlleva una pérdida del péptido activo, su incorporación exógena bien con el hidrolizado péptico de albúmina o con el hidrolizado péptico de suero condujo a una intensidad de pigmento inferior en

comparación con la solución sin tripsinizar lo que indica la presencia de algún compuesto que también favorece un incremento en la producción de pigmento.

Suero

Su incorporación a los medios de cultivo no solo favorece el crecimiento de los microorganismos sino que también aumenta el tamaño de la colonia y disminuye el tiempo de incubación. Además se comporta como un activador de la pigmentación de EGB (**Sukroongreug et al 1984; De la Rosa et al 1983**).

El componente del suero que influye en la producción de pigmento ha sido identificado como la amilasa. En los medios de cultivo que contienen glucosa y almidón, el aumento de pigmentación por parte del suero está causado por la aparición de malto-oligosacáridos como consecuencia de la hidrólisis del almidón por parte de la amilasa ya que estos pueden remplazar la actividad intensificadora de la pigmentación de la amilasa. El mecanismo por el cual estos oligosacáridos incrementan la pigmentación no está claro pero solo es observada en presencia de glucosa (**Rosa-Fraile et al 1996**).

I.7.2.2. Atmósfera y temperatura de incubación

Clásicamente se ha admitido que la producción de pigmento por EGB requería condiciones de anaerobiosis (**Fallon 1974**). Sin embargo, han sido muchas las experiencias que han demostrado esa producción en aerobiosis (**Flandrois and Fleurette 1975; Merritt and Jacobs 1976; Reardon et al 1984; Sukroongreug et al 1984; De la Rosa et al 1992a**), aunque la observación de colonias pigmentadas en superficie es mucho mejor en anaerobiosis. En cambio, cuando el crecimiento de EGB se realiza en el interior de un medio de cultivo (líquido o semisólido) que contenga suero y un inhibidor de la vía del folato, no hay diferencias en la producción y observación del pigmento entre ambas atmósferas e incubación (**De la Rosa et al 1992a**).

En 1999, Rosa-Fraile y col. demostraron que cultivos de EGB incubados en aerobiosis y cubiertos con un cubre en la siembra, presentan la misma intensidad de pigmentación que aquellos que se incuban en anaerobiosis (**Rosa-Fraile et al 1999a**). Este fenómeno parece ser debido a que el crecimiento debajo del cubre provoca el desarrollo de EGB en lamina. En estas condiciones provoca un stress en el microorganismo que conlleva un aumento de la producción de pigmento (**Rosa-Fraile et al 1999a**). La formación y liberación de pigmento es máxima a 37 °C (**Tapsall 1986**).

I.8. HISTORIA DE LA PROTEOSA PEPTONA Nº 3

La proteosa peptona (Difco) son digestos enzimáticos de proteína de tejido animal. El desarrollo de las diferentes proteosa por parte de la compañía Difco (proteosa peptona, proteosa peptona Nº 2 y proteosa peptona Nº 3) se basó en variaciones de los parámetros de hidrólisis de los digestos enzimáticos (**Difco 1998**).

Durante el periodo de la Primera Guerra Mundial fue imposible para el mercado americano conseguir la peptona de Witte's producida en Alemania, componente indispensable del medio de cultivo utilizado para la producción de toxina de *Corynebacterium diphtheriae*. Por lo tanto, esto planteaba la necesidad de realizar u obtener una nueva peptona para continuar con la preparación de la toxina diphtheria. Varios fabricantes de medios de cultivo ofrecieron diferentes tipos de peptonas para este fin. La proteosa peptona de Difco incorporada en el medio de cultivo permitía obtener una toxina potente y uniforme (**Gibas and Rettger 1927**).

La proteosa peptona se usa en la preparación de un medio de cultivo utilizado para la obtención de toxina diphtheria a partir de la cual se obtenía antitoxina, mezcla de antitoxina-toxina y toxoide. La proteosa peptona es excepcionalmente valiosa en la producción de toxinas bacterianas, incluye toxina de *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium botulinum*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella pullorum* y la toxina de la escarlatina. Además, algunas propiedades que justifican la idoneidad de la proteosa peptona en medios de cultivo para microorganismos exigentes incluyen sus componentes nitrogenados, rango de buffer y su alto contenido en proteosa (**Difco 1998**).

Todos estos elementos crean un ambiente adecuado para mantener la virulencia de algunas bacterias y favorecer la producción de productos metabólicos bacterianos. Por esta razón, el almacenamiento de medio de cultivo con proteosa peptona mejora la conservación (**Difco 1998**).

Además la proteosa peptona puede ser usada en medios de cultivo para una gran variedad de aplicaciones incluyendo la producción de sustancias en bacterias, hongos y células de mamíferos. La proteosa peptona se ha utilizado en la producción de glucosidasas de *Bacteroides fragilis* y en la estimulación de la producción de aminoglucosidasas de *Aspergillus spp.* Jan y col. (**Difco 1998**) comprobaron que la proteosa peptona añadida en sus medios incrementaba el número de anticuerpos monoclonales. Incluso se ha utilizado como nutriente en medios de amebas.

La proteosa peptona N° 2 y la proteosa peptona N° 3, son modificación de la proteosa peptona. La primera se usa en la preparación de medios de cultivo para la producción de toxina diphtheria.

En cuanto a la proteosa peptona N° 3 se usa para la preparación del agar chocolate favoreciendo el crecimiento de *Neisseria spp.* y agar chocolate telurito para el crecimiento de *Corynebacterium diphtheriae* ya que tiene mayor valor nutricional que la proteosa peptona. Puede remplazar a la combinación de peptona e infusión de carne lo que permite el crecimiento de gran cantidad de microorganismos exigentes, estreptococos, estafilococos, meningococos, gonococos y otros microorganismos que requieren sustratos muy nutritivos (**Difco 1998**).

Objetivos

OBJETIVOS:

1. Estudiar el/los componentes de la Proteosa Peptona N° 3 responsables de aumentar la intensidad de pigmento por *Streptococcus agalactiae*.
2. Encontrar una sustituto (hidrolizado o extracto proteico producido en el laboratorio) de la Proteosa Peptona N° 3 capaz de soportar de manera análoga la producción de pigmento por *Streptococcus agalactiae*.

Material

y

Métodos

III. MATERIAL Y MÉTODOS

MM.1. CEPAS BACTERIANAS E INTENSIDAD DE PIGMENTO

Para el estudio y dado que las cepas de *Streptococcus agalactiae* (EGB) son muy variables en su capacidad de producir pigmento, se escogió la cepa F de EGB (serotipo 3) (**García Peña 2003**). Esta cepa se caracteriza por ser muy dependiente del medio de cultivo para producir pigmento. Para el mantenimiento de la misma se realizó subcultivos semanales en placas de agar sangre de carnero 5% (Biomedics, Madrid. España) y en caldo Brain Heart Infusión (0037-01-9 BD/Difco, Detroit. USA) a 37 °C.

Reseñar que a lo largo de este trabajo consideraremos equivalentes los términos intensidad de pigmento y capacidad de soportar la producción de pigmento por EGB (Cepa F), por lo que se utilizarán indistintamente. Dado que en este estudio pretendemos conocer la influencia de las peptonas en la producción de pigmento y esta es una característica fenotípica subjetiva, se evaluó la intensidad de pigmento de la colonia de EGB de acuerdo con una escala no paramétrica modificada (**García Peña 2003**) como se muestra en la MM.1. **Tabla 1** y MM.1. **Figura 1**:

| Pigmento | Color de la colonia | Puntuación de intensidad |
|----------------|---------------------|--------------------------|
| No pigmento | | 0 |
| Muy pobre | Naranja amarillo | 1-1.5 |
| Escasa- Pobre | Naranja claro | 2-2.5 |
| Débil-Moderada | Naranja | 3-3.5 |
| Buena-Intensa | Naranja intenso | 4-4.5 |
| Excelente | Rojo | 5 |

MM.1. **Tabla 1.** Gradación no paramétrica de la pigmentación de EGB



MM.1. **Figura 1.** Intensidad de pigmento de la cepa F de EGB de acuerdo con la escala no paramétrica modificada

Cuando los productos a ensayar adicionados al medio fueron de color oscuro (p.e. hidrolizados ácidos de peptonas o extractos de carne) la determinación de actividad se efectuó sobre membranas Sartorius, estériles de tamaño de poro 0.45 micras colocadas sobre el medio (MM.1. **Figura 2**). El color blanco de estas membranas permite observar perfectamente el pigmento de EGB cuando crece sobre medios muy oscuros.

Como la intensidad del pigmento producido por la cepa F en medio Granada es excelente (MM.1. **Figura 3**), no se consideró que una peptona, hidrolizado enzimático o extracto soportaba adecuadamente la producción de pigmento por EGB salvo que se produjera una intensidad intensa-excelente (**4.5-5**).

Se definió como **concentración activa**, la concentración (p/v, mg/ml) en un medio de ensayo de un producto que presenta una actividad [capacidad de soportar el crecimiento de EGB como colonias con pigmento bueno-intenso (equivalente a un 2.5% (25 mg/ml) de **PP3**)] (**4-4.5**).

Cuando una peptona comercial se sometió a fraccionamiento (ultrafiltración, cromatografía, etc), se definió el concepto de **concentración equivalente**, la concentración teórica a la que queda la fracción separada respecto de la concentración original del producto estudiado.

Así por ejemplo, si 100 ml de peptona comercial al 2% son ultrafiltrados y se separa una fracción de PM inferior a 1000 Da y otra superior a 1000 Da y luego cada una de esas fracciones es concentrada o diluida hasta 100 ml obtendremos que la concentración equivalente de cada una de ellas es 1.



MM.1. **Figura 2.** Observación del pigmento de EGB sobre membranas de Sartorius en medios oscuros



MM.1. **Figura 3.** Colonias de EGB con una pigmentación intensa-excelente en medio Granada

Denominaremos **actividad** al cociente entre 25 (25 mg/ml concentración activa de **PP3**) y la concentración activa (p/v, mg/ml) de un producto activo. Por ejemplo, si obtenemos una fracción activa de peptona con una concentración equivalente al 0.5 %, dicha fracción tiene una actividad 5 veces mayor que la **PP3** a una concentración del 2.5%.

MM.2. INOCULACIÓN E INCUBACIÓN

Se prepara una suspensión de bacterias en solución estéril de NaCl 0.85% a partir de colonias crecida en agar sangre incubada a 37 °C en aerobiosis durante 18 horas, hasta obtener una turbidez de 0.5 en la escala de McFarland aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC). El inóculo así preparado se diluye 1:10. La inoculación de la placa se realiza con asas 1 μ l (aproximadamente 10000 UFC).

El crecimiento, así como la producción de pigmento, es detectado por la inspección de las placas tras 24 horas de incubación a 37 °C en anaerobiosis.

MM.3. MÉTODO BIOAUTOGRAFICO

Con la finalidad de simplificar el estudio de la capacidad de determinadas sustancias para soportar la producción de pigmento por *S. agalactiae*, algunas experiencias se han realizado utilizando una modificación de la técnica bioautográfica (**Kennedy 1955; Moss 1966; Rosa-Fraile et al 1996; Rosa-Fraile et al 1999a**) que consiste en realizar pocillos de 7 mm de diámetro en el medio de cultivo distribuido en las placas de Petri. En cada pocillo se incorpora los diferentes compuestos cuya intensidad de pigmento se quiere conocer. Tras la incubación (37 °C 18-24 horas en atmósfera anaerobia) se anotó la ausencia o presencia de halo de pigmentación alrededor de los pocillos utilizando la escala no paramétrica descrita **MM.1** producido por los diferentes compuestos ensayados.

Preparación del medio para ensayos autobiográficos:

Se toman 20 μl de un cultivo de *S. agalactiae* en caldo Brain Heart Infusion (BHI) incubado 18-24 horas, y se añade a 11 ml de medio de cultivo (50 °C) antes de que solidifique, procediendo a su homogenización y distribución en placas Petri de 9.5 cm de diámetro. Transcurrido el tiempo necesario para solidificación, se realizan los pocillos en el medio. En cada uno de los pocillos se incorporan 100 μl de las soluciones a ensayar. Antes de proceder a su incubación se espera aproximadamente unos 15 minutos (hasta que el pocillo esté seco) para permitir de esta forma la difusión de las sustancias al medio.

MM.4. MEDIO DE PRUEBA Y BASE DEL MEDIO DE PRUEBA

MM.4.1. BASE DEL MEDIO DE PRUEBA (B)

Se trata de un medio preparado a partir de productos definidos que denominaremos base de medio (**B**) y que contiene almidón, MOPS, glucosa, piruvato, antibióticos, sales, agar y buffer. Esta base de medio deriva del medio Granada (**De la Rosa et al 1983**) con la única diferencia que no incorpora **PP3** ni suero de caballo.

Esta base de medio cuando se adiciona de peptonas o mezclas de aminoácidos y sales, permite el crecimiento de EGB como colonias grandes que serán o no pigmentadas en función de las sustancias añadidas.

La composición por litro de la base de medio (**B**) es:

| | |
|--------------------------------------|-------|
| Almidón (1252 Merk) | 10 g |
| Fosfato disódico anhidro (6586 Merk) | 8.5 g |
| MOPS sal hemisódica (M-9027 Sigma) | 11 g |
| Agar purificado (Oxoid) | 10 g |
| Agua destilada | 1 l. |

El medio de base se disolvió y pasteurizó calentando en baño María durante 10 minutos, se dejó enfriar a 52 °C, y se añadió 10 ml suplemento.

Composición del suplemento:

| | |
|----------------------------------|--------|
| Glucosa monohidrato (8342 Merk) | 25 g |
| Piruvato sódico (6619 Merk) | 10 g |
| MgSO ₄ (M-7505 Merk) | 2 g |
| Sulfato colistina (C-4461 Sigma) | 50 mg |
| Metronidazol (M 1547 Sigma) | 100 mg |
| Metotrexate sódico (Lederle) | 60 mg |
| Cristal Violeta (Merk 15940) | 0.2 mg |

Preparación del suplemento (**De la Rosa et al 1992a**):

Añadir hasta 100 ml de agua y disolver calentando 50-60 °C en agitación, esterilizar filtrando por 0.45 µm despreciando los primeros mililitros hasta que el cristal violeta sature el filtro.

MM.4.2. MEDIO DE PRUEBA (X)

Dado que se pretende estudiar la influencia de la peptona en la pigmentación de EGB, el medio de prueba al cabo de 18-24 horas de incubación en anaerobiosis debe reunir las siguientes condiciones:

1. EGB crezca como colonias grandes (2 mm)
2. No se produzca pigmento (**0**)
3. No se produzca pigmento apreciable (**0-1**) cuando es suplementado con hidrolizado péptico de suero (**HP.S**) (adición del péptido activo Ile-Ala-Arg-Arg-His-Pro-Tyr-Phe apartado I.7.2.1), extracto de levadura (**Y**) o mezcla de ambos (**Rosa-Fraile et al 1999a**).
4. Que al añadir **PP3** (2-2.5%) se produzca crecimiento como colonias grandes fuertemente pigmentadas (**4.5-5**).
5. Que al medio de prueba suplementado con **PP3** pueda añadirse suero, hidrolizado péptico de suero o extracto de levadura sin que se produzca inhibición de la pigmentación.

El medio de prueba (**X**) no es más que el medio de base (**B**) con una peptona y suero de caballo. Concretamente es el medio Granada al cual se substituyó el 2.5% proteosa peptona N° 3 (**PP3**) por un 1% proteosa peptona de Oxoid (**PPO**) que permite el crecimiento EGB como colonias grandes no pigmentadas o con muy pobre pigmento (**0-0,5**).

MM.4.2.1. Hidrolizado péptico de suero (HP.S)

El hidrolizado péptico de suero se utiliza como fuente de factores nutritivos inespecíficos y fundamentalmente como fuente del péptido activo (**factor α**) cuya secuencia (Ile-Ala-Arg-Arg-His-Pro-Tyr-Phe) está presente en la albúmina de mamíferos (posición 166 a 173) (MM. 4.2.1. **Figura 1**) (Meloun 1975), de donde se libera por hidrólisis con pepsina (Rosa-Fraile et al 1999a). Su presencia en el medio es necesaria para la producción de pigmento.

Preparación:

Se diluye 100 ml de suero de caballo (SR 0035 Oxoid) con 200 ml de agua (aproximadamente 7 g de proteína).

Se acidifica con ácido clorhídrico (HCl) hasta pH 2.5.

Se añade 100 mg de pepsina (P7000 Sigma).

Se mantiene en baño maría a 47 °C en agitación durante 12 horas ajustando el pH a 2.5 cada 2 h, al cabo de 12 horas se añaden 50 mg más de pepsina y se continua la hidrólisis durante 12 horas. Se hierve 10 minutos en baño de agua y se conserva sin neutralizar (queda a una concentración teórica del 2.5%). Antes de utilizar se neutraliza (pH 7.2) con hidróxido sódico concentrado (NaOH). Se uso a una concentración del 10% de este producto con relación a la concentración final de medio (aproximadamente al 0.25 % de producto seco).

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
|------------|------------|------------|------------|--------------------|---------------------|
| MKWVTFISLL | FLFSSAYSRG | VFRRDAHKSE | VAHRFKDLGE | ENFKALVLIA | FAQYLQQCPF |
| 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| EDHVKLVNEV | TEFAKTCVAD | ESAENCDSL | HTLFGDKLCT | VATLRETYGE | MADCCAKQEP |
| 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| ERNECFLQHK | DDNPNLPRLV | RPEVDVMCTA | FHDNEETFLK | KYLYE IARRH | PYF YAPPELLF |
| 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| FAKRYKAAFT | ECCQAADKAA | CLLPKLDELK | DEGKASSAQ | RLKCASLQKF | GERAFKAWAV |
| 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| ARLSQRFPKA | EFAEVSKLVT | DLTKVHTECC | HGDLLECADD | RADLAKYICE | NQDSISSKLL |
| 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |
| ECCEKPLLEK | SHCIAEVEND | EMPADLPSLA | ADFVESKDVC | KNYAEAKDVF | LGMFLYEYAR |
| 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 |
| RHPDYSVLL | LRLAKTYETT | LEKCCAAADP | HECYAKVFDE | FKPLVEEPQN | LIKQNCSELF |
| 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 |
| QLGEYKFNNA | LLVRYTKKVP | QVSTPTLVEV | SRNLGKVGSK | CCKHPEAKRM | PCAEDYLSVV |
| 490 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 |
| LNQLCVLHEK | TPVSDRVTKC | CTESLVNRRP | CFSALEVDET | YVPKEFNAET | FTFHADICTL |
| 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | 600 |
| SEKERQIKKQ | TALVELVKHK | PKATKEQLKA | VMDDFAAFVE | KCKKADDKET | CFAEEGKLLV |
| AASQAALGL | | | | | |

MM. 4.2.1. **Figura 1.** Secuencia de aminoácidos de la albúmina humana sin el péptido señal donde se muestra la secuencia de aminoácidos del péptido activo (**Factor α**) posición (166-173) (**Meloun 1975**). <http://expasy.hcuqe.ch/> (Búsqueda realizada 18-1-2005)

MM.4.2.2. Extracto levadura (Y)

Se utiliza extracto de levadura (0127 BD-Difco, Detroit. USA) en solución al 10% y se añade a una concentración final a los medios de prueba del 1% para proporcionar vitaminas y otros factores metabólicos. Se decidió añadirlo al comprobar que en algunos hidrolizados y extractos se produce incremento en la producción de pigmento al utilizar medios conteniendo extracto de levadura. Aunque la adición de extracto de levadura no consigue elevar la producción de pigmento más allá de débil-moderada (**3-3.5**).

MM.4.3. MEDIOS DE ENSAYO

Los medios de ensayo que se han utilizado durante este trabajo son el medio de prueba descrito en el apartado MM.4.2 adicionado de un 10% de hidrolizado péptico de suero (**HP.S**) al 7% (p/v) y extracto de levadura (**Y**) al 1% (p/v) de forma individual o en combinación como se reflejan en la tabla MM.4.3. **Tabla 1.**

| Medio de ensayo | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|----------------------------|------------------------------------|
| X (medio de prueba) | 0-1 |
| X + Y | 0-1 |
| X + HP.S | 0-1 |
| X + HP.S + Y | 0-1 |

MM.4.3. Tabla. 1. Intensidad de pigmento en los medios de ensayo

MM.4.4. CONTROLES

Los controles que utilizamos para las experiencias fueron los diferentes medios de prueba adicionados de peptonas al 1% y 2.5% que estimulan la producción de pigmento por EGB como la proteosa peptona N° 3 (**PP3**) y primatona de Sheffield (**PSH**) adicionada de hidrolizado pépsico de suero. Se consideraron adecuados los controles si:

A) La producción de pigmento para la cepa F en los medios de ensayo con proteosa peptona N° 3 al 1 y 2.5%, presentó una intensidad de pigmento como se muestra en **MM.4.4. Tabla. 1** de acuerdo con la escala no paramétrica modificada (**García Peña 2003**):

| Medio de ensayo | Peptona | Concentración ensayada | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|-----------------|---------|------------------------|---------------------------------|
| X | PP3 | 2.5% | 4.5-5 |
| X | | 1% | 3-4 |
| X + Y | | 2.5% | 4.5-5 |
| X + Y | | 1% | 3-4 |
| X + HP.S | | 2.5% | 4.5-5 |
| X + HP.S | | 1% | 3-4 |
| X + HP.S + Y | | 2.5% | 4.5-5 |
| X + HP.S + Y | | 1% | 3-4 |

MM.4.4. Tabla. 1. Intensidad de pigmento de los medios de ensayo tras incorporar 1 y 2.5% de proteosa peptona N° 3 (**PP3**).

B) La producción de pigmento para la cepa F en los medios de ensayo con primatona de Sheffield (**PHS**) al 1 y 2.5% presentó una intensidad de pigmento de acuerdo con la escala no paramétrica modificada (**García Peña 2003**) como se muestra en **MM.4.4. Tabla. 1**:

| Medio de ensayo | Peptona | Concentración ensayada | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|-----------------|---------|------------------------|---------------------------------|
| X | PHS | 2.5% | 0-1 |
| X | | 1% | 0-1 |
| X + Y | | 2.5% | 0-1 |
| X + Y | | 1% | 0-1 |
| X + HP.S | | 2.5% | 4.5-5 |
| X + HP.S | | 1% | 3-4 |
| X + HP.S + Y | | 2.5% | 4.5-5 |
| X + HP.S + Y | | 1% | 3-4 |

MM.4.4. Tabla. 1. Intensidad de pigmento de los medios de ensayo tras incorporar 1 y 2.5% de primatona de Sheffield (**PHS**).

MM.5. COMPUESTOS QUÍMICOS. MEZCLAS COMPLEJAS. PRODUCTOS ACTIVADORES

Hay compuestos que además de actuar como factores de crecimiento para determinadas especies bacterianas, intervienen en procesos más especializados como pueden ser la producción de pigmento o factores de virulencia (p.e., toxinas), actuando como precursores o intermediarios de alguna de las rutas biosintéticas (**Cote and Gherna 1994**).

Los diferentes compuestos químicos y mezclas complejas se incorporaron en los medios de ensayo como precursores para potenciar la capacidad de soportar la producción de pigmento de EGB, realizando pocillos según el método bioautográfico descrito en el apartado MM.3.

Deltaaminolevulínico y Porfobilinógeno

El ácido Deltaaminolevulinico y el porfobilinógeno son precursores de la síntesis de porfirinas, a partir del cual se forma el porfirinógeno. Las porfirinas derivan del grupo hemo por sustitución de algunos o todos los átomos de hidrógeno por varias cadenas laterales (**Rimington and Kennedy 1962**). Forman parte de los pigmentos tetrapirrólicos además de las porfirinas, la clorofila, vitamina B12, pigmentos biliares, etc. Algunos microorganismos los utilizan para la síntesis de pigmento aunque no son muy frecuentes como la prodigiosina en *Serratia marcescens* (**Gerber 1975**).

El ácido Deltaaminolevulinico (A3785 Sigma) se probó a diferentes concentraciones (doble diluciones desde 0.025 mg/ml a 5 mg/ml) a igual que el porfirinógeno (P1134 Sigma) (doble diluciones desde 0.05 mg/ml a 2 mg/ml) en los medios de ensayo **X**, **X+Y**, **X+PSH** y **X+Y+HP.S**.

Disco X y XV

Algunos microorganismos exigentes como *Haemophilus spp.* requieren que en el medio de cultivo exista factor X (hemina) y factor V (NAD) para su crecimiento. En nuestro caso, la intención de incorporar estos factores al medio juntos o por separado fue para comprobar si aumentaban la capacidad de soportar la producción de pigmento por EGB.

Se ensayó en este caso utilizando discos (X, Y, X+Y) comerciales (Oxoid) en los medios de ensayo **X**, **X+Y**, **X+PSH** y **X+Y+HP.S**.

Cistina y Cisteína

Se utilizó L-Cistina (0184-13 Difco, Detroit. USA) y L-Cisteína (C-1276 Sigma) como compuestos activadores ya que su incorporación individual a concentraciones muy superiores a las necesarias para el crecimiento de EGB (100 µg/ml) presentan máxima capacidad de soportar la producción de pigmento en el medio de casaminoácidos y quasi-definido (**García Peña 2003; Rosa-Fraile et al 2001**).

Se probó por separado la cistina y cisteína a una concentración de 100 µg/ml en los medios de ensayo **X**, **X+Y**, **X+PSH** y **X+PSH+Y** mediante la incorporación de un volumen de 100 µl a pocillos realizados sobre estos medios (método bioautográfico).

Galactosa

La galactosa (G6404 Sigma) es un monosárido común en la estructura primaria de las glicoproteínas estableciendo una unión O-glicosil β -1,4 con el aminoácido 5-hidroxi-L-lisina como se explicó en el apartado I.2.2.3. Este tipo de uniones es muy característico de la estructura del colágeno.

Se probó utilizando la técnica bioautográfica al 0.2 % en todos los medios de ensayo: **X**, **X+Y**, **X+PSH** y **X+PSH+Y**.

Ácido N-acetilneurámico y Ácido N-glicosilneurámico

El ácido siálico es el término genérico de un compuesto de nueve carbonos que se forma de un azúcar (ácido 5-amino-3,5-didesoxi-D-glicerol-D-galacto-nonulosónico) donde los grupos amino se sustituyen por N-acetil o N-glicosil de ahí que también se llame N-acetilneurámico y N-glicosilneurámico respectivamente. Este azúcar forma parte de la estructura de las glicoproteínas (**Schauer et al 1995**).

Para comprobar si el ácido siálico es un activador de la producción de pigmento del EGB se realizó soluciones a distintas concentraciones (0.25 mg/ml a 2 mg/ml) y se incorporaron a los medios de ensayo (**X**, **X+Y**, **X+PSH** y **X+PSH+Y**) utilizando la técnica bioautográfica.

Timina, Timidina, Timidina 5 fosfato (ácido 5-timidilico), Timidina 3 fosfato (ácido 3-timidilico)

La mayoría de las bacterias, aunque no todas, llevan a cabo mediante diferentes vías metabólicas la síntesis de todos los nucleótidos. Un ejemplo de es la vía del folato donde la desoxiuridina monofosfato (dUMP) que no es componente del ADN se convierte por metilación en desoxitimidina monofosfato (dTMP) que sí lo es.

Esta metilación es llevada a cabo por la enzima timidilato sintetasa donde el dador del metilo es el N⁵, N¹⁰-metilentetrahidrofolato que se convierte en dihidrofolato. Para que la reacción no se detenga es necesario recuperar la forma N⁵, N¹⁰-metilentetrahidrofolato, lo cual se consigue gracias a la enzima hidrofalato reductasa y a la oxidación NADPH (**Stryer 1995**).

La síntesis del dTMP puede ser bloqueada por diferentes métodos. uno de ellos se basa en una inhibición competitiva de la enzima hidrofalato reductasa utilizando análogos del dihidrofolato como el trimetoprim y el metotrexato (**Stryer 1995**). Este bloqueo es minimizado por parte de las bacterias mediante las llamadas rutas de recuperación, siempre que en el medio existan bases pirimidínicas, nucleósidos y nucleótidos (**Stanier et al 1984**).

La incorporación de dichos inhibidores al medio Granada aumenta la intensidad de pigmento por *Streptococcus agalactiae* (**De la Rosa et al 1983; De la Rosa et al 1992a**)

Para estudiar la actividad sobre la formación de pigmento de bases pirimidínicas (timina), nucleósidos (timidina) y nucleótidos (timidina 5 fosfato y timidina 3 fosfato) de forma individual se realizaron soluciones de cada una a diferentes concentraciones entre 0.05 g/ml y 0.5 mg/ml. Se utilizó el método bioautográfico incorporando 100 µm por pocillo de cada una de las soluciones en los medios de ensayo: **X**, **X+Y**, **X+HP.S** y **X+Y+HP.S**. La timidina se probó adicionada de cisteína por sí se potenciaba la capacidad de soportar la producción de pigmento por EGB.

Mezcla de vitaminas

También se ha utilizado como mezcla de varios factores de crecimiento un complejo vitamínico, Dayamineral filmtab (Abbott Laboratorios, Illinois. USA) para estudiar la actividad sobre la formación de pigmento por *Streptococcus agalactiae*.

La composición de esta mezcla es:

| | |
|-----------------|---------|
| Ergocalcsterol | 1000 UI |
| Nicotinamida | 35 mg |
| Piridoxina Cl | 2500 UI |
| Retinol | 10 mg |
| Riboflavina | 10 mg |
| Pantotenato Ca | 5 mg |
| Cianocobalamina | 5 mg |
| Ácido fólico | 0.25 mg |
| Ácido ascórbico | 150 mg |

Para su ensayo se dispersó Dayamineral filmtab en 20 ml de agua y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente 30 minutos filtrándose posteriormente. Se utilizó el método bioautográfico mediante la incorporación de diversas cantidades (3 μ l a 1ml) en cada pocillo en el medios de ensayo **X**, **X+Y**, **X+HP.S** y **X+HPS+Y**.

MM.6. PEPTONAS. HIDROLIZADOS. EXTRACTOS COMERCIALES

Se estudió la influencia en la pigmentación por EGB cuando a la base de medio se añadió diferentes peptonas, hidrolizados y extractos comerciales. Se ensayaron al 2.5% (p/v) de concentración final. Cuando se usaron a otra concentración se especifica en el apartado correspondiente.

PEPTONAS BD-DIFCO (Detroit, USA)**A) Peptona de tejido animal:**

| | |
|--|-----------------------------------|
| Proteose Peptone (0120) | Hidrolizado péptico tejido animal |
| Proteose Peptone 2 (0121) | Hidrolizado péptico tejido animal |
| Proteose Peptone 3 (PP3) (0122) | Hidrolizado péptico tejido animal |
| Peptamina (0905) | Hidrolizado péptico tejido animal |
| Peptone (0118) | Digerido enzimático de proteína |
| Tryptose (0124) | Mezcla hidrolizados enzimáticos |

B) Peptona de caseína:

| | |
|-------------------------|---------------------------------|
| Tryptone Peptone (0123) | Digerido pancreático de caseína |
|-------------------------|---------------------------------|

C) Peptona de soja:

| | |
|----------------|--------------------------------|
| Soytone (0436) | Hidrolizado enzimático de soja |
|----------------|--------------------------------|

PEPTONAS OXOID. (Basingstoke, UK)**A) Peptona de tejido animal:**

| | |
|--|--------------------------|
| Proteose Peptone (PPO) (LP85) | Peptona péptica de carne |
| Orthana Peptone (RP174) | Peptona péptica de cerdo |
| Peptic Digest (L549) | Peptona péptica de cerdo |
| Peptone P (L49) | Peptona péptica de carne |

| | |
|-------------------------------|---|
| Liver Digest (L27) | Peptona papaína de hígado |
| Tryptose (L47) | Mezcla de peptonas |
| Proteose Peptone N2 (L85) | Mezcla de peptonas |
| B) Peptona de caseína: | |
| Tryptone (L42) | Digerido pancreático de caseína |
| C) Peptona de soja: | |
| Soy Peptone (L44) | Hidrolizado de harina de soja con papaína |

PEPTONAS ORGANOTECHNIE (La Courneuve, France)

A) Peptona de tejido animal:

| | |
|--------------------------|---|
| Meat Peptone S1 (19018) | Hidrolizado enzimático tejido animal |
| Meat Peptone S2 (19518) | Hidrolizado enzimático tejido animal |
| Meat Peptone N2 (19543) | Hidrolizado enzimático tejido animal + factores de crecimiento |
| Meat Peptone N1 (19521) | Hidrolizado enzimático tejido animal |
| Meat extract M1 (19022) | Hidrolizado enzimático tejido animal |
| Gelatine Peptone (19532) | Hidrolizado enzimático de gelatina |

B) Peptonas vegetales:

| | |
|--------------------------|---|
| Plant Peptone E1 (19025) | Hidrolizado enzimático de proteínas de patata |
| Wheat Peptone E1 (19559) | Hidrolizado enzimático proteínas de trigo |

PEPTONAS QUEST-SHEFFIELD (Hoffman Estates, IL, USA)

A) Peptona de tejido animal:

| | |
|---|--------------------------------------|
| Primagen (Sigma P-6088) | Hidrolizado enzimático tejido animal |
| Primagen P (Sigma P-6213) | Hidrolizado enzimático tejido animal |
| Primatone HS (PHS) (Sigma P- 4838) | Hidrolizado enzimático tejido animal |
| Primatone RL (Sigma P-4963) | Hidrolizado pépsico de carne |

| | |
|--------------------------|---------------------------------------|
| Primatote (Sigma P-8388) | Hidrolizado enzimático carne refinada |
|--------------------------|---------------------------------------|

| | |
|------------------------------|------------------------------------|
| Primatona CLT (Sigma C-4588) | Hidrolizado enzimático de colágeno |
|------------------------------|------------------------------------|

B) Peptona de caseína:

| | |
|----------------------------|----------------------------------|
| N-Z-Amine A (Sigma C-0626) | Digestión pancreática de caseína |
|----------------------------|----------------------------------|

| | |
|----------------------------|---------------------------------|
| N-Z-Amine B (Sigma C-6835) | Digestión enzimática de caseína |
|----------------------------|---------------------------------|

| | |
|------------------------------|---------------------------------|
| N-Z-Amine EKC (Sigma N-4767) | Digestión enzimática de caseína |
|------------------------------|---------------------------------|

| | |
|----------------------------|-------------------------------|
| N-Z-Amine E (Sigma C-7085) | Digestión tripsica de caseína |
|----------------------------|-------------------------------|

| | |
|----------------------------|-----------------------------------|
| N-Z-Amine HD (Sigma C7210) | Hidrolizado enzimático de caseína |
|----------------------------|-----------------------------------|

| | |
|----------------------------|--|
| N-Z case TT (Sigma C-4523) | Hidrolizado enzimático refinado de caseína |
|----------------------------|--|

| | |
|-----------------------------|---|
| N-Z case EKC (Sigma N-4642) | Hidrolizado de grado técnico de caseína |
|-----------------------------|---|

C) Peptona de soja:

| | |
|-----------------------|--|
| HY SOY (Sigma P-6463) | Hidrolizado con papaína de leche de soja |
|-----------------------|--|

| | |
|--------|--|
| AMYSOY | Hidrolizado completo de soja con ácido |
|--------|--|

MARCOR (Carlstadt, NJ, USA)

| | |
|------------------|----------------------|
| Proteose Peptone | Hidrolizado de carne |
|------------------|----------------------|

| | |
|--------------|----------------------|
| Meat Peptone | Hidrolizado de carne |
|--------------|----------------------|

| | |
|----------------|----------------------|
| Meat Peptone C | Hidrolizado de carne |
|----------------|----------------------|

| | |
|----------------|----------------------|
| Meat Peptone E | Hidrolizado de carne |
|----------------|----------------------|

PANREAC (Barcelona, España)

| | |
|--------------------|---|
| Proteosa peptona 3 | Hidrolizado péptico de tejidos animales |
|--------------------|---|

PEPTONAS DIVERSAS

| | |
|--|---------------------------------|
| Bacteriological peptone (Sigma P-0556) | Hidrolizado enzimático |
| Peptona Sigma Type I (Sigma P-7750) | Hidrolizado enzimático de carne |
| Proteose Peptone (Sigma P-0431) | Hidrolizado enzimático |

HIDROLIZADOS NO ENZIMÁTICOS

| | |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| Casein Hydrolysate (L41 Oxoid) | Hidrolizado ácido de caseína |
| Colágeno hidrolizado (L125 Oxoid) | Hidrolizado ácido de colágeno |
| Casaminoácidos (0288 BD-Difco) | Hidrolizado ácido de la caseína |

EXTRACTOS COMERCIALES DE TEJIDOS

Yeast Extract (0127 BD-Difco, Detroit. USA) consiste en una solución concentrada de hidrolizado de células de *Saccharomyces cerevisiae*, producido por una reacción autolítica o plasmolítica de dichas células. Es una buena fuente de aminoácidos, carbohidratos y vitaminas especialmente del complejo hidrosoluble B y tiene un bajo contenido en sales.

Lab-lemco (L29 Oxoid, Basingtoke. UK) es un extracto de carne refinado hecho de materiales crudos, decolorado y neutralizado. Los extractos de carne se obtienen a partir de carnes trituradas libres de grasas y nervios, las cuales se hierven, extrayéndose los compuestos solubles eliminando las proteínas coaguladas y la grasas por centrifugación. Los extractos de carne contienen fracciones hidrosolubles de proteínas junto con otros productos solubles como las vitaminas, sales e hidratos de carbono favoreciendo el desarrollo bacteriano de ahí su uso en una gran variedad de medios de cultivo (**Oxoid Manual 1998**)

Brain Extract (Sigma 53282) es una infusión de extracto de cerebro vacuno o de cerdo altamente nutritivo útil en el cultivo de una gran variedad de microorganismos exigentes, incluyendo *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis*.

Brain Heart Infusion (0037 BD-Difco, Detroit. USA) es un caldo transparente preparado a partir de extracto de corazón y cerebro de ternera, altamente nutritivo, utilizado en la preparación de medios de cultivo para estimular el crecimiento de microorganismos fastidiosos.

Beef Infusion (MD-04909 MARCOR Development Corporation, Carlstadt NJ. USA) es una infusión obtenida por hidrólisis enzimática a partir de carne fresca de vaca que se puede usar como base de medio para enriquecer tanto medios líquidos como sólidos gracias a su alto contenido en proteínas, aminoácidos libres, factores de crecimiento y vitaminas.

Meat extract (M1 19022 Organotechnie, La Courneuve. France) es un extracto de carne nutritivo elaborado por hidrólisis enzimática controlada de tejido animal libre de grasas y tendones, que proporciona el nitrógeno, las vitaminas, los aminoácidos y los hidratos de carbono a los medios de cultivo microbiológicos.

MM.7. FRACCIONAMIENTO DE PEPTONAS**MM.7.1. ULTRAFILTRACIÓN**

Para la ultrafiltración de la **PP3** y **PHS** se utilizó el sistema de filtración tangencial Minitan II (Millipore Corp., Bedford MA. USA). Este sistema está compuesto de una célula de filtración y una bomba peristáltica de velocidad variable.

Las moléculas de igual o mayor tamaño que el límite de corte de las membranas quedan retenidas, dejando pasar el solvente y las moléculas de menor tamaño forman el ultrafiltrado. La separación depende del peso molecular pero la conformación y la carga de las moléculas influye en cierta medida en el proceso de filtración (**Harris and Angal 1989**)

En la tabla **MM.7.1. tabla 1** se muestran las membranas Minitan que se utilizaron para la ultrafiltración.

| Membrana | NMWC | Referencia |
|----------|-------|------------|
| Celulosa | 10000 | PTGCOMS10 |
| Celulosa | 1000 | PCACOMS10 |

Nominal Molecular Weight cut-off (NMWC): Peso molecular mínimo de una molécula globular que no es capaz de atravesar la membrana (**Harris 1989**).

MM.7.1.Tabla. 1. Membranas Minitan

Para el proceso de ultrafiltración se partió de 50 ml de una solución en agua de Proteosa Peptona N° 3 y de Primatona Sheffield HS ambas al 4% (p/v). Mediante este proceso se logró obtener una fracción de **PP3** y **PSH** con un peso molecular teórico mayor y menor de 10000 Da, así como una fracción teórica menor de 1000 Da.

Además se consiguió una fracción capaz de filtrar por una membrana de NMWC 10000 Da pero que queda retenida en una membrana de NMWC 1000 Da. Cada fracción se volvió a concentrar a su volumen original (concentración equivalente 4%) y se probó en los medios de ensayo (**X**, **X+Y**, **X+HP.S** y **X+HPS+Y**).

MM.7.2. DIÁLISIS

La diálisis se realizó empleando membranas de celulosa Visking (Medicell Internacional Ltd., London. UK). Las propiedades de permeabilidad de estas membranas permiten la difusión de compuestos de peso molecular (PM) menos de 10000 Daltons (Da) en solución acuosa, reteniendo aquellos compuestos de mayor peso molecular.

Se dializaron 50 ml de soluciones de Proteose Peptone N° 3 (**PP3**) y de Primatona Sheffield (**PHS**) al 4% (p/v) frente a 500 ml de agua destilada durante 12 horas y a continuación se dializó de nuevo frente a otros 500 ml de agua, este proceso se realizó en agitación a temperatura de 4 °C para evitar la contaminación bacteriana.

Una vez terminada la diálisis, tanto la fracción dializada como la retenida se concentraron a vacío a una temperatura de 50 °C hasta 50 ml (dado que el volumen final obtenido dentro del saco de diálisis fue de unos 80 ml). Se consideró que ambas fracciones quedaron a la misma concentración equivalente (4%) que la solución original dializada.

MM.7.3. EXTRACCIÓN CON DISTINTOS SOLVENTES

Se ensayó la extracción de soluciones proteosa peptona N° 3 (**PP3**) y primatona de Sheffield (**PHS**) al 5% (p/v) con diferentes disolventes orgánicos: éter, hexano, acetonitrilo, metanol, propanol y mezclas cloroformo-metanol.

Las fracciones orgánicas se evaporaron a sequedad en rotavapor a 70 °C y se redisolvieron en agua a 100 °C hasta el volumen original (concentración equivalente 5%). Las fracciones acuosas se concentraron al 25% en rotavapor a la misma temperatura para eliminar restos de disolventes orgánicos y se reconstituyó al volumen original para alcanzar una concentración final del 5%.

Ambas fracciones se probaron en los medios de ensayo a una concentración final 1% y 2.5% (p/v).

MM.7.4. PRECIPITACIÓN DE GLICOPROTEÍNAS

Las glicoproteínas pueden ser precipitadas mediante la adición de disolventes orgánicos miscibles en agua. Los factores que influyen en la precipitación son similares a los involucrados en la precipitación isoeléctrica. La precipitación se produce por un descenso de solubilidad y una agregación electrostática cuando el pH se acerca al punto isoeléctrico. El tamaño de la glucoproteína también influye en la precipitación. Para minimizar la desnaturalización de las proteínas la precipitación debe realizarse a temperaturas por debajo de 0 °C. La acetona y etanol son los disolventes más utilizados aunque también puede usarse el metanol o propanol (**Harris and Angal 1989**).

Se efectuó una dilución 1+11 de solución de peptona **PHS** y **PP3** al 5% en alcohol de 96°, se almacenaron a 4 °C durante 2 horas y se centrifugaron a 3500 r.p.m. Se evaporó el sobrenadante y se reconstituyó con 5 ml (concentración equivalente 5%) probándose en los distintos medios de ensayo (**X**, **X+Y**, **X+HP.S** y **X+HP.S+Y**).

MM.7.5. ADSORCIÓN CON LECTINAS

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas que tienen una afinidad selectiva por enlazarse de forma específica y reversible (no covalente) a carbohidratos, ya sean oligosacáridos o glicoproteínas. Esta capacidad de las lectinas permite realizar cromatografía de afinidad inmovilizando en una columna de agarosa la lectina (concanavalina A, Jacalina, lectina de *Arachis Hipogaea*, etc.), utilizándose esta técnica para la separación o purificación de glucoconjugados o polisacáridos. En función del glucoconjugado que queramos separar utilizaremos una lectina u otra como se describe en el apartado I.5.5 (**Debray 1995; Walker 2002**).

MM.7.5.1. Concanavalina A

La concanavalina A (Con A) (C6904 Sigma) es una proteína globular de origen vegetal obtenida a partir del frijol *Canavalia ensiformis*. Esta lectina permite adsorber N-glicosilproteínas (MM.7.5.1. **Figura 1**) que posteriormente mediante una elución competitiva con metil α -manósido se disocia de la lectina (**Debray, 1995; Spik, 1995; Walker, 2002**).

Las condiciones de adsorción fueron (**Debray, 1995**):

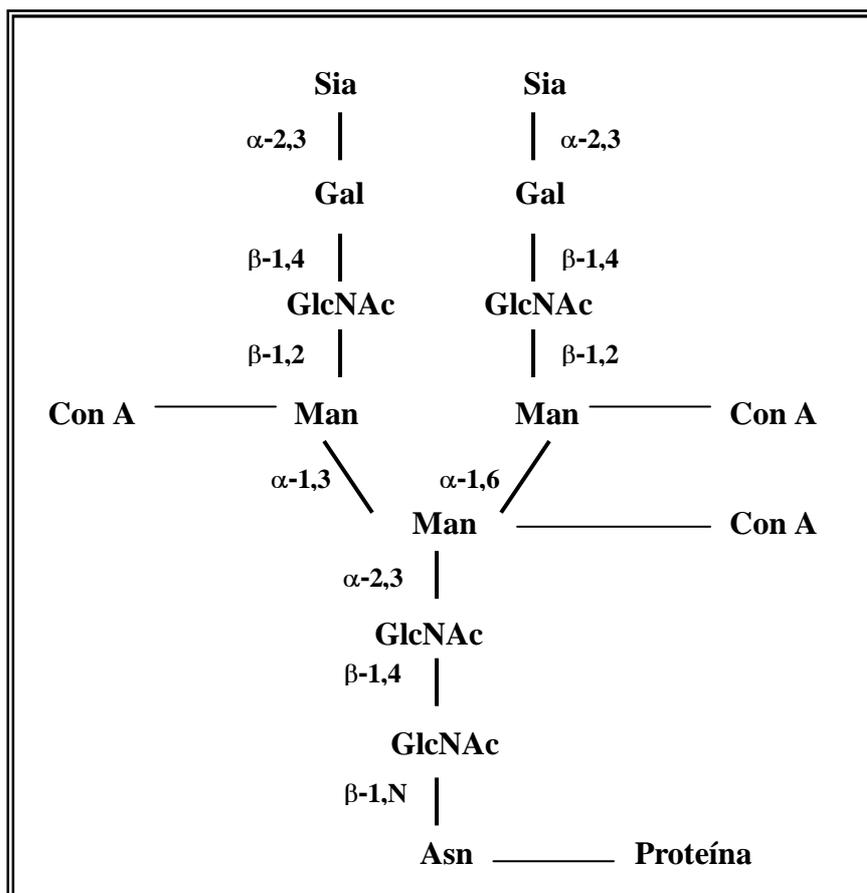
Volumen de muestra: 0.5 ml PSH 6% (p/v)

Columna: Sepharoseth-ConA

Fase móvil: **1º** Buffer de equilibrado; **2º** Metil α -manósido 0.3 M

Flujo: 0.1 ml/min

Buffer de equilibrado: 10 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂ y 1 mM MgCl₂ pH 7.4



* Abreviatura apartado I.2.2.3

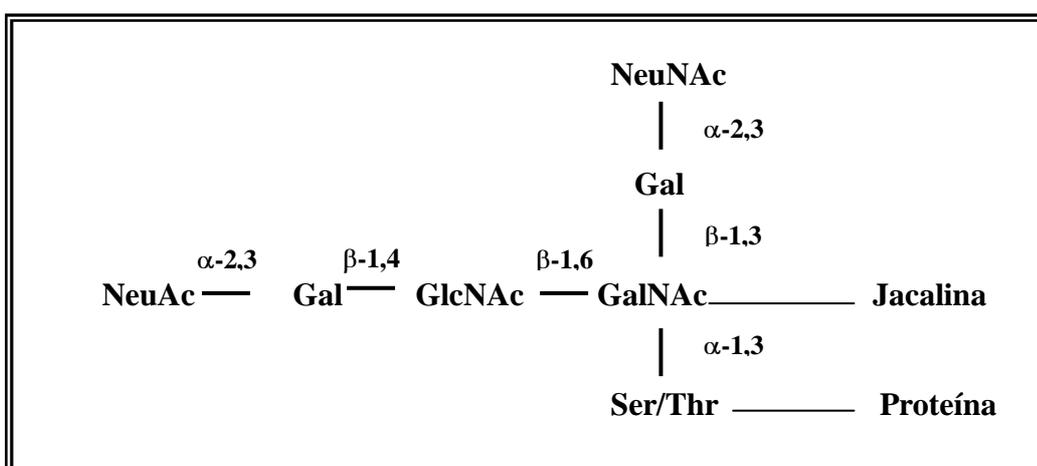
MM.7.5.1. Figura 1. Adsorción de la Concanavalina A a una glicoproteína N-glicosil

Se obtuvieron dos fracciones que se llevaron a sequedad en rotavapor:

- Fracción no retenida (**F1**) se reconstituyó con 4 ml y se añadió a los medios de ensayo (**X**, **X+Y**, **X+HP.S** y **X+HP.S+Y**) a una concentración equivalente 1,2%.
- Fracción eluida con metil α -manósido (**F2**) se reconstituyó con 3 ml y se añadió a los medios de ensayo a una concentración equivalente 1%.

MM.7.5.2. Jacalina

La Jacalina (L5147 Sigma) es una lectina compuesta de cuatro subunidades de diferente tamaño, que se obtiene de la fruta del *Artocarpus integrifolia*. Tiene una alta afinidad por los glucoconjugados del tipo O-glicosilproteínas preferentemente galactosil (β -1,3) N-acetilgalactosamina, dicha adsorción se muestra en MM.7.5.2. **Figura 1:**



* Abreviatura apartado I.2.2.3

MM.7.5.2. Figura 1. Adsorción de la Jacalina a una glicoproteína O-glicosil

La separación de estos carbohidratos de la matriz se realizó con una elución de melibiosa en buffer fosfato (PBS) (**Debray 1995; Spik 1995; Walker 2002**).

Las condiciones de adsorción fueron (**Debray, 1995**):

Volumen de muestra: 2 ml PP3 2% (p/v)

Columna: Sepharoseth-Jacalina

Fase móvil: **1º** Buffer de equilibrado; **2º** Melibiosa 0.1 M

Flujo: 0.5 ml/min

Buffer de equilibrado: 10 mM Tris-HCl, 0.07 M NaCl pH 7.4

Se obtuvieron dos fracciones que se llevaron a sequedad en rotavapor:

- Fracción no retenida (**F1**) 5 ml se concentró a 3 ml y se incluyó en los medios de ensayo (**X**, **X+Y**, **X+HP.S** y **X+HP.S+Y**) a una concentración equivalente 1.5%.
- Fracción eluida con melódiosa (**F2**) 5 ml se concentró a 3 ml y se incluyó en los medios de ensayo a una concentración equivalente 1.5%.

MM.7.5.3. Lectina de *Arachis hypogaea*

La lectina de *Arachis hypogaea* (L6646 Sigma) es una lectina formada por cuatro subunidades idénticas que se obtiene del cacahuete, tiene una gran afinidad por los galactoconjugados igual que la Jacalina (**Debray 1995; Spik 1995; Walker 2002**).

Las condiciones de adsorción fueron (**Debray, 1995**):

Volumen de muestra: 1 ml PP3 4% (p/v)

Columna: Sepharoseth-*Arachis hypogaea*

Fase móvil: **1º** Buffer de equilibrado; **2º** Melibiosa 0.1 M

Flujo: 0.5 ml/min

Buffer de equilibrado: 10 mM Tris-HCl, 0.07 M NaCl pH 7.5

En esta ocasión solo se obtuvo una fracción no retenida (**F1**), 4 ml que se concentraron hasta 3 ml en rotavapor incluyéndose en los medios de ensayo **X**, **X+Y**, **X+HP.S** y **X+HP.S+Y** a una concentración equivalente 1.2%.

MM.7.5.4. Lectina de *triticum vulgare*

La lectina de *Triticum vulgare* (L9640 Sigma) es una lectina que se obtiene del germen de trigo, tiene una gran afinidad por los residuos N-acetil- β -D-glucosamina (**Debray 1995; Spik 1995; Walker 2002**).

Las condiciones de adsorción fueron (**Debray, 1995**):

Volumen de muestra: 1 ml PP3 4% (p/v)

Columna: Sepharoseth- *Triticum vulgare*

Fase móvil: **1º** Buffer de equilibrado; **2º** N-acetilglucosamina 0.5 M

Flujo: 0.5 ml/min

Buffer de equilibrado: 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl pH 7.4

De la misma manera que antes se obtuvo una fracción no retenida (**F1**), 4 ml que se concentraron hasta 3 ml en rotavapor y que se incorporó a los medios de ensayo **X**, **X+Y**, **X+HP.S** y **X+HP.S+Y** a una concentración equivalente 1.2%.

MM.7.6. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO SIÁLICO

Como ya comentamos en el apartado **MM.5** el ácido siálico es el término genérico de un compuesto de nueve carbonos que se forma de un azúcar donde los grupos amino se sustituyen por N-acetil o N-glicosil de ahí que también se llame N-acetilneurámico y N-glicosilneurámico respectivamente. Las glicoproteínas resultan del acoplamiento covalente de carbohidratos con proteínas, uno de estos carbohidratos es el ácido siálico (**Debray 1995; Spik 1995; Walker 2002**).

Para determinar si la **PP3**, la **PSH** y la peptona de estómago de oveja (**MM. 11.7.1**) contienen ácido siálico se utilizó un ensayo colorimétrico de ácido siálico para suero humano (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany).

El principio del test es el siguiente: Se hidroliza las uniones de ácido siálico con neuraminidasa liberando ácido N-acetilneuramínico el cual en presencia de la N-acetilneuramínico-aldolasa se forma N-acetilmanosamina y piruvato. El piruvato es oxidado en presencia de $MgCl_2$, Flavin Adenin dinucleótido y tiamina pirofosfato por la piruvato oxidasa a acetilfosfato, CO_2 y H_2O_2 . La cantidad de H_2O_2 formado es equivalente al ácido N-acetilmuramínico libre. El peróxido de hidrógeno en presencia de peroxidasa, 4-aminoantipirina y N-etil-N-2-hidroxi-etil-3-toluidina se convierte en un colorante violeta que absorbe a 550 nm.

Para realizar la experiencia además de las muestras problema (**PP3**, **PHS** y peptona de estómago de oveja) se necesitó un suero standard (que contiene el Kit), y agua como reactivo blanco. A cada tubo se le incorporó las soluciones (A + B) las cuales contienen las enzimas y reactivos necesarios para que se den las reacciones anteriores.

Todas las soluciones se incubaron 20 min a 37 °C, seguidamente se le añadió detergente y se midió la absorbancia a 550 nm. Para medir la absorbancia se utilizó un Spectronic 20 (Milton Roy, New York. USA).

MM.7.7. PRECIPITACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La mayoría de los métodos de lisis de tejido animal provocan la aparición de ácidos nucleicos (ADN y ARN) y ribosomas en el sobrenadante. Estos deben ser eliminados porque pueden causar problemas de viscosidad e interferencias en una posterior cromatografía, p.e., para separar proteínas. Los métodos utilizados para precipitar los ácidos nucleicos son variados, nosotros utilizamos:

Sulfato de protamina

Las protaminas son las proteínas más simples y sencillas que se conocen de carácter básico fuerte, muy soluble en agua y no coagulable por el calor. Se componen casi exclusivamente de diaminoácidos, especialmente arginina. Se localizan en el esperma de pescados. El sulfato de protamina actúa como un polícatión capaz de precipitar ácidos nucleicos u otros orgánulos celulares (**Harris and Angal 1989**).

Se utilizó para precipitar ácidos nucleicos con sulfato de protamina 5 mg para 5 ml de **PHS** y **PP3** al 10% (p/v).

Cell debris remover

Cell debris remover (Whatman International Ltd, Springfield Mill. UK) es un dietilaminoetil derivado de celulosa utilizado para el aclaramiento de lisados crudos después de una filtración o centrifugación inicial. Este producto es capaz de adsorber mediante interacciones iónicas e hidrofóbicas, lípidos, ácidos grasos, ácidos nucleicos, células enteras o fragmentadas, y otros contaminantes que interfieren en la purificación de biopolímeros.

Se utilizó para aclarar 10 ml de **PSH** y **PP3** al 10% (p/v) con 0.5 g de cell debris.

MM.8. HIDRÓLISIS DE PEPTONAS**MM.8.1. ACCIÓN DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS SOBRE PRIMATONA SHEFFIELD (PHS) Y PROTEOSA PEPTONA Nº 3 (PP3)**

Soluciones de **PHS** y **PP3** al 5% (p/v) se sometieron a la acción de diferentes enzimas proteolíticas que se describen en el apartado I.3.4 y cuyas condiciones de actuación se muestra en la **MM.8.1. Tabla 1**. La proporción enzima-peptona fue 1:40 (p. e., 25 mg de pepsina por gramo de peptona), para cada solución se ajustó el pH y la temperatura según la enzima utilizada, y se incubó durante 10 horas, transcurrido este tiempo la enzima se inactivó por ebullición.

| Enzimas | pH óptimo | T° óptima | Estabilizador |
|----------------------------|--------------|--------------|---------------------------------------|
| Pepsina (P 7000 Sigma): | 2.5 | 45 °C | |
| Tripsina (T 4799 Sigma): | 7.5 | 45 °C | CaCl ₂ |
| Proteinasa K (Merck) | 7.5 | 60 °C | |
| Termolisina (P1512 Sigma) | 7.5 | 50 °C | CaCl ₂ |
| Pronasa (53702 Calbiochem) | 7.5 | 50 °C | CaCl ₂ |
| Ficina (F 4125 Sigma) | 7.5 | 50 °C | CaCl ₂ |
| Papaina (P3375 Sigma) | 7.5 | 50 °C | CaCl ₂ y Mercaptoetanol |

MM.8.1.Tabla 1. Enzimas proteolíticos

La adición 1 mM cloruro cálcico (CaCl₂) en algunas enzimas tiene como finalidad retardar la autólisis de éstas, en el caso de la papaina se incorporó además mercaptoetanol para romper los puentes disulfuro de las proteínas.

Cada hidrolizado enzimático de **PHS** y **PP3** se incluyó a una concentración final de 2.5% (p/v) en los medios de ensayo, ajustando su pH a 7 con NaOH salvo que se indique lo contrario antes de incorporarlo al medio de cultivo.

MM.8.2. ACCIÓN DEL ÁCIDO CLORHÍDRICO SOBRE PRIMATONA SHEFFIELD Y PROTEOSA PEPTONA Nº 3

Se prepararon hidrolizados con HCl de **PP3** y **PHS**. Para ello se realizaron soluciones de estas peptonas al 1% (p/v) en HCl concentrado (~ 11 N) y en HCl 6 N. Las soluciones en HCl concentrado se mantuvieron a 37 °C 72 horas y las soluciones en HCl 6 N se mantuvieron a 100 °C durante 8 horas.

Completada la hidrólisis la solución resultante (prácticamente negra) se diluyó con agua (1+4) y se llevó a sequedad en rotavapor. Se redisolvió en agua a una concentración equivalente del 4% (p/v) y se neutralizó con NaOH 1 M.

Dado que los productos resultantes son de color muy oscuro la determinación de actividad se efectuó sobre membranas Sartorius estériles colocadas sobre los medios de ensayo como se describe en el apartado MM.1.

MM.9. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR O GEL FILTRACIÓN DE LA PROTEOSA PEPTONA Nº 3

Este tipo de cromatografía permite separar los componentes de una mezcla en función de los pesos moleculares, aunque también pueden intervenir otras interacciones como la adsorción sobre la matriz como se describe en el apartado I.5.3. Las matrices utilizadas en exclusión molecular combinan las excelentes propiedades de gel filtración del dextrano con la alta estabilidad físico-química de las uniones covalentes cruzadas de agarosa. Aunque la composición del eluyente no es importante en los mecanismos de separación de las moléculas de la muestra si puede conducir a cambios conformacionales, disociación de subunidades proteicas, etc. Por esta razón el eluyente más utilizado en gel filtración es el agua más un buffer que modifique la fuerza iónica aunque se puede utilizar cualquier eluyente (**Gel filtración 1997**).

Se utilizó el cromatógrafo AKTA basic 10/100 (Amersham Pharmacia Biotech, Upsala. Sweden). El seguimiento de la cromatografía se realizó a tres longitudes de onda, 215 nm longitud a la cual absorbe el enlace peptídico, 256 nm longitud a la cual absorben determinados pigmentos y 280 nm a la cual absorbe el grupo fenilo de los aminoácidos aromáticos.

MM.9.1. CROMATOGRAFÍA GEL FILTRACIÓN DE LA PROTEOSA PEPTONA Nº 3 EN SUPERDEX® PEPTIDE

Superdex® peptide HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech, Upsala. Sweden) es una columna preparada con superdex de alta resolución que presenta un diámetro de 10 mm y tiene una altura de 30-31 cm cuyo volumen de columna es de 94 ml y tiene un tamaño de partícula de 13-15 μm . Tiene una excelente resolución, siendo capaz de separar péptidos cuyo peso molecular oscila entre 100-7000 Da.

Se utilizó como eluyente agua que es lo habitual en gel filtración y acetonitrilo (20%) con ácido trifluoroacético (0.1%). Se usó el acetonitrilo por su carácter volátil y capacidad de separar péptidos muy hidrofobicos unidos a la matriz del gel como se describió en el apartado I.5.3.2.

Para eliminar posibles interacciones iónicas de tipo inespecífico entre moléculas de la muestra y la matriz se modificó la fuerza iónica utilizando cloruro sódico (NaCl) 0.1 M o se usó un agente caotrópico como el cloruro de guanidina 6M.

MM.9.1.1. Superdex® Peptide. Acetonitrilo-Ácido Trifluoroacético

Volumen de muestra: 0.5 ml PP3 2.5% (p/v)

Columna: Superdex® peptide HR 10/30

Fase móvil: 1º Acetonitrilo 20%-TFA 0.1%; 2º Gradiente: Acetonitrilo 30%-TFA 0.1%

Flujo: 0.5 ml/min.

MM.9.1.2. Superdex® Peptide. Agua-Cloruro sódico

Volumen de muestra: 0.5 ml PP3 2.5% (p/v)

Columna: Superdex® peptide HR 10/30

Fase móvil: 1º Agua; 2º Gradiente: Agua-CINa 0.1M

Flujo: 0.5 ml/min.

MM.9.1.3. Superdex® Peptide. Agua-Cloruro de guanidina

Columna: Superdex® peptide HR 10/30

Fase móvil: 1º Agua y 2º Gradiente: Agua-Cloruro de guanidina 6M

Flujo: 1º 0.5 ml/min y 2º 1 ml/min

MM.9.2. CROMATOGRAFÍA GEL FILTRACIÓN DE LA PROTEOSA PEPTONA Nº 3 EN SEPHADEX® G25 SUPERFINE

Se preparó una columna de Sephadex® G25 superfine (Amersham Pharmacia Biotech, Upsala. Sweden) que presenta un diámetro de 16 mm y tiene una altura de 55 cm, cuyo volumen de columna es de 442 ml y tiene un tamaño de partícula de 13-15 µm. La matriz de Sephadex® está formada por puentes de unión entre agarosa y dextrano. Tiene una resolución capaz de separar péptidos cuyo peso molecular oscila entre 1000-5000 Da.

Se utilizó como eluyente agua y bicarbonato amónico, este último sobre todo para aumentar la fuerza iónica y disminuir las posibles interacciones entre la matriz y los componentes activos de la **PP3**, además de por su carácter volátil (**Gel filtración 1997**).

MM.9.2.1. Cromatografía Sephadex® G25 Superfine. Agua

Volumen de muestra: 1 ml PP3 2.5% (p/v)

Columna: Sephadex® G25 superfine 1.6 x 55

Fase móvil: Agua

Flujo: 1 ml/min

MM.9.2.2. Cromatografía Sephadex® G25 Superfine. Agua-Bicarbonato amónico

Volumen de muestra: 1 ml PP3 2.5% (p/v)

Columna: Sephadex® G25 superfine 1.6 x 55

Fase móvil: 1º Agua y 2º Agua-Bicarbonato amónico 0.2M

Flujo: 1 ml/min

MM.9.3. CROMATOGRAFÍA GEL FILTRACIÓN DE LA PROTEOSA PEPTONA Nº 3 EN SUPERDEX® 30

Se preparó una columna de Superdex® 30 (Amersham Pharmacia Biotech, Upsala. Sweden) que presenta un diámetro de 16 mm y tiene una altura de 55 cm cuyo volumen de columna es de 442 ml y tiene un tamaño de partícula de 24-44 μm . Tiene una resolución capaz de separar péptidos cuyo peso molecular oscila entre 3000-10000 Da.

En esta cromatografía se utilizó como eluyentes bicarbonato y formiato amónico para extraer el **factor β** de la **PP3** que se adsorben a la matriz de Superdex® 30 con la cromatografía en agua (**RD. 7.1.3**). El bicarbonato amónico se utilizó además, porque produce una aumento en la fuerza iónica y en el pH, y por su volatilidad que permite evaporar o liofilizar la muestra (**Gel filtración 1997**).

El formiato amónico se recurrió a él no solo para eliminar posibles interacciones hidrofóbicas que existan entre la matriz y el **factor β** de la proteosa peptona Nº 3, sino también por su carácter volátil que permite evaporar o liofilizar la muestra (**Gel filtración 1997**).

MM.9.3.1. Cromatografía Superdex® 30. Agua

Volumen de muestra: 4 ml PP3 2.5% (p/v)

Columna: Superdex® 30 1.6 x 55

Fase móvil: Agua

Flujo: 1 ml/min

MM.9.3.2. Cromatografía Superdex® 30. Agua-Formiato amónico

Columna: Superdex® 30 1.6 x 55

Fase móvil: Agua-Formiato amónico 0.2 M

Flujo: 1 ml/min

MM.9.3.3. Cromatografía Superdex[®] 30. Agua-Bicarbonato amónico

Columna: Superdex[®] 30 1.6 x 55

Fase móvil: 1º Agua y 2º Agua-Bicarbonato amónico 0.2M

Flujo: 1 ml/min

MM.9.3.4. Cromatografía Superdex[®] 30. Bicarbonato amónico

Volumen de muestra: 4 ml PP3 2.5% (p/v)

Columna: Superdex[®] 30 1.6 x 55

Fase móvil: Agua-Bicarbonato amónico 0.1M y 0.2M

Flujo: 1 ml/min

MM.9.4. CROMATOGRFÍA GEL FILTRACIÓN DE LA PROTEOSA PEPTONA Nº 3 EN HILOADth SUPERDEX

HiLOADth Superdex 30 prep grade 26/60 (Amersham Pharmacia Biotech, Upsala. Sweden) es una columna preparada con Superdex[®] (agarosa/dextrano) de alta resolución que presenta un diámetro de 16 mm y una longitud de 60 mm, siendo su volumen de columna de 48 ml. El rango de separación de esta columna es < 10000 Da.

El uso de cloruro sódico, bicarbonato amónico se debe a que el **factor** β de la **PP3** se adsorben a la matriz como se indica en el apartado RD.7.1.4. Para romper esta interacción se aumentó la fuerza iónica con dichos eluyentes.

MM.9.4.1. HiLOADth Superdex. Agua-Cloruro sódico

Volumen de muestra: 8 ml PP3 2.5% (p/v)

Columna: HiLOADth Superdex 30 prep grade 26/60

Fase móvil: 1º Agua y 2º Gradiente: Agua-NaCl 0.1 M

Flujo: 2 ml/min

MM.9.4.2. HiLOADth Superdex. Agua-Bicarbonato amónico

Volumen de muestra: 8 ml PP3 2.5% (p/v)

Columna: HiLOADth Superdex 30 prep grade 26/60

Fase móvil: Agua-Bicarbonato amónico 0.1M y 0.2M

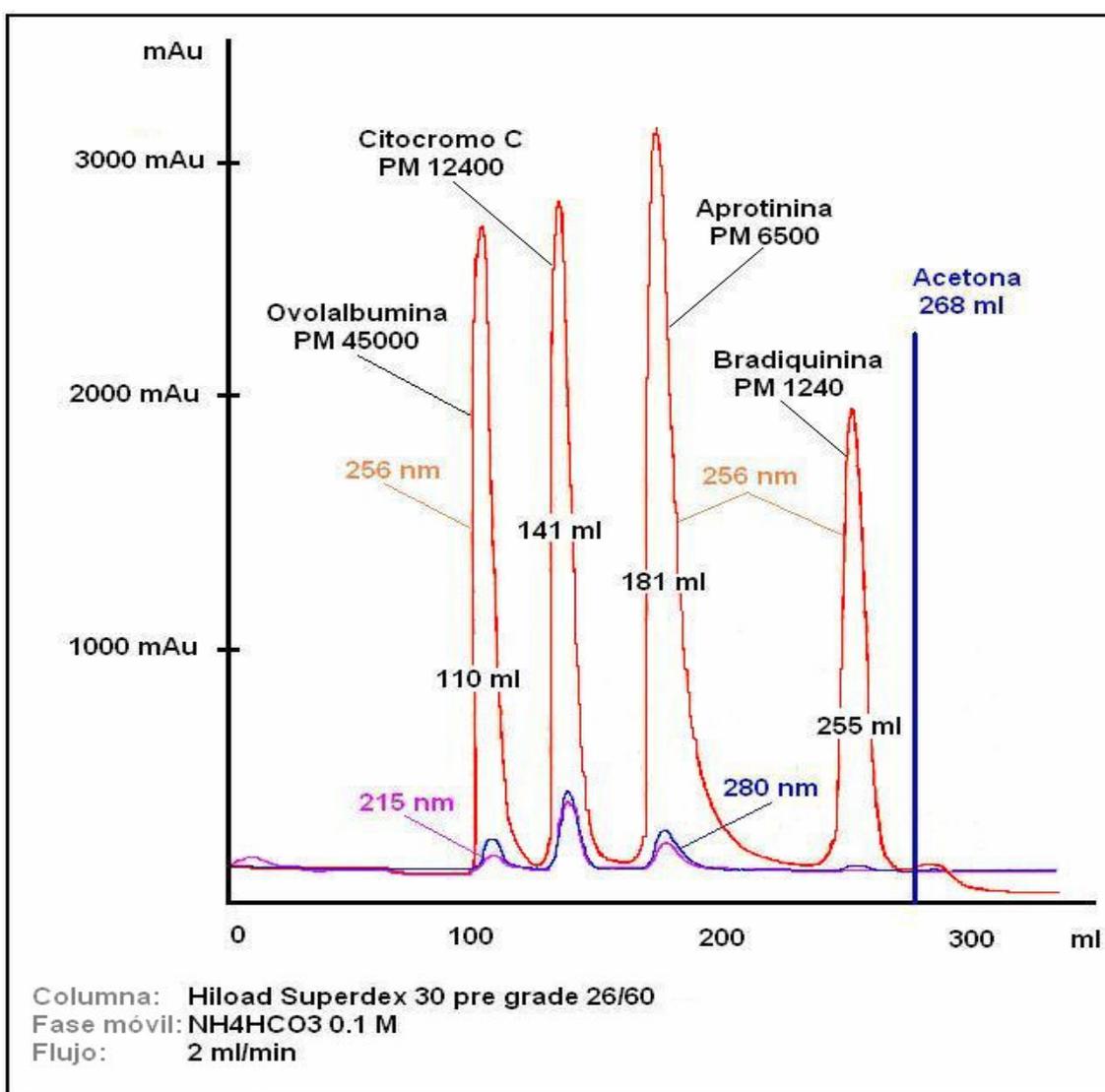
Flujo: 2 ml/min

MM. 9.5. CALIBRACIÓN DE COLUMNAS DE GEL FILTRACIÓN**MM. 9.5.1. Calibración HiLOADth Superdex**

Dado que no fue posible el fraccionamiento de la **PP3** utilizando gel filtración **RD.7.1**, aunque si pudo obtenerse una fracción enriquecida en producto activo a partir de la cromatografía en HiLOADth Superdex fluyendo con bicarbonato amónico.

Se decidió efectuar una calibración de la columna con péptidos y proteínas de peso molecular conocido (Ovoalbumina (PM 46000), Citocromo C (PM 12400), Aprotinina (PM 6500) Bradiquinina (PM 1240) y acetona utilizando como eluyente bicarbonato amónico 0.1 M a un flujo de 2 ml/min (**MM.9.5.1. Figura 1**).

Según la teoría standard que se describió en el apartado **I.5.3**, en gel filtración solo los efectos estéricos contribuyen al comportamiento de elución de las moléculas de soluto. Sin embargo pueden ocurrir interacciones del material empaquetado con las moléculas biológicas con lo cual la molécula eluiría más tarde de lo que se esperaría por su peso molecular (**Gel filtración 1997**).



MM.9.5.1. Figura 1

Comprobamos en el apartado RD.7.1.4 que una parte de los componentes de la peptona eluyen más allá del volumen de elución de la acetona (volumen total de la matriz) que es una molécula pequeña (PM 58), indicando esto, que una parte de componentes de la peptona sufren adsorción en este tipo de columnas y no obedecen a la teoría standard de gel filtración.

Entre estos compuestos retenidos en la columna están el **factor β** , ello indicaría que probablemente no se trate de un polipéptido pues estos eluyen en general en el volumen de columna.

MM. 9.5.2. Calibración Sephadex® G25

Para comprobar que este fenómeno no era exclusivo de HiLOADth Superdex se efectuó una elución en una columna de Sephadex® G-25, con las siguientes condiciones:

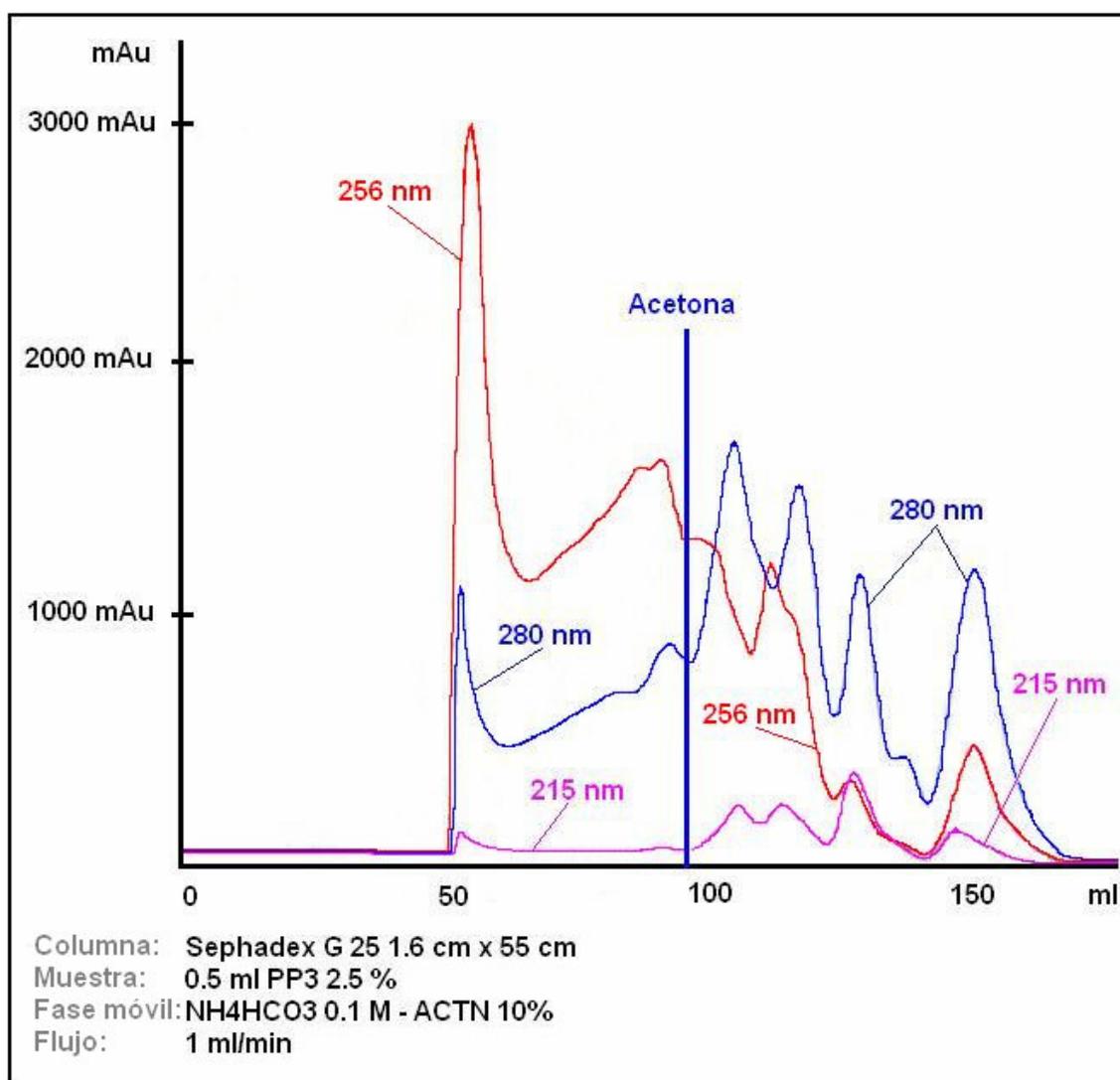
Volumen de muestra: 0.5 ml PP3 2.5% (p/v)

Columna: Sephadex® G25 superfine 1.6 x 55

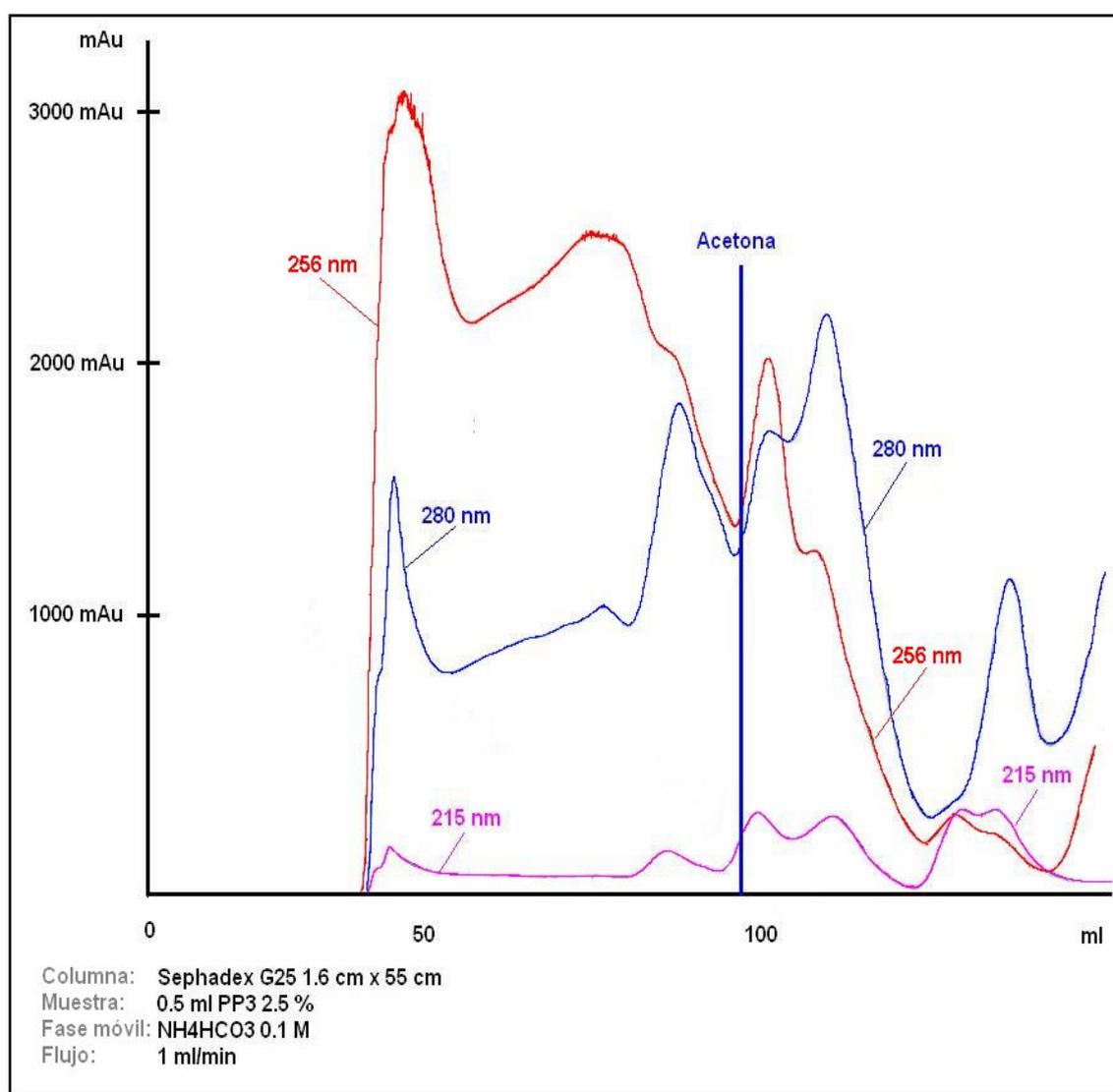
Fase móvil: Agua-Bicarbonato amónico 0.1 M y 1 M; Agua-Bicarbonato amónico 0.1 M-Acetonitrilo 10%

Flujo: 1 ml/min

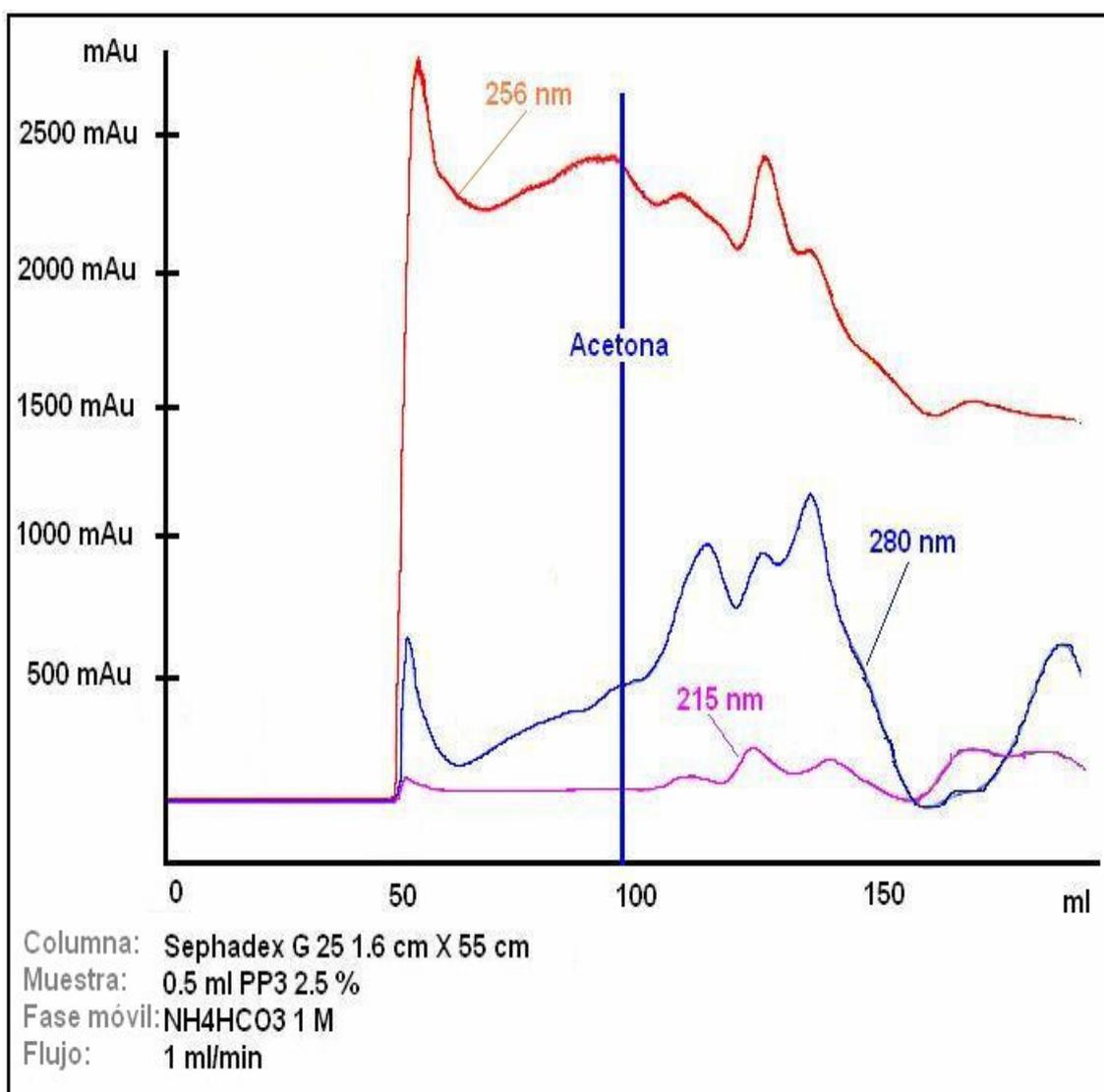
En todos los casos una importante proporción de la peptona eluye más allá del volumen total de la columna teniendo en cuenta el volumen de elución de la acetona, indicando esto que una importante adsorción de compuestos en la columna no se elimina ni con acetonitrilo (MM.9.5.2. **Figura 1**) ni incrementando la fuerza iónica del eluyente con soluciones de bicarbonato amónico a diferente molaridad (0.1 M y 1M) (MM.9.5.2. **Figura 2 y 3**).



MM.9.5.2. Figura 1



MM.9.5.2. Figura 2



MM.9.5.2. Figura 3

MM.10. CROMATOGRAFÍA EN FASE REVERSA DE LA PROTEOSA PEPTONA Nº 3

La cromatografía de adsorción o fase reversa como se describió en el apartado I.5.4, está basada en las interacciones químicas entre las moléculas de soluto y los ligandos hidrofóbicos específicos que forman la matriz de la columna. La separación de los componentes de la muestra va a depender de las propiedades de la matriz, de la hidrofobicidad del soluto y de la composición de la fase móvil. La elución de polipéptidos en cromatografía en fase reversa se logra usando elución en gradiente. Estas modificaciones en la polaridad conllevan a pequeños cambios en las interacciones entre los péptidos y la superficie de la fase reversa afectando a la selectividad y con ello a la resolución. El disolvente orgánico más utilizado para modificar dicha polaridad es el acetonitrilo (ACNT). Otra manera de controlar el tiempo de retención es incorporando contraiones que conducen a un incremento de la hidrofobicidad, el más utilizado es el ácido trifluoroacético (TFA) (**Reversed Phase Chromatography 1996**).

Para la cromatografía se utilizó el cromatógrafo AKTA basic 10/100 (Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Sweden). El seguimiento de la misma se realizó al igual que en el apartado MM.9, a tres longitudes de onda (215, 256 y 280 nm).

MM.10.1. COLUMN WATER SPHERISORB®

Se utilizó una columna Water Spherisorb® C-18 ODS2 (DS Water, Atlanta, USA), con una matriz de silica cuyo tamaño de partícula es 5 µm y un tamaño de poro de 80 Å, unida por grupos C18 octadecilsulfónico (ODS).

Las condiciones de la cromatografía son:

Volumen de muestra: 2 ml PP3 4% (p/v)

Columna: Water Spherisorb[®] C-18 ODS2, Analítica: 4.6 x 250 mm.

Semiprep: 20 x 250 mm

Fase móvil: Eluyente A: Agua, Eluyente B: Acetonitrilo

Flujo: 10 ml/min

MM.10.2. COLUMNNA SOURCEth

Se utilizó una columna de Sourceth 15 RPC preparada (Amersham Pharmacia Biotech, Upsala. Sweden), cuyo diámetro es 4.6 mm y tiene una altura de 10 cm. Está formada por una matriz polimérica rígida de poliestireno/divinilbenceno con un tamaño de partícula de 15 µm.

Las condiciones de la cromatografía son:

Volumen de muestra: 0.5 PP3 2.5% (p/v)

Columna: Sourceth HPLC 15RPC ST 4.6 x 100 mm.

Fase móvil: Eluyente A: Agua-TFA 0.1%, Eluyente B: ACTN-TFA 0.1%

Flujo: 2 ml/min

MM.10.3. COLUMNNA VYDAC[®]

Se utilizó una columna semipreparativa Vydac[®] 218 TP 510 (Grade & CO, St Louis. USA) con un altura de 25 cm y un diámetro de 10 mm cuya fase estacionario esta compuesta de partículas de silica de 5 µm con un tamaño de poro de 300 Å enlazada con grupos alifáticos octadecil. Se utilizaron diferentes eluyentes como fase móvil siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las condiciones de la cromatografía son:

Volumen de muestra: 2 ml PP3 2.5% (p/v)

Columna: Vydac[®] 218 TP 510 Reversed fase

Fase móvil: Eluyente A: Agua, Eluyente B: Acetonitrilo; Eluyente A:

Agua-TFA 0.1%, Eluyente B: Acetonitrilo-TFA 0.1%; Eluyente A: Agua

HCl 0.2%, Eluyente B: Acetonitrilo-HCl 0.2%

Flujo: 2 ml/min

MM.11. HIDROLIZADOS PRODUCIDOS EN EL LABORATORIO

Se estudió la capacidad de soportar la producción de pigmento por EGB cuando se añadió a los medios de ensayo, diferentes extractos e hidrolizados enzimáticos obtenidos como se describe en el apartado I.3.5, I.3.5.2 y I.3.6 de distintos tejidos animales a una concentración final en el medio del 1% y 2.5% (p/v).

MM.11.1. HIDROLIZADOS DE CARNE DE VACUNO

La carne fresca como el músculo es la fuente proteica más utilizada para obtener peptonas de alta calidad nutricional (**Bridson 1978**). Por ello en la obtención de los distintos hidrolizados y extractos en este trabajo se utilizó principalmente tejido vacuno de distintas zonas anatómicas.

MM.11.1.1. Hidrolizado de carne de vacuno con pepsina

Los dominios compactos de las proteínas son generalmente resistentes a la proteólisis, en cambio las zonas superficiales están más expuestas a la acción de la enzima. Por lo tanto, la degradación de una fuente proteica en este caso carne de vacuno será más o menos completa si las proteínas están desnaturalizadas, es decir, han perdido las estructuras de orden superior (secundarias, terciarias y cuaternarias) que dando únicamente la cadena peptídico. Esta pérdida de la conformación de algunas proteínas hace que pierdan su estabilidad y precipiten (**Walker 2002**).

La desnaturalización proteica puede realizarse por calor, con solución de ácido tricloroacético 5%, ácido clorhídrico, aumentando la fuerza iónica con sulfato amónico, urea o con clorhidrato de guanidina (**Walker 2002**). Señalar que la desnaturalización de las proteínas de los tejidos salvo que se indique lo contrario siempre se realizó por ebullición.

Se utilizó 100 g de carne fresca de lomo de ternera que se mezclaron con 300 ml de agua que se homogeneizaron con una trituradora. Este extracto se hirvió durante 15 min para desnaturalizar las proteínas y permitir la acción de la enzima proteolítica, una vez frío se volvió a homogeneizar con la picadora. Seguidamente se añadió 0.3 g de pepsina (P7000 Sigma) y se acidificó con HCl hasta pH 2.5.

La solución se dejó a 50 °C durante 12 horas, agitándose continuamente y manteniendo el pH 2.5. Pasado este tiempo se añadió 0.1 g de pepsina y se continuó 12 horas más la hidrólisis. Posteriormente el extracto de carne se llevó a ebullición durante 15 min para inactivar la enzima, se filtró y se neutralizó con NaOH hasta pH 7 (MM.11.1.1. **Figura 1**). Se separó de este hidrolizado pépsico total una alícuota, que se llevó a sequedad en rotavapor y se pesó obteniéndose 8% respecto al peso inicial.

MM.11.1.1.1. Influencia de la acidificación con fosfórico y neutralización con amoníaco en la hidrólisis de carne de vacuno

Se utilizó ácido fosfórico para la hidrólisis y amoníaco para neutralizar por dos razones, la primera porque la obtención de la proteosa peptona N° 3 por parte de BD-Difco según se indica en el manual de Difco se basó en variaciones de los parámetros de hidrólisis de los digestos enzimáticos utilizados para la obtención de la proteosa peptona (**Difco 1998**), y la segunda razón para evitar una alta concentración NaCl en el medio de cultivo.

Se ensayaron en paralelo hidrolizados con pepsina de carne de ternera (HP.C herv) siguiendo el procedimiento anterior bien acidificados con HCl o con ácido fosfórico (H_2PO_4). La neutralización en la etapa final se realizó bien con NaOH o con NH_3 (MM.11.1.1. **Figura 1**).

MM.11.1.1.2. Influencia de una extracción previa con agua en la hidrólisis de carne de vacuno

En la hidrólisis de un tejido animal las proteínas conjugadas (fosfoproteínas, cromoproteínas, nucleoproteínas, glucoproteínas, lipoproteínas, metaloproteínas, etc.) se separan en proteínas simples, que a su vez se desdoblán en péptidos, polipéptidos, y distintos subproductos derivados del grupo prostético (ácido fosfórico, porfirinas, nucleótidos, nucleósidos, hidratos de carbono, lípidos, coenzimas, sales, oligoelementos etc.) (**Berenyi 1974**).

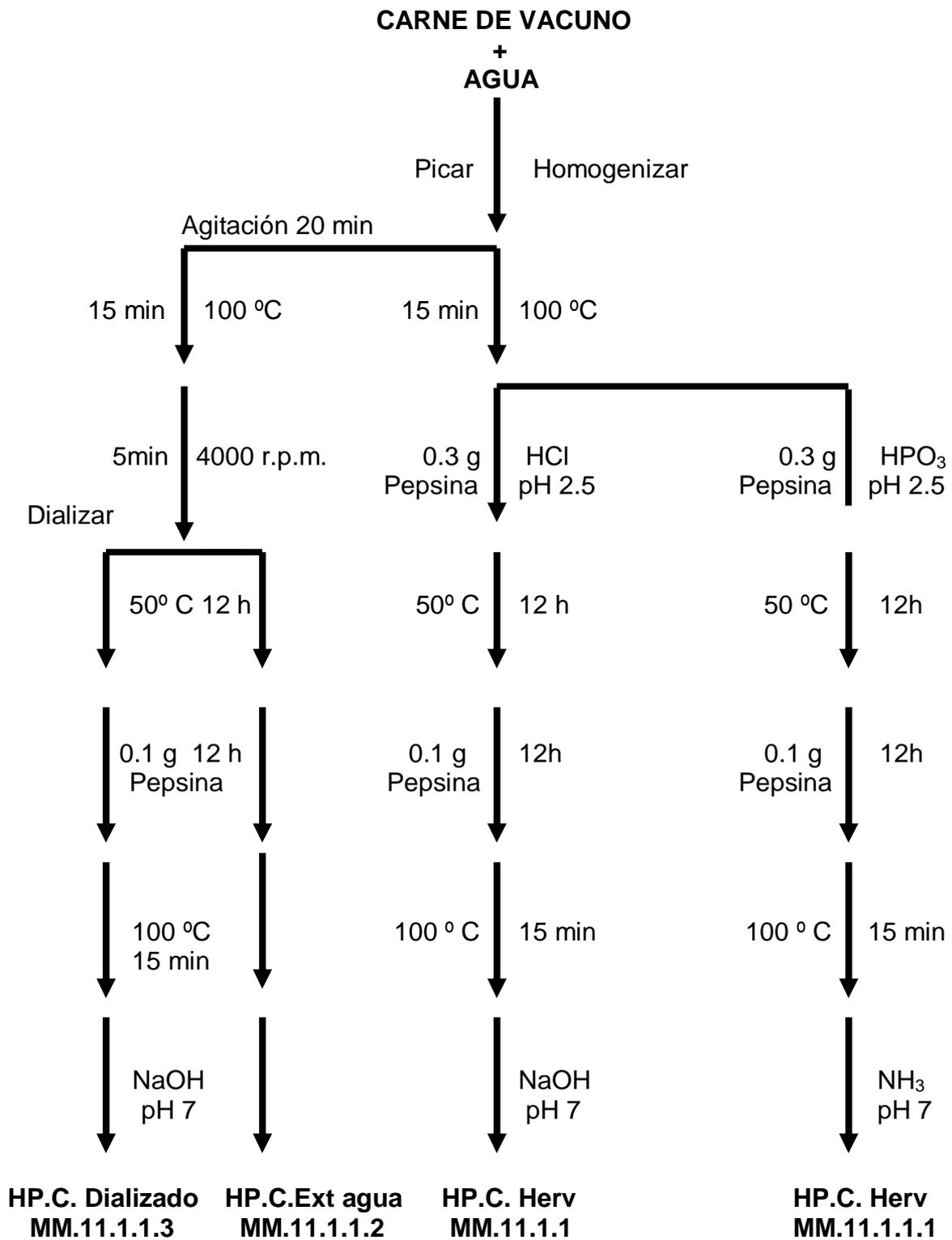
Para eliminar la parte soluble de este pool metabólico se realizó una extracción con agua, previa al proceso de hidrólisis. Se homogeneizó 20 g de carne de ternera picada con 60 ml de agua en agitación 20 min, se hirvió durante 15 min y se centrifugó durante 5 min a 4.000 r.p.m. El precipitado se lavó con agua varias veces se centrifugó y se decantó. Posteriormente se realizó la hidrólisis péptica de dicho precipitado se le añadió 20 ml de agua y 0.2 mg de pepsina siguiendo a partir de aquí el mismo proceso que se indica en el apartado MM.11.1.1 (MM.11.1.1. **Figura 1**).

MM.11.1.1.3. Influencia de una diálisis previa en la hidrólisis de carne de vacuno

Con la diálisis lo que pretendemos es eliminar al igual que antes la parte soluble del pool metabólico pero en este caso además eliminamos aquellos compuestos no dializables.

Se homogeneizó al igual que antes 20 g de carne de ternera picada con 60 ml de agua en agitación 20 min, se hirvió durante 15 min y se centrifugó durante 5 min a 4.000 r.p.m. El pellet de carne se dializa frente a 1500 ml de buffer por una membrana de NMWC 10000 obteniéndose una fracción dializada a la cual se realiza la hidrólisis con pepsina descrita en el apartado MM.11.1.1 (MM.11.1.1. **Figura 1**).

MM.11.1.1. **Figura 1.** Diagrama de hidrolizados de carne de vacuno



MM.11.1.1.4. Influencia de modificaciones en los tiempos de hidrólisis sobre la hidrólisis de carne de vacuno con pepsina

Teniendo en cuenta que la proteosa peptona N° 3, de acuerdo con lo indicado por el fabricante se obtiene variando los parámetros de hidrólisis de los digestos enzimáticos utilizados para la obtención de la proteosa peptona (**Difco 1998**). Se comprobó si el tiempo de hidrólisis influía sobre el hidrolizado péptico de carne de vaca.

Para ello se separaron diferentes alícuotas de carne de ternera durante el procedimiento descrito en el apartado **MM.11.1.1** a distintos tiempos (90 min, 3h, 6h, 8h y 16h). Para cada tiempo, el hidrolizado se hirvió 10 min para inactivar la pepsina, se filtró y se neutralizó con NaOH hasta pH 7.

MM.11.1.2. Hidrolizado con pepsina de carne de vacuno previamente desnaturalizada con ácido

En este caso las proteínas del tejido de carne de vacuno se desnaturalizaron no calentando hasta ebullición como en el apartado **MM.11.1.1** sino mediante una solución de ácido clorhídrico (pH 2.5).

Se homogeneizó 100 g de carne de ternera con 300 ml de agua con una picadora. Las proteínas en este caso se coagularon previamente acidificando con HCl el extracto, a continuación se añadió la pepsina y se siguió el mismo proceso que en el apartado **MM.11.1.1** (**MM.11.1.2. Figura 1**).

MM.11.1.3. Hidrolizado de carne de vacuno con otras enzimas proteolíticas

Basando de nuevo en lo descrito en el manual de Difco sobre el proceso de obtención de la **PP3** (**Difco 1998**) se utilizó diferentes enzimas proteolíticas para la hidrólisis del tejido de carne de vacuno.

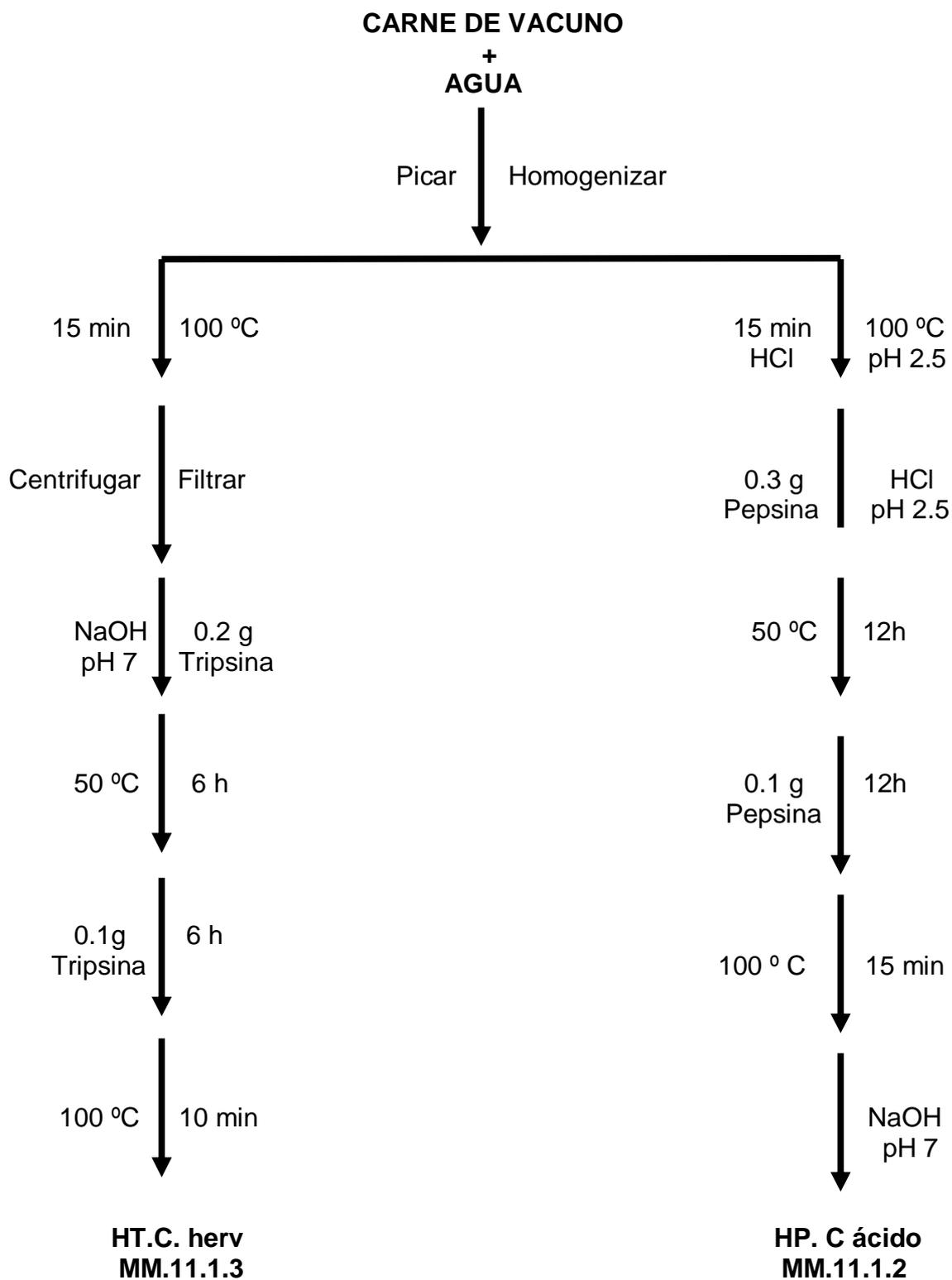
Se empleó una solución 1:3 de carne de ternera y agua, y se hirvió durante de 10-15 min. Una vez que la solución se había enfriado, se centrifugó y filtró, volviéndose a añadir la misma cantidad de agua. A esta solución se ajustó el pH 7 con NaOH, se le añadió 0.2 g de tripsina (T 4799 Sigma) (1% del peso de la carne) y se dejó a 50 °C durante 6 horas. Pasado este tiempo se volvió a añadir 0.1 g de tripsina y se continuó 6 h más la hidrólisis. Transcurrido el proceso, la solución se hirvió 10 min para inactivar a la tripsina (MM.11.1.2. **Figura 1**).

El resto de proteasas como papaína, proteinasa K, termolisina, pronasa y ficina descritas en el apartado I.3.4 se utilizaron siguiendo el procedimiento descrito para el hidrolizado de carne con tripsina adaptando las condiciones de actuación de cada enzima marcadas en el apartado MM.8.1.

MM.11.1.4. Hidrolizados de otros tejidos de vacuno

Además de músculo de vaca, se utilizó también como producto crudo corazón, pulmón, tendón y oreja, por la alta proporción de glicoproteínas que poseen estos tejidos. Concretamente el pulmón contiene colágeno y otros tipos de glicoproteínas unidas al surfactante. El tendón y la oreja son ricos en colágeno, algunos residuos de la hidroxilisina de las moléculas de colágeno poseen carbohidratos unidos covalentemente, haciendo que el colágeno sea una glicoproteína. La unidad de hidratos de carbono más frecuente es un disacárido formado por un residuo de glucosa que está unido por un enlace glicosídico (α -1,2) a un residuo de galactosa. El procedimiento utilizado fue el mismo que en el hidrolizado péptico de carne, apartado MM.11.1.1.

MM.11.1.2. **Figura 1.** Diagrama de hidrolizados de carne de vacuno



MM.11.3. HIDROLIZADOS DE COLÁGENO CON PEPSINA

Además de utilizar tejido animal rico en colágeno por su proporción en glicoproteínas como se ha comentado, también se ensayó diferentes tipos de colágeno comerciales.

Se utilizó colágeno (C-9879 Sigma), colágeno en sobres (Ruff), colágeno hidrolizado (30451-25 Roig Farma) y gelatina (0143 Difco). El procedimiento de hidrólisis con pepsina y con papaína fue el mismo que en la carne de vacuno apartado MM.11.1.1.

MM.11.4. HIDROLIZADO DE SANGRE, HEMOGLOBINA, SUERO Y ALBÚMINA CON PEPSINA

SANGRE

Se empleó la sangre entera como producto para obtener una peptona ya que está posee entre sus componentes hemoglobina, albúmina, aportando al medio de cultivo factores que estimulan el crecimiento de microorganismos.

Se disolvió 100 ml de sangre de caballo (SR0035 Oxoid) en 200 ml agua y se llevo a ebullición durante 15 min. Se añadió 0.3 g de pepsina (P7000 Sigma) y se llevo a pH 2.5 con HCl. La solución se dejó a 55 °C durante 5 horas, agitándola de manera frecuente, cada dos horas se reajustó el pH. Pasadas estas 5 horas se volvió añadir 0.1 g de pepsina y se continuó 5 horas más la hidrólisis. Finalmente se hirvió el hidrolizado durante 15 min y se neutralizó con NaOH hasta pH 7.2.

HEMOGLOBINA

La hemoglobina es el transportador de oxígeno de los eritrocitos, está formada por cuatro cadenas polipeptídicas unidas no covalentemente. Cada cadena posee un grupo prostético responsable de la actividad

biológica llamado hemo que a parte de conferir el color rojo a la misma es el responsable de que se una el oxígeno.

Este grupo hemo consta de una parte orgánica y un átomo de hierro. La parte orgánica corresponde a una protoporfirina formada por cuatro grupos pirrólicos. En los medios de cultivo la hemoglobina aporta al medio factores como la hemina (factor X), Fe^{++} y aminoácidos que estimulan el crecimiento de microorganismos exigentes (*Haemophilus spp.*, *Neisseria spp.*).

Para obtener el hidrolizado de hemoglobina se disolvió 2 g de hemoglobina (08449 Sigma) en 50 ml de agua, y se siguió el mismo procedimiento de hidrólisis utilizado en la sangre.

SUERO

Para comprobar que el efecto fundamental de este hidrolizado es el aporte del péptido activo (**factor α**), se sometió a hidrólisis con pepsina (en las mismas condiciones que se usaron para el suero) una solución de albúmina bovina (A p647 Sigma) al 2.5 %. Para realizar el hidrolizado péptico de suero se siguió lo descrito en el apartado **MM. 4.2.1**

Preparación:

Se disuelve albúmina bovina al 2.5% en agua 50 °C manteniéndose en agitación suave. Una vez disuelta se hierve 30 min, se deja enfriar y se añade una 3% (respecto al peso de albúmina) de pepsina (P7000 Sigma). Se acidifica con HCl hasta pH 2.5 y se mantiene a 55 °C en agitación continua durante 5 horas (reajustando el pH cada 2 horas). Se añade un 1% más de pepsina y se continúa 5 horas más la hidrólisis. Se inactiva la pepsina con agua hirviendo 15 min. Antes de utilizar se neutralizó (pH 7.2) con NaOH concentrada.

MM.11.5. HIDROLIZADO DE CARNE DE POLLO CON PEPSINA

Se utilizó como producto crudo pollo picado, el procedimiento utilizado fue el mismo que en el hidrolizado de carne con pepsina apartado MM.11.1.1.

MM.11.6. HIDROLIZADO DE CLARA DE HUEVO

Por su alto contenido en proteínas se utilizó la clara de huevo para obtener una peptona. Se siguieron los mismos pasos que en el hidrolizado de carne con pepsina apartado MM.11.1.1.

MM.11.7. HIDROLIZADO Y EXTRACTOS DE ESTÓMAGO E INTESTINO DE OVEJA

El estómago de la oveja está constituido por cuatro estómagos completamente diferenciados (rumen, retículo, omaso y abomaso) como se describe en el apartado I.2.1.5. Se utilizó como tejido para la obtención de hidrolizados fundamentalmente por su alto contenido en mucinas, un tipo de proteínas glicosiladas con uniones O-glicosil α 1-3 N-acetilgalactosamina y L-serina o L-treonina.

MM.11.7.1. Hidrolizados de estómago de oveja con pepsina

MM.11.7.1.1. Hidrolizado de estómago de oveja con pepsina

Al igual que en la carne de vacuno, antes del proceso de hidrólisis con pepsina, las proteínas del tejido se desnaturalizaron por calor, calentando una solución de tejido a ebullición.

Se homogeneizó con una picadora, 10 g de tejido de estómago de oveja con 20 ml de agua, el procedimiento utilizado fue el mismo que en el hidrolizado con pepsina de carne de vacuno apartado MM.12.1.1 (MM.11.7.1.1. **Figura 1**).

MM.11.7.1.2. Hidrolizado de estómago de oveja con pepsina desnaturalizado previamente con ácido

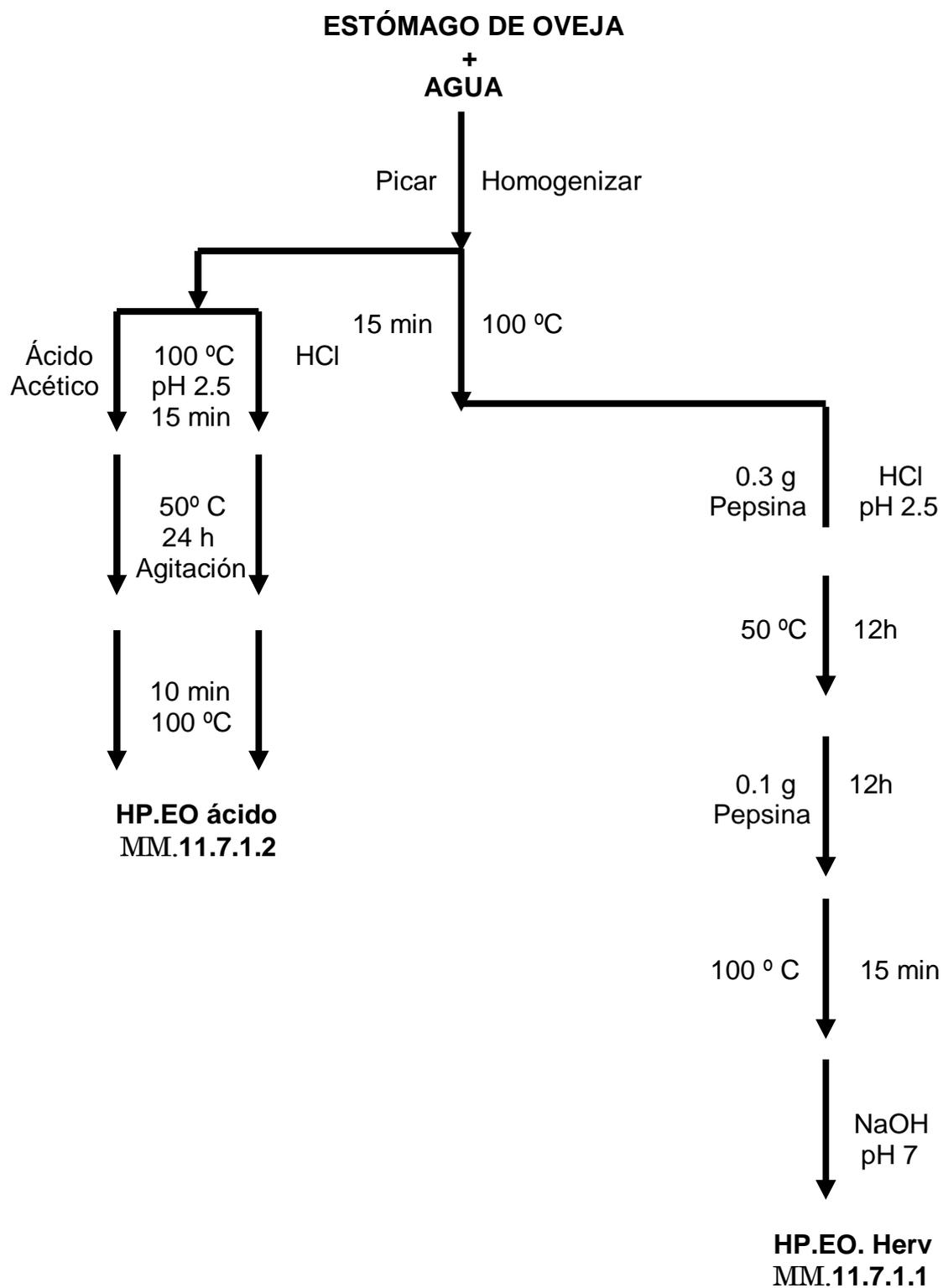
En este caso las proteínas del tejido de estómago de oveja se desnaturalizaron acidificando con ácido clorhídrico una solución de dicho tejido. Se siguió el mismo procedimiento que el apartado MM.12.1.2 con la salvedad de que el extracto de partida es una solución homogénea de tejido de estómago de oveja y agua en una proporción 1:2 respectivamente. Se separó de este hidrolizado ácido con pepsina una alícuota, que se llevó a sequedad en rotavapor y se peso obteniéndose una riqueza del 5%.

Para comprobar si la pepsina presente en el estómago de oveja es suficiente para realizar la hidrólisis se homogeneizó con una picadora, 10 g de tejido de estómago de oveja con 20 ml de agua, a este extracto se acidifico hasta pH 2.5 con ácido clorhídrico y con ácido acético ambas soluciones se dejaron a 50 °C durante 24 horas agitando continuamente, se calentó durante 10 minutos para inactivar la pepsina del estómago, se filtró y se neutralizó con hidróxido sódico (MM.11.7.1.1. **Figura 1**).

MM.11.7.2. Hidrolizado de intestino de oveja con pepsina

MM.11.7.2.1. Hidrolizado con pepsina de intestino de oveja previamente desnaturalizado por ebullición

De la misma manera que en el estómago, las proteínas de intestino de oveja se desnaturalizaron por calor. Se utilizó como producto crudo intestino de oveja, el procedimiento utilizado fue el mismo que en el hidrolizado con pepsina de estómago de oveja apartado MM.12.1.1.

MM.11.7.1.1. **Figura 1.** Diagrama de hidrolizados de estómago de oveja

MM.11.7.3. Extractos de estómago de oveja

MM.11.7.3.1. Extracto ácido de estómago de oveja

En este caso el tejido de estómago de oveja se pica, homogeneizó y se hirvió durante 20 min para inactivar la pepsina presente en el tejido, durante este proceso se coagulan muchas proteínas. Para que el extracto fuese homogéneo se trituró cada 5 min. Seguidamente se añadió ácido clorhídrico hasta pH 3. Al igual que antes para evitar la formación de coágulos se volvió a picar y se dejó durante 24 horas a 50 °C agitándose continuamente. Pasado este tiempo, se filtró y neutralizó con NaOH hasta pH 7.

MM.11.7.3.2. Extracto acuoso de estómago de oveja a temperatura ambiente

Se realizó este procedimiento para obtener un extracto de estómago de oveja con compuestos solubles en agua. Para ello se homogeneizó con una picadora, 10 g de tejido de estómago de oveja con 20 ml de agua, la solución se centrifugó 20 min 10000 r.p.m. y posteriormente se filtró.

MM.11.7.3.3. Extracto acuoso de estómago de oveja a ebullición

Se siguió el mismo procedimiento que el apartado anterior con la salvedad que previo al centrifugado se hirvió la solución durante 15 min y tras la filtración se volvió a hervir de nuevo durante 15 min. Ambos procesos de calentamiento se realizaron para desnaturalizar proteínas.

MM.11.7.3.4. Extracto buffer fosfato de estómago de oveja

Se homogeneizó con una picadora, 10 g de tejido de estómago de oveja con 20 ml de buffer HPO_4Na_2 0.1M, se centrifugó durante 20 min a 10000 r.p.m., se separó el sobrenadante y el sedimento.

Al sobrenadante se añadió 0.2 g de pepsina (P7000 Sigma) y se acidificó con HCl hasta pH 2.5. La solución se dejó a 50 °C durante 6 horas, volviéndose añadir 0.1 g de pepsina. El proceso de hidrólisis se continuó durante 6 horas más. Pasado este tiempo se hirvió durante 10 min, se filtró y neutralizó con NaOH hasta pH neutro.

En cuanto al sedimento se lavó dos veces con buffer HPO_4Na_2 0.1M. Posteriormente se añadió 20 ml de agua y se hirvió durante 10 min, a partir de aquí el procedimiento que se siguió es el mismo que el realizado en el apartado **MM.12.1.1**.

Resultados

y

Discusión

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RD.1. MEDIO DE PRUEBA (X)

Es el medio a partir del cual se realizaran las distintas experiencias de este trabajo, en el cual *Streptococcus agalactiae* crece de forma óptima sin producir pigmento.

Esta formado por la base de medio descrito en el apartado MM.4.1, que deriva del medio Granada por sustitución de la proteosa peptona N° 3 (**PP3**) al 2.5%, por un 1% de proteosa peptona Oxoid (**PPO**).

RD.1.1. DESARROLLO DEL MEDIO DE PRUEBA

Aunque se han descrito medios definidos para el crecimiento de *S. agalactiae* (Willet 1966; Terleckyj 1975; Mickelson 1976) la producción de pigmento por EGB ha sido descrita únicamente en medios de cultivo complejos (Islam 1977; De la Rosa 1992).

Para el desarrollo del medio de prueba (**X**) se probó a adicionar al medio de base (**B**) (medio Granada sin **PP3** y sin suero), varias peptonas que de acuerdo con experiencias anteriores se conocía que no soportan la producción de pigmento (Carazo 1993; García Peña 2003).

Se ensayaron diferentes peptonas de caseína [(N-Z amine A (Sheffield), N-Z amine B (Sheffield)], triptona (211705 BD-Difco), triptone peptone (Oxoid)) y proteosa peptona Oxoid (**PPO**) que se incorporaron a la base de medio a una concentración final del 1% y 2.5% (p/v).

De ellas se escogió como peptona para adicionar al medio de base (**B**) la proteose peptone Oxoid (**PPO**) al 1%, por cumplirse los siguientes criterios:

1. Permitir el desarrollo de colonias de EGB como colonias grandes (2 mm) no pigmentas o con muy pobre pigmento (**0-0.5**).
2. No interferir con la acción de la **PP3**, es decir, que adicionando un 1% de **PP3** la intensidad de pigmento es moderada-intensa y si incorporamos un 2.5% de **PP3** la intensidad de pigmento es intensa-excelente (**RD.1.1.Tabla 1**).
3. No modificar los resultados obtenidos por adición de hidrolizado pépsico de suero (**HP.S**) ni de extracto de levadura (**Y**) (**R.1.1.Tabla 2**).

| Medio de prueba | Peptona | Concentración ensayada | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|-----------------|---------|------------------------|---------------------------------|
| X | | | 0-1 |
| X | PP3 | 2.5% | 4.5-5 |
| X | PP3 | 1% | 3.5-4 |

RD.1.1. Tabla 1. Producción de pigmento en el medio de prueba tras añadir 1% y 2.5% de PP3.

| Medios de ensayo | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|------------------|---------------------------------|
| X + Y | 0-1 |
| X + HP.S | 0-1 |
| X + HP.S + Y | 0-1 |

RD.1.1. Tabla 2. Producción de pigmento en el medio de prueba tras añadir extracto de levadura, hidrolizado pépsico de suero y ambos.

El medio de prueba (**X**) es pues, el medio base (**B**) adicionado de un 1% proteose peptone Oxoid (**PPO**), con suero y suplemento. Cuya composición por litro se especifica en el apartado MM.4.2.

RD.1.2. ACCIÓN DE LA TRIPSINA SOBRE LA PROTEOSA PEPTONA Nº3 Y EFECTO DEL HIDROLIZADO PÉPSICO DE SUERO (HP.S) SOBRE EL MEDIO DE PRUEBA: FACTOR β

Se comprobó que el efecto fundamental del hidrolizado péptico de suero en el medio de prueba además de actuar como favorecedor del crecimiento es el aporte del péptido (Ile-Ala-Arg-Arg-His-Pro-Tyr-Phe) que activa la producción de pigmento por EGB (**Rosa-Fraile 1999**), a este factor lo hemos llamado **factor α** . Para demostrarlo se sometió a hidrólisis con pepsina una solución de albúmina bovina (A p647 Sigma) al 2% (**HP.albúmina**) en las mismas circunstancias que la hidrólisis con pepsina del suero como se describe en el apartado MM.11.6.

Así mismo se procedió a la destrucción del **factor α** presente en la proteosa peptona Nº 3 (**PP3**), para ello se hidrolizó con tripsina una solución de **PP3** al 2.5% (**HTr.PP3 2%**) según las condiciones descritas en el apartado MM.8.1.

Este hidrolizado de tripsina posteriormente se incorporó al medio de prueba **X** sobre el cual se añadió por separado el hidrolizado péptico de albúmina (**HP.albúmina**) y el hidrolizado péptico de suero (**HP.S**) y se obtuvo el resultado que se refleja en la RD.1.2.Tabla 1.

| Medios de ensayo | Peptona | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|---------------------|--------------|---------------------------------|
| X (Medio de prueba) | HTr.PP3 2.5% | 0-1 |
| X + HP.S | | 0-1 |
| X + HP.S | HTr.PP3 2.5% | 4.5-5 |
| X + HP.albúmina | HTr.PP3 2.5% | 4.5-5 |

RD.1.2. **Tabla 1.** Importancia del hidrolizado con pepsina de suero

Con esta experiencia nos permitió comprobar que el efecto activador de la pigmentación por EGB del **HP.S** en el medio es debida al **factor α** , y además esta experiencia evidenció que la proteosa peptona N° 3 aporta al medio otro factor que hemos llamado **factor β** y que no es destruido por la acción de la tripsina. Esto se observa cuando se incorpora al medio de prueba el **HP.S (factor α)** o el hidrolizado con tripsina de **PP3 (con factor β y sin factor α)**, la producción de pigmento en ambos es nula (RD.1.2. **Tabla 1**). Por consiguiente, ni el **factor α** ni el **factor β** por si solos incrementan la producción de pigmento. Sin embargo, el **factor α** más el **factor β** sí favorece la producción de pigmento por EGB hasta intensa-excelente (**4.5-5**) (RD.1.2.**Tabla 1 y 2**).

| Medios de ensayo | Peptona | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|---------------------|----------|---------------------------------|
| X (medio de prueba) | PP3 2.5% | 4.5-5 |
| X + Y | PP3 2.5% | 4.5-5 |
| X + HP.S | PP3 2.5% | 4.5-5 |
| X + Y + HP.S | PP3 2.5% | 4.5-5 |

RD.1.2. **Tabla 2.** Producción de pigmento en los medios de ensayo tras añadir 2.5% de PP3

RD.2. MEDIOS DE ENSAYO

Como medios de ensayo se utilizaron para probar la actividad de compuestos y fracciones:

1. Medio de prueba (**X**)
2. Medio de prueba (**X**) más un 10% (p/v) de hidrolizado péptico de suero (**HP.S**) al 7% (p/p) → **X + HP.S**
3. Medio de prueba (**X**) más un 1% (p/v) de extracto de levadura (**Y**) → **X+ Y**
4. Medio de prueba (**X**) más la combinación del extracto de levadura y el hidrolizado péptico de suero → **X + HP.S + Y**

Estas combinaciones se realizaron por las siguientes razones:

- Al medio de prueba **X** se le incorporó el hidrolizado péptico de suero (**HP.S**) con objeto de suplementar el medio con el **factor** α descrito en el apartado MM.4.2.1. Este medio presentó una producción de pigmento nula o muy pobre como muestra la RD.2.Tabla 1, según la escala no paramétrica modificada (**García Peña, 2003**) descrita en el apartado MM.1, ya que para que se produzca pigmento es necesario además el **factor** β aportado por la **PP3**.

| Medios de ensayo | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|---------------------|------------------------------------|
| X (medio de prueba) | 0-1 |
| X + Y | 0-1 |
| X + HP.S | 0-1 |
| X + Y + HP.S | 0-1 |

RD.2. **Tabla 1.** Producción de pigmento en los medios de ensayo

- El medio de prueba **X** se le incorporó extracto de levadura (**Y**) exclusivamente como aporte de factores de crecimiento diverso, la producción de pigmento en el medio fue también nula o muy pobre

Se ensayó también si diferentes concentraciones (0.5, 1%, 2% y 3%) de extracto de levadura (**Y**), por si producía inhibición de la pigmentación. No se apreció efecto alguno sobre la producción de pigmento en los medio de ensayo.

- El medio de prueba **X** exhibió también una producción de pigmento nula o muy pobre cuando se combinó con extracto de levadura (**Y**) e hidrolizado péptico de suero (**HP.S**).

Se probó además si concentraciones mayores de proteosa peptona Oxoid (**PPO**) eran capaces de soportar la producción de pigmento. Para ello se ensayó en el medio base (**B**) y en el resto de combinaciones (**B+Y**, **B+HP.S**, y **B+HP.S+Y**) el efecto de adicionar proteosa peptona Oxoid al 2%, 3%, 4% y 5% no siendo capaz estos medios de soporta mas allá de pobre-débil producción de pigmento (2.5-3).

RD.3. ACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS QUÍMICOS Y MEZCLAS COMPLEJAS

Ninguno de los productos que se probaron en los diferentes medios de ensayo como precursores de la producción de pigmento expuestos en el apartado MM.5 fue capaz de soportar producción de pigmento por EGB como muestra la tabla RD.3. **Tabla 1.**

| Medios de ensayo | Compuesto químico | Concentración ensayada | Intensidad pigmento (Cepa F) |
|--------------------------------|----------------------|------------------------|------------------------------|
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Deltaaminolevulínico | 0.025 a 5mg/ml | 0-1 |
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Porfobilinógeno | 0.05 a 2 mg/ml | 0-1 |
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Disco X y VX | | 0-1 |
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Cistina Cisteína | 100 µm/ml | 0-1 |
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Galactosa | 0.2% | 0-1 |

| | | | |
|--------------------------------|--|----------------------|------------|
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | N-acetilneurámico | 0.25 a 2 mg/ml | 0-1 |
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | N-glicosilneurámico | 0.25 a 2 mg/ml | 0-1 |
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Timina Timidina Timidina 5 fosfato Timidina 3 fosfato | 0.05 y 0.5 mg/ml | 0-1 |
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Timidita + Cisteína | 100 µg + 100µg | 0-1 |
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Mezcla de vitaminas (Dayamineral filmtab) | Ver apartado MM.5 | 0-1 |

RD.3. **Tabla 1.** Efecto sobre la producción de pigmento en los medios de ensayo al incorporar compuestos químicos y mezclas complejas

RD.4. ACTIVIDAD DE PEPTONAS, HIDROLIZADOS Y EXTRACTOS COMERCIALES

Como se describe en el apartado MM.6 se añadió diferentes peptonas, hidrolizados y extractos comerciales a la base de medio a una concentración que salvo que se indique lo contrario es de un 2.5% (p/v). La intensidad de pigmento se evaluó de acuerdo con la escala no paramétrica modificada (**García Peña 2003**) descrita en el apartado MM.1 obteniéndose los siguientes resultados.

RD.4.1. PEPTONAS BD-DIFCO

| Medios de ensayo | Peptonas de tejido animal | Concentración ensayada | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|--------------------------------|--|------------------------|---------------------------------|
| X X+HP.S | Tryptose Peptone | 2.5% | 0-1 0-1 |
| X+Y X+Y+HP.S | Tryptose Peptone | 2.5% | 1-2.5 1-2.5 |
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Peptamina, Proteose peptone, Proteosa peptone N° 2 | 2.5% | 4-4.5 |
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Proteose peptone N° 3 (PP3) | 2.5% | 4.5-5 |
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Proteose peptone N° 3 (PP3) | 1% | 3.5-4 |

RD.4.1. Tabla 1. Peptonas de tejido animal

| Medios de ensayo | Peptonas de caseína | Concentración ensayada | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|--------------------------------|---------------------|------------------------|---------------------------------|
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Tryptone Peptone | 2.5% | 0-1 |

RD.4.1. Tabla 2. Peptona de caseína

| Medios de ensayo | Peptonas de Soja | Concentración ensayada | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|--------------------------------|------------------|------------------------|---------------------------------|
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Soytone | 2.5% | 0-1 |

RD.4.1. Tabla 3. Peptona de soja

De todas las peptonas probadas de BD-Difco solo peptamina, proteosa peptona, proteosa peptona N° 2 y proteosa peptona N° 3 son capaces de soportar la producción de pigmento por EGB intensa-excelente en los distintos medios de ensayo.

Como se observa RD.4.1. **Tabla 1** los medios de ensayo sin **HP.S** (no incorporan el **factor α**) y con peptamina, proteosa peptona, proteosa peptona N° 2 y proteosa peptona N° 3 presentan una producción de pigmento intensa-excelente lo que indica que estas peptonas poseen el **factor α** sin necesidad de agregárselo.

Como se indicó en el apartado RD.1.2, por si solo el **factor** α no produce pigmento, por lo tanto, estas peptonas deben poseer también el **factor** β capaz junto al **factor** α de alcanzar dicha intensidad de pigmento.

RD.4.2. PEPTONAS OXOID

| Medios de ensayo | Peptonas de tejido animal | Concentración ensayada | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|--------------------------------|--|------------------------|---------------------------------|
| X X+Y | Proteose Peptone Orthana Peptone Peptic Digest Tryptose Liver Digest | 2.5% | 0-1 |
| X+HP.S X+Y+HP.S | Proteose Peptone Orthana Peptone Peptic Digest Tryptose Liver Digest | 2.5% | 1-2.5 |
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Peptone P | 2.5% y 4% | 3-3.5 |
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Peptic Digest | 2.5% | 2-2.5 |

RD.4.2. Tabla 1. Peptonas de tejido animal

| Medios de ensayo | Peptonas de caseína | Concentración ensayada | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|--------------------|---------------------|------------------------|---------------------------------|
| X X+Y | Tryptone | 2.5% | 0-1 |
| X+HP.S X+Y+HP.S | Tryptone | 2.5% | 1-2.5 |

RD.4.2. Tabla 2. Peptona de caseína

| Medios de ensayo | Peptonas de soja | Concentración ensayada | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|--------------------|------------------|------------------------|---------------------------------|
| X X+Y X+HP.S | SoyPeptone | 2.5% | 0-1 |
| X+Y+HP.S | SoyPeptone | 2.5% | 1-2.5 |

RD.4.2. Tabla 3. Peptona de soja

En nuestros resultados ninguna peptona de Oxoid fue capaz de producir una intensidad de pigmento intensa-excelente en los distintos medios de ensayo, solo la peptona P a una concentración del 4% alcanzo una producción de pigmento débil-moderada (3-3.5). Por lo tanto, ninguna peptona de Oxoid presenta el **factor** β ya que ni siquiera en los medios en los que se incorporó el **HP.S** (**Factor** α) se produjo aumento de la intensidad de pigmento, con la excepción de la peptona P que parece que posee el **factor** β pero la concentración activa de este en la peptona debe de ser inferior al de la **PP3** ya que a una concentración de 2.5% e incluso aumentándola al 4% dio una intensidad de pigmento moderada.

RD.4.3. PEPTONAS ORGANOTECHNIE

| Medios de ensayo | Peptonas de tejido animal | Concentración ensayada | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|--------------------------------|-----------------------------------|------------------------|---------------------------------|
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Meat Peptone S1 Meat Petone N2 | 2.5% | 2-3 |
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Meat Peptone S2 | 2.5%, 4% y 6% | 2-3 |
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Peptona de gelatina | 2.5% | 0.5-1 |

RD.4.3. Tabla 1. Peptonas de tejido animal

| Medios de ensayo | Peptonas de caseína | Concentración ensayada | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|--------------------------------|---------------------|------------------------|---------------------------------|
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Tryptone | 2.5% | 0.5-1 |

RD.4.3. Tabla 2. Peptonas de caseína

| Medios de ensayo | Peptonas vegetales | Concentración ensayada | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|--------------------------------|--------------------|------------------------|---------------------------------|
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Peptona vegetal E1 | 2.5% | 0.5-1 |
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Peptona de trigo | 2.5% | 0.5-1 |

RD.4.3. **Tabla 2.** Peptonas vegetales

Ninguna peptona de Organotechnie fue capaz de soportar la producción de pigmento por EGB lo que indica que estas peptonas tampoco contienen el **factor** β ya que incluso incorporando el **factor** α con el **HP.S** (suponiendo que no lo tuvieran) no se modificó la intensidad de producción de pigmento por EGB en ninguna de ellas.

RD.4.4. PEPTONAS SHEFFIELD

| Medios de ensayo | Peptonas de tejido animal | Concentración ensayada | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|--------------------------------|--|------------------------|---------------------------------|
| X X+Y | Primatote RL | 2.5% | 1-2 |
| X+HP.S X+Y+HP.S | Primatote RL | 2.5% | 3.5 |
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Primagen P | 2.5% | 1-2 |
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Primatone CLT (colágeno) | 2.5% | 0-0.5 |
| X X+Y | Primatone Sheffileld (PHS) | 2.5% | 1-2 |
| X+HP.S X+Y+HP.S | Primatone Sheffileld (PHS) | 2.5% | 4.5-5 |

RD.4.4. **Tabla 1.** Peptonas de tejido animal

Observando los resultados solo soportaron la producción de pigmento la primatona RL y primatona Sheffileld, alcanzando una intensidad de pigmento moderada e intensa-excelente respectivamente. Aparentemente primatona Sheffileld es equivalente a la proteosa peptona N° 3 en los medios en los que se ha incorporado **HP.S** (factor α) lo que se desprende que la **PHS** no posee dicho factor, pero si posee el **factor β** el cual por si solo como se observa en los medios **X** y **X+Y**,

no aumenta la intensidad de producción de pigmento como ya se indicó en el apartado RD.1.2.

Si a la **PHS** que contiene el **factor** β se le incorpora el **factor** α que no lo posee con **HP.S** la producción de pigmento alcanza la máxima intensidad de la escala no paramétrica modificada (**García Peña 2003**) descrita en el apartado MM.1. La primatona RL también debe poseer el **factor** β , pero a diferencia de la **PHS** la concentración activa de este en la peptona debe de ser inferior al de la **PP3** ya que a una concentración de 2.5% da una intensidad de pigmento moderada.

| Medio de ensayo | Peptonas de caseína | Concentración ensayada | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|--------------------------------|--|------------------------|---------------------------------|
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | N-Z Amine A N-Z-Amine B N-Z case EKZ N-Z case TT | 2.5% | 1-1.25 |
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | N-Z Amine A N-Z case EKZ | 2.5%, 4% y 6% | 1-1.25 |

RD.4.4. **Tabla 2.** Peptonas de caseína

| Medio de ensayo | Peptonas vegetales | Concentración ensayada | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|--------------------------------|--------------------|------------------------|---------------------------------|
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | HY SOY | 2.5% | 1 |
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | AMYSOY | 2.5% | 1 |

RD.4.4. Tabla 3. Peptonas vegetales

Ninguna de las peptonas de caseína ni de las peptonas vegetales de Sheffield presentó una producción de pigmento con la intensidad adecuada lo que sugiere que estas peptonas no poseen el **factor β** .

RD.4.5. PEPTONAS MARCOR

| Medios de ensayo | Peptonas | Concentración ensayada | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|--------------------------------|-------------------------------------|------------------------|---------------------------------|
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Proteosa peptone Meat Peptone | 2.5% | 0-1.5 |

| | | | |
|--------------------------------|----------------|------|--------------|
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Meat Peptone C | 2.5% | 0-1.5 |
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Meat Peptone E | 2.5% | 2-3.5 |

RD.4.5. Tabla 1. Peptonas de tejido animal

Las peptonas de Marcor que se ensayaron no soportaron producción de pigmento por EGB. Esta circunstancia insinúa que estas peptonas tampoco poseen el **factor** β presente en la **PP3** y **PHS**.

RD.4.6. PEPTONAS PANREAC

| Medios de ensayo | Peptonas | Concentración ensayada | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|--------------------------------|--------------------|------------------------|---------------------------------|
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Proteosa peptona 3 | 2.5%, 4% y 6% | 0-1 |

RD.4.6. Tabla 1.

La proteosa peptona 3 de Panreac dio una intensidad de pigmento nula-muy pobre lo que apunta a que está peptona pesé a obtenerse por hidrólisis enzimática y presentar una proporción alta de polipéptidos largos (> 6000 Da) de hay su nombre a igual que la **PP3**, el tejido animal

de partida tiene que ser diferente ya que no posee el **factor** β necesario junto al **factor** α para alcanzar la intensidad de pigmento máxima.

RD.4.7. PEPTONAS DIVERSAS

| Medios de ensayo | Peptonas | Concentración ensayada | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|--------------------------------|------------------------------------|------------------------|---------------------------------|
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Peptona Sigma Type I | 2.5% | 2-2.5 |
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Proteose Peptone (Sigma) | 2.5% | 4 |
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Bacteriological peptone (Sigma) | 2.5% | 0 |

RD.4.7. Tabla 1.

Como se observa en la RD.4.7. **Tabla 1** solo la proteose peptone de Sigma presentó una intensidad de pigmento buena en todos los medios de ensayo lo que apunta a que esta peptona debe de presentar tanto el **factor** β como el **factor** α ya que incluso en los medios de ensayo **X** y **X+Y** la intensidad de pigmento fue intensa-excelente.

RD.4.8. HIDROLIZADOS NO ENZIMATICOS

| Medios de ensayo | Peptonas | Concentración ensayada | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|--------------------------------|--|------------------------|---------------------------------|
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Hidrolizado caseína Casaminoácidos Colágeno hidrolizado | 2.5% | 0-1 |

R.4.8. Tabla 1. Hidrolizados ácidos

Ningún de los hidrolizados no enzimáticos presentó intensidad de pigmento intensa-excelente en ningún medio de ensayo con lo cual refleja que estas peptonas no contienen el **factor β** .

RD.4.9. EXTRACTOS COMERCIALES DE TEJIDO

| Medios de ensayo | Extracto | Concentración ensayada | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|--------------------------------|---|------------------------|---------------------------------|
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | Yeast Extract (BD-Difco) Lab-Lemco (Oxoid) Brain Extract (Sigma) Brain-Heart Infusion (BD-Difco) Beef Infusion (Marcor) Meat Extract (Organotechnie) | 2.5% | 0-1 |

RD.4.9. Tabla 1. Extractos

Ningún extracto condujo a una producción de pigmento con la intensidad máxima de la escala no paramétrica (**García Peña 2003**) descrita en MM.1 lo que sugiere que estos extractos no poseen el factor β .

RD.5. FRACCIONAMIENTO DE PEPTONAS**RD.5.1. ULTRAFILTRACIÓN**

Los fracción ultrafiltrable <10Kda como la fracción <1 KDa tanto de la **PHS** como de la **PP3** en los medios **X+HPS** y **X+HPS+Y** soportaron intensa-excelente producción de pigmento (**4.5-5**) (R.5.1.Tabla 1).

| Medios de ensayo | Fracción ultrafiltrable de PP3 | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | < 10 KDa | 4.5-5 |
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | < 1 kDa | 4.5-5 |

RD.5.1. Tabla 1. Intensidad de pigmento de la Fracción ultrafiltrable de la proteosa peptona N° 3

| Medios de ensayo | Fracción ultrafiltrable de PHS | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|--------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| X X+Y | < 10 KDa | 0-1 |
| X+HP.S X+Y+HP.S | < 10 KDa | 4.5-5 |
| X X+Y | < 1 kDa | 0-1 |
| X+HP.S X+Y+HP.S | < 1 kDa | 4.5-5 |

RD.5.1. **Tabla 2.** Intensidad de pigmento de la Fracción ultrafiltrable de la primatona de Sheffield HS

La fracción no ultrafiltrable (retenido) >10Kda como la fracción no ultrafiltrable (retenido) >1 KDa de **PHS** y de **PP3** no soportó producción de pigmento (**0.5-1**) en los medios **X+HPS** y **X+HPS+Y** (R.5.1. **Tabla 2**).

| Medios de ensayo | Fracción no ultrafiltrable de la PHS | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|--------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| X X+Y | > 10 KDa | 0.5-1 |
| X+HP.S X+Y+HP.S | > 1 kDa | 0.5-1 |
| X X+Y | > 10 KDa | 0.5-1 |
| X+HP.S X+Y+HP.S | > 1 kDa | 0.5-1 |

RD.5.1. **Tabla 3.** Intensidad de pigmento de la Fracción no ultrafiltrable de la primatona de Sheffield HS

La ultrafiltración de la **PHS** y **PP3** ha permitido comprobar que el **factor β** atraviesa una membrana de NMWC 1000, por lo que en teoría debe de tener un peso molecular inferior a 1000 Da teniendo en cuenta las limitaciones de la técnica: el tamaño de poro suele no ser uniforme y la forma de la molécula puede influir sobre el paso a través del poro (p.e., proteína globular de 100000 Da no atraviesa una membrana de 100000 NMWC, sin embargo, una proteína lineal de 1000.000 Da si es capaz de atravesarla) (**Harris 1989**).

RD.5.2. DIÁLISIS

La fracción dializable (NMWC <10 KDa) de **PHS** y **PP3** cuando se incorporaron a los medios de ensayo **X+HPS** y **X+HPS+Y** soporto intensa-excelente producción de pigmento (**4.5-5**) (RD.5.2.Tabla 1).

La fracción no dializable (NMWC >10 KDa) de **PHS** y **PP3** no soporto la producción de pigmento (**0.5-1**) en los medios **X+HP.S** y **X+HP.S+Y** (RD.5.2.Tabla 2).

| Medios de ensayo | Fracción dializable | Peptona comercial | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|--------------------------------|---------------------|-------------------|---------------------------------|
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | NMWC <10 KDa | PP3 | 4.5-5 |
| | | PHS | 4.5-5 |

RD.5.2.Tabla 1. Intensidad de pigmento de ambas fracciones

| Medios de ensayo | Fracción no dializable | Peptona comercial | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|--------------------------------|------------------------|-------------------|---------------------------------|
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | NMWC >10KDa | PP3 | 0.5-1 |
| | | PHS | 0.5-1 |

RD.5.2.Tabla 2. Intensidad de pigmento de ambas fracciones

Tanto el **factor** β de la **PP3** como de la **PHS** es dializable reforzando la conclusión anterior de que dicho factor tiene un peso molecular pequeño. Estos resultados confirman experiencias anteriores que indican que el compuesto activo de la proteosa peptona N° 3 responsable de la producción del pigmento es dializable (**De la Rosa. 1990a; Carazo 1993**).

RD.5.3. EXTRACCIÓN DE PRIMATONA SHEFFIELD Y PROTEOSA PEPTONA N° 3 CON SOLVENTES

La primatona Sheffield (**PHS**) y la proteosa peptona N° 3 (**PP3**) tras extracción con éter, hexano, acetonitrilo, metanol, propanol y combinaciones cloroformo-metanol según lo explicado en el apartado **MM.7.3** no provocó ninguna alteración de su actividad que se mantuvo intensa-excelente (**4.5-5**) en los medios de ensayo **X+HP.S** y **X+Y+HP.S** para ambas peptonas. En los medios **X** y **X+Y** la extracción tampoco produjo alteración en la intensidad de pigmento para la solución extraída de **PP3** como es de esperar ya que la **PHS** no posee el **factor** α y la intensidad en este caso fue nula-muy pobre.

Ninguno de los extractos orgánicos tras la extracción mostró capacidad de soportar la producción de pigmento en los diferentes medios de ensayo como se muestra en la RD.5.3. **Tabla 1.**

| Medios de ensayo | Peptona comercial | Soluciones extractoras | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|--------------------------------|-------------------|---|---------------------------------|
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | PP3 | Éter Hexano Acetonitrilo Metanol Propanol Cloroformo/Metanol | 4.5-5 |
| X X+Y | PHS | Éter Hexano Acetonitrilo Metanol Propanol Cloroformo/Metanol | 0-1 |
| X+HP.S X+Y+HP.S | PHS | Éter Hexano Acetonitrilo Metanol Propanol Cloroformo/Metanol | 4.5-5 |

RD.5.3. **Tabla 1.**

| Medios de ensayo | Peptona comercial | Extractos orgánicos | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|--------------------------------|-------------------|--|---------------------------------|
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | PP3 PHS | Extractos orgánicos de las diferentes soluciones | 0-1 |

RD.5.3. Tabla 2.

Estos resultados lo que indican en primer lugar es que el **factor β** de **PP3** y **PHS** no se extrae con ningún de los disolventes orgánicos lo que permite resaltar que dicho **factor β** debe de ser un compuesto polar.

RD.5.4. REPERCUSIÓN EN LA PRIMATONA DE SHEFFIELD Y PROTEOSA PEPTONA Nº 3 LA PRECIPITACIÓN DE GLICOPROTEÍNAS

La fracción de **PHS** y **PP3** precipitada con etanol evaporado y redisuelta según lo expuesto en el apartado MM.7.4 no mostró producción de pigmento (**0.5**) en ninguno de los medios de ensayo.

Este resultado hace que sea poco probable que el **factor β** de ambas peptonas se trate de glicoproteínas al menos de elevado peso molecular ya que estas precipitan en las condiciones que hemos empleado (**Harris 1989**).

RD.5.5. EFECTO DE LA ADSORCIÓN CON LECTINAS DE LA PRIMATONA DE SHEFFIELD Y LA PROTEOSA PEPTONA Nº 3

La cromatografía de afinidad realizada con Concanavalina A, Jacalina, lectina de *Arachis Hipogaea* y lectina de *triticum vulgare* según se refiere en el apartado MM.7.5 no tuvo ninguna consecuencia sobre la actividad de la primatona sheffield HS (**PHS**) ni la proteosa peptona Nº3 (**PP3**) siendo la producción de pigmento nula tanto en las fracciones eluídas de las lectinas como en las fracciones no retenidas en los diferentes medios de ensayo **X**, **X+Y**, **X+HP.S** y **X+Y+HP.S**.

Este resultado descartar que el **factor** β se trate de glicoproteínas con uniones del tipo O-glicosilproteínas preferentemente galactosil (β -1,3) N-acetilgalactosamina y glicoproteínas con uniones N-glicosil.

RD.5.6. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO SIÁLICO EN LA PRIMATONA DE SHEFFIELD Y EN LA PROTEOSA PEPTONA Nº 3

No se obtuvo presencia de ácido siálico (apartado MM.7.6) en ninguna de las peptonas ensayadas (**PP3** y **PHS**). Lo que indica que el **factor** β no debe de tratar de glicopéptidos en cuya composición forme parte el N-acetilneuramínico y el N-glicosilneuramínico.

RD.5.7. INFLUENCIA DE LA PRECIPITACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS SOBRE PRIMATONA SHEFFIELD Y PROTEOSA PEPTONA Nº 3

Ninguno de los métodos utilizados para precipitar ácido nucleicos (sulfato de protamina, cell debris remover) de la solución de **PSH** y **PP3**, descritos en el apartado MM.7.7, produjo disminución de la producción de pigmento de ambas peptonas por lo que continuo siendo intensa-excelente (4.5-5) en los medios de ensayo **X+HP.S** y **X+Y+HP.S** y en los medios **X** y **X+Y** solo para la **PP3**.

El hecho de que permanezca intacta la producción de pigmento del sobrenadante de las soluciones de ambas peptonas una vez precipitados los ácidos nucleicos en las condiciones anteriores permite señalar que el **factor** β no debe de tratarse ni de ácidos nucleicos ni de un compuesto relacionado con los mismos.

RD.6. HIDRÓLISIS DE PEPTONAS

RD.6.1. EFECTO DE LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS SOBRE LA ACTIVIDAD DE PRIMATONA SHEFFIELD Y PROTEOSA PEPTONA N° 3

Se estudió la acción de diferentes enzimas proteolíticas sobre proteosa peptona N° 3 y primatona Sheffield tal y como se indica en el apartado MM.8.1 por ser las únicas peptonas comerciales que soportan producción de pigmento intensa-excelente por *Streptococcus agalactiae* en los medios de ensayo **X** y **X+Y** en el caso de la **PP3** y **X+HP.S** y **X+HP.S+Y** tanto en la **PP3** como en **PHS**

RD.6.1.1. Acción de las enzimas proteolíticas sobre la proteosa peptona N° 3

La acción de la pepsina sobre **PP3** no provocó ninguna alteración de su actividad se mantuvo como intensa-excelente producción de pigmento en los medios de ensayo probados (**X**, **X+Y**, **X+HP.S** y **X+HP.S+Y**) (RD.6.1.1. **Tabla 1**). Por lo tanto, ni el **factor β** ni el **factor α** (péptido activo) se ven afectados por la acción hidrolítica de la pepsina.

Sin embargo, la acción de tripsina, proteinasa K, termolisina, pronasa, ficina y papaína, determinó pérdida de producción de pigmento en **X**, **X+Y** como consecuencia de la destrucción del **factor α** presente en la proteosa peptona N° 3 porque no afectó a la producción de pigmento en los medios en los cuales se incorpora dicho factor (**X+HP.S** y **X+Y+HP.S**) que se mantuvo en intensa-excelente (4.5-5) (RD.6.1.1. **Tabla 1**). Por lo tanto, estas enzimas proteolíticas no destruyen el **factor β** .

| Medios de ensayo | Peptona comercial | Enzima proteolítico | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|--------------------------------|-------------------|--|---------------------------------|
| X X+Y X+HP.S X+Y+HP.S | PP3 | Pepsina | 4.5-5 |
| X X+Y | PP3 | Tripsina, Proteinasa K Termolisina Pronasa Ficina Papaína | 0-1 |
| X+HP.S X+Y+HP.S | PP3 | Tripsina Proteinasa K Termolisina Pronasa Ficina Papaína | 4.5-5 |

RD.6.1.1.Tabla 1. Acción de las enzimas proteolítica sobre la PP3

Estos resultados permiten establecer la siguiente explicación, es muy probable que el **factor** β de la **PP3** no se trate de un oligopéptido y si se trata de un compuesto de naturaleza peptídico la estructura proteica no debe de estar accesible a los enzimas proteolíticos bien porque se trate de una heteroproteína y el grupo prostético proteja la parte peptídico lo que no es probable por su bajo peso molecular o porque se trate de un péptido pequeño (di- o tri-péptido) ya que sobre el **factor** α (heptapéptido) (**Rosa-Fraile 1999**) si actúan los enzimas proteolíticos (tripsina, proteinasa K, termolisina, pronasa, ficina y papaína).

En contra de que se trate de un péptido pequeño esta los resultados obtenidos de los diferentes hidrolizados y extractos comerciales (apartado RD.4) donde solo la peptamina, la proteosa peptona, proteosa peptona N° 2, la proteosa peptona N° 3 y la primatona de Sheffield presentaron capacidad de soportar producción de pigmento por EGB lo que indica que si se tratara de un péptido debería haberse obtenido en otros hidrolizados enzimáticos. Esta explicación se complementa con los resultados de los hidrolizados realizados en el laboratorio (apartado RD.9 y RD.10) donde ningún tejido animal produjo la máxima intensidad de pigmento según la escala no paramétrica modificada (**García Peña 2003**) descrita en MM.1 con diferentes enzimas proteolíticos excepto el tejido de estomago de oveja lo que reafirma la opinión de que no debe de ser un oligopéptido pequeño exclusivamente.

RD.6.1.2. Acción de las enzimas proteolíticas sobre primatona Sheffield HS

La acción de pepsina, tripsina, proteinasa K, termolisina, pronasa, ficina y papaína no alteró la capacidad de producir pigmento por **PHS** que continuo sin soportar producción de pigmento en **X**, **X+Y** ya que esta peptona no posee en su composición el **factor α** (**Rosa-Fraile 1999**) y sin él, el **factor β** por si solo no favorece la producción de pigmento. En cambio, mantuvo en intensa excelente (**4.5-5**) la producción de pigmento en los medios de ensayo que incorporaban el péptido activo a través de el hidrolizado pépsico de suero porque de esta manera si existe la combinación del **factor β** más **factor α** .

| Medios de prueba | Peptona comercial | Enzima proteolítico | Intensidad de pigmento (Cepa F) |
|--------------------|-------------------|--|---------------------------------|
| X X+Y | PHS | Pepsina Tripsina Proteinasa K Termolisina Pronasa Ficina Papaína | 0-1 |
| X+HP.S X+Y+HP.S | PHS | Pepsina Tripsina Proteinasa K Termolisina Pronasa Ficina Papaína | 4.5-5 |

RD.6.1.2. **Tabla 1.** Acción de las enzimas proteolítica sobre la PHS

Este resultado acerca más la posibilidad de que el **factor** β presente en la **PHS** y la **PP3** es muy similar y es muy probable que en la fabricación de ambas peptonas se utilice un tejido animal de partida muy parecido.

RD.6.2. EFECTO DEL ÁCIDO CLORÍDRICO CONCENTRADO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PRIMATONA DE SHEFFIELD Y LA PROTEOSA PEPTONA N° 3

La acción de HCl concentrado (~ 11 N) tanto a 37°C como a 100°C sobre **PP3** y **PHS** como se describe en el apartado MM.8.2 determinó pérdida de producción de pigmento (**0.5-1**) en los distintos medios de ensayo. Dado que los productos resultantes son de color muy oscuro la determinación de actividad se efectuó sobre membranas Sartorius estériles colocadas sobre los medios de ensayo según lo establecido en el apartado MM.1.

La acción del ácido clorhídrico a esas temperaturas conlleva una hidrólisis inespecífica, ya que este ataca todas las uniones peptídicas degradando proteínas y polipéptidos a pequeños péptidos y aminoácidos.

Con lo cual esta operación no solo destruyó el **factor** α presente en la proteosa peptona N° 3, sino que también destruyó el **factor** β tanto de la **PHS** como de la **PP3** al no recuperarse la actividad ni si quiera en los medios de ensayo en los que se suplementó el **factor** α con hidrolizado péptico de suero.

Por lo tanto, el **factor** β se puede decir que es ácido lábil.

RD.7. CROMATOGRAFÍA DE LA PROTEOSA PEPTONA Nº 3

Se eligió la proteosa peptona Nº 3 (**PP3**) para intentar la purificación y extracción del **factor** β presente en la misma porque es la peptona que originalmente forma parte del medio Granada y porque a diferencia de la primatona de Sheffield (**PHS**) posee además el **factor** α (péptido activo).

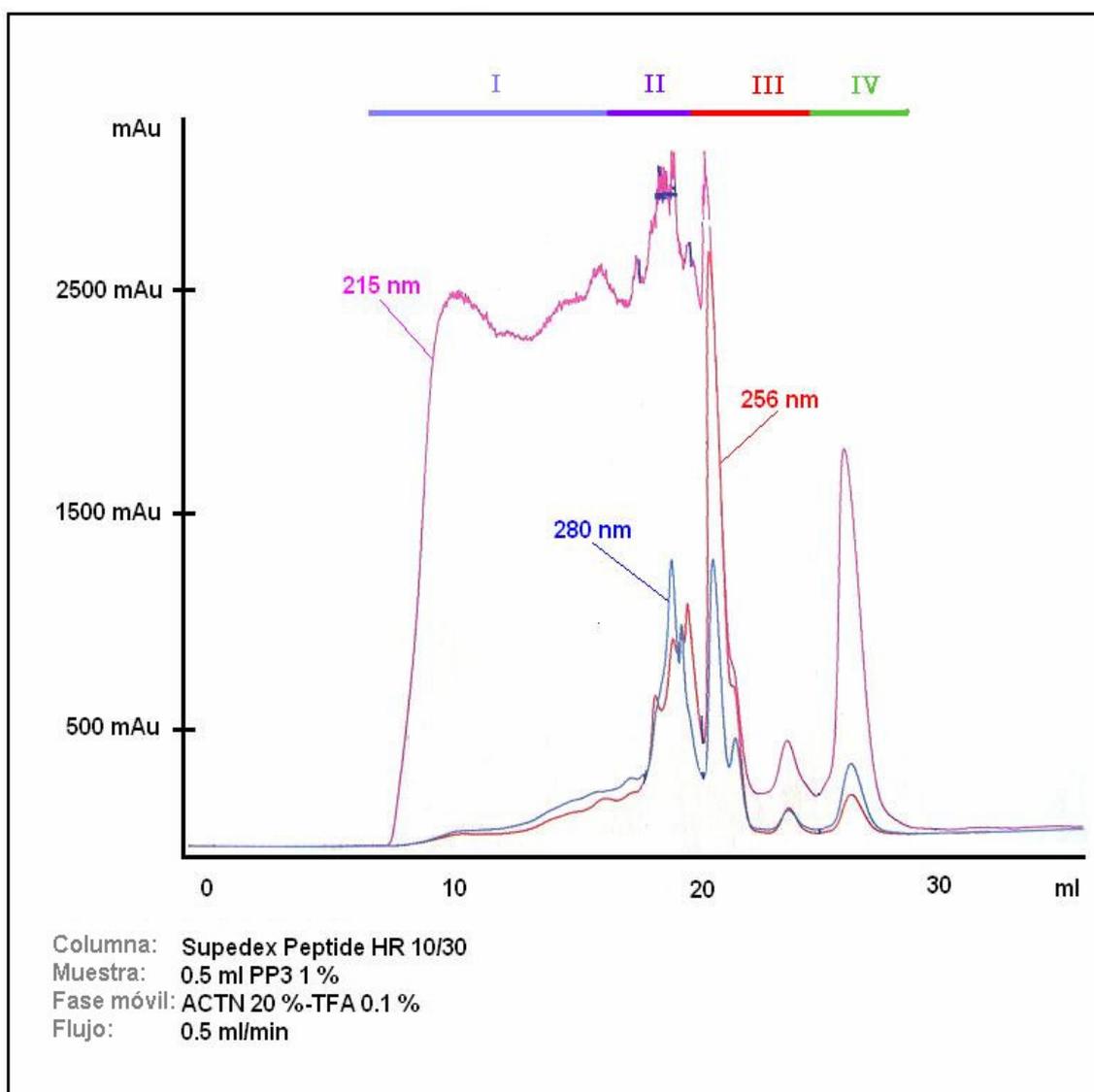
RD.7.1. CROMATOGRAFÍA EXCLUSIÓN MOLECULAR DE LA PROTEOSA PEPTONA Nº 3

RD.7.1.1. Cromatografía Gel Filtración de la PP3. Superdex[®] Peptide

RD.7.1.1.1. Cromatografía Superdex[®] Peptide de la PP3. Acetonitrilo-TFA

Se inyectan 4 cromatografías de 0.5 ml de **PP3** al 1% (total 2 ml PP3 1%) y se eluye con acetonitrilo 20%-ácido trifluoroacético (TFA) 0.1% en una columna Superdex[®] Peptide HR 10/30 (Pharmacia Biotech, Upsala. Sweden) en las condiciones descritas en el apartado MM.9.1.1. Se recogen 4 fracciones I, II, III y IV (**RD.7.1.1.1. Figura 1**), cada fracción se seca en rotavapor y se redisuelve en 1 ml (concentración equivalente al 2% del original). Se prueba cada fracción en los medios de ensayo (**X**, **X+Y**, **X+Y+HP.S** y **X+HP.S+Y**) siendo la producción de pigmento muy pobre (**1**).

Esta pérdida de actividad se puede explicar por distintas razones bien porque el **factor** β han quedado distribuido en las distintas fracciones, bien porque se ha adsorbido en la matriz de Superdex[®] Peptide por interacciones iónicas o bien porque el acetonitrilo-TFA ha podido destruir el factor.



RD.7.1.1.1.Figura 1

Por estas razones, se vuelve a inyectar otras 4 cromatografías de 0.5 ml de **PP3** al 1% (total 2 ml PP3 1%) con las mismas condiciones anteriores pero en este caso se recoge todo el eluido (**T**), realizándose la misma operación anterior. Se prueba actividad en los medios de ensayo **X**, **X+Y**, **X+HP.S** y **X+HP.S+Y** siendo la producción de pigmento muy pobre (**1**).

Como la distribución de la actividad entre las fracciones parece no ser el problema, se efectúa la misma experiencia utilizando como eluyente ACTN 30%-TFA 1%, es decir, aumentamos la concentración de ACTN para eliminar posibles interacciones iónicas e hidrofóbicas obteniéndose el mismo resultado, es decir, no recuperación de actividad en ninguna de las fracciones obtenidas (después de evaporar y redissolver en agua) ni en la mezcla total de fracciones.

Probablemente el **factor** β ha quedado retenido en la columna y no puede ser recuperado con ACTN-TFA o se ha alterado por la acción de ACTN o del TFA.

Ante la posibilidad de que se hubiese producido inactivación del **factor** β presente en la **PP3** con el ACTN ácido se procede a preparar una solución de **PP3** al 2.5% en ACTN 30% y en ACTN 30%-TFA 0.1%.

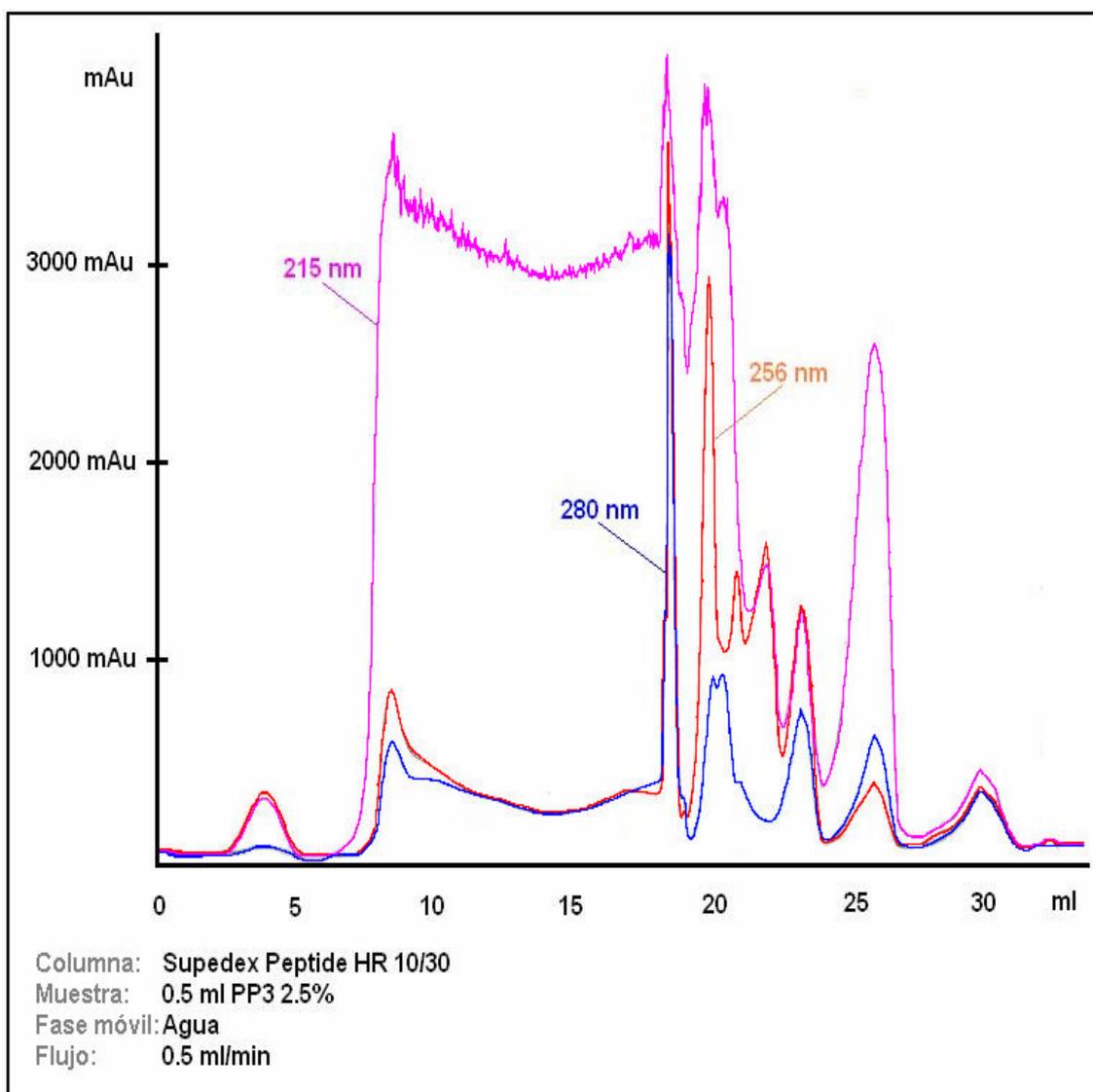
Ambas soluciones se evaporan a sequedad en rotavapor y se redissuelve en el mismo volumen de agua destilada (concentración equivalente 2.5%). Se prueba actividad en los medios de ensayos antes mencionados y no se observa pérdida de actividad. Cuando estas experiencias se repiten el resultado es variable, lo que parece existir, dependiendo de las condiciones experimentales, es una pérdida variable de actividad que no se pudo controlar.

En estas experiencias parece que no hay pérdida de actividad al disolver y evaporar en ACTN y si hay pérdida de la actividad en ACTN-TFA, es decir, el hecho de acidificar o no la solución parece ser uno de los factores que influir en la recuperación de la actividad. Cuando se secan soluciones de **PP3** en presencia de ácido diluido (p. ej., ácido trifluoroacético), éste puede alcanzar concentraciones al final del secado altas y formación de sales poco solubles que conducen a que el **factor β** se altera bien porque se hidroliza o bien pierde la conformación necesaria para favorecer la producción de pigmento por EGB.

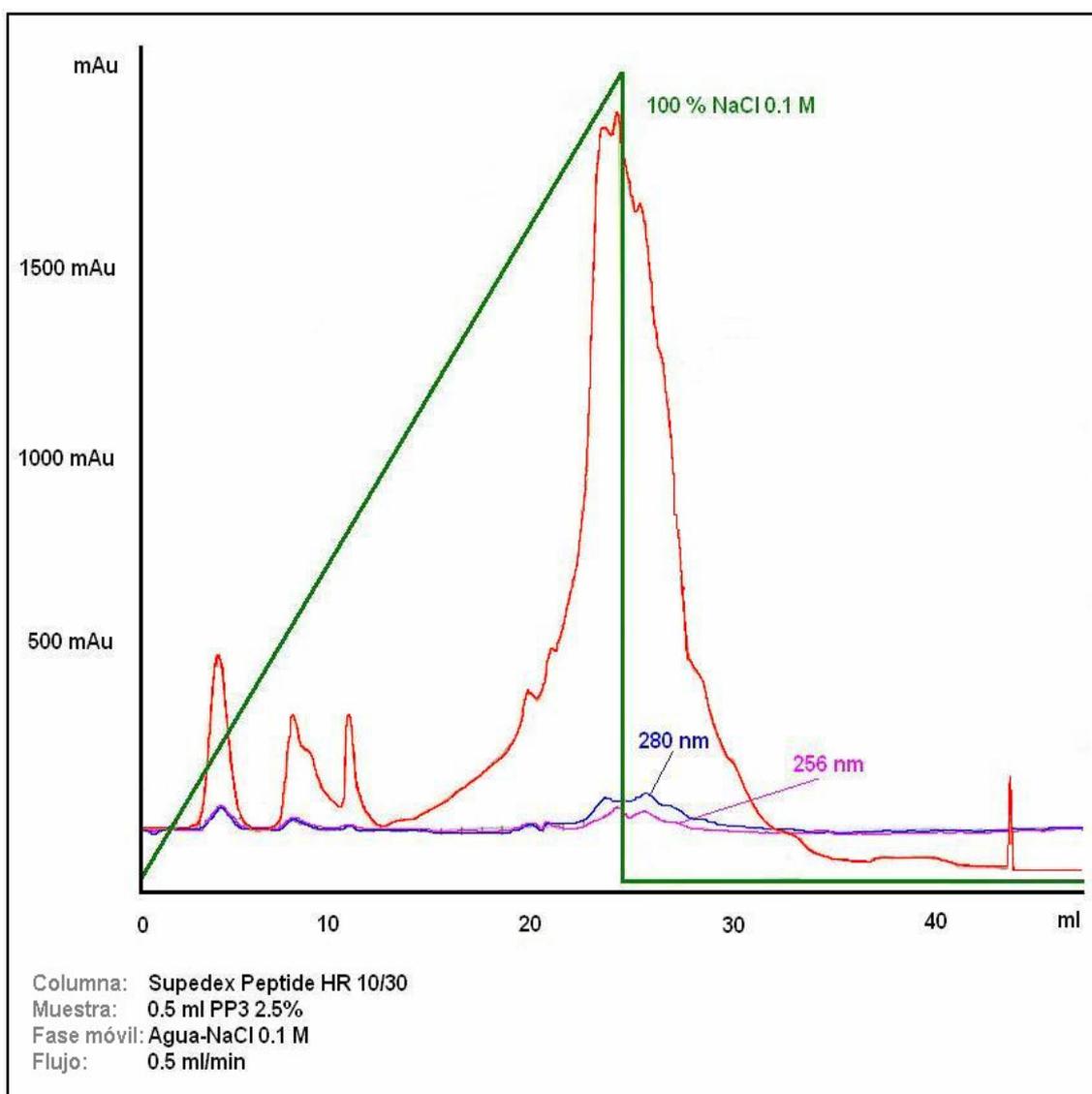
RD.7.1.1.2. Cromatografía Superdex[®] Peptide de la PP3. Agua-Cloruro Sódico

Después de lo observado en la cromatografía anterior, se intenta realizar la cromatografía en agua para evitar las posibles alteraciones sobre el **factor β** producidas por el ACTN-TFA. Para ello, se realizan 4 cromatografías con 0.5 ml **PP3** al 2.5% (p/v) (volumen total 2 ml) utilizando la misma columna anterior (**RD.7.1.1.2. Figura 1**). La totalidad del eluido se evapora hasta sequedad en rotavapor y se redisolvió en el mismo volumen de agua destilada (concentración equivalente 2.5%) se prueba actividad en **X**, **X+Y**, **X+HP.S** y **X+HP.S+Y** y no se observa producción de pigmento.

Este resultado nos hizo pensar que se había producido una adsorción del **factor β** en la matriz. Para romper estas interacciones iónicas inespecíficas se modificó la fuerza iónica del eluyente con cloruro sódico 0.1 M. Se eluyó la columna, tras cuatro cromatografías en agua, con un gradiente de agua-NaCl (0.1 M), obteniéndose un pico definido con absorción a 215 nm (**RD.7.1.1.2. Figura 2**) que una vez concentrado y redisolto en 1.5 ml de agua (aproximadamente queda 0.2 M de NaCl con una concentración equivalente de 1.5%). Se probó actividad en los mismos medios de ensayo anteriores no observándose producción de pigmento.



RD.7.1.1.2. Figura 1



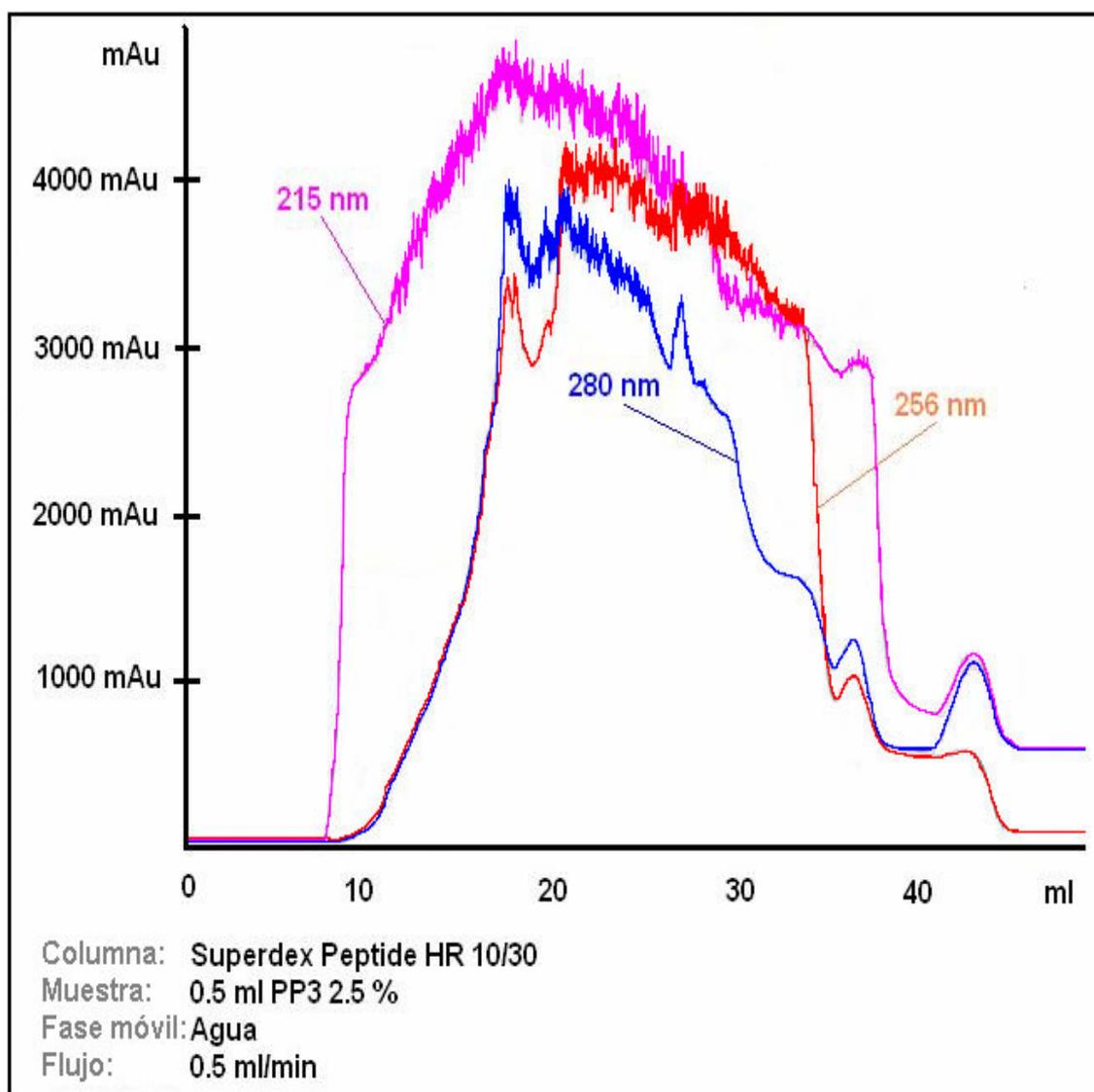
RD.7.1.1.2. Figura 2

Para comprobar que la falta de actividad de la fracción eluída con NaCl no era debida a la presencia de exceso de NaCl (0.2 M), se preparó una solución de **PP3** al 2.5% (p/v) en NaCl 0.3 M y se probó actividad en los distintos medio de ensayo (**X**, **X+Y**, **X+HP.S** y **X+HP.S+Y**), se observó alguna pérdida de actividad en la capacidad de soportar la producción de pigmento desde intensa (**4.5**) a moderada (**3.5**). Ello indica que la perdida total de actividad de la **PP3** no es únicamente debida a la presencia del NaCl, sugiriendo que se ha producido adsorción del **factor** β de la **PP3** en el Superdex[®] Peptide que no es capaz de despegar el cloruro sódico.

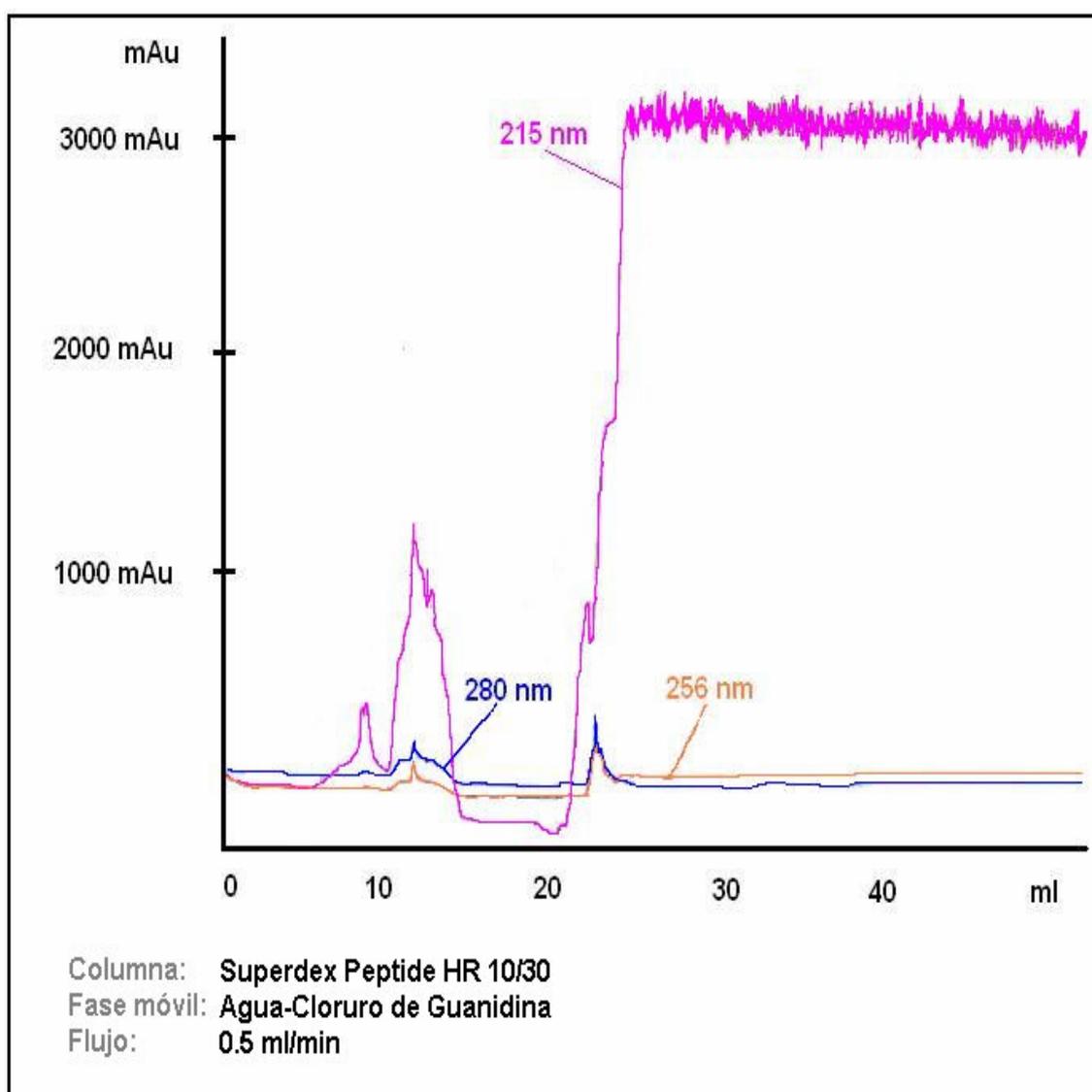
RD.7.1.1.3. Cromatografía Superdex[®] Peptide de la PP3. Agua-Cloruro de Guanidina

Dada la posibilidad de una adsorción del **factor** β en la matriz de Superdex[®] Peptide que ni el NaCl es capaz de separar recurrimos a eluir con cloruro de guanidina 6 M en las condiciones del apartado **MM.9.1.3**, después de cromatografiar 8 ml de **PP3** al 1% con agua. El eluido con agua (**Fracción A**) se secó en rotavapor y se redisolvió en 2 ml de agua (concentración equivalente 4%) (RD.7.1.1.3. **Figura 1**). Seguidamente a esta cromatografía se realizó una elución utilizando cloruro de guanidina 6 M con el objetivo de romper interacciones inespecíficas que se pueden haber producido con la matriz (RD.7.1.1.3. **Figura 2**).

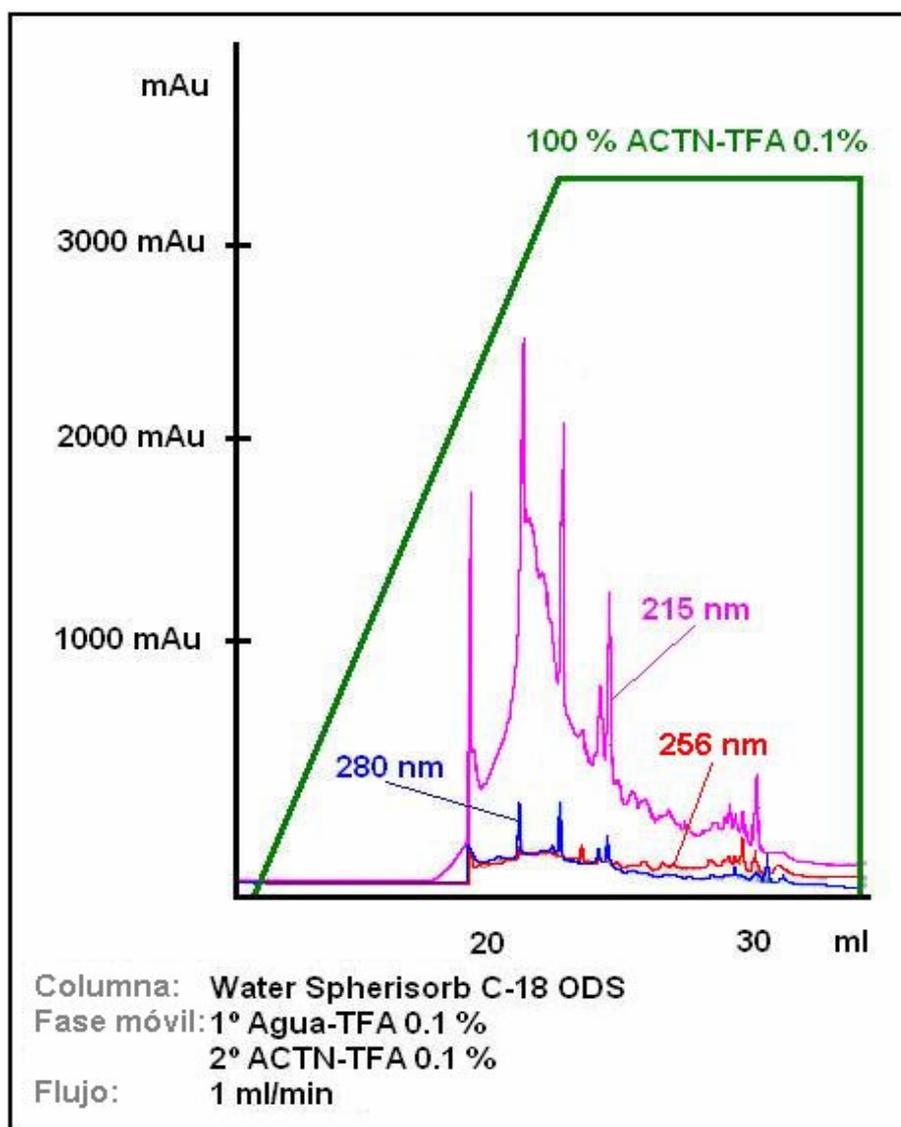
Posteriormente el pico eluido con cloruro de guanidina 6 M se sometió a cromatografía en fase reversa (columna analítica Waters Spherisorb[®] D52 4.6X250) para eliminar la guanidina (que sale en el frente) utilizando las condiciones descritas en el apartado **MM.9.1.3**. El pico con absorción a 215 nm se secó en rotavapor y se redisolvió en 2 ml de agua (concentración equivalente 4%) y después de neutralizar se probó actividad en **X**, **X+Y**, **X+HP.S** y **X+HP.S+Y**, no detectándose producción de pigmento (RD.7.1.1.3. **Figura 3**). Con lo cual las posibles interacciones del **factor** β con la matriz de Superdex[®] Peptide tampoco fue capaz de romperlas el cloruro de guanidina.



RD.7.1.1.3. Figura 1



RD.7.1.1.3. Figura 2



RD.7.1.1.3. Figura 3

RD.7.1.2. Cromatografía Gel Filtración de la PP3. Sephadex® G25

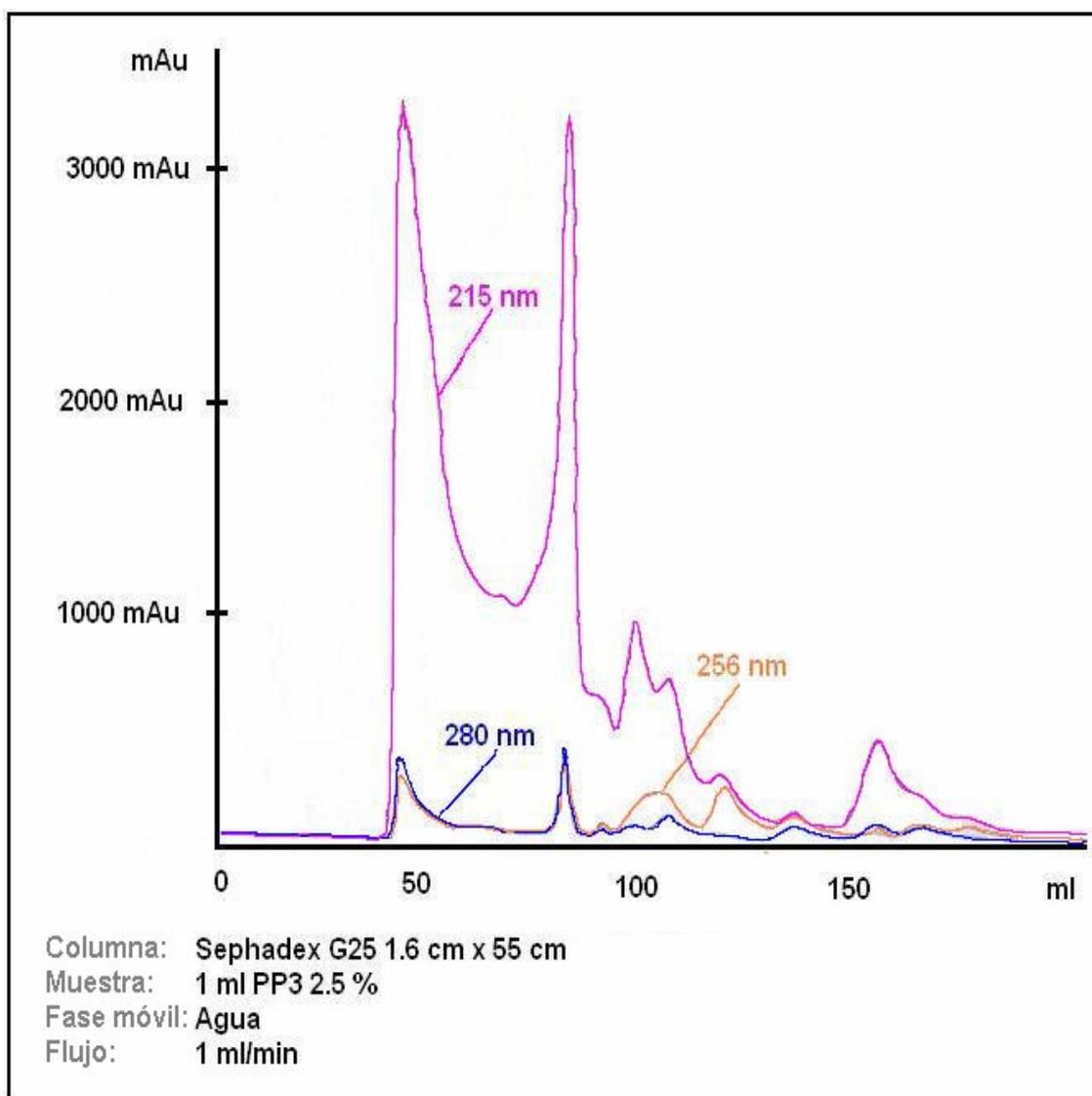
Dado que con la utilización del Superdex® Peptide no se pudo recuperar la actividad de la **PP3** como consecuencia de que queda adsorbido en la matriz, decidimos realizar la cromatografía con Sephadex G25 en una columna de 1.6cm x 55 cm (Pharmacia Biotech, Upsala. Sweden).

RD.7.1.2.1. Cromatografía Sephadex® G25 de la PP3. Agua

Se realizan 4 cromatografías de 1 ml **PP3** al 2.5% en las condiciones establecidas en el apartado **MM.9.2.1**, utilizando como eluyente agua, para evitar posibles alteraciones del **factor** β con otros disolventes. Se recoge la totalidad del eluido, se secan en rotavapor y se redisuelve en 1 ml de agua (concentración equivalente al 5% del original) (**RD.7.1.2.1. Figura 1**) y se prueba en los medios de ensayo **X**, **X+Y**, **X+HP.S**, **X+HP.S+Y** siendo la producción de pigmento escasa (**2**). Probablemente el **factor** β ha quedado a igual que en Superdex® Peptide retenido en la columna por interacciones inespecíficas con la matriz.

RD.7.1.2.2. Cromatografía Sephadex® G25 de la PP3. Agua-Bicarbonato Amónico

Para comprobar el hecho anterior, se vuelve a inyectar en la misma columna 1 ml de **PP3** al 2.5 % (8 cromatografías), se eluye con agua a 1ml/min y se recoge la totalidad del eluido (**RD.7.1.2.1. Figura 1**). El eluido se lleva a sequedad en rotavapor y se redisuelve en 4 ml de agua (concentración equivalencia 5%). Se probó actividad en los medios de ensayo (**X**, **X+Y**, **X+HP.S**, **X+HP.S+Y**).

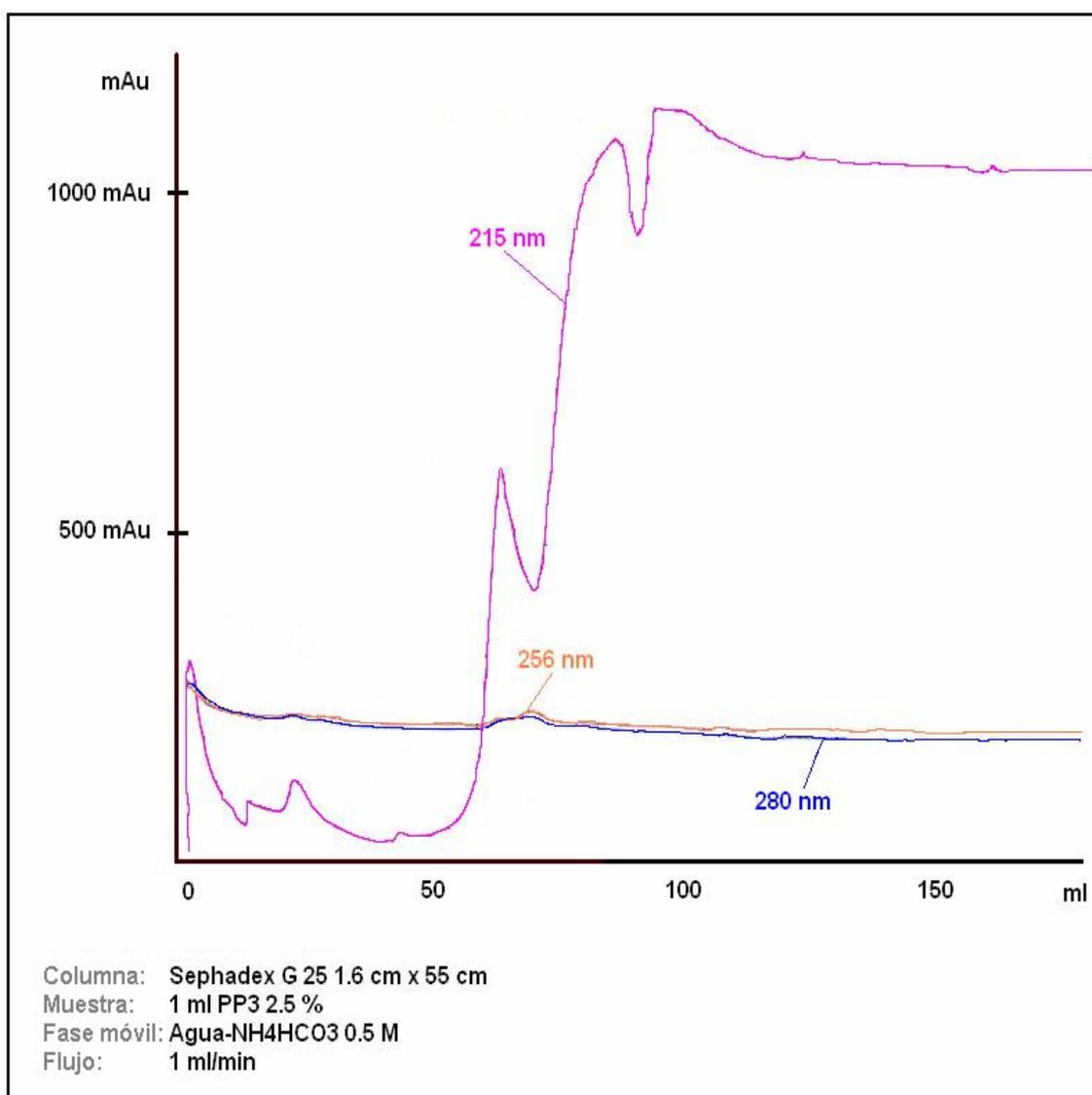


RD.7.1.2.1. Figura 1

Una vez terminada la elución con agua se hace una elución en la misma columna con agua-bicarbonato amónico 0.5 M (RD.7.1.2.2. **Figura 1**) con el fin de aumentar la fuerza iónica del eluyente e intentar separar el **factor** β adsorbido en la matriz. Se prueba actividad en los medio de ensayo (**X**, **X+Y**, **X+HP.S**, **X+HP.S+Y**).

La actividad buena-intensa (**4.5-5**) se recuperó totalmente en el eluido con agua. Sin embargo, esta experiencia se repitió cinco veces encontrándose que no había reproducibilidad, pues en dos ocasiones la actividad se recuperó en el eluido con agua y en tres la actividad se perdió.

Este hecho lo interpretamos como que cuando se cromatografía **PP3** en Sephadex G-25 se produce a veces una retención del **factor** β presente en la **PP3**, que no se elimina por elución con bicarbonato amónico 0.5 M o por lo menos la elución del factor por parte del bicarbonato es tan lenta que no es capaz de eluirlo como un pico definido. Por otro lado tampoco hemos podido controlar los factores que condicionan esta retención.



RD.7.1.2.2. Figura 1

RD.7.1.3. Cromatografía Gel Filtración de la PP3. Superdex® 30

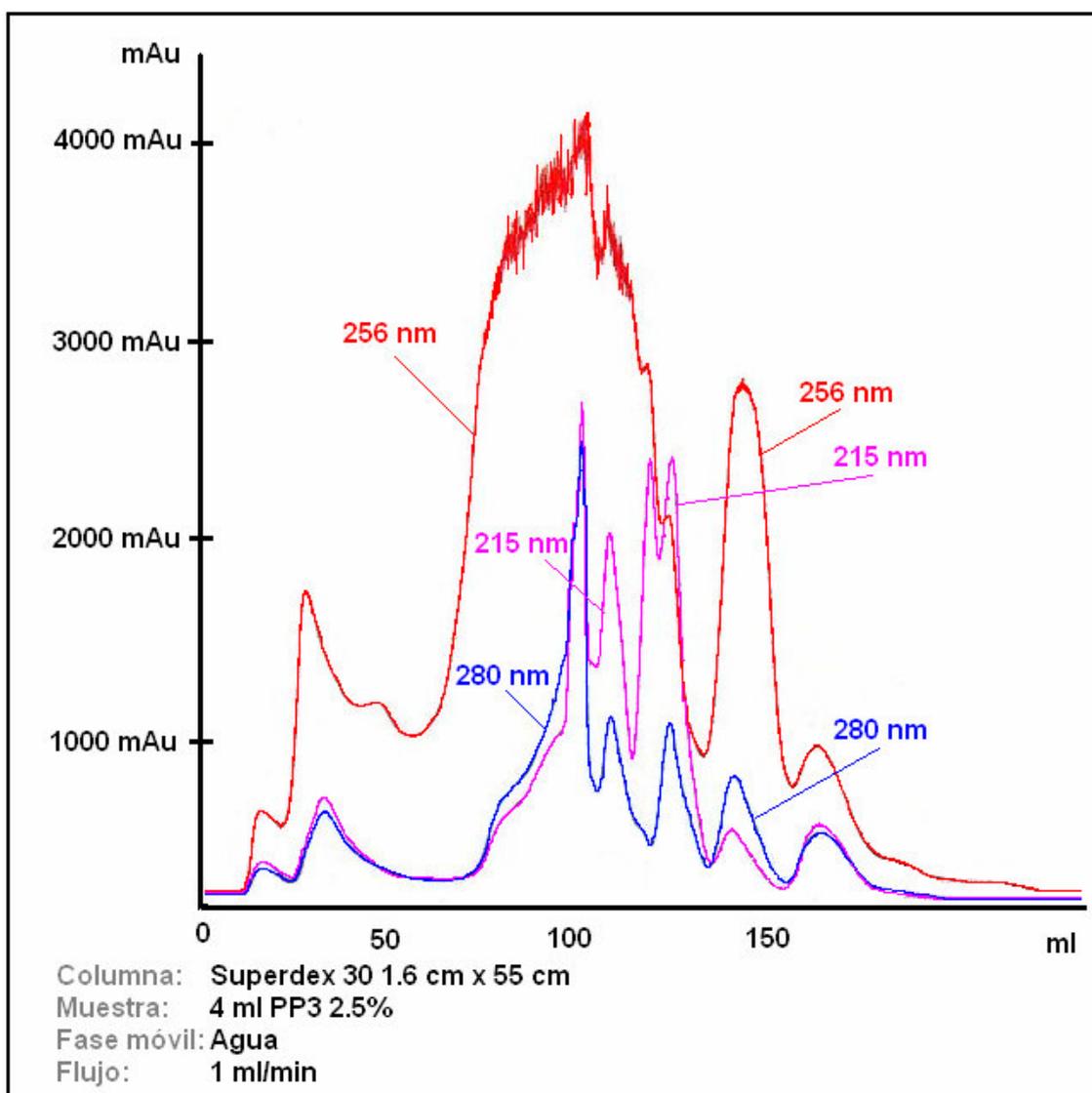
RD.7.1.3.1. Cromatografía Superdex® 30 de la PP3. Agua

Viendo que con Superdex® Peptide y Sephadex® G25 no obteníamos los resultados deseados, se recurre a realizar una cromatografía con Superdex® 30 en una columna 1.6 x 55 (Pharmacia Biotech, Upsala. Sweden) eluyendo con agua según las condiciones establecidas en el apartado MM.9.2.1. Se recogen 400 ml de eluido (aunque mas allá de 200 ml ya no se observa que eluyan compuestos con absorción a las longitudes de onda utilizadas para la detección) se secan en rotavapor y se redisuelven en 4 ml agua (concentración equivalente **PP3** 2.5%). Se ensaya en los medios de ensayo **X**, **X+Y**, **X+HP.S**, **X+HP.S+Y**, la producción de pigmento fue muy pobre/escasa (**1-2**) (RD.7.1.3.1. **Figura 1**).

De nuevo al igual que en Superdex® Peptide y Sephadex® G25 el **factor** β probablemente interaccione de manera inespecífica con la matriz de Superdex® 30 al no recuperarse la actividad en los medios ensayados.

RD.7.1.3.2. Cromatografía Superdex® 30 de la PP3. Agua-Formiato amónico

Para separar el **factor** β de la **PP3** adsorbido en Superdex® 30 se realizan 8 cromatografías con 4 ml **PP3** al 2.5% (p/v) utilizando inicialmente agua. Se mezclan todo lo eluido (200 ml por cromatografía) se evapora en rotavapor y reconstruye con 8 ml (concentración equivalente 6%). Se prueba actividad en los mismos medios de ensayo anteriores, la producción de pigmento fue muy pobre/escasa (**1-2**) (RD.7.1.3.1. **Figura 1**).

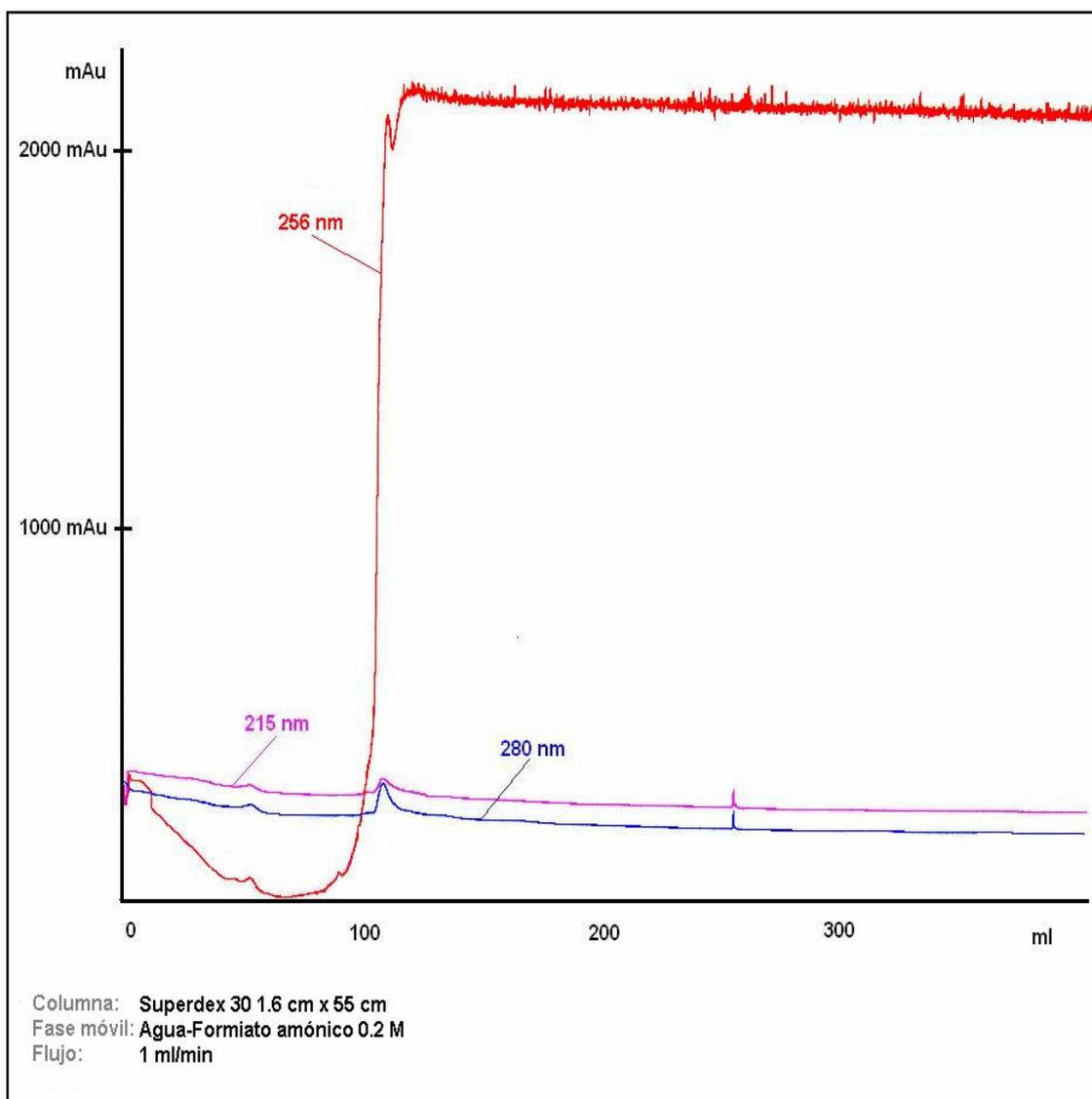


RD.7.1.3.1. Figura 1

Seguidamente se intenta eluir el **factor** β de la **PP3** aparentemente adsorbidos en la columna con 400 ml de formiato amónico 0.2 M para eliminar posibles interacciones de tipo hidrofóbico con la matriz.

El eluído con formiato se seca en rotavapor, se redisuelve en 10 ml de agua y se vuelve a secar y se liofiliza para eliminar las trazas de formiato amónico y se redisuelve en 8 ml (concentración equivalente 6%). Se prueba actividad en los medios de ensayo (**X**, **X+Y**, **X+HP.S**, **X+HP.S+Y**) no observándose producción de pigmento (RD.7.1.3.2. **Figura 1**).

Es evidente que el formiato amónico 0.2 M utilizado para aumentar la fuerza iónica y eliminar las interacciones hidrofóbicas entre **factor** β y la matriz de Superdex[®] 30 no ha sido capaz de conseguir separarlo de la matriz.



RD.7.1.3.2. Figura 1

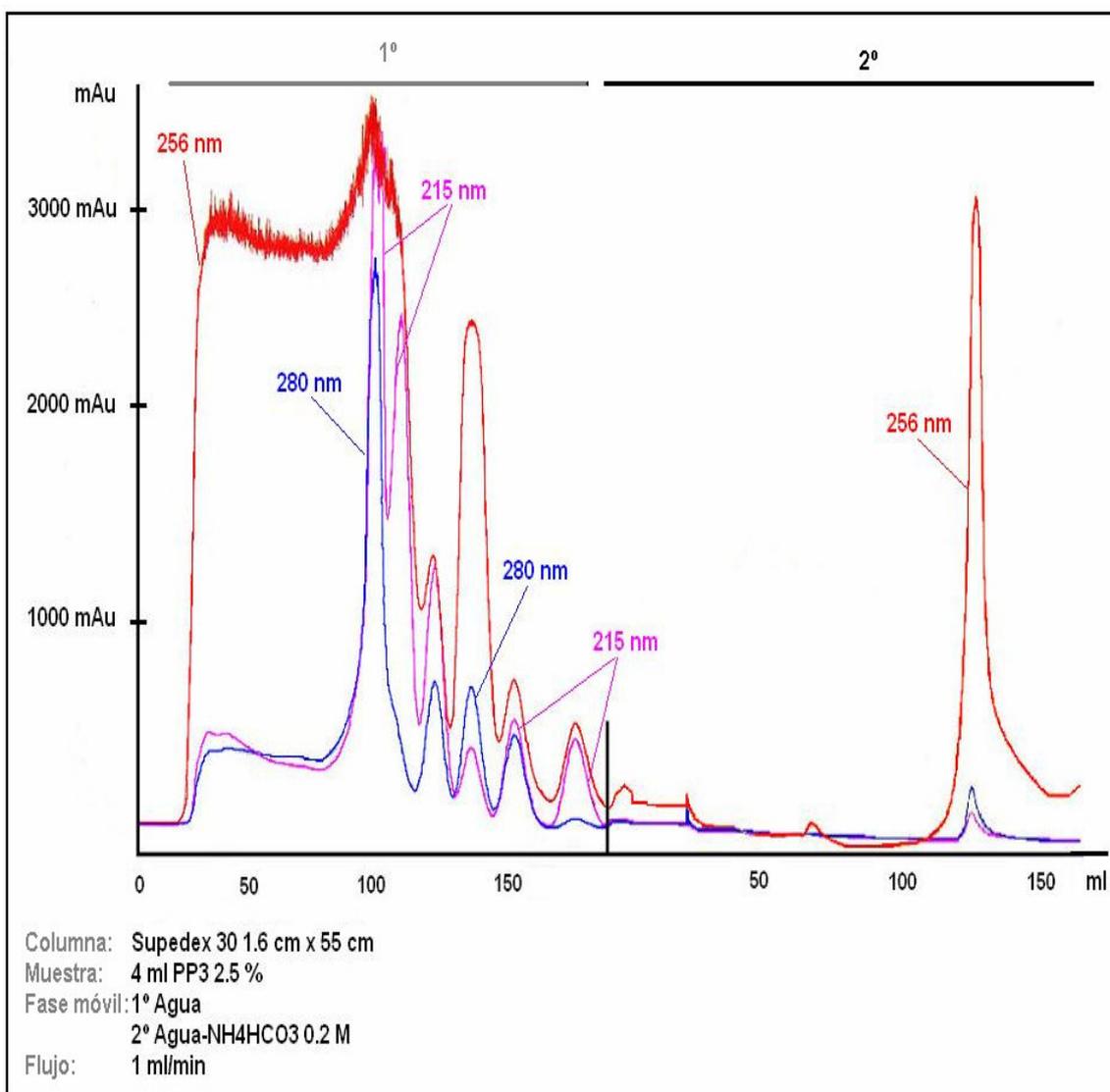
RD.7.1.3.3. Cromatografía Superdex[®] 30 de la PP3. Agua-Bicarbonato amónico

Se realizan nuevamente 4 cromatografías con 4 ml de **PP3** al 2.5% eluyendo con agua. Los 800 ml de eluido con agua se evaporan y reconstruyen a 8 ml (concentración equivalente 5%) (Fracción Superdex[®] 30 agua) (RD.7.1.3.1. Figura 1).

A continuación se realizó una elución aumentando la fuerza iónica con agua-bicarbonato amónico 0.2 M para eliminar posibles interacciones con la matriz e intentar eluir el **factor** β de la **PP3**. Se recoge el pico con absorción 215-280 nm se evapora en rotavapor y redisuelve en 5 ml de agua, se liofiliza para eliminar todas las trazas de bicarbonato y redisuelve en 8 ml agua (concentración equivalente 5%) (Fracción Superdex[®] 30 bicarbonato) (RD.7.1.3.3. Figura 1).

Se prueba actividad de ambas fracciones (**Fracción agua** y **Fracción bicarbonato**) en los medios de ensayo **X**, **X+Y**, **X+HP.S**, **X+HP.S+Y**, siendo la producción de pigmento escasa (**2**). Sin embargo se probó la mezcla de ambas fracciones y la intensidad de pigmento fue buena (**4**), pero cuando la experiencia se repite, los resultados no son reproducibles.

En virtud de los resultados permiten concluir que cuando se cromatografía una solución de **PP3** en Superdex[®] 30 eluyendo con agua se produce interacción del **factor** β y la matriz, que un aumento de la fuerza iónica con bicarbonato amónico 0.2 M no es capaz de eliminar o por lo menos no se ha conseguido controlar las condiciones que permiten romper dicha interacción.

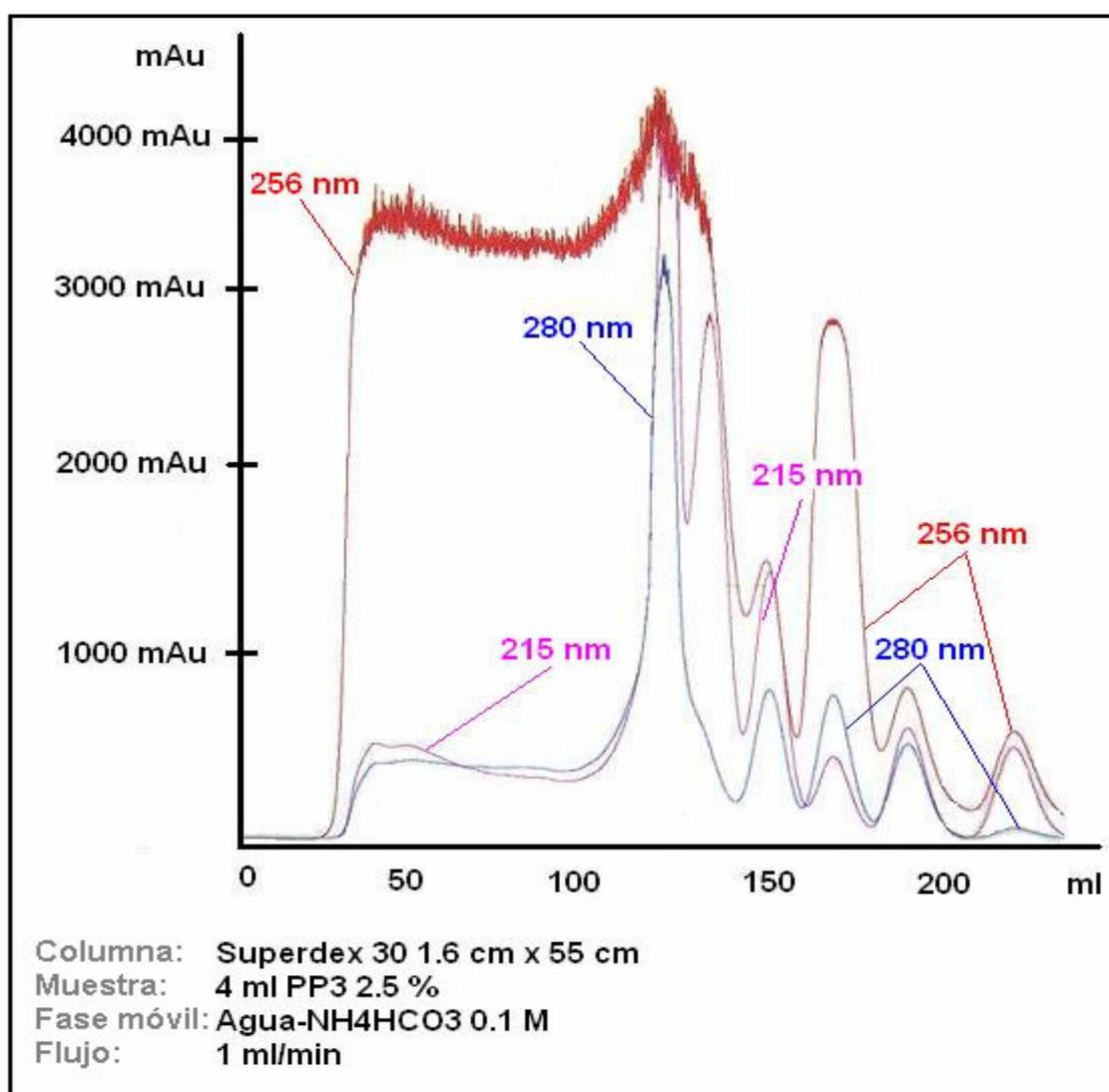


RD.7.1.3.3. Figura 1

RD.7.1.3.4. Cromatografía Superdex® 30 de la PP3. Bicarbonato amónico

Para evitar las interacciones que se producen con la matriz al eluir con agua, se realizan dos cromatografías con 4 ml de **PP3** 2.5% (p/v) eluyendo con agua-bicarbonato amónico 0.1 M (RD.7.1.3.4. **Figura 1**) exclusivamente. El eluido total se seco en rotavapor y se disolvió en 5 ml, se liofilizó para eliminar todas las trazas de bicarbonato y se redisolvió en 4 ml de agua (concentración equivalente 5%). Se probó actividad en los medios de ensayo **X**, **X+Y**, **X+HP.S**, **X+HP.S+Y**, obteniéndose buena producción de pigmento en todos ellos (4).

Esto apunta a que la utilización de bicarbonato amónico parece evitar que las interacciones del **factor** β con la matriz de Superdex 30 no sean tan fuertes como cuando se utiliza como eluyente agua lo que favorece la recuperación de la actividad.



RD.7.1.3.4. Figura 1

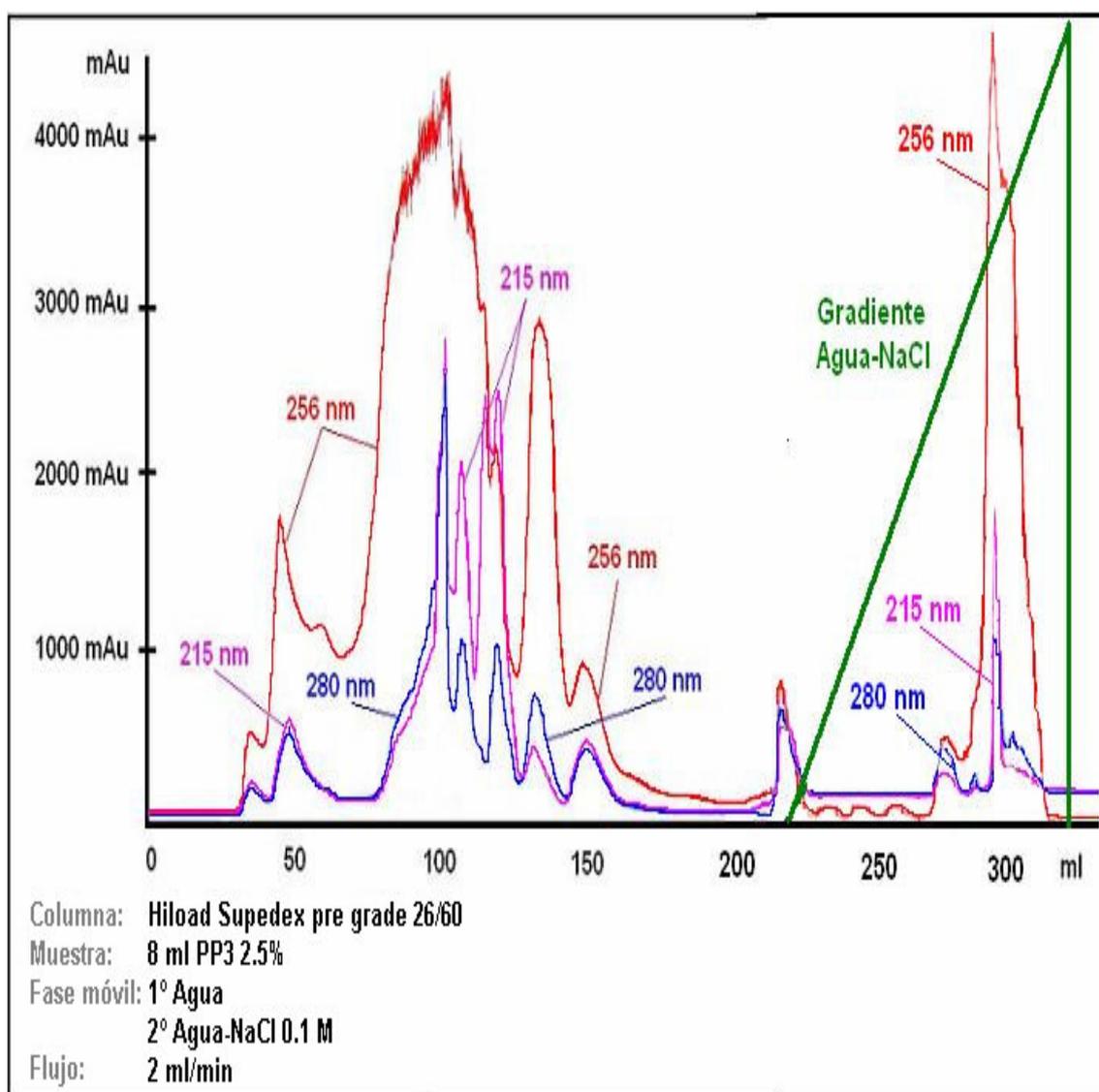
RD.7.1.4. Cromatografía Gel Filtración de la PP3. HiLOADth Superdex

Dado que la resolución de la columna con Superdex[®] 30 es inferior a la obtenida con HiLOADth Superdex y que en Superdex 30 se había conseguido recuperar la actividad utilizando como eluyente agua-bicarbonato amónico se intentó el fraccionamiento de la **PP3** con HiLOADth Superdex.

RD.7.1.4.1. Cromatografía HiLOADth Superdex de la PP3. Agua-Cloruro Sódico

Se realiza una cromatografía en HiLOADth Superdex 30 prep grade 26/60 (Pharmacia Biotech, Upsala. Sweden) eluyendo inicialmente con agua en las condiciones indicadas en el apartado **MM.9.4.1**. Se recogen la **fracción A** se seca en rotavapor y se redisuelve en 4 ml agua (concentración equivalente 5%). A continuación se procede a eluir con gradiente 0.1 M de agua-NaCl que permite romper las posibles interacciones de la muestra con la matriz al aumentar la fuerza iónica del eluyente obteniéndose la **fracción B** que se evapora en rotavapor y disuelve en 4 ml agua (concentración equivalente 5%) (**RD.7.1.4.1. Figura 1**). Se prueban ambas fracciones en los medios de ensayo **X**, **X+Y**, **X+HP.S**, **X+HP.S+Y**, siendo la producción de pigmento muy pobre/escasa (**1-2**) tanto en la eluída con agua como con agua-NaCl.

La pérdida de actividad puede ser debida varias razones: La actividad del **factor β** se haya distribuido en ambas fracciones, el aumento de la concentración de NaCl en los medios de ensayo ha producido una perdida de actividad pero teniendo en cuenta los resultados del apartado **RD.7.1.1.2** el aumento de la concentración de NaCl no puede se responsable de una perdida completa de actividad o que ha ocurrido una adsorción del factor en la matriz de HiLOADth Superdex que el NaCl no es capaz de eliminar.



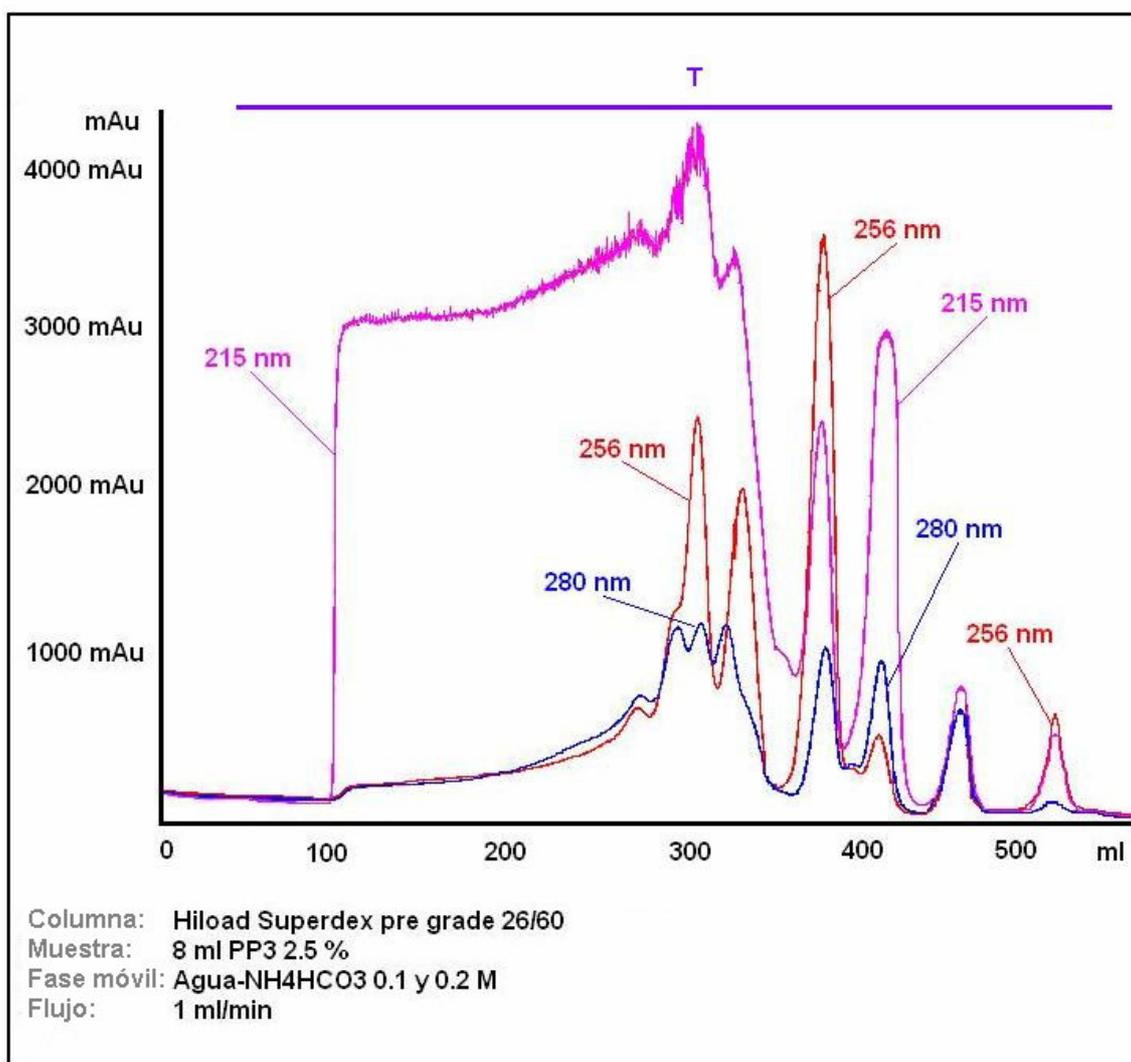
RD.7.1.4.1. Figura 1

RD.7.1.4.2. Cromatografía HiLOADth Superdex de la PP3. Agua-Bicarbonato amónico

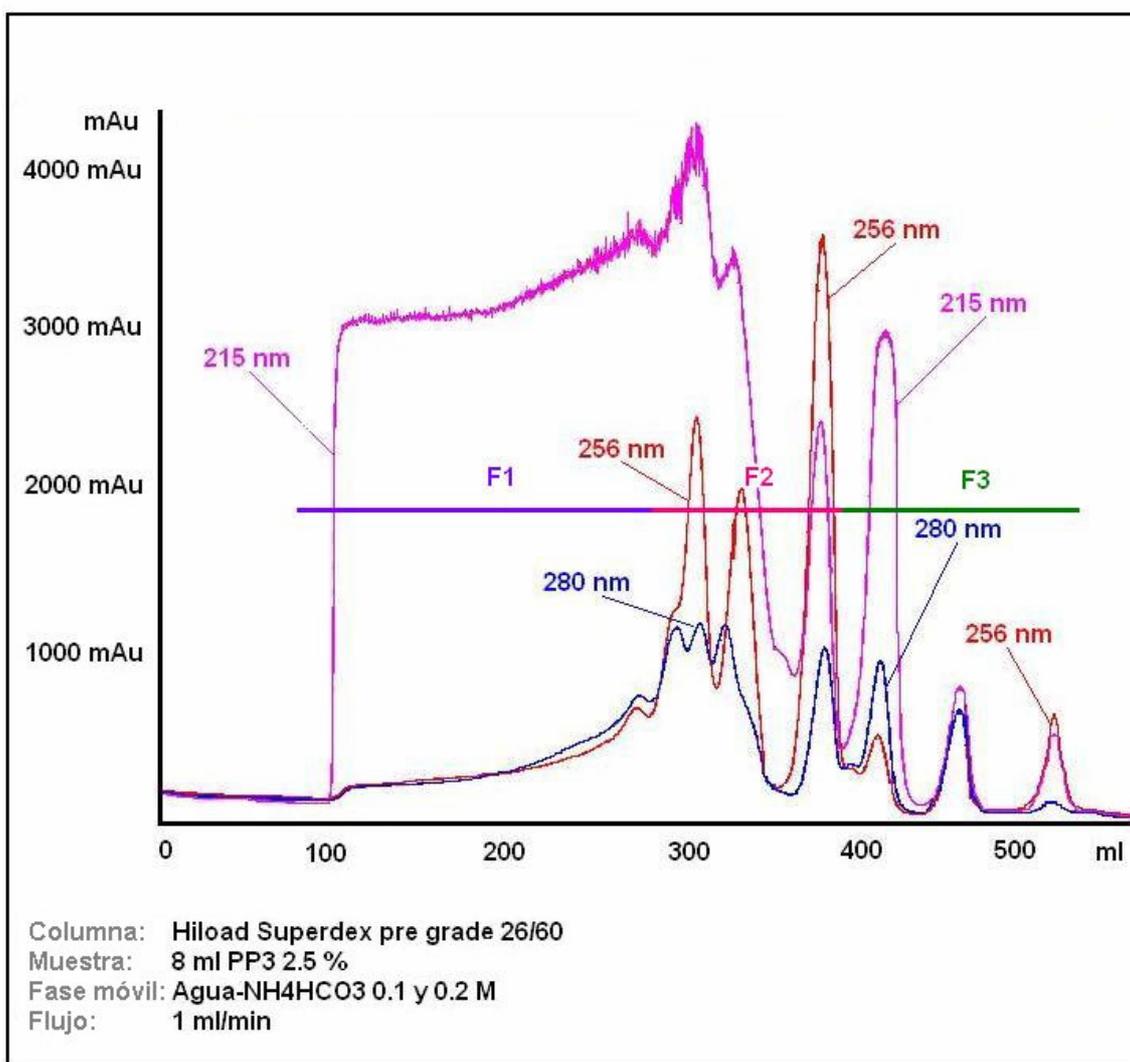
Para comprobar que la pérdida de actividad anterior se debe a la adsorción del factor a la matriz se vuelve a repetir la cromatografía eluyendo con agua, se recoge todo el eluido (**T**) (400 ml) en fracciones 20 ml, se seca en rotavapor y se redisuelve en 5 ml de agua. Seguidamente, se liofiliza y se redisuelve en 4 ml agua (concentración equivalente 4%), se prueba actividad en los medios de ensayo **X**, **X+Y**, **X+HP.S**, **X+HP.S+Y**, recuperándose la actividad (**4-4.5**) (RD.7.1.4.2. **Figura 1**).

Dado que se ha recuperado la actividad se vuelve a realizar una nueva cromatografía, pero en esta ocasión se fracciona en tres el eluido en agua: **Fracción 1 (F1)**, **Fracción 2 (F2)** (120 ml) y **Fracción 3 (F3)**. Se procede a evaporar, liofilizar y redissolver cada fracción en 4 ml de agua (concentración equivalente 5%) se prueba actividad en los diferentes medios de ensayo a igual que antes, recuperándose la actividad en **F2** (**4-4.5**) y no se detecta actividad ni en **F1** ni **F3** (RD.7.1.4.2. **Figura 2**).

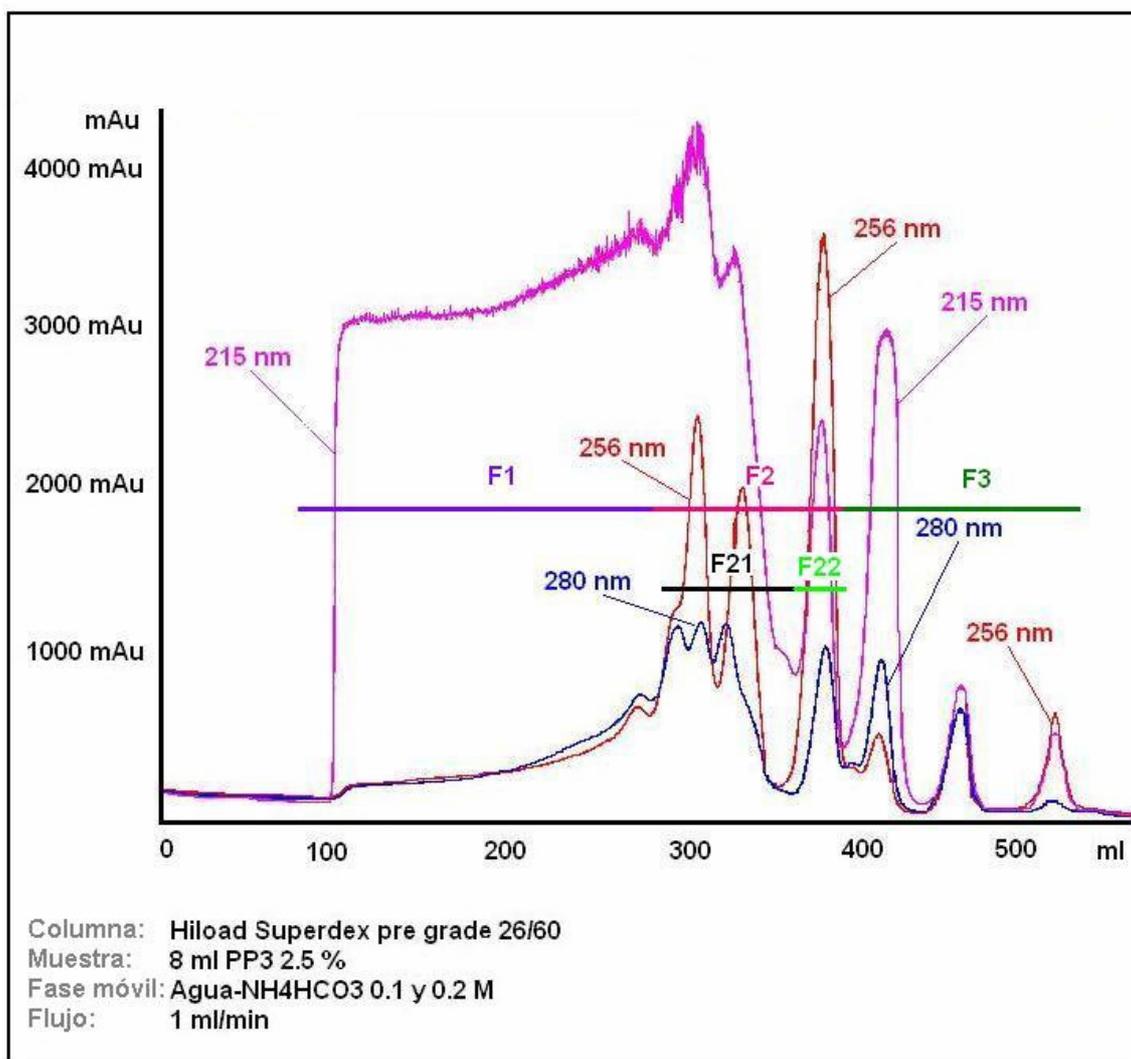
Vuelve a efectuarse otra cromatografía en condiciones análogas y la **fracción F2** se recoge en dos fracciones **F21** (80 ml) y **F22** (40 ml) (RD.7.1.4.2. **Figura 3**) realizándose la misma operación anterior. La actividad aparece concentrada en la fracción **F21**.



RD.7.1.4.2. Figura 1



RD.7.1.4.2. Figura 2

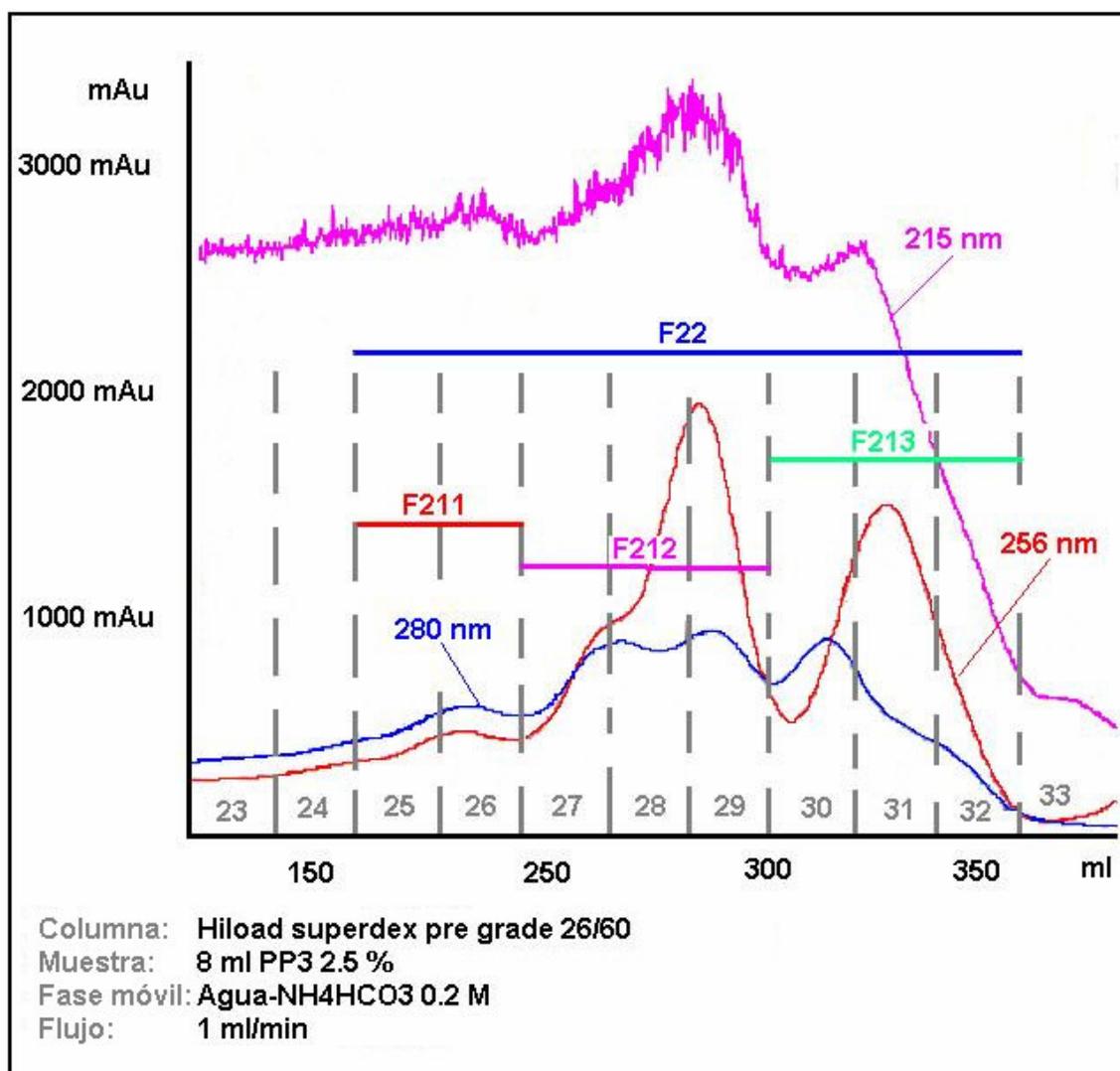


RD.7.1.4.2. Figura 3

Se realiza de nuevo una cromatografía en las mismas condiciones pero recogiendo fracciones de 10 ml de la fracción **F21**. Esta se acopia en tres fracciones **F211** (20 ml), **F212** (30 ml) y **F213** (30 ml). La actividad es moderada (**3.5**), y aparece en la fracción **F212** existiendo una pequeña pérdida de actividad en relación con la fracción **F2**. Para fraccionar la fracción **F212** se repite otra cromatografía en condiciones análogas separando está en tres fracciones **F212.1**, **F212.2** y **F212.3**, se secan, liofilizan y redisuelven en las mismas condiciones y se prueba actividad, en todas aparece actividad aunque con diferente grado **F212.1** (**2**), **F212.2** (**3**) y **F212.3** (**2**) (RD.7.1.4.2. Figura 4).

Se efectúa una nueva cromatografía en las mismas condiciones separando las fracciones **F1**, **F2** y **F3**, se secan, liofilizan y pesan, **F1** constituye el 64%, **F2** el 20% y **F3** un 16% respecto al peso inicial. Pero dado que para conseguir la misma actividad de la **PP3** al 2.5% (**5**) hemos de usar **F2** a un 1%, el enriquecimiento en **factor** β es escaso. A la fracción más activa **F2** se realizó una gravimetría, el peso introducido en cada cromatografía es de un 25%. Lo que significa que se ha enriquecido la actividad cuatro veces, es decir, al 0.5% hay la misma actividad que en **PP3** al 2.5%.

Aparentemente y según los resultados, la actividad del **factor** β puede estar distribuida en varios compuestos de características parecidas que no eluyen como un pico en este sistema cromatográfico o bien la actividad es eluída lentamente por el bicarbonato amónico lo que provoca que no aparezca un pico definido.



RD.7.1.4.2. Figura 4

RD.8. CROMATOGRAFÍA EN FASE REVERSA DE LA PP3

RD.8.1. COLUMNA WATER SPHERISORB® DE LA PP3. AGUA-ACETONITRILO

Se realizó una cromatografía con una columna de silica con uniones octadecilsulfónico llamada Spherisorb® C-18 ODS2 (DS Water, Atlanta, USA) descrita en el apartado MM.10.1.

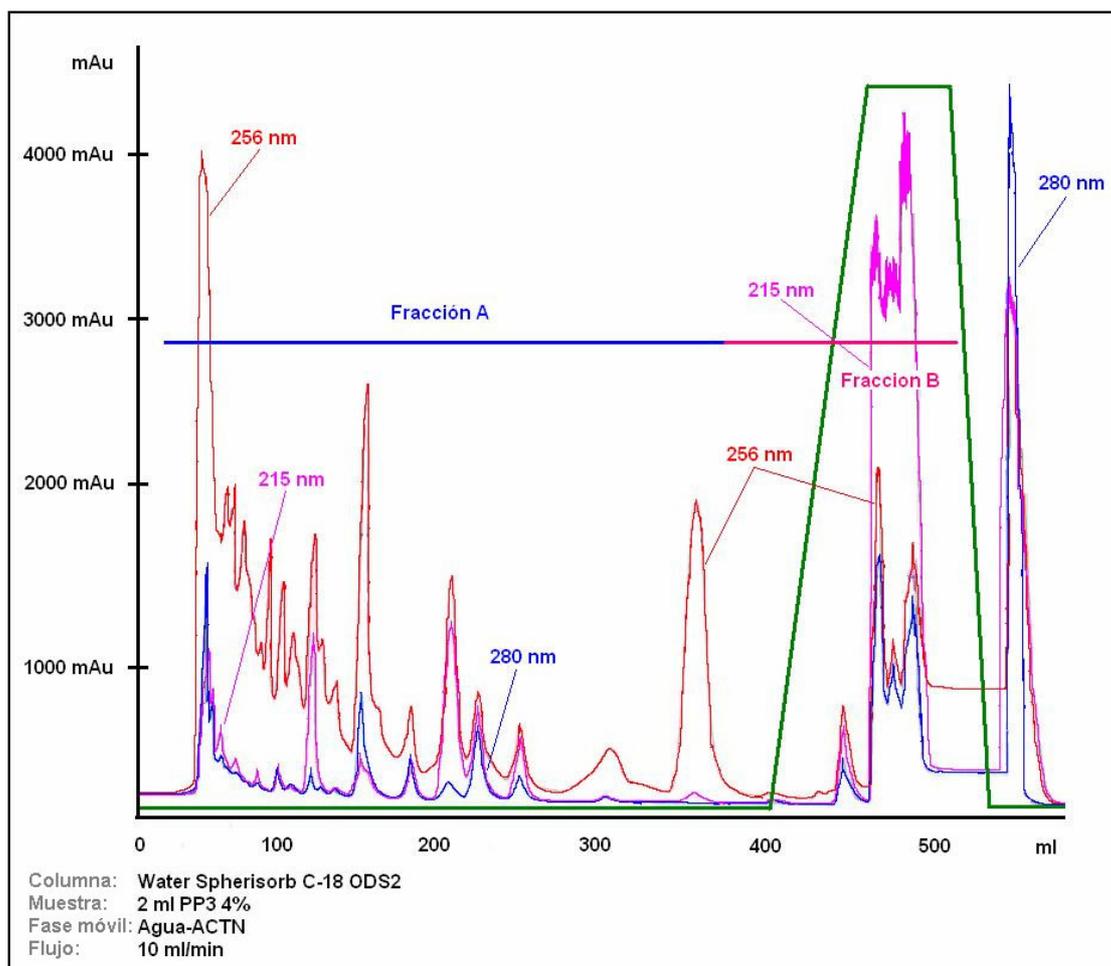
Se inyectó 2 ml **PP3** al 4% (p/v), eluyéndo en primer lugar con agua obteniendo la **fracción A** y completando la elución con ACTN 100% recogiendo la **fracción B** (RD.8.1. Figura 1).

Se evaporó a sequedad y se reconstruyó cada fracción con 2 ml de agua (concentración equivalencia 4%). Se probó actividad en los medios de ensayo (X, X+Y, X+HP.S y X+HP.S+Y) recuperándose en la **fracción A** (4.5).

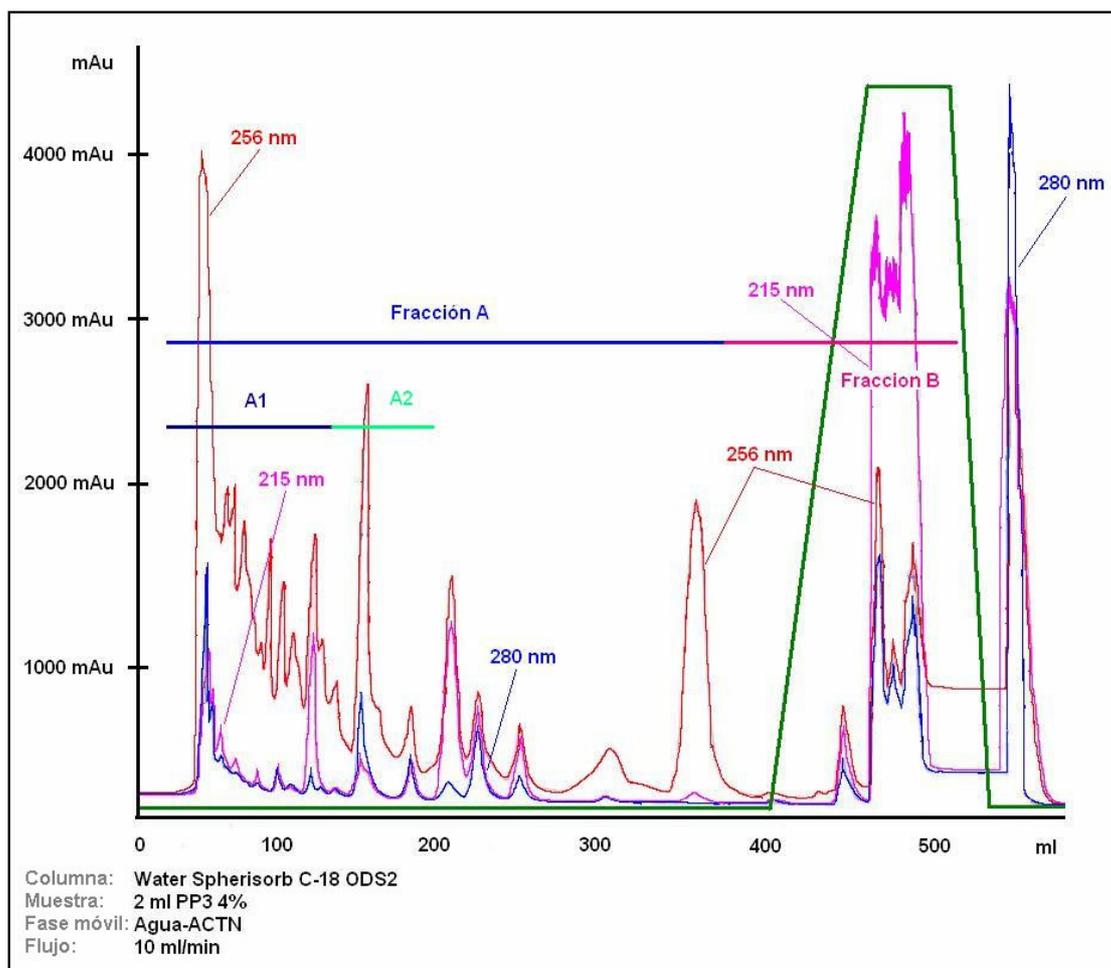
Se procedió a repetir la cromatografía en las mismas condiciones fraccionando la **fracción A** en **A1** y **A2** recuperándose la actividad en la **fracción A1** (4.5) (RD.8.1. Figura 2).

Se procedió a repetir la cromatografía en las mismas condiciones fraccionando la **fracción A1** (80 ml) en fracciones de 10 ml y en este caso no se consiguió recuperar actividad en ninguna de las fracciones.

Que la actividad se localice en la fracción acuosa indica en primer lugar que el **factor β** presente en la **PP3** no se adsorbe en la columna de silica y en segundo lugar la perdida de actividad al fraccionar la **fracción A** puede explicar que dicho factor se trata de un conjunto de compuestos con un comportamiento análogo en el sistema cromatográfico utilizado.



RD.8.1. Figura 1



RD.8.1. Figura 2

RD.8.2. COLUMNA SOURCEth DE LA PP3. AGUA-ACETONITRILO-ÁCIDO TRIFLUOROACETICO

Se utilizó una columna preparada Sourceth 15 RPC (Amersham Pharmacia Biotech, Upsala. Sweden) de matriz polimérica rígida de poliestireno/divinilbenceno.

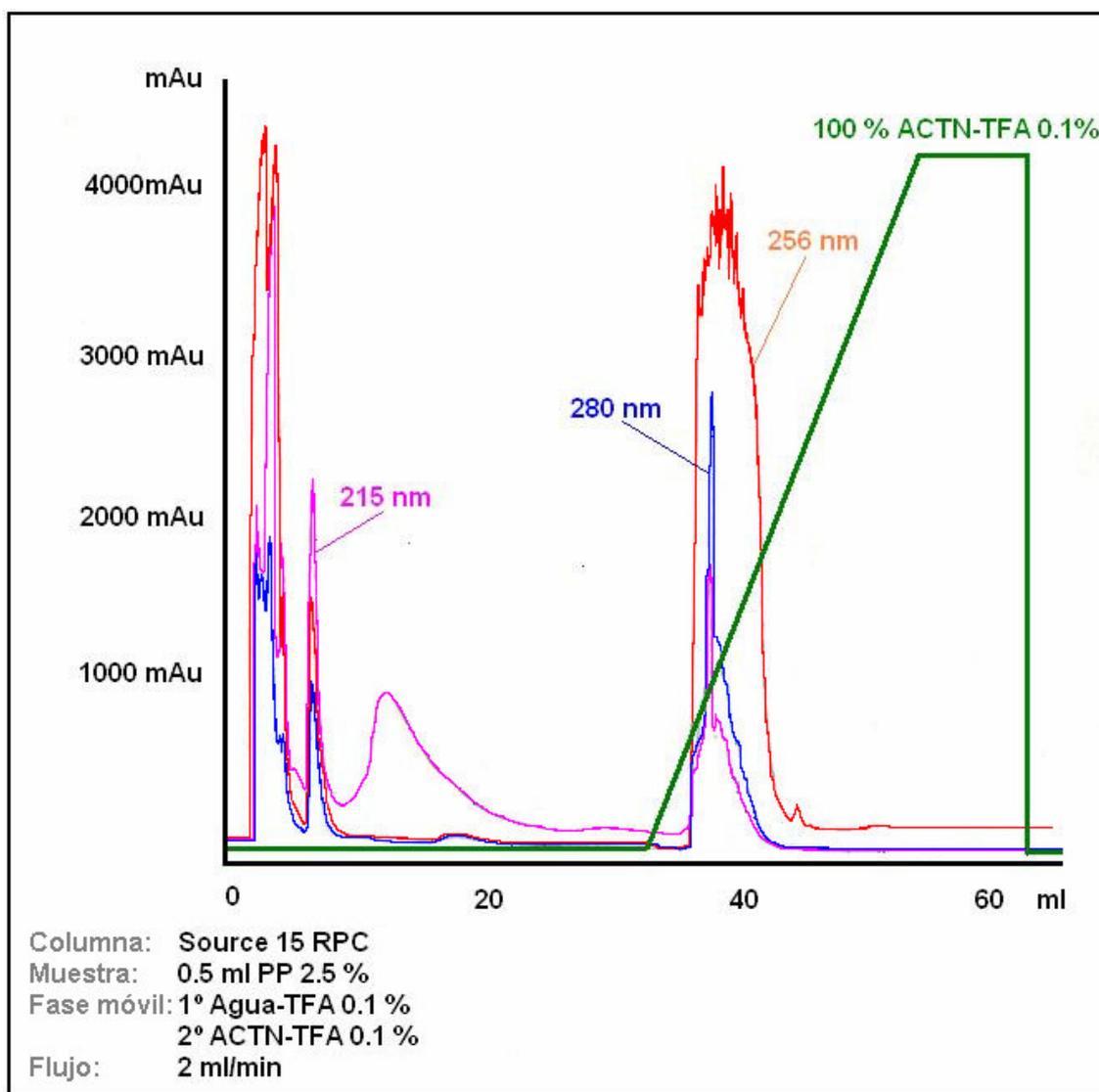
Se inyectan 8 cromatografías de 0.5 ml de **PP3** al 2.5%, cada cromatografía se eluye primero con agua-TFA 0.1% y posteriormente se inicia un gradiente del 100% de ACNT-TFA 0.1%.

Se recogen las 2 fracciones indicadas en la figura (RD.8.2. **Figura 1**), la **fracción A** corresponde al agua y la **fracción B** a la totalidad del gradiente con ACTN. Ambas fracciones se secan en rotavapor, se redisuelve cada fracción en 1 ml de agua (equivalente al 8% del original) y se llevan a pH 7 con NaOH 0.1 M.

Se prueban en los medios de ensayo (**X**, **X+Y**, **X+HP.S** y **X+HP.S+Y**), la **fracción A**, la **fracción B** y la mezcla **A+B**, la producción de pigmento fue muy pobre (**1**) en todas los casos.

Para comprobar si la actividad se ha perdido al quedar el **factor β** retenido en la columna, se inyectan 8 cromatografías de 0.5 ml de **PP3** 2.5%, cada cromatografía se eluye primero con agua-TFA 0.1% y una vez efectuadas las 8 cromatografías la totalidad del eluido (de las 8 cromatografías) se evapora en rotavapor y se redisuelve en 2 ml de agua (concentración equivalente 5 %) y se lleva a pH 7 con NaOH 0.1 M (**Fracción C**).

Terminadas las 8 cromatografías con agua-TFA se pasa un pulso de ACTN-TFA 0.1%. Se recoge el pico eluido con el ACTN-TFA 0.1% (**Fracción D**) se seca en rotavapor, se redisuelve en 2 ml de agua (concentración equivalente al 5%) y se llevan a pH 7 con NaOH 0.1 M.



RD.8.2. Figura 1

Se prueban en los mismos medios de ensayo, la **fracción C**, la **fracción D** y la mezcla **C+D** a concentración equivalente al 2.5%. La producción de pigmento fue muy pobre (**1**) en todas los casos.

El hecho de no haber recuperado la actividad en ninguna fracción solo puede ser explicado bien porque el **factor β** ha quedado adsorbido en la matriz polimérica de poliestireno/divinilbenceno de la columna de Sourceth, o bien que dicho factor se haya inactivado por la presencia del ACTN-TFA como ocurría en la cromatografía gel filtración.

Se pasa a comprobar si simplemente el ACTN-TFA afectan a la actividad. Para ello se preparan soluciones de **PP3** al 0.1% en 60 ml agua, y se añaden 30 ml de ACTN-TFA 0.1%, la solución se evapora a sequedad en rotavapor se redisuelven en 1.5 ml de agua (concentración equivalente 4%) y se neutralizan con NaOH 0.1 M y con NH₃ 0.1M. Se utilizó amoniaco para neutralizar por si el aumento de concentración de NaCl influye en la perdida de actividad. Se prueba actividad en los medios de ensayo siendo la producción de pigmento nula-muy pobre (**0-1**). Parece que la falta de actividad tras cromatografiar sea más bien a la presencia de TFA, que a una adsorción del **factor β** a la matriz de poliestireno/divinilbenceno. Por lo tanto, al igual que en gel filtración cuando se secan soluciones de **PP3** en presencia de ácido el **factor β** se altera bien porque la concentración de ácido aumenta conforme se seca la solución alcanzándose concentraciones altas que hidrolizan el factor o bien porque el TFA forme sales insolubles que influyan sobre la solubilidad del factor

RD.8.3. COLUMNA VYDAC[®] DE LA PP3. AGUA-ACETONITRILÓ- ÁCIDO TRIFLUOROACETICO

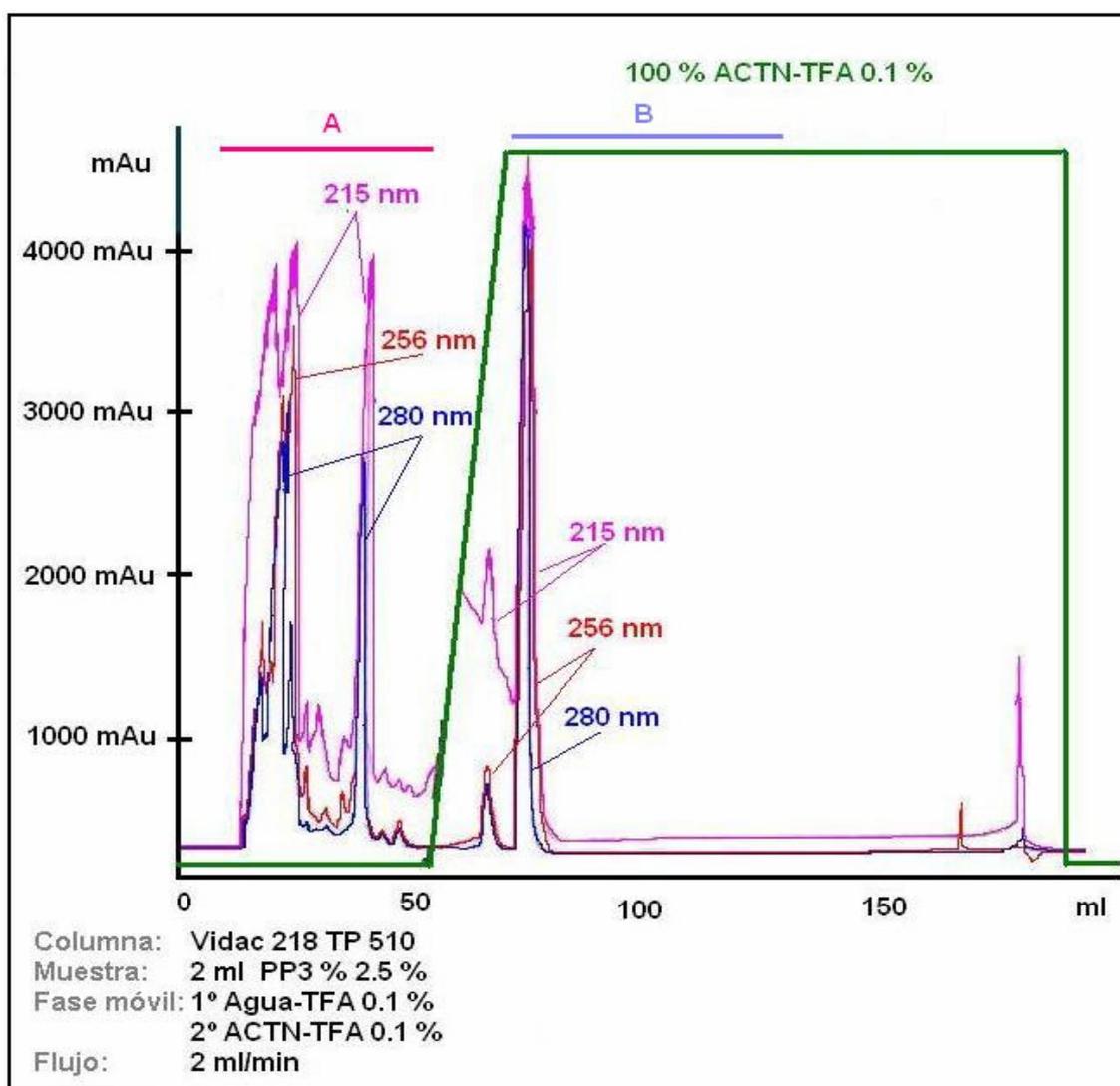
Se utilizó una columna semipreparativa Vydac[®] 218 TP 510 Reversed fase (Grade & CO, St Louis. USA) cuya matriz es de silica unida con grupos alifáticos octadecil.

Se inyectan 3 ml **PP3** al 2.5%, eluyéndo en primer lugar con agua obteniendo la **fracción A** y completando la elución con ACTN 100% recogiendo la **fracción B**. Se evaporó a sequedad y se reconstruyó cada fracción con 1.5 ml de agua (concentración equivalencia 5%). Se probó actividad en los medios de ensayo (**X**, **X+Y**, **X+HP.S** y **X+HP.S+Y**) recuperándose en la **fracción A (4.5)** (RD.8.3. Figura 1).

Se procedió a repetir la cromatografía en las mismas condiciones fraccionando la **fracción A** en **A1** y **A2**, se probó actividad en los medios anteriores repartiéndose la actividad en ambas fracciones. El hecho de que la actividad se localice en la fase acuosa sugiere que al igual que ocurría en la columna Water Spherisorb[®] el **factor β** no se adsorbe en la columna. Por otra parte, la perdida de actividad al fraccionar la **fracción A** puede explicar que dicho factor se trata de un conjunto de compuestos con un comportamiento análogo en el sistema cromatográfico utilizado.

Se inyectan igualmente 3 ml **PP3** al 2.5%, pero en este caso se eluye con agua-TFA 0.1% y luego se realiza un gradiente de 100% de ACTN-TFA 0.1%. Se recoge la totalidad del eluído, se seca en rotavapor y se redisuelve en 1.5 ml agua (concentración equivalente al 5%) y se neutraliza con NaOH 0.1 M. Se prueban en los medios de ensayo **X**, **X+Y**, **X+HP.S** y **X+HP.S+Y**. La producción de pigmento fue nula.

En este caso atendiendo a los resultados puede haber ocurrido que el **factor** β se adsorba a la matriz de sílice al igual que ocurre en la columna de Water Spherisorb[®] o bien la presencia del TFA haya provocado una pérdida de la actividad como ocurre en la columna Sourceth 15 RPC. Dado que con el TFA parece que provoca pérdida de actividad según los resultados del apartado RD.7.1.1.1 y el apartado RD.8.2 se realiza una experiencia análoga con ácido clorhídrico (HCl). Se realizan tres experiencias disolviendo **PP3** en ACTN-HCl al 0.2 % para comprobar si esta disolución afecta al pigmento tras evaporar y apareció pérdidas de actividad variable en los distintos medios de ensayo (2-3.5). Lo que indica que la presencia de ácido cuando se secan soluciones de **PP3** provocase una pérdida no controlable de actividad.



RD.8.3. Figura 1

RD.9. HIDROLIZADOS PRODUCIDOS EN EL LABORATORIO DE CARNE DE VACUNO

RD.9.1. HIDROLIZADOS DE CARNE DE VACUNO CON PEPSINA

El hidrolizado obtenido de carne de vacuno como se describe en el apartado MM.11.1.1, se probó en los diferentes medios de ensayo. La producción de pigmento vario entre muy pobre (1) para los medios sin extracto de levadura (X y X+HP.S) y pobre-débil (2.5-3) para medios con extracto de levadura (X+Y y X+Y+HP.S).

El resultado obtenido indica que en las condiciones de hidrólisis utilizadas (ebullición previa para desnaturalizar las proteínas, e hidrólisis con pepsina) no se ha conseguido obtener el **factor** β de la carne de vacuno. Posiblemente porque el factor no este presente en el tejido o se encuentre a una baja concentración activa bien porque se haya destruido por la acción del ácido clorhídrico ya que la pepsina no lo destruye (apartado RD.6.1.1) o bien porque en el proceso de desnaturalización por ebullición de la proteínas del tejido, la coagulación de proteínas haya impidiendo el proceso hidrolítico de la pepsina y la consiguiente liberación del **factor** β .

RD.9.1.1. Influencia de la acidificación con fosfórico y neutralización con amoniaco en la hidrólisis de carne de vacuno

Dado que en las condiciones de hidrólisis anteriores no se obtiene el **factor** β y según señala la literatura BD-Difco (Difco 1998), la PP3 se fabrica por hidrólisis enzimática controlada variando los parámetros de hidrólisis utilizados para la obtención de la proteosa peptona (Difco, 1998). Se procedió a una modificación de las condiciones de hidrólisis, acidificando con ácido fosfórico y neutralizando con amoniaco (NH₃).

Se ensayaron en paralelo hidrolizados con pepsina de carne total, según lo descrito en el apartado MM.11.1.1.1, bien acidificados con ácido clorhídrico o con ácido fosfórico utilizando para neutralizar bien NaOH o NH₃. El hidrolizado obtenido se probó en los medios de ensayo, la producción de pigmento variando entre muy pobre (1) para los medios sin extracto de levadura (X, X+HP.S) y débil-moderada (3,5) para los medios con extracto de levadura (X+Y. X+HP.S+Y).

No se encontraron diferencias en la capacidad de soportar producción de pigmento por EGB en los medios preparados con hidrolizados de carne con pepsina bien acidificados con HCl ó ácido fosfórico ni cuando la neutralización se realizó con NaOH ó NH₃.

Este resultado apunta a que las condiciones hidrolíticas no es el único factor que interviene en la formación del **factor** β , esta explicación se apoya además en los resultados obtenidos de las peptona comercial incorporadas al medio base apartado RD.4 en el cual solo la proteosa peptona N° 3, proteosa peptona N° 2, proteosa peptona, peptamina y la primatona de Sheffield en presencia está última del **factor** α son capaces de soportar la producción de pigmento por EGB en los medios de ensayo obteniendo una intensidad de pigmento intensa-excelente. Por lo tanto, que esté o no el **factor** β en un hidrolizado no depende exclusivamente de las condiciones de hidrólisis como cabría de esperar según lo descrito por el manual de Difco (Difco 1998) sino también del tejido animal de partida.

RD.9.1.2. Influencia de una extracción previa con agua en la hidrólisis de carne de vacuno

La extracción previa con agua no influyó sobre el hidrolizado de carne de vacuno obteniéndose un producción de pigmento variando entre muy pobre (1) y débil-moderada (3-3.5) en los distintos medios de ensayo (X, X+HP.S, X+Y. X+HP.S+Y).

Con este resultado solo podemos insinuar que el **factor** β si esta presente en la carne de vacuno no esta soluble en el tejido.

RD.9.1.3. Influencia de una diálisis previa en la hidrólisis de carne de vacuno

Tras la diálisis del pellet de carne se probó en los medios de ensayo la fracción dializada consiguiéndose una producción de pigmento entre muy pobre (1) y débil (3). De manera similar a la explicación anterior podemos decir que el **factor** β , si esta en la carne de vacuno, no es dializable y por tanto nos esta soluble en el tejido.

RD.9.1.4. Influencia de modificaciones en los tiempos de hidrólisis sobre la hidrólisis de carne de vacuno con pepsina

No se apreciaron cambios en la actividad de la peptona de carne dependiendo del tiempo de hidrólisis desde 90 min hasta 16 h.

Lo que apunta a que el **factor** β no debe de tratarse de un péptido pequeño además de por los resultados obtenidos en el apartado RD.6.1 porque tras una hidrólisis de tejido vacuno de 16 horas es poco probable que ningún péptido formado no corresponda con el **factor** β .

RD.9.2. HIDROLIZADO DE CARNE DE VACUNO CON PEPSINA DESNATURALIZADA PREVIAMENTE CON ÁCIDO

Cuando el hidrolizado de carne con pepsina se prepara sin previa ebullición de la carne, desnaturalizando las proteínas por acidificación según lo indicado en el apartado MM.11.1.2 la producción de pigmento no cambia respecto a la obtenida con carne hidrolizada tras previa ebullición. Siendo muy pobre (1) para los medios sin extracto de levadura (X, X+HP.S) y pobre-moderada (2.5-3,5) para medios con extracto de levadura (X+Y, X+HP.S+Y).

Esto indica que el factor β es poco probable que este presente en este tejido ya que la utilización de ácido clorhídrico para desnaturalizar proteínas conlleva también a un aumento de la permeabilidad celular favoreciendo la extracción de compuestos celulares con lo cual el tejido es prácticamente digerido.

RD.9.3. HIDROLIZADO DE CARNE DE VACUNO CON DIFERENTES ENZIMAS PROTEOLITICOS

No soportó o soportó muy pobre producción de pigmento (0-0.5) en los medios X y X+Y el hidrolizado con tripsina descrito en el apartado MM.11.1.3. Soportó una producción de pigmento débil-moderada (3-3.5) en los medios X+HP.S y X+HP.S+Y.

El hidrolizado de carne utilizando otras proteasas como papaína, proteinasa K, termolisina, pronasa y ficina obtenido según los pasos indicados en el apartado MM.11.1.4 no soporto o soporto muy pobre producción de pigmento (0-0.5) en los medios de ensayo X, X+Y, X+HP.S y X+YHP.S.

Estos resultados permiten afianzar más las explicaciones expuestas en los apartados RD.9.1.4 y RD.6.1.1 de que el **factor** β no debe de ser un oligopéptido pequeño ya que si así lo fuera debería haberse obtenido de alguno de estos hidrolizados enzimáticos.

RD.9.4. HIDROLIZADOS DE OTROS TEJIDOS VACUNOS

El hidrolizado de corazón, pulmón y tendón de ternera con pepsina en los distintos medios de ensayo **X**, **X+Y**, **X+HP.S** y **X+YHP.S** soportó una producción pobre-moderada de pigmento (2.5-3.5). El hidrolizado de oreja de ternera con pepsina así como el hidrolizado con papaína no soportó producción de pigmento o fue muy pobre (0.5-1) en los medios **X**, **X+Y**, **X+HP.S** y **X+YHP.S**.

El resultado sugiere que **factor** β no esta presente en ninguno de estos tejidos. Por lo tanto, se puede aventurar que este factor no presenta uniones del tipo O-glicosil β 1-5 entre D-galactosa y 5-hidroxi-L-lisina ya que la hidrólisis de estos tejidos conduce a un pool metabólico rico en este tipo de glicoproteínas.

RD.10. HIDROLIZADOS DE COLÁGENO. SANGRE. POLLO

RD.10.1. HIDROLIZADO DE COLÁGENO CON PEPSINA

De igual manera ocurrió con el hidrolizado con pepsina de colágeno (C9879 Sigma), el hidrolizado de colágeno de Roic Farma y el hidrolizado con pepsina de gelatina así como con el hidrolizado con papaína de colágeno (C-9879 Sigma) no soportaron producción de pigmento o fue muy pobre (0.5-1) en los medios de ensayo. Lo que reafirma la explicación anterior de que el **factor** β no esta relacionado con este tipo de glicoproteínas.

RD.10.2. HIDROLIZADOS DE SANGRE, HEMOGLOBINA, SUERO Y ALBÚMINA CON PEPSINA

SANGRE

El hidrolizado péptico de sangre (sangre de caballo, Oxoid) descrito en el apartado MM.11.4 se probó en los medios de ensayo **X**, **X+Y**, **X+HP.S** y **X+Y+HP.S** utilizando la técnica de membrana Sartorius descrita en el apartado MM.1 como consecuencia del tono oscuro de los medios. La producción de pigmento vario entre muy pobre (**1**) para los medios sin extracto de levadura (**X**, **X+HP.S**) y pobre-débil (**2.5-3**) para medios con extracto de levadura (**X+Y**, **X+Y+HP.S**). Por lo tanto, la sangre tampoco posee el **factor** β .

HEMOGLOBINA

En cuanto a la hemoglobina (08449 Sigma) se probó en los medios de ensayo utilizando igualmente la técnica de membrana, la producción de pigmento vario entre muy pobre y nula (**0.5-1**) en todos ellos. Con lo cual el **factor** β no debe no debe estar relacionado con compuestos pirrólicos.

SUERO

El hidrolizado péptico de suero (suero de caballo, Oxoid) en los medios de ensayo **X+HP.S** y **X+YHP.S** no soportó producción de pigmento o fue muy pobre (**0-1**). Este resultado es de esperar porque como se indicó en el apartado RD.1.2, el **HP.S** solo aporta el **factor** α en el medio, para que se produzca la producción de pigmento es necesario además el **factor** β procedente de la proteosa peptona N^o 3 o de primatona de Sheffield.

El hidrolizado de albúmina con pepsina se ha utilizado en este trabajo para demostrar que el efecto fundamental del hidrolizado péptico de suero en el medio de prueba es aportar el **factor** α y que en la **PP3** existe dicho factor (ver RD.1.2).

RD.10.3. HIDROLIZADO DE POLLO CON PEPSINA

Se ensayo incorporado a los medio de ensayo **X**, **X+Y**, **X+HP.S** y **X+YHP.S** el hidrolizado de pollo obtenido en el apartado MM.11.5, la producción de pigmento fue muy pobre en todos los casos (**0.5-1**). El tejido de pollo tampoco posee el **factor** β .

RD.10.4. HIDROLIZADO DE CLARA DE HUEVO

El hidrolizado obtenido en el apartado MM.11.6 se incorporó a los medios de ensayo **X**, **X+Y**, **X+HP.S** y **X+YHP.S** siendo la producción de pigmento muy pobre (**0.5-1**) en todos. Con lo cual el **factor** β no esta presente en la clara de huevo.

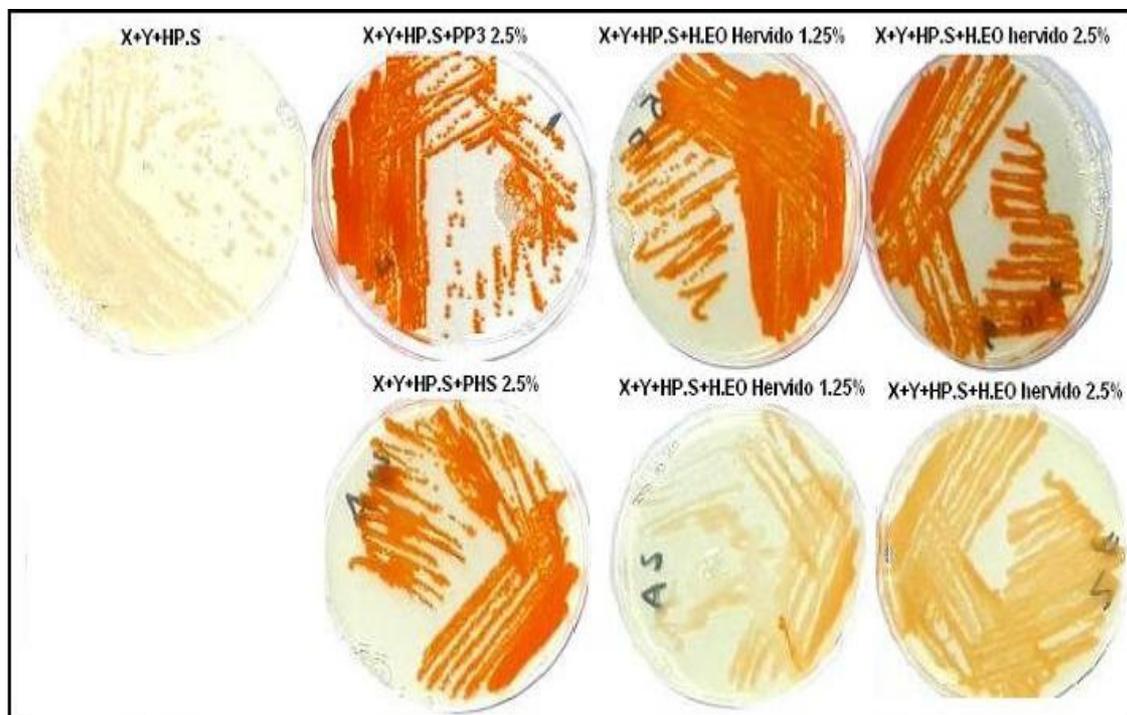
RD.11. HIDROLIZADO Y EXTRACTOS DE ESTÓMAGO E INTESTINO DE OVEJA

RD.11.1. HIDROLIZADO DE ESTÓMAGO DE OVEJA

RD.11.1.1. Hidrolizado de estómago de oveja con pepsina

Este hidrolizado se incorporó a los medios de ensayo (**X**, **X+Y**, **X+HP.S** y **X+Y+HP.S**) obteniéndose resultados variables en cuanto a la producción de pigmento (**2-4.5**) (RD.11.1.1. **Figura 1**).

Dado que en algunos ensayos se obtuvo una intensidad de pigmento intensa, parecida a la obtenida por la **PP3** y por la **PHS** (esta última cuando se incorpora el **factor α**), el **factor β** estaría presente en el tejido del estómago de oveja. La ebullición previa utilizada para la desnaturalización de las proteínas del tejido puede explicar esta falta de reproducibilidad ya que en este proceso se forman coágulos de proteínas que puede hacer inaccesible en ocasiones la acción hidrolítica de la pepsina, no liberándose el **factor β** . Otra posible explicación es que el **factor β** se encuentre formando parte de la membrana celular o de productos intracelulares donde la pepsina no puede actuar y una ebullición previa del tejido no es capaz de extraer dichos compuestos por lo menos de forma reproducible.



RD.11.1.1. **Figura 1.** Intensidad de pigmento del hidrolizado de en los medios de ensayo

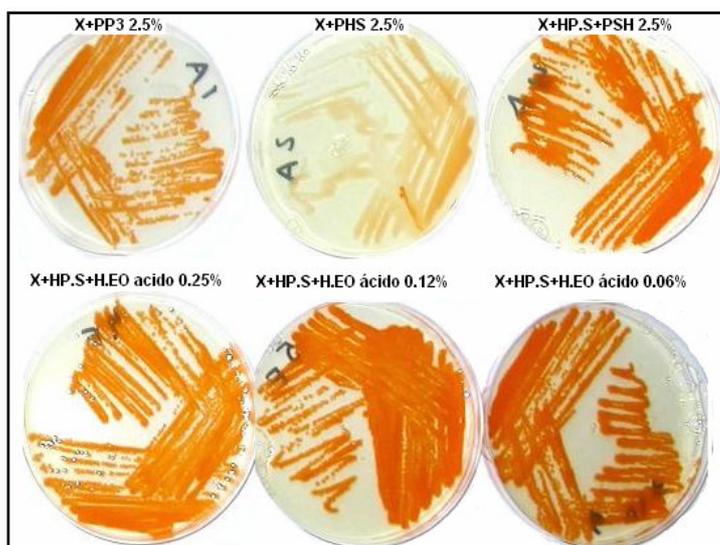
RD.11.1.2. Hidrolizado de estómago de oveja con pepsina desnaturalizado previamente con ácido

Dado que con el proceso anterior no se consigue de manera reproducible liberar el **factor** β del tejido de estómago de oveja, se modificó el proceso de desnaturalización del tejido utilizando ácido clorhídrico como se indica en el apartado MM.11.7.1.2. Se ensayo incorporado ambos hidrolizados a los medio de ensayo, obteniéndose intensa producción de pigmento (4.5) en todos ellos (RD.11.1.2. **Figura 1**).

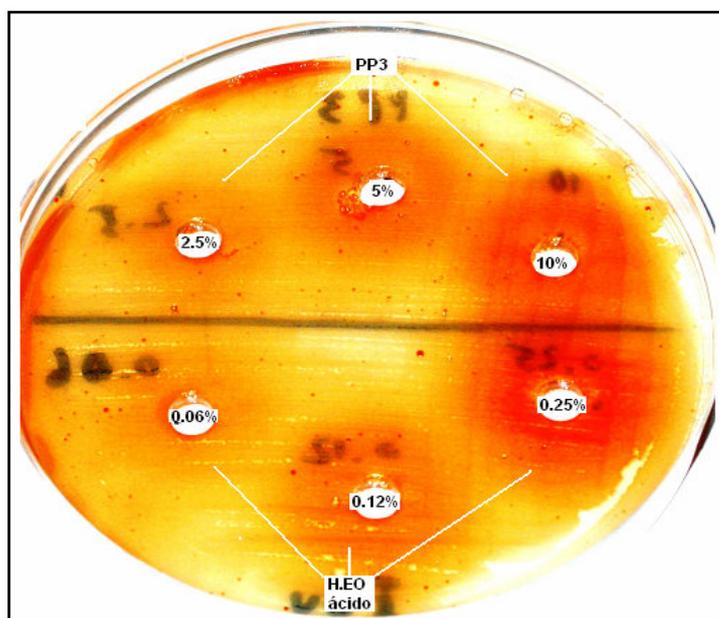
Se cogió una alícuota del hidrolizado de estómago de oveja anterior y se realizó una gravimetría, el peso en seco del hidrolizado es de 5%. A partir de este resultado se ensayó el hidrolizado realizando pocillos según el método bioautográfico descrito en el apartado MM.3 a diferentes concentraciones (5%, 1%, 0.5%, 0.25%, 0.12% y 0.06%) (RD.11.1.2. **Figura 2**). La producción de pigmento en todos ellos fue intensa-excelente (4.5-5) excepto a una concentración de 0.06% en la cual la intensidad fue moderada (3). Con una concentración del 0.12% se obtuvo una actividad similar a la **PP3** al 2.5%, por lo tanto, el hidrolizado de estómago de oveja tiene una riqueza 20 veces mayor que la **PP3**.

Este resultado permite explicar que la ebullición previa con ácido además de desnaturalizar las proteínas, favorece la extracción de un mayor número de productos del interior celular al aumentar la permeabilidad de la membrana, lo que beneficia la actuación de la pepsina que junto con la hidrólisis inespecífica el propio ácido produce una liberación del **factor** β .

En cuanto al hidrolizado de tejido de estómago de oveja realizado con la propia pepsina del tejido, se ensayo incorporado a los medios de ensayo, obteniéndose intensa producción de pigmento en todos (4.5) Esto apunta a que la proporción de pepsina presente en el tejido es suficiente para realizar el proceso de hidrólisis y no es necesario un aporte extra de la misma.



RD.11.1.2. **Figura 1.** Intensidad de pigmento del hidrolizado de estómago de oveja a distintas concentraciones.



RD. 11.1.2. **Figura 2.** Intensidad de pigmento de la PP3 y del hidrolizado de estómago de oveja ácido (H.EO ácido) utilizando el método bioautográfico

RD.11.2. HIDROLIZADO DE INTESTINO DE OVEJA

RD.11.2.1. Hidrolizado de intestino de oveja con pepsina

Teniendo en cuenta el resultado anterior, se realizó la misma experiencia con intestino de oveja. Se ensayó incorporado a los medios de ensayo, no obteniéndose pigmento en ninguno de ellos (**0-0.5**). Este resultado permite concluir que el tejido de intestino de oveja no posee el **factor** β .

RD.11.3. EXTRACTOS DE ESTÓMAGO DE OVEJA

RD.11.3.1. Extracto ácido de estómago de oveja

El hidrolizado obtenido según lo escrito en MM.12.7.3.1 se incorporó a los medios de ensayo obteniéndose una pigmentación débil-moderado (**3-3.5**). Este resultado indica que el ácido por si solo no es capaz de obtener el **factor** β del tejido, posiblemente porque en este proceso aunque el ácido fuera capaz de extraerlo del tejido se produce una coagulación de las mayoría de las proteínas produciéndose una masa gelatinosa que impide que tras filtrar obtengamos concentraciones activas del **factor** β lo suficientemente altas para obtener un pigmentación intensa-excelente. Otra posible explicación podría ser que sea necesaria la presencia de pepsina para poder liberar el **factor** β de compuestos de naturaleza peptídica extraídos por el ácido. Además con la pepsina se obtiene una peptona más homogénea y una reproducibilidad más exacta.

RD.11.3.2. Extracto acuoso a temperatura ambiente de estómago de oveja

Se ensayo incorporado a los medios de ensayo, obteniéndose no producción de pigmento en todos ellos (**0-0.5**).

Dado que el **factor** β no es un compuesto que este soluble en el tejido de oveja al no extraerse con una solución acuosa a temperatura ambiente sugiere que este factor debe encontrarse formando parte de algún compuesto de la membrana celular o intracelular.

RD.11.3.3. Extracto acuoso a ebullición de estómago de oveja

Se ensayo incorporado a los medios de ensayo, obteniéndose una producción nula de pigmento en todos los medios (**0-0.5**). Lo que refuerza la explicación anterior, ya que una simple ebullición de tejido solo provoca una extracción y desnaturalización de proteínas solubles en el tejido y no es capaz de extraer compuestos adheridos a la membrana celular o compuestos intracelulares poco solubles.

RD.11.3.4. Extracto buffer fosfato de estómago de oveja hidrolizado con pepsina

Se ensayo el sobrenadante y el sedimento por separado incorporado a los medios de ensayo, obteniéndose no pigmento en todos los medios (**0-0.5**) y actividad moderada en todos ellos (**3.5**) respectivamente. Esto apunta a que una modificación de la fuerza iónica de la solución no permite tampoco extraer el **factor** β .

RD.12. DISCUSIÓN GENERAL

La compañía Difco desarrolló a principios de siglo XX la proteosa peptona N° 3 (**PP3**) a partir de tejido animal mediante hidrólisis enzimática realizando variaciones en los parámetros de hidrólisis respecto a los utilizados para la obtención de la proteosa peptona (**Difco 1998**).

A finales de los 70, Islam desarrollo un medio de cultivo selectivo y diferencial para *Streptococcus agalactiae* (EGB) en el que incorporó **PP3** y donde EGB crece produciendo un pigmento anaranjado característico (**Islam 1977**). Mas tarde, en 1983, De la Rosa y col. (**De la Rosa 1983**) basándose en la formulación del medio descrita por Islam, diseñaron un medio de cultivo selectivo y diferencial (Medio Granada), en cuya composición también se encuentra la **PP3** y donde EGB crece con un color rojo-anaranjado intenso.

La elección de la fuente proteica en ambos medios es de gran importancia, ya que su eliminación en la composición del medio se traduce en ausencia de crecimiento de EGB, pero además, su sustitución por otra peptona conduce a una disminución o pérdida de la producción de pigmento.

Los factores presentes en la proteosa peptona N° 3 (**PP3**) que favorecen la producción de pigmento por EGB no son del todo conocidos. Existe un péptido que hemos llamado **factor α** , que activa la producción de pigmento, esta presente en la secuencia de la albúmina humana y bovina de donde se libera por hidrólisis péptica (**Rosa-Fraile 1999**). El porqué este péptido actúa aumentando la pigmentación no esta claro.

Para comprobar de modo indirecto que el **factor α** esta presente en la **PP3** y en el hidrolizado péptico de suero (**HP.S**) se sometió por un lado a hidrólisis con tripsina (**HTr.PP3**) una solución de **PP3** al 2.5% según las

condiciones descritas en el apartado MM.8.1; esta hidrólisis conduciría a una destrucción del **factor** α . Por otro lado se realizó una hidrólisis con pepsina de una solución de suero de caballo y de una solución de albúmina bovina (A p647 Sigma) al 2% (**HP.albúmina**) según lo descrito en MM.4.2.1 y MM.11.6 respectivamente, para obtener el **factor** α .

El hidrolizado de **PP3** tratado con tripsina (**HTr.PP3**) se incorporó al medio de ensayo **X+HP.S** y **X+HP.albúmina** (en ambos medios se aporta el péptido **-factor** α - que activa la producción de pigmento) siendo la intensidad de pigmento en ambos intensa-excelente (**4.5-5**) lo que demuestra que la **PP3** posee el **factor** α .

Sin embargo, este **factor** α incorporado de manera individual al medio de prueba **X** produce una intensidad de pigmento muy pobre o nula (**0-1**) lo que indica que por si solo, esté **facto** α , no es capaz de aumentar la intensidad de pigmento y que por lo tanto requiere la presencia de otro factor. Este factor adicional se localiza en la **PP3** y en algunas otras peptonas (proteosa peptona, proteosa peptona N° 2, peptamina y primatona de Sheffield) y lo hemos llamado **factor** β , que por si solo tampoco es capaz de aumentar la intensidad de pigmento hasta intensa-excelente ya que el medio de prueba (**X**) más hidrolizado trípico de **PP3** (**HTr.PP3**) (sin **factor** α) presentó una muy pobre o nula producción de pigmento (**0-1**).

Por consiguiente, solo la combinación del **factor** β con el **factor** α incrementa la producción de pigmento por EGB.

Según los resultados que se han obtenido de los diferente hidrolizados y extractos comerciales así como en los hidrolizados de laboratorio el **factor** β solo esta presente en unas pocas peptonas: en la proteosa peptona (BD-Difco); en la proteosa peptona N° 2 (BD-Difco), en la peptamina (BD-Difco), en la proteosa peptona N° 3 (BD-Difco), en la primatona de Sheffield (Sheffield) y en el tejido de estómago de oveja

(apartados RD.4, RD.11.1.2 y RD.11.3). Con estos resultados junto con los obtenidos por hidrólisis de diferentes tejidos animales con distintas enzimas proteolíticas (apartados RD.4, RD.9 y RD.10) se desprende que la presencia del **factor** β en un hidrolizado de tejido no depende de la variación de los parámetros de hidrólisis enzimática como sugiere el manual de Difco (**Difco 1998**) para la **PP3** sino que también es clave la materia prima de partida.

Además el hecho de que tan pocas peptonas presente el **factor** β , que prácticamente ninguna enzima proteolítica intervenga en su formación y que solamente se obtenga por hidrólisis pepsica de tejido de estómago de oveja (apartado RD.11.1.3), indicaría que no se trata de un péptido o bien si se trata de un péptido este debe de ser pequeño (di- o tripéptido).

Esto se complementa con lo obtenido en el apartado RD.6.1 donde se comprueba que ninguna enzima proteolítica es capaz de destruir el **factor** β presente en la **PP3** o en la **PHS**. Sin embargo estas enzimas proteolíticas sí destruyen el **factor** α que es un péptido (apartado RD.6.1.1).

Otra explicación de que el **factor** β no sea digerido por los enzimas proteolíticos es que el componente peptídico esté protegido por un grupo prostético. Este grupo protético no debe de tratarse de ácidos nucleicos ya que la actividad de las soluciones de **PP3** y **PHS** tras su tratamiento con sulfato de protamina nos se tradujo en pérdida de pigmento en los medios de ensayo (apartado RD.5.7); tampoco debe de ser un lípido (p.e., lipoproteínas) pues los solventes orgánicos (apartado RD.5.3) son incapaces de extraerlo de las soluciones de **PP3** y **PHS**, y por tanto el **factor** β debe de tener carácter polar.

Este factor no se han conseguido precipitar de una solución de **PP3** y **PHS** con etanol (apartado RD.5.4) por tanto no se trataría de una glicoproteína, al menos de elevado peso molecular, es ultrafiltrable por membrana de NMWC 1000 y es dializable (apartado RD.5.1 y RD.5.2),

por lo tanto debe tratarse de un compuesto con un peso molecular pequeño.

Experiencias realizadas con lectinas (Concanavalina A, Jacalina, lectina de *Arcocarpus hipogaea* y lectina de *Triticum vulgare*) para comprobar si el **factor** β posee uniones del tipo O-glicosilproteínas preferentemente galactosil (β -1,3) N-acetilgalactosamina y uniones N-glicosil no han dado resultado lo que sugiere que dicho factor no sea un glicopéptido, con uniones de ese tipo según los resultados del apartado **RD.5.5**.

En base a los resultados obtenidos en lo referente a la presencia de ácido siálico en la composición de la proteosa peptona y primatona Sheffield (apartado **RD.3**) permite eliminar también la posibilidad de que el **factor** β sea una glicopéptido con residuos N-acetilneuraminico ni N-glicosilneuraminico.

El fraccionamiento de la proteosa peptona N° 3 por cromatografía de exclusión molecular (Superdex[®] Peptide, Sephadex[®] G25, Superdex[®] 30 y HiLOADth Superdex) nos ha permitido conocer que el **factor** β no se puede separar porque se retiene con las matrices utilizadas (apartado **RD.7**). Solo en cromatografía HiLOADth Superdex eluyendo con bicarbonato amónico 0.1 M (apartado **RD.7.4**) se consiguió una fracción activa que cuando se intento fraccionar para alcanzar la actividad en un pico definido se obtuvo una actividad repartida en varias picos cromatográficos lo que sugiere que el **factor** β puede tratarse de un conjunto de compuestos con una estructura parecida o bien el bicarbonato amónico provoca que la actividad se eluya lentamente lo que provoca que no aparezca un pico definido.

El fraccionamiento con cromatografía en fase reversa utilizando diferentes matrices (Water Spherisorb[®], Sourceth y Vidac[®]) aunque tiene una mayor resolución no fue mejor que en gel filtración, pese a que el **factor** β no se altera con los cambios de polaridad (apartado **RD.5.3**).

En este caso el hecho de tener que utilizar ácido (p.e., ácido trifluoroacético) para controlar el tiempo de retención y aumentar la hidrofobicidad se convirtió en un inconveniente porque según el resultado obtenido en gel filtración (apartado RD.7.1.1) el **factor** β se altera cuando se secan en soluciones ácidas que lo contengan, probablemente porque en la última fase de secado se alcance concentraciones de ácido elevadas que como se comprobó en el apartado RD.6.2 destruyen el **factor** β . Otra posibilidad es que el uso de ácido trifluoroacético conduzca en el secado a la formación de sales insolubles que inactiven el factor.

Dado que solo se pudo obtener el **factor** β de tejido de estómago de oveja, el cual es rico en glicoproteínas fundamentalmente mucinas, indicaría que el **factor** β podría ser una glicopéptido pequeño o un azúcar.

Por último, se puede concluir que la proteasa peptona N° 3 (**PP3**) tiene que utilizar en su fabricación digeridos de tejido de estómago de oveja que son los que aportan el **factor** β y digeridos pépsicos de proteínas que aportan el **factor** α , es decir, que contengan albúmina o la secuencia del péptido (Ile-Ala-Arg-Arg-His-Pro-Tyr-Phe).

Conclusiones

VII. CONCLUSIONES

- 1- Los componentes de la Proteosa Peptona N° 3 que incrementan la producción de pigmento por *Streptococcus agalactiae* en medio Granada son múltiples (al menos dos).
- 2- Los componentes activos presentes en la Proteosa Peptona N° 3 son de bajo peso molecular (<1000 Da).
- 3- Uno de los componentes activos de la Proteosa Peptona N° 3 (factor β) no es separable en cromatografía en fase reversa, ni exclusión molecular.
- 4- El factor β está presente en otras peptonas comerciales (Primatona Sheffield) y en hidrolizados pépsicos de estómago de ovejas.
- 5- La Primatona Sheffield o hidrolizados pépsicos de estómago de oveja pueden ser sustitutos de la Proteosa Peptona N° 3 en el medio Granada sin que EGB disminuya la producción de pigmento, siempre que este medio Granada se suplemente con factor α (hidrolizado pépsico de albúmina).

Bibliografia

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. **Ancona RJ, Ferrieri P, Willians PP.** Maternal Factors that Enhance the Acquisition of Group B Streptococci by Newborn Infants. *J Med Microbiol* 1980; 13: 273-280.
2. **Andreu A, Salcedo S, Heredia F, González J, Bartolomé RM, Cabero L.** Evaluación de tres técnicas rápidas para la detección intraparto de estreptococo del grupo B. *An Esp Pediatr* 1997; 46:378-382.
3. **Anthony BF.** Epidemiology of GBS in man. *Antibiot Chemother.* 1985; 35:10-16.
4. **A.O.A.C.** Official methods of analysis. 16th Ed. Washington D.C (USA): Horowitz; 1995.
5. **Baker CJ, Barrett FF.** Transmission of group B streptococci among parturient women and their neonates. *J Pediatr* 1973; 83: 919-925.
6. **Baker CJ, Clark DJ, Barrett FF.** Selective broth medium for isolation of group B streptococci. *Appl Microbiol* 1973; 26: 884-885.
7. **Baker CJ, Barrett FF, Gordon RC, Yow MD.** Suppurative meningitis due to streptococci of Lancefield group B: a study of 33 infants. *J Pediatr* 1973; 82: 724-729.
8. **Baker CJ.** Group B Streptococcal infections. *Adv Intern Med* 1980; 25: 475-501.
9. **Baker CJ.** Group B streptococcal infections. *Clin Perinatol* 1997; 24: 59-70.
10. **Barrett AJ and Salvesen G.** Proteinase Inhibitors. In: Dingle JT, Gordon JL (Eds.). *Research monographs in cell and tissue physiology.* Vol 12. Amsterdam (Netherlands): Elsevier; 1986. p. 3-18.
11. **Bayer AS, Chow AW, Anthony BF, Guze LB.** Serious infections in adults due to group B streptococci. Clinical and serotype characterization. *Am J Med* 1976; 61: 498-503.
12. **Berenyi T, Gergely J.** *Amino Acids, Peptides and Proteins.* Amsterdam: Elsevier; 1974.
13. **Benedi VJ, Hervás JA.** Bases moleculares de los serotipos de estreptococos del grupo B. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1992; 10: 321-322.

14. **Bey M, Pastorek JG, Millar JM.** Group B Streptococcal Colonization in the Diabetic Gravida Patient. *Am J Perinatol* 1992; 9: 425-427.
15. **Beynom RJ, Bond JS.** *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach.* Oxford: Academic press; 1989.
16. **Bliss SJ, Manning SD, Tallman P, Baker CJ, Pearlman MD, Marrs CF, Foxman B.** Group B *Streptococcus* Colonization in Male and Nonpregnant Female University Students: a Cross-sectional Prevalence Study. *Clin Infect Dis* 2002; 15:184-190.
17. **Bosch J, Pericot A, Amoros M, Ros R.** Puerperal endometritis: study of 52 clinically and microbiologically diagnosed cases. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1995; 13: 203-208.
18. **Boyer KM, Gadzala CA, Kelli PD, Gotoff SP.** Selective Intrapartum Chemoprophylaxis of Neonatal Group B Streptococcal Early-Onset Disease. Interruption of Mother to Infant Transmission. *J Infect Dis* 1983; 148: 810-816.
19. **Boyer KM, Gotoff SP.** Prevention of Early-Onset Neonatal Group B Streptococcal Disease with Selective Intrapartum Chemoprophylaxis. *N Engl J Med* 1986; 314: 1665-1669.
20. **Bridson EY, Brecker A.** Design and formulation of microbial culture media. In: Norris JR, Ribbons DW, (Eds.). *Methods in Microbiology.* Vol 3A. Oxford (UK): Academic Press; 1970. p. 229-295.
21. **Bridson EY.** Natural and synthetic culture media for bacteria. In: Rechcigl M, (Eds.). *CRC Handbook Series in Nutrition and Food, Section G. Diets, Culture Media, Food Supplements, Vol III.* Cleveland (USA): CRC Press, Inc.; 1978. p. 91-115.
22. **Bridson EY.** *The Development, Manufacture and Control of Microbiological Cultura Media: Oxoid Manual.* 8th Ed. UK: Oxoid Ltd. Basingtoke; 1998.
23. **Bromberger P, Lawrence JM, Braun D, Saunders B, Contreras R, Petitti DB.** The Influence of Intrapartum Antibiotics on the Clinical Spectrum of Early-Onset Group B Streptococcal Infection in Term Infants. *Pediatrics* 2000; 106:244-250.
24. **Carazo C.** Influencia de la Composición del Medio Cultivo sobre la Producción de Pigmento por *Streptococcus agalactiae*. [Tesis Doctoral]. Granada: Universidad de Granada; 1993.

25. **Carr D.** The Handbook of Analysis and Purification of Peptides and Proteins by Reversed-Phase HPLC. 3ª Ed. Maryland (USA): GRACEVIDAC; 2002.
26. **Centers for Disease Control and Prevention.** Prevention of Group B Streptococcal Disease: A Public Health Perspective. MMWR 1996; 45:1-24.
27. **Christensen KK, Christensen P, Judorf F, Petterson L.** Rectal colonization with group B streptococci: relation to urogenital carriage. Scand J Infect Dis 1978; 10: 291-293.
28. **Christensen KK, Christensen P.** The R proteins. Antibiot Chemother 1985; 35: 114-118.
29. **Colford JM Jr, Mohle-Boetani J, Vosti KL.** Group B streptococcal bacteremia in adults. Five years' experience and a review of the literature. Medicine (Baltimore) 1995; 74: 176-190.
30. **Coll P, Condom MJ, Merelis B, Ausina V, Prats G.** La susceptibilidad del Trimetoprim-sulfametoxazol en la diferenciación de estreptococos. Laboratorio 1985; 79: 287-292.
31. **Cote RJ, Gherna RL.** Nutrition and Media. In: Gerhardt P. (Ed.). Methods for General and Molecular Bacteriology. 2ª Ed. Washington D.C (USA): American Society for Microbiology; 1994. p. 155-78.
32. **Cueto M, Sánchez MJ, Sampedro A, Miranda JA, Herruzo AJ, Rosa-Fraile M de la.** Timing of rapartum Ampicillin ad Prevention o Vertical Transmisión o Group B *Streptococcus*. Obstet Gynecol 1998; 91:112-114.
33. **Cunningham JG.** Fisiología veterinaria. 3th Ed. Amsterdam: Elsevier; 2003.
34. **Davis R.A., Vance J.E.** Structure, assembly and secretion of lipoproteins. In: Vance D.E., Vance J.E. (Eds.). Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. Amsterdam (Netherlands): Elsevier Science; 1996. p. 473-493.
35. **Debray H.** Use of lectins. In: Verbert A. (Ed.). Methods on Glycoconjugates. Switzerland: Harwood Academic Publischers Chur; 1995. p. 103-133
36. **De la Rosa M, Villareal R, Vega D, Miranda C, Martinezbrocal A.** Granada medium for detection and identification of group B streptococci. J Clin Microbiol 1983; 18: 779-785.

37. **De la Rosa M, Peis J, Carazo C, Cueto M, García V.** Effect of culture medium components on *Streptococcus agalactiae* pigment-enhancing media. XI Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal disease. Siena. Italia; 1990.
38. **De la Rosa M, Perez M, Carazo C, Pareja L, Peis J, Hernandez F.** New Granada Medium for detection and identification of group B streptococci. J Clin Microbiol 1992; 30: 1019-1021.
39. **De la Rosa M, Perez M, Carazo C, Orts A, Gonzalez J, Hernandez F, y Ruiz-Bravo A.** Datos epidemiológicos de la colonización por *Streptococcus agalactiae* en mujeres no gestantes. Clin Invest Gin Obst 1992; 19: 376-379.
40. **De la Rosa M, Perez M, Carazo C, Pareja L, Orts A, Cantudo P.** Medios de cultivo para la detección e identificación de *Streptococcus agalactiae*. Microbiología 1994; 10: 181-186.
41. **De la Rosa M, De Cueto M.** Infecciones del tracto urinario. En: García-Rodríguez JA, Picazo JJ, (Eds.) Microbiología Médica. 1. Microbiología Médica general. Madrid (España): Mosby/Doyma S.A; 1996. p. 105-18.
42. **Demartino GN.** Purification of proteolytic enzymes. In: Beynom RJ, Bond JS (Eds.). Proteolytic Enzymes: A Practical Approach. Oxford (UK): Academic press; 1989. p. 15-23.
43. **Difco Laboratories.** Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology. 11^a ed. Detroit: Difco; 1998.
44. **Dillon HC Jr, Gray E, Pass MA, Gray BM.** Anorectal and vaginal carriage of group B streptococci during pregnancy. J Infect Dis 1982; 145: 794-799.
45. **Domingo P, Barquet N, Alvarez M, Coll P, Nava J, Garau J.** Group B streptococcal meningitis in adults: report of twelve cases and review. Clin Infect Dis 1997; 25: 1180-1187.
46. **Easmon CS, Hastings MJ, Blowers A, Bloxham B, Deeley J, Marwood R, Rivers RP, Stringer J.** Epidemiology of group B streptococci: one year's experience in an obstetric and special care baby unit. Br J Obstet Gynaecol 1983; 90: 241-246.

47. **Edwards MS, Baker CJ.** *Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococcus). In: Mandell GL, Bennett JE (Eds.). Principles and Practice infectious Diseases. 5th Ed. New York (USA): Churchill Livingstone Inc; 2000. p. 2156-2166.
48. **Edwards MS, Baker CJ.** "Group B Streptococcal Infections". In: Remington JS, Klein JOR, (Eds.). Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant. 5th Ed. Philadelphia (USA): Saunders Co; 2001. p. 1091-1156.
49. **Ellinghausen HC.** Growth, cultural characteristics, and antibacterial sensitivity of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. Cornell Vet 1983; 73: 225-239.
50. **Facklam RR, Padula JF, Thacker LG, Wortham EC, Sconyers BJ.** Presumptive identification of group A, B, and D streptococci. Appl Microbiol 1974; 27: 107-113.
51. **Facklam RR, Washington JA.** *Streptococcus* and related catalase-negative gram positive cocci. In: Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, (Eds.). Manual of clinical microbiology, 5^a Ed. Washington D.C (USA): American Society for Microbiology; 1991. p. 238-57.
52. **Fallon RJ.** The rapid recognition of Lancefield group B haemolytic streptococci. J Clin Pathol 1974; 27: 902-905.
53. **Ferrieri P.** GBS enzymes, hemolysin, toxins and others products. Antibiot Chemother 1985; 35: 57-70.
54. **Ferrieri P.** GBS infections in the newborn infant: diagnosis and treatment. Antibiot Chemother 1985; 35: 211-224.
55. **Fenton LJ, Harper MH.** Evaluation of colistin and nalidixic acid in Todd-Hewitt broth for selective isolation of group B streptococci. J Clin Microbiol 1979; 9: 167-169.
56. **Flandrois JP, Fleurette J.** Bacteriological characteristics of *Streptococcus agalactiae*. Incidence and conditions of appearance of the pigmentation. Sensitivity to antibiotics. Ann Biol Clin (Paris) 1975; 33: 369-377.
57. **Fischer G, Horton RE, Edelman R.** From the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Summary of the National Institutes of Health workshop on group B streptococcal infection. J Infect Dis 1983; 148: 163-166.

58. **Franciosi RA, Knostman JD, Zimmerman RA.** Group B streptococcal neonatal and infant infections. *J Pediatr* 1973; 2: 707-718.
59. **Fox PF, Morrissey PA, Mulvihill DM.** Chemical and enzymatic modification of food proteins. In: Hudson B.J.F. (Ed.). *Development in food proteins-I*. New Jersey (USA): Applied Science Publishers Inc. Englewood; 1982. p. 1-57.
60. **Gel Filtration.** Principles and Methods. Pharmacia Fine Chemicals 5^a ed. Upsala: Pharmacia LKB Biotechnology AB; 1997.
61. **Gerber NN.** Prodigiosine-like Pigments. *Crit Rev Microbiol* 1975; 3: 469-485
62. **García Peña ML.** Desarrollo de un Medio de Cultivo Quasi-definido para la Producción de Pigmento por *Streptococcus agalactiae*. [Tesis doctoral]. Granada: Universidad de Granada; 2003.
63. **Gibbs CS, Rettger LF.** Some Factors Governing the Production of Diphtheria Toxin in Artificial Culture Media. *J Immunol* 1927; 13:323-344.
64. **Gray BM, Pass MA, Dillon HC Jr.** Laboratory and field evaluation of selective media for isolation of group streptococci. *J Clin Microbiol* 1979; 9: 466-470.
65. **Griffiths BB.** Iron and glucose affecting growth and haemolysin production in human strains of group B streptococci. *Microbios* 1989; 58: 135-146.
66. **Guirard MB, Snell EE.** Nutritional Requirements of Microorganisms. In: Grunsaes IC, Stanier RY (Eds.). *The Bacteria*. Vol 4. UK: Academic Press; 1962. p. 33-93.
67. **Gunn BA.** SXT and Taxo A disks for presumptive identification of group A and B streptococci in throat cultures. *J Clin Microbiol* 1976; 4: 192-193.
68. **Gunn BA, Ohashi DK, Gaydos CA, Holt ES.** Selective and enhanced recovery of group A and B streptococci from throat cultures with sheep blood agar containing sulfamethoxazole and trimethoprim. *J Clin Microbiol* 1977; 5: 650-655.
69. **Hardie JM.** Genus *Streptococcus*. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, and Holt JG (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. Baltimore (USA): The Williams and Wilkins Co; 1986. p. 1043-71.

70. **Haug RH, Soderlund E.** Pigment production in group B streptococci. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1977; 85: 286-288.
71. **Harris ELV and Angal S.** Protein purification methods a practical approach. UK: IRL Press at oxford University Press; 1989.
72. **Henrichsen J.** The bacteriology of GBS. *Antibiot Chemother* 1985; 35: 53-56.
73. **Howard JB, McCracken GH Jr.** The spectrum of group B streptococcal infections in infancy. *Am J Dis Child* 1974; 128: 815-818.
74. **Hung ND, Vas M, Cheke E, Bolcsi SZA.** Relative tryptic digestion rates of food protein. *J Food Sci* 1984; 49: 1535-1542.
75. **Islam AK.** Rapid recognition of group B streptococci. *Lancet* 1977; 1: 256-257.
76. **Jelinkova J., Motlova J.** Worldwide Distribution of Two New Serotypes of Group B Streptococci: Type IV and provisional type V. *J Clin Microbiol* 1985; 21: 361-362.
77. **Karmali MA, Petric M, Lim C, Cheung R, Arbus GS.** Sensitive method for detecting low numbers of verotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of verotoxin. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 614-619.
78. **Karayianis P, Hobson D.** Amino acid requirements of a *Chlamydia trachomatis* genital strain in McCoy cell cultures. *J Clin Microbiol* 1981; 13: 427-432.
79. **Kennedy He, Speck MI, Aurand LW.** Studies on a growth stimulant from corn steep using *Lactobacillus casei*. *J Bacteriol* 1955; 70: 70-77.
80. **Kogan G, Brisson JR, Kasper DL, von Hunolstein C, Orefici G, Jennings HJ.** Structural elucidation of the novel type VII group B *Streptococcus* capsular polysaccharide by high resolution NMR spectroscopy. *Carbohydr Res* 1995; 277: 1-9.
81. **Kogan G, Uhrin D, Brisson JR, Paoletti LC, Blodgett AE, Kasper DL, Jennings HJ.** Structural and immunochemical characterization of the type VIII group B *Streptococcus* capsular polysaccharide. *J Biol Chem* 1996; 271: 8786-8790.

82. **Kogan G, Uhrin D, Brisson JR, Paoletti LC, Blodgett AE, Kasper DL, Jennings HJ.** Structural and immunochemical characterization of the type VIII group B *Streptococcus* capsular polysaccharide. J Biol Chem 1996; 271: 8786-8790.
83. **Lancefield RC, McCarty M, Everly WN.** Multiple mouse-protective antibodies directed against group B streptococci. Special reference to antibodies effective against protein antigens. J Exp Med 1975; 142: 165-179.
84. **Lerner PI, Gopalakrishna KV, Wolinsky E, McHenry MC, Tan JS, Rosenthal M.** Group B streptococcus (*S. agalactiae*) bacteremia in adults: analysis of 32 cases and review of the literature. Medicine (Baltimore) 1977; 56: 457-473.
85. **Levy NJ, Benes S, McCormack WM.** Growth of host cells and *Chlamydia trachomatis* in medium containing serum from 16-week-old calves. J Clin Microbiol 1983; 17: 68-71.
86. **Lim DV, Morales WJ, Walsh AF, Kazinis D.** Reduction of Mortality and Morbidity Rates for Neonatal Group B Streptococcal Disease through Early Diagnosis and Chemoprophylaxis. J Clin Microbiol 1986; 23:489-492.
87. **Lorian V.** Antibiotics in Laboratory Medicine. In: Victor Lorian (Eds.). Antibiotics in laboratory medicine. 4th ed. Baltimore (USA): Williams y Wilkins; 1996. p. 422-425
88. **Mason EO Jr, Wong P, Barrett FF.** Evaluation of four methods for detection of group B streptococcal colonization. J Clin Microbiol 1976; 4: 429-431.
89. **Marchlewicz BA, Duncan JL.** Properties of a hemolysin produced by group B streptococci. Infect Immun 1980; 30: 805-813.
90. **Mazon A, Salvo MS, Ezcurra R.** Resultados del Programa de Prevención de la Infección Neonatal por Estreptococo del Grupo B. Prog Obstet Gynecol 2000; 43:233-236.
91. **Meloun B, Moravek L, Kostka V.** Complete amino acid sequence of human serum albumin. FEBS Lett 1975; 58:134-137.
92. **McCarcy M.** *Streptococcus*. In: Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS, (Eds.). Tratado de Microbiología. 3th ed. Barcelona (España): Salvat editors S.A; 1984. p. 498-551.

93. **McFaddin JF.** Biochemical test for identification of medical bacteria. 2ª Ed. Baltimore (USA): Williams and Wilkins; 1980.
94. **McFaddin JF.** Biochemical test for identification of medical bacteria. 3ª Ed. McGrew L (Ed.). Baltimore (USA): Lippincott Williams and Williams; 2000.
95. **Meloun B, Moravek L, Kostka V.** Complete amino acid sequence of human serum albumin. FEBS Lett 1975; 58:134-137
96. **Merritt K, Jacobs NJ.** Improved medium for detecting pigment production by group B streptococci. J Clin Microbiol 1976; 4: 379-380.
97. **Merritt K, Jacobs NJ.** Characterization and incidence of pigment production by human clinical group B streptococci. J Clin Microbiol 1978; 8: 105-107.
98. **Meynell GC, Meynell E.** Theory and Practice in Experimental Bacteriology. 2ª Ed. Cambridge (UK): Cambridge University Press. 1970.
99. **Milligan TW, Doran TI, Straus DC, Mattingly SJ.** Growth and amino acid requirements of various strains of group B streptococci. J Clin Microbiol 1978; 32: 238-244.
100. **Moller M, Thomsen AC, Borch K, Dinesen K, Zdravkovic M.** Rupture of fetal membranes and premature delivery associated with group B streptococci in urine of pregnant women. Lancet 1984; 2: 69-70.
101. **Moss CW, Speck ML.** Identification of nutritional components in trypticase responsible for recovery of *Escherichia coli* injured by freezing. J Bacteriol 1966; 91: 1098-1104.
102. **Nemergut RA, Merrit K. 1983.** Abstracts of the annual Meeting. American Society for Microbiology. B-32, p. 28
103. **Noble MA, Bent JM, West AB.** Detection and identification of group B streptococci by use of pigment production. J Clin Pathol 1983; 36: 350-352.
104. **Pass MA, Gray BM, Khare S, Dillon HC Jr.** Prospective studies of group B streptococcal infections in infants. J Pediatr 1979; 95: 437-443.
105. **Pass MA, Gray BM, Dillon HC Jr.** Puerperal and perinatal infections with group B *streptococci*. Am J Obstet Gynecol 1982; 143: 147-152.

106. **Pass MA, Khare S, Dillon HC Jr.** Twin pregnancies: incidence of group B streptococcal colonization and disease. *J Pediatr* 1980; 97: 635-637.
107. **Payne JW.** Peptides and Microorganisms. *Adv Microb Physiol* 1976; 13: 55-113.
108. **Payne JW.** Transport and hydrolysis of peptides by microorganisms. In: Elliot I., O'connor M. *Peptide transport and hydrolysis*. Amsterdam: Elsevier; 1977. p. 305-334
109. **Preneta AZ.** Protein purification methods a practical approach. In: Harris ELV and Angal S (Eds.). UK: IRL Press at Oxford University Press; 1989. p. 293-306.
110. **Persson KM, Forsgren A.** Antimicrobial susceptibility of group B streptococci. *Eur J Clin Microbiol* 1986; 5: 165-167.
111. **Persson KM, Forsgren A.** Evaluation of culture methods for isolation of group B streptococci. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1987; 6: 175-177.
112. **Prescott LM, Harley JP, Klein DA.** *Microbiología*. Madrid (España): McGraw-Hill Interamericana; 1999.
113. **Pollock HM, Dahlgren BJ.** Distribution of Streptococcal groups in clinical specimens with evaluation of bacitracin screening. *Appl Microbiol* 1974; 27: 141-143.
114. **Reardon EP, Noble MA, Luther ER, Wort Aj, Bent J, Swift M.** Evaluation of a Rapid Method for the Detection of Vaginal Group B Streptococci in Women in Labor. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 148: 575-578.
115. **Regan JA, Klebanoff A, Nugent RP.** The Epidemiology of Group B in Pregnancy. *Obstet Gynecol* 1991; 77:604-610.
116. **Reversed Phase Chromatography.** Principles and Methods. Pharmacia Fine Chemicals. 5ª ed. Upsala: Pharmacia LKB Biotechnology AB; 1996.
117. **Rimington C, Kennedy G.** Porphyrins: structure, distribution and metabolism. In: Florkin M, Mason HS (Eds.). *Comparative Biochemistry IV Constituents of Life-Part metabolism*. New York (USA): Academic Press; 1962. p. 558-614.
118. **Röd To, Haug RH, Mistvedt T.** Beta-glucuronidase in the streptococcal group B and D. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1974; 82: 533-536.

130. **Schrag S, Gorwitz R, Fultz-Butts K, Schuchat A.** Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. Revised Guidelines from CDC. MMWR 2002; 51: 1-22.
131. **Schuchat A, Oxtoby M, Cochi S, Sikes RK, Hightower A, Plikaytis B, Broome CV.** Population-based risk factors for neonatal group B streptococcal disease: results of a cohort study in metropolitan Atlanta. J Infect Dis 1990; 16: 672-77.
132. **Schuchat A.** Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. Clin Microbiol Rev 1998; 11: 497-513.
133. **Sociedad Española de Obstetricia y Ginecología, Sociedad Española de neonatología, Sociedad Española de Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica, Sociedad Española de Quimioterapia y Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria.** Prevención de la Infección Perinatal por Estreptococo Grupo B. Recomendaciones revisadas. Prog Obstet Ginecol 2003; 46: 411-420.
134. **Spellerberg B, Pohl B, Haase G, Martin S, Weber-Heynemann J, Luticken R.** Identification of genetic determinants for the haemolytic activity of *Streptococcus agalactiae* by ISS1 transposition. J Bacteriol 1999; 181: 3212-3219.
135. **Spellerberg B, Martin S, Brandt C, Luticken R.** The cyl genes of *Streptococcus agalactiae* are involved in the production of pigment. FEMS Microbiol Lett 2000; 188: 125-128.
136. **Spik G.** Isolation of Glycopeptides and Glycosilation sites. In: Verbert A. (Ed.). In Methods on Glycoconjugates, Switzerland: Harwood Academic Pub. Chur; 1995. p. 4041-4046.
137. **Stanier RY, Adelberg EA, Ingraham JL.** Microbiología. 4ª Ed. Barcelona: Reverté S.A; 1984. p. 180-236.
138. **Stryer L.** Biosíntesis de nucleótidos. In: Stryer L (Ed.). Bioquímica. Vol 2. 4ª ed. Barcelona: Editorial reverté; 1995. p. 739-762.
139. **Sukroongreung S, Nilakul C, Tuntimavanich S, Santiwatanakul S.** New medium for enhancing pigment production of group B streptococci. J Clin Pathol 1984; 37: 1310-1311.

140. **Tapsall JW.** Pigment production by Lancefield-group-B streptococci (*Streptococcus agalactiae*). J Med Microbiol 1986; 21: 75-81.
141. **Tapsall JW.** Relationship between pigment production and haemolysin formation by Lancefield group B streptococci. J Med Microbiol 1987; 24: 83-87.
142. **Van Slyke DD.** On The Measurement Of Buffer Values And On The Relationship Of Buffer Value To The Dissociation Constant Of The Buffer And The Concentration And Reaction Of The Buffer Solution. J. Biol. Chem 1922; 52: 525-570.
143. **Vergheze A, Mireault K, Arbeit RD.** Group B streptococcal bacteremia in men. Rev Infect Dis 1986; 8: 912-17.
144. **Von Hunolstein C, D'Ascenzi S, Wagner B, Jelinkova J, Alfaroni G, Recchia S, Wagner M, Orefici G.** Immunochemistry of capsular type polysaccharide and virulence properties of type VI *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci). Infect Immun 1993; 61: 1272-1280.
145. **Waitkins SA.** A selective and differential medium for group B streptococci. Med Lab Sci 1982; 39: 185-188.
146. **Walker MJ.** The Protein Protocols Handbook. 2th ed. Totawa: Humana press; 2002.
147. **Weisman LE, Stoll BJ, Cruess DF, Hall RT, Merenstein GB, Hemming VG, Fischer GW.** Early-onset group B streptococcal sepsis: a current assessment. J Pediatr 1992; 121: 428-433.
148. **Wennerstrom DE, Tsaihong JC, Crawford JT.** Evaluation of the role of Hemolysin and Pigment in Pathogenesis of Early-onset Group B Streptococcal Infection. In: Kimura Y, Kotomi S, Shiokawa Y, (Eds.). Reverts Avances in Streptococci and Streptococcal Disease. UK: Beedbooks, Bracknell, Berkshire; 1985. p. 155-56.
149. **Wennerstrom DE, Lee LN, Baseman AG, LeBlanc DJ, Cerniglia CE, Trotter KM.** Genetic and Characterization of Group B Streptococcal Pigment. In: Dunny GM, Cleary PP, and McKay LL, (Eds.). Genetics and Molecular Biology of *Streptococcus*, *Lactococcus* and *Enterococci*. Washington D.C (USA): American Society for Microbiology; 1991. p. 224.

150. **Wood EG, Dillon HC Jr.** A prospective study of group B streptococcal bacteriuria in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1981; 140: 515-520.
151. **Woods CR, Edwards MS.** Renal abscess caused by group B *Streptococcus*. *Clin Infect Dis* 1994; 18: 662-663.
152. **Yagupsky P, Menegus MA, Powell KR.** The changing spectrum of group B streptococcal disease in infants: an eleven-year experience in a tertiary care hospital. *Pediatr Infect Dis J* 1991; 10: 801-808.
153. **Yancey MK, Duff P, Clark P, Kurtzer T, Frentzen BH, Kubilis P.** Peripartum infection associated with vaginal group B streptococcal colonization. *Obstet Gynecol* 1994; 84:816-819.
154. **Yancey MK, Duff PTI, Clark P, Kurtzer T, Frentzen BH, Kubilis P.** The Accuracy of Late Antenatal Screening Cultures in Predicting Genital Group B Streptococcal Colonization at Delivery. *Obstet Gynecol* 1996; 88:811-815.
155. **Yokoyama K, Horii T, Yamashino T, Hashikawa S, Barua S, Hasegawa T, Watanabe H, Ohta M.** Production of shiga toxin by *Escherichia coli* measured with reference to the membrane vesicle-associated toxins. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 192: 139-144.
156. **Ziska P.** Untersuchungen zur molekularen verteilung von polypeptiden und peptiden in handelsüblichen kasein-und fleischpeptonen mittels gelfiltration. *Arch Hyg* 1967; 151: 370-376.

Publicaciones

Use of Unmodified Starches and Partial Removal of Serum To Improve Granada Medium Stability

Manuel Rosa-Fraile,* Javier Rodríguez-Granger, Enrique Camacho-Muñoz, and Antonio Sampedro

Microbiology Service, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain

Received 22 September 2004/Returned for modification 27 October 2004/Accepted 23 November 2004

The use of 1% unmodified rice starch and 1% horse serum instead of 2% soluble starch and 5% serum in Granada medium is described. These components result in a medium of increased stability, preventing spoilage after a few days of storage at room temperature.

The detection of orange-red colonies in Granada medium (GM) (5) is an easy way of identifying hemolytic *Streptococcus agalactiae* (a group B streptococcus [GBS]) in clinical samples (1, 3, 9, 11, 15, 17, 20). Proteose Peptone 3 (BD/Difco, Franklin Lakes, N.J.) (12, 18), soluble starch (6), and horse serum (10, 13) are necessary components of culture media aimed to detect GBS by pigment production. In addition to these components, GM contains a folate pathway inhibitor (methotrexate) (4, 5), a Good's buffer (MOPS [morpholinepropanesulfonic acid]) (5, 8), and glucose (5) to trigger GBS pigment production.

However, an important drawback of GM is its poor stability if not stored refrigerated. The use of improperly stored GM can cause failure in the detection of GBS (7, 14, 20). We hypothesized that hydrolysis of soluble starch caused by the amylase in the serum (16) may be an important factor in the spoilage of nonrefrigerated GM (M. De La Rosa-Fraile, Letter, *J. Clin. Microbiol.* **41**:4007, 2003). Here we report on the use of unmodified starch, instead of soluble starch, and the reduction or removal of the serum in order to increase the stability of nonrefrigerated GM.

An overnight culture of GBS strain ATCC 12386 in brain heart broth diluted 1/100 in 0.85% NaCl was used for initial testing. The GBS pigment was graded 0 (no pigment), 1+ (yellow), 2+ (pale orange), 3+ (orange-red), or 4+ (deep red). Colony size and pigment score were assessed after 18 h of anaerobic incubation at 36°C.

Several formulations of GM were prepared with 1 or 2% soluble starch (catalog no. 1252; Merck HGaA, Darmstadt, Germany) and the following unmodified starches (from Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Mo.): cornstarch (catalog no. S 4126), rice starch (catalog no. S 7260), and wheat starch (catalog no. S 5127). Each medium was prepared with 5, 2, or 1% horse serum or without horse serum. Plates were inoculated as they were prepared or after storage for 6 days at 4, 22, or 30°C.

When GM plates were inoculated with GBS strain ATCC 12386, either as they were prepared or after 6 days of storage in the refrigerator, the pigment production scores were 4+ for

all media, but GBS colonies were smaller in the media prepared without serum (1- versus 2-mm diameters). Nevertheless, after 6 days at either 22 or 30°C, the media performed differently (Fig. 1). Media prepared with unmodified starches and serum supported good GBS pigment production (scores of 3+ and 4+). Media prepared with either 1 or 2% soluble starch and serum deteriorated, and pigment production diminished (scores of 1+ and 2+). All the media prepared without serum supported good GBS pigment production (scores of 3+ and 4+), but the colonies were smaller (about 1 mm in diameter). Owing to these results, and because the rice starch was easier to dissolve, the use of 1% rice starch plus 1% serum was chosen in place of 2% soluble starch plus 5% serum in the GM recipe.

To test the suitability of this modified GM to withstand stringent storage conditions, a field evaluation was carried out comparing GM prepared with 2% soluble starch and 5% horse serum (standard recipe), GM prepared with 2% soluble starch and 0% serum, and GM prepared with 1% unmodified rice starch and 1% serum. All the media were stored at 4°C either as they were prepared or after being kept for 6 days at 25°C.

Vagino-rectal swabs ($n = 350$) from pregnant women were placed in tubes with 0.8 ml of 0.85% NaCl and swirled vigorously. Six additional swabs were immersed in a tube and used to inoculate one plate of the media assayed. The results are shown in Table 1. GBS recoveries (51 colonies from 350 swabs) from the following media were identical: (i) GM prepared with soluble starch and serum and then refrigerated as prepared, (ii) GM prepared with unmodified starch and serum and then refrigerated as prepared, and (iii) GM prepared with unmodified starch and serum and refrigerated after being kept for 6 days at 25°C. Nonetheless, GBS were recovered from 46 swabs in GM prepared with soluble starch and without serum and refrigerated either as the media were prepared or after being kept for 6 days at 25°C ($P < 0.05$, binomial test) and from 35 swabs in GM prepared with soluble starch and 5% serum and kept for 6 days at 25°C before being stored in the refrigerator ($P < 0.01$, binomial test). There was a slight loss of pigment intensity in the medium prepared with unmodified starch and serum, kept at 25°C for 6 days, and refrigerated afterwards. This loss of pigment did not impair the detection of any GBS-positive samples. There was an important loss of pigment in GM prepared with soluble starch and serum and stored for 6

* Corresponding author. Mailing address: Servicio de Microbiología, Hospital Virgen de las Nieves, 18014 Granada, Spain. Phone: 34-958-020010. Fax: 34-958-020169. E-mail: manuel.rosa.sspa@juntadeandalucia.es.



FIG. 1. GBS colonies (ATCC 12386) in GM stored for 6 days at 22°C. Left, GM prepared with 1% rice starch and 1% serum; center, GM prepared with 2% soluble starch but without serum; right, GM prepared with 2% soluble starch plus 5% serum.

days at 25°C before being refrigerated. GBS colonies were always smaller in the media without serum.

An important factor in the poor performance of nonrefrigerated GM prepared with soluble starch and serum is the hydrolysis of starch caused by α -amylase (16). This starch hydrolysis can be observed when plates of GM prepared with soluble starch and serum are left for a few days at room temperature, a drop of Lugol's solution is added, and the blue color of the iodine-starch complex does not appear. When GM is prepared with unmodified starch, the hydrolysis process takes longer, and the Lugol's solution produces the characteristic deep-blue color even if GM is kept for several days at 30°C. Moreover, α -amylase hydrolysis of starch produces maltose, from which GBS produces acid (19). This acid can overpower the buffering capacity of the medium and hinder GBS pigment production, which is impaired at pH values below 7 (4, 6, 13, 21). The starch hydrolysis is related to the amylase content of the serum used, and this can help explain the dif-

ferences in stability observed among different batches of GM (14).

A possible way of increasing GM stability is the elimination of serum (and amylase) from its formulation. Our data, however, support the observations of Noble et al. (13) indicating the superiority of serum-containing media to detect GBS pigment. The data also show that GM spoilage at room temperature is slower when there is no serum in the medium, but GBS colonies are smaller and pigment production is weaker. The increase in GBS pigment in media which contains both serum and starch (10, 13) might be explained by the need for starch for rapid pigment production (12) and by the facilitation of pigment production by maltooligosaccharides produced during the starch hydrolysis (16). Nevertheless, when the starch is completely hydrolyzed, pigment production is weak (2). Nonetheless, a comprehensive explanation as to why pigment production is triggered in GM and why nonhydrolyzed starch (2, 6) is required for optimal pigment detection is not yet possible. The chemical structure of the pigment and the biochemical pathways involved in its production are unknown.

This work shows that GM stability improves with the use of 1% unmodified rice starch (Sigma 7260) instead of 2% soluble starch and with the use of 1% instead of 5% horse serum. These modifications can help in a safer use of GM to detect GBS.

TABLE 1. Comparison of GBS culture results obtained from 350 vaginorectal swabs

| GM formulation and storage conditions | No. of cultures | | | | Colony diam (mm) | |
|--|-------------------|-------------------------------------|----|----|------------------|-------|
| | With GBS detected | With pigment score ^a of: | | | | |
| | | 4+ | 3+ | 2+ | | 1+ |
| 2% soluble starch, 5% horse serum | | | | | | |
| Refrigerated as prepared | 51 | 38 | 10 | 3 | 0 | 1.5-2 |
| Refrigerated after 6 days at 25°C | 35 | 0 | 6 | 19 | 10 | 1.5-2 |
| 2% soluble starch, without horse serum | | | | | | |
| Refrigerated as prepared | 46 | 32 | 8 | 6 | 0 | 1-1.5 |
| Refrigerated after 6 days at 25°C | 46 | 28 | 9 | 7 | 2 | 1-1.5 |
| 1% unmodified corn starch, 1% horse serum | | | | | | |
| Refrigerated as prepared | 51 | 38 | 10 | 3 | 0 | 1.5-2 |
| Refrigerated after 6 days at 25°C | 51 | 32 | 10 | 9 | 0 | 1.5-2 |

^a See text for details.

REFERENCES

1. Blanckaert, H., J. Frans, J. Bosteels, M. Hanssens, and J. Verhaegen. 2003. Optimisation of prenatal group B streptococcal screening. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **22**:619-621.
2. Carazo, M. D. 1993. Influencia de la composición del medio de cultivo sobre la producción de pigmento por *Streptococcus agalactiae*. Ph.D. thesis. University of Granada, Granada, Spain.
3. Claeys, G., G. Verschraegen, and M. Temmerman. 2001. Modified Granada agar medium for the detection of group B streptococcus carriage in pregnant women. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**:22-24.
4. de la Rosa, M., R. Villarreal, D. Vega, C. Miranda, and A. Martínezbrocal. 1983. Granada medium for detection and identification of group B streptococci. *J. Clin. Microbiol.* **18**:779-785.
5. de la Rosa, M., M. Perez, C. Carazo, L. Pareja, J. I. Peis, and F. Hernandez. 1992. New Granada medium for detection and identification of group B streptococci. *J. Clin. Microbiol.* **30**:1019-1021.
6. Fallon, R. J. 1974. The rapid recognition of Lancefield group B haemolytic streptococci. *J. Clin. Pathol.* **27**:902-905.
7. García Gil, E., M. C. Rodríguez, R. Bartolomé, B. Berjano, L. Cabero, and A. Andreu. 1999. Evaluation of the Granada agar plate for detection of

- vaginal and rectal group B streptococci in pregnant women. *J. Clin. Microbiol.* **37**:2648–2651.
8. **Good, N. E., G. D. Winget, W. Winter, T. N. Connolly, S. Izawa, and R. M. Singh.** 1966. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry* **5**:467–477.
 9. **Gupta, C., and L. E. Briski.** 2004. Comparison of two culture media and three sampling techniques for sensitive and rapid screening of vaginal colonization by group B streptococcus in pregnant women. *J. Clin. Microbiol.* **42**:3975–3977.
 10. **Islam, A. K. M. S.** 1977. Rapid recognition of group B streptococci. *Lancet* **i**:256–257.
 11. **Kelly, V. N., and S. M. Garland.** 1994. Evaluation of new Granada medium (modified) for the antenatal detection of group B streptococcus. *Pathology* **26**:487–489.
 12. **Merritt, K., and N. J. Jacobs.** 1976. Improved medium for detecting pigment production by group B streptococci. *J. Clin. Microbiol.* **4**:379–380.
 13. **Noble, M. A., J. M. Bent, and A. B. West.** 1983. Detection and identification of Group B streptococci by use of pigment production. *J. Clin. Pathol.* **36**:350–352.
 14. **Overman, S. B., D. D. Eley, B. E. Jacobs, and J. A. Ribes.** 2002. Evaluation of methods to increase the sensitivity and timeliness of detection of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women. *J. Clin. Microbiol.* **40**:4329–4331.
 15. **Rolland, C., B. Bailleux, S. Biaisque, and L. Fortin.** 2003. Evaluation du milieu Granada appliqué au dépistage de *Streptococcus agalactiae* au huitième mois de grossesse. *Ann. Biol. Clin.* **61**:705–708.
 16. **Rosa-Fraile, M., A. Sampedro, A. Ruiz-Bravo, S. Sanbonmatsu, and G. Gimenez-Gallego.** 1996. Identification of serum and urine proteins responsible for enhanced pigment production by group B streptococci as amylases. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **3**:594–596.
 17. **Rosa-Fraile, M., J. Rodriguez-Granger, M. Cueto-Lopez, A. Sampedro, E. Biel Gaye, J. M. Haro, and A. Andreu.** 1999. Use of Granada medium to detect group B streptococcal colonization in pregnant women. *J. Clin. Microbiol.* **37**:2674–2677.
 18. **Rosa-Fraile, M., A. Sampedro, J. Varela, M. Garcia-Peña, and G. Gimenez-Gallego.** 1999. Identification of a peptide from mammal albumins responsible for enhanced pigment production by group B streptococci. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **6**:425–426.
 19. **Rotta, J.** 1986. Pyogenic hemolytic streptococci, p. 1047–1054. *In* P. H. A. Sneath, N. S. Mair, N. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
 20. **Tamayo, J., J.-L. Gómez-Garcés, and J.-I. Alós.** 2004. Evaluation of Granada agar plate for detection of *Streptococcus agalactiae* in urine specimens from pregnant women. *J. Clin. Microbiol.* **42**:3834–3836.
 21. **Tapsall, J. W.** 1986. Pigment production by Lancefield-group B streptococci (*Streptococcus agalactiae*). *J. Med. Microbiol.* **21**:75–81.

Specimen Storage in Transport Medium and Detection of Group B Streptococci by Culture

Manuel Rosa-Fraile,* Enrique Camacho-Muñoz, Javier Rodríguez-Granger, and Carmen Liébana-Martos

Microbiology Service, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain

Received 12 August 2004/Accepted 28 September 2004

Recovery of group B streptococci (GBS) was assessed in 1,204 vaginorectal swabs stored in Amies transport medium at 4 or 21°C for 1 to 4 days either by direct inoculation onto Granada agar (GA) or by culture in blood agar (BA) and GA after a selective broth enrichment (SBE) step. Following storage at 4°C, GBS detection in GA was not affected after 72 h by either direct inoculation or SBE; however, GBS were not detected after SBE in the BA subculture in some samples after 48 h of storage and in GA after 96 h. After storage at 21°C, loss of GBS-positive results was significant after 48 h by direct inoculation in GA and after 96 h by SBE and BA subculture; some GBS-positive samples were not detected after 24 h of storage followed by SBE and BA subculture or after 48 h of storage followed by SBE and GA subculture. Storage of swabs in transport medium, even at 4°C, produced after 24 h an underestimation of the intensity of GBS colonization in most specimens. These data indicate that viability of GBS is not fully preserved by storage of vaginorectal swabs in Amies transport medium, mainly if they are not stored under refrigeration.

The recommendations of the Centers for Disease Control and Prevention (10) for prevention of infections with neonatal group B streptococci (GBS) include cultures from anogenital swabs on all pregnant women, collected at 35 to 37 weeks of gestation. The recommendations state that swabs could be placed into a nonnutritive transport medium (such as Amies or Stuart without charcoal) and that transport media will maintain GBS viability for up to 4 days at room temperature or under refrigeration. Nevertheless, the accepted practice (3) of placing vaginal and rectal swabs in a transport medium and transporting them (even after several days) to the clinical laboratory has been questioned, because it has been reported that the yield of GBS-positive specimens increases when swabs are inoculated directly into selective media, thereby avoiding transport media (11). Moreover, some reports suggest a rapidly declining number of GBS for GBS-positive swabs that are stored in transport media (8).

This study examines the effect of time and temperature on GBS viability and GBS recovery rates for vaginorectal swabs stored in Amies transport medium either when the swabs are inoculated directly in Granada agar (GA) plates (9) or a selective broth enrichment (SBE) step (1, 3) is used before inoculating GA and blood agar (BA) plates.

Swab collection and processing. Two vaginorectal swabs were collected from each of 1,204 pregnant women (at 35 to 37 weeks of gestation); after collection, the swabs were placed in Amies transport medium (Biomedics, Madrid, Spain) and sent to the laboratory. All specimens were processed within 4 h of collection.

In the first phase of the study, we studied 300 samples, using one vaginal swab from each woman. Each swab was placed in

a tube containing 0.8 ml of 0.85% NaCl and swirled vigorously. Nine additional swabs were immersed in this tube and then placed in tubes of Amies transport medium. One of the nine swabs was immediately used to inoculate a plate of GA. Of the remaining eight swabs, four were stored at 4°C and four were stored at 21°C. After 24, 48, 72, and 96 h, one swab stored at 4°C and one stored at 21°C were inoculated onto GA plates using the four-quadrant technique to allow semiquantization of GBS colonies (5). The GA plates were incubated anaerobically for 48 h, and GBS growth (red colonies) was graded as 0 (no growth), 1+, 2+, 3+, and 4+, defined as growth in the first, second, third, and fourth quadrants, respectively. In the second phase we studied 904 samples, using two vaginorectal swabs from each woman. One swab was processed as received in the laboratory, and the remaining swab was stored (before processing) at either 4 or 21°C for 24, 48, 72, or 96 h (113 swabs for each condition). All swabs were processed in the same way, i.e., placed them in tubes with 5 ml of selective broth (SB) (Todd-Hewitt with 8 µg of gentamicin per ml plus 15 µg of nalidixic acid per ml) (1). Tubes of SB were incubated for 18 h at 36°C and then were subcultured onto BA and GA plates, which were incubated for 48 h (GA anaerobically). Hemolytic GBS colonies were identified by typical beta-hemolysis, Gram staining, and antigen detection.

Phase 1 results. The results of semiquantitative growth from GBS-positive vaginorectal swabs stored in Amies medium and directly inoculated in GA (without previous SBE) are shown in Table 1. GBS were recovered from 41 of the 300 (13.7%) swabs inoculated immediately after being received by the laboratory, and GBS growth from these swabs was scored 4+ in 24 swabs, 3+ in 10 swabs, and 2+ in 7 swabs.

From swabs kept at 4°C, GBS colonies were recovered from the same 41 samples after 24, 48, and 72 h (100%) and from 39 samples after 96 h (95%) ($P > 0.05$; Cochran's test). Nevertheless, among these 41 initially positive swabs stored at 4°C, the number of GBS colonies declined during storage in 10

* Corresponding author. Mailing address: Servicio de Microbiología, Hospital Virgen de las Nieves, 18014 Granada, Spain. Phone: 34-958-020010. Fax: 34-958-020169. E-mail: manuel.rosa.sspa@juntadeandalucia.es.

TABLE 1. GBS growth from 41 GBS-positive vaginorectal swabs after storage in Amies transport medium and direct inoculation onto Granada agar

| GBS culture result ^a | No. of swabs with indicated culture result after being stored for indicated time at indicated temp | | | | | | | | |
|---------------------------------|--|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | Initial no. | 4°C | | | | 22°C | | | |
| | | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
| 4+ | 24 | 20 | 12 | 8 | 4 | 15 | 10 | 5 | 1 |
| 3+ | 10 | 10 | 14 | 10 | 8 | 8 | 7 | 5 | 1 |
| 2+ | 7 | 8 | 7 | 14 | 17 | 10 | 12 | 17 | 18 |
| 1+ | 0 | 3 | 8 | 9 | 10 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 5 | 6 | 12 |
| Total positive | 41 | 41 | 41 | 41 | 39 | 39 | 36 | 35 | 29 |

^a For an explanation of culture results, see the text.

(24%) of the swabs stored for 24 h, in 26 (63%) of the swabs stored for 48 h, in 33 (80%) of the swabs stored for 72 h, and in 36 (88%) of the swabs stored for 96 h ($P < 0.01$; Friedman's test).

Among the 41 initially positive swabs kept at 21°C, GBS were recovered only from 39 (95%) after 24 h, from 36 (88%) after 48 h, from 35 (85%) after 72 h, and from 29 (71%) after 96 h ($P < 0.05$; Cochran's test). GBS were detected after 96 h of storage at 21°C in all swabs ($n = 24$) that initially scored 4+ and in 50% of swabs that initially scored 3+, and they were not detected when the initial score was 2+. Among the GBS-positive swabs stored at 21°C, a decline (or loss) in the number of GBS colonies was observed in 22 (54%), 30 (73%), 36 (88%), and 40 samples (98%), respectively, after 24, 48, 72, and 96 h of storage ($P < 0.01$; Friedman's test).

Phase 2 results. GBS recovery, after SBE, from the 904 vaginorectal swabs preserved in Amies transport medium is shown in Table 2. In the samples processed as received in the laboratory, GBS were recovered from 135 swabs (14.9%) in the GA subculture and from 132 (14.6%) of the swabs in the BA subculture ($P > 0.05$; binomial test).

Among the 69 initially positive samples stored at 4°C, and when the subculture was carried out on BA, GBS were not detected in one sample after 48 h, in two after 72 h, and in two after 96 h ($P > 0.05$; binomial test). From these five negative samples (in the BA subculture), GBS were lost only in one (after 96 h) when GA was used to subculture.

Among the 66 initially positive samples stored at 21°C in transport medium, and when the subculture was carried out on BA, GBS were not detected in one sample after 24 h, in two samples after 48 h, in three samples after 72 h, and in five

samples after 96 h ($P < 0.05$; binomial test). From these 11 negative samples (in the BA subculture), GBS were lost only in 6 samples when GA was used to subculture.

GBS colonies were not observed in any BA plate subculture when they were not present in the GA plate subculture. In all (Table 2), there were 15 cases in which GBS were recovered after the subculture onto GA but not when BA was used ($P < 0.001$ binomial test).

Conclusions. The ideal transport system should maintain the viability of bacteria in specimens without promoting multiplication. However, some bacteria, such as *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp., which can be present in vaginorectal samples, may proliferate during transport, and this proliferation can impair the recovery of GBS from vaginorectal swabs preserved in transport media (D. M. Warshauer, L. J. Bartell, and J. T. Paloucek, Abstr. 98th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol., abstr. C-444, 1998). It has been shown that storage of vaginorectal swabs in transport medium for a few hours does not result in a significant decrease of GBS detection after SBE (4), but longer storage of vaginorectal samples in transport media has not been studied. Our data show that 4 days of storage of vaginorectal swabs in Amies transport medium at 4°C does not result in a significant decrease in the ability of the culture in GA to detect GBS by either direct inoculation or following SBE. However, when the subculture from SBE is carried out in BA, storage of swabs in transport medium impairs the detection of some GBS-positive samples, even after 24 h at 4°C. On the other hand, storage of vaginorectal swabs in transport medium at 21°C compromises the ability of the culture to detect GBS colonization, even after SBE, and some positive samples are lost after 24 h, when BA plates are used to detect GBS colonies, or after 48 h, when subculture onto GA plates is used.

Results of this study confirm those of previous reports that GBS can be detected in the GA subculture after SBE from samples stored in transport medium for 24 h (12). Our data also confirm that subculture onto GA is more sensitive than subculture onto BA to detect GBS in vaginorectal swabs after SBE (9). This finding could be explained by the fact that in all the samples in which GBS were detected in GA but not in BA, there was a large growth of fecal bacteria in BA (after SBE) that did not allow the observation of GBS beta-hemolytic colonies while, in contrast, red GBS colonies were easily spotted in GA. Our results also show that storage of vaginorectal swabs in Amies medium, either at 4 or at 21°C, decreases GBS viability after 24 h. The drop in GBS viability during storage at 21°C can cause the loss of some GBS-positive samples in BA

TABLE 2. Number of GBS carriers detected (after selective enrichment) by direct and delayed culture (after being stored in Amies medium during the indicated time at the indicated temperature) in 8 groups of 113 vaginorectal samples

| Subculture | No. at temp: | | | | | | | |
|--------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | 4°C | | | | 21°C | | | |
| | Direct/delayed 24 h | Direct/delayed 48 h | Direct/delayed 72 h | Direct/delayed 96 h | Direct/delayed 24 h | Direct/delayed 48 h | Direct/delayed 72 h | Direct/delayed 96 h |
| Blood agar | 20/20 | 13/12 | 19/17 | 16/14 | 12/11 | 18/16 | 13/10 | 21/16 ^a |
| Granada agar | 20/20 | 13/13 | 20/20 | 16/15 | 13/13 | 19/18 | 13/11 | 21/18 |

^a $P < 0.05$, binomial test.

subculture after 24 h. In light of these findings, the claim that vaginorectal swabs for GBS detection can be safely stored in transport medium for 4 days at room temperature perhaps should be reevaluated.

The density of GBS colonization has been correlated with the risk of neonatal infection, with a lower risk of infection if there is light maternal colonization at delivery (2, 6, 7). Because of this, if loss of GBS viability occurs as a result of specimen storage and a direct sampling technique is used to evaluate the intensity of colonization, the culture results can lead to an underestimation of the intensity of maternal GBS colonization and of the actual risk of GBS neonatal infection.

REFERENCES

1. Baker, C. J., D. J. Clark, and F. F. Barret. 1973. Selective broth medium for isolation of group B streptococci. *Appl. Microbiol.* **26**:884–885.
2. Boyer, K. M., C. A. Gadzala, P. D. Kelli, L. I. Burd, and S. P. Gotoff. 1983. Selective intrapartum chemoprophylaxis of neonatal group B streptococcal early-onset disease. II. Predictive value of prenatal cultures. *J. Infect. Dis.* **148**:802–809.
3. Centers for Disease Control and Prevention. 1996. Prevention of group B streptococcal disease: a public health perspective. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **45**(RR7):1–24.
4. Crisp, B. J., M. K. Yancey, C. Uyehara, and W. F. Nauschuetz. 1998. Effect of delayed inoculation of selective media in antenatal detection of group B streptococci. *Obstet. Gynecol.* **92**:923–925.
5. Forbes, B. A., D. F. Sham, and A. S. Weissfeld. 2002. *Bayley & Scots diagnostic microbiology*, 11th ed. Mosby, St. Louis, Mo.
6. Itakura, A., O. Kurauchi, S. Morikawa, K. Matsuzawa, S. Mizutani, and Y. Tomoda. 1996. A prospective study on the relationship between intrapartum maternal group-B streptococcal concentration and signs of infection in neonates. *J. Obstet. Gynecol. Res.* **22**:101–105.
7. Lim, D. V., W. J. Morales, A. F. Walsh, and D. Kazinis. 1986. Reduction of mortality and morbidity rates for neonatal group B streptococcal disease through early diagnosis and chemoprophylaxis. *J. Clin. Microbiol.* **23**:489–492.
8. Ostroff, R. M., and J. W. Steffens. 1995. Effect of specimen storage, antibiotics, and feminine hygiene products on the detection group B streptococcus by culture and the STREP B OIA test. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **22**:253–259.
9. Rosa-Fraile, M., J. Rodriguez-Granger, M. Cueto-Lopez, A. Sampedro, E. Biel-Gaye, J. M. Haro, and A. Andreu. 1999. Use of Granada medium to detect group B streptococcal colonization in pregnant women. *J. Clin. Microbiol.* **37**:2674–2677.
10. Schrag, S., R. Gorwitz, K. Fultz-Butts, and A. Schuchat. 2002. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **51**(RR11):1–22.
11. Silver, H. M., and J. Strumminsky. 1996. A comparison of the yield of positive antenatal group B *Streptococcus* cultures with direct inoculation in selective growth medium versus primary inoculation in transport medium followed by delayed inoculation in selective growth medium. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **175**:155–157.
12. Teese, N., D. Henessey, C. Pearce, N. Kelly, and S. Garland. 2003. Screening protocols for group B streptococcus: are transport media appropriate? *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* **11**:199–202.