

CONVENIO:

ENTORN QUÍMIC – UNIV. AUTÒNOMA DE BARCELONA

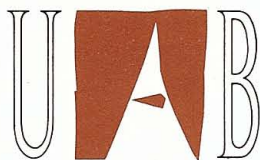
Informe completo

***“Análisis y cuantificación bacteriana,
identificación proteica y determinación”***

Investigador Responsable: José Aguilera

Personal técnico que ha colaborado: José Aguilera, Carles Gil,
Roger Cubí.

Entidad: Dpto. Bioquímica, Facultad de Medicina, UAB



Universitat Autònoma de Barcelona

Bellaterra, 30 de mayo de 2005

CONVENIO ENTORN QUÍMIC - UAB

Informe completo:

“Análisis y cuantificación bacteriana, identificación proteica y determinación”

Persona de contacto: José Aguilera

Personal técnico que ha colaborado: José Aguilera, Carles Gil, Roger Cubí.

Entidad: Dpto. Bioquímica, Facultad de Medicina, UAB

A partir de unas muestras entregadas por el Sr. Antonio Corcoy en marzo de 2005 en la *Unitat de Bioquímica de la Universitat Autònoma de Barcelona*. (Muestras consistentes en bolsas de algo más de 100 gramos de productos de apariencia arenosa, en cada una de ellas). Se han realizado determinación de proteínas en cada una de las muestras, en presencia y en ausencia de bacterias o partículas grandes no solubles en agua.

Las muestras están etiquetadas como:

Producto E-E (Entol-Enzibac)

Parte del **producto E-E** (1 gramo) se envió al *Servei d'Anàlisis i d'Aplicacions Microbiològiques de la Universitat Autònoma de Barcelona*. En dicho servicio se determinó la concentración de bacterias viables presentes en la muestra.

El método fue el siguiente:

Un miligramo del producto se regeneró en 10 ml de agua purificada estéril. Se realizaron diluciones de la solución y se procedió a la siembra en superficie (0,1 ml) por duplicado, en placas de TSA (Agar tristona soja; OXOID). Las placas se incubaron a 30°C durante 48 horas, en aerobiosis. Posteriormente, se realizó el recuento del total de colonias crecidas. Este procedimiento se realizó por duplicado y de forma independiente.

El resultado comunicado por la Dra. Montserrat Llagostera, responsable del Servicio, fue el siguiente:

“El contenido del **producto E-E** en bacterias viables es de **5,8 x 10⁶ cfu/gr** (unidades formadoras de colonias por gramo de producto). La morfología colonial que hemos observado es compatible con que sean *Bacillus* en la mayoría de los casos”.

Pruebas realizadas por un laboratorio independiente confirman la ausencia de mohos, levaduras y enterobacterias entre ellas la ausencia de *Escherichia coli*, que confiere al producto mayor seguridad de manipulación y ausencia de contaminación biológica.

Análisis del laboratorio independiente:

ANÁLISIS DEL COMPONENTE ENZIMÁTICO DEL PRODUCTO E-E					
HUMEDAD	GRASAS	AEROBIOS	MOHOS Y LEVADURAS	E.COLI	ENTEROBACTERIAS
3,62%	0,29% sobre materia seca	600 u.f.c./gr	Ausencia	Ausencia	Ausencia

El análisis del componente enzimático presenta una humedad de 3,62% con un contenido mínimo de 0,29% de grasas en tejido seco.

Capacidad de absorción de agua destilada de

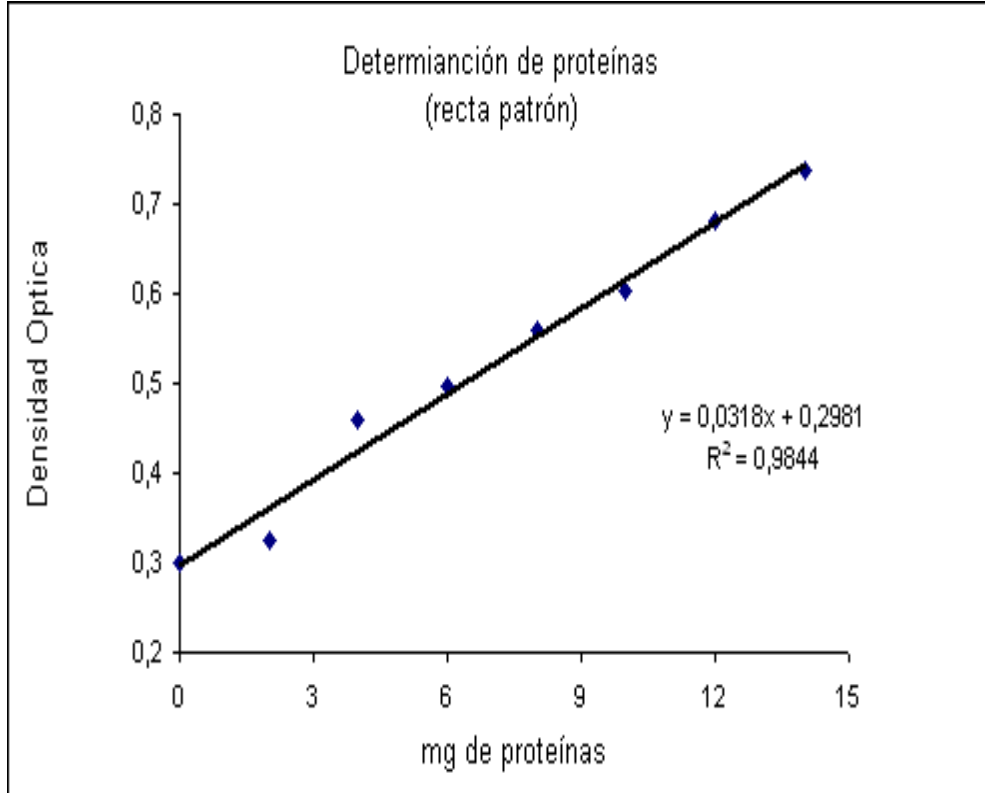
PRODUCTO	AGUA DESTILADA
Producto Entol-Enzibac	176,5; 174,5 ml/gr (26,3 L/150gr)

La determinación se realizó en superficie añadiendo el solvente lentamente y finalmente decantando el exceso de líquido absorbido. Si realizamos la determinación en tubo falcons de 15 ml observamos la formación de una gelatina con mayor capacidad de absorción (**360 a 400 ml/gr** - de 50 a 60 litros por bolsa de 150 gramos del producto E-E).

Determinaciones de proteínas por el método de Bradford.

(Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254)

0	2	4	6	8	10	12	14
0,301	0,326	0,459	0,496	0,558	0,603	0,681	0,739



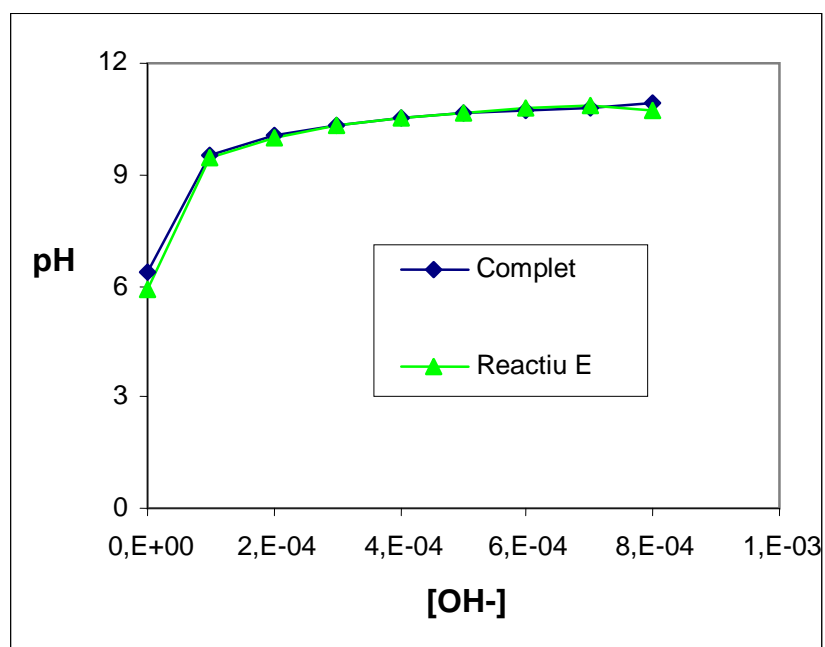
	Prod. E-E
	0,356
	0,343
promig	0,350
ug/ml	1,62
ug prot	16,16
% (ug prot/ug prod).	0,32

Capacidad tamponante

Se ha determinado la capacidad tamponante de las muestras, ya que tanto los enzimas (biocatalizadores biológicos) como las bacterias suelen ser más activos a pH neutros (pH fisiológicos).

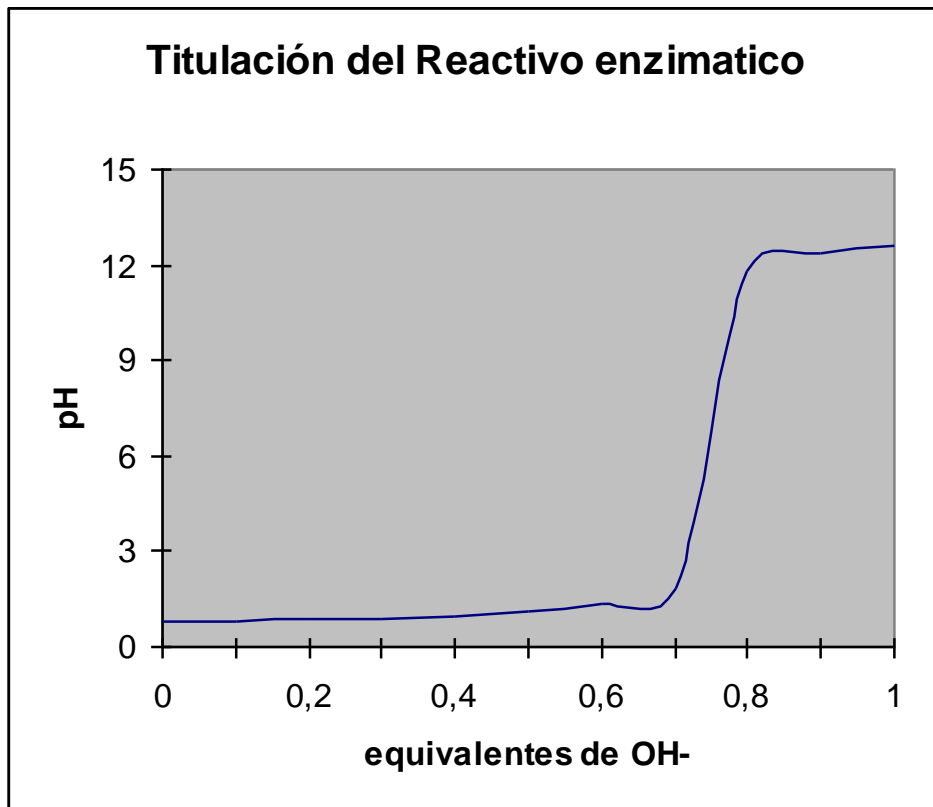
Para dicha determinación se ha realizado una titulación doble con ácido clorhídrico y con hidróxido sódico.

PRODUCTO	pH (0'01%)
Producto E-E (Entol-Enzibac)	6,4



Titulación del reactivo enzimático en HCl 0,1 M con NaOH 0,1 M

Para comprobar la capacidad tamponante del producto E-E hacemos la titulación. El resultado es que el producto E-E no muestra capacidad tamponante (la concentración determinada fue de 0,25 mg/ml).



Este resultado no **significa merma de actividad**, puesto que las muestras biológicas pueden no modificar significativamente el pH del medio.

Determinación de la actividad enzimática hidrolítica.

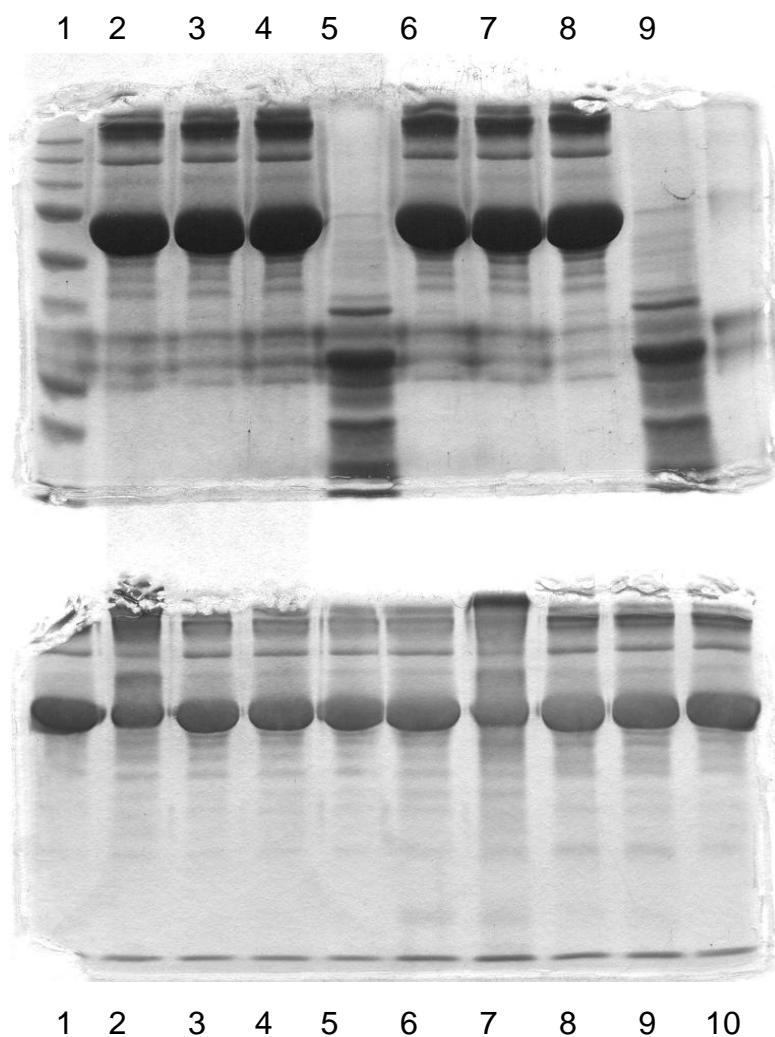
En el primer gel, mostrado en la figura inmediatamente después, se presenta los resultados que se obtienen en un gel del 12% de poliacrilamida. Resultados de varias muestras de BSA tratadas con 10 mg de producto enzimático, 10 mg de producto EE o con 10 mg de otro producto similar, a las temperaturas indicadas, durante 5 horas.

Podemos observar una gran actividad del producto enzimático moderada del los demás por lo que pasamos al gel segundo en el que utilizamos otras condiciones mas moderadas

En este segundo gel podemos observar que las bandas por debajo de la banda mayoritaria correspondiente a la proteína BSA son más densas en los carriles 6 a 10 con respecto a los carriles 1 a 5 que corresponden respectivamente a las bandas que no contienen el producto enzimático.

Estos resultados indican actividad específica hidrolítica del producto base de E-E en condiciones más suaves que las anteriores en mg de producto (2 mg) en tiempo (1 hora) y en concentración de BSA (5 mg).

Determinación de la capacidad hidrolítica frente a BSA



Primer Gel

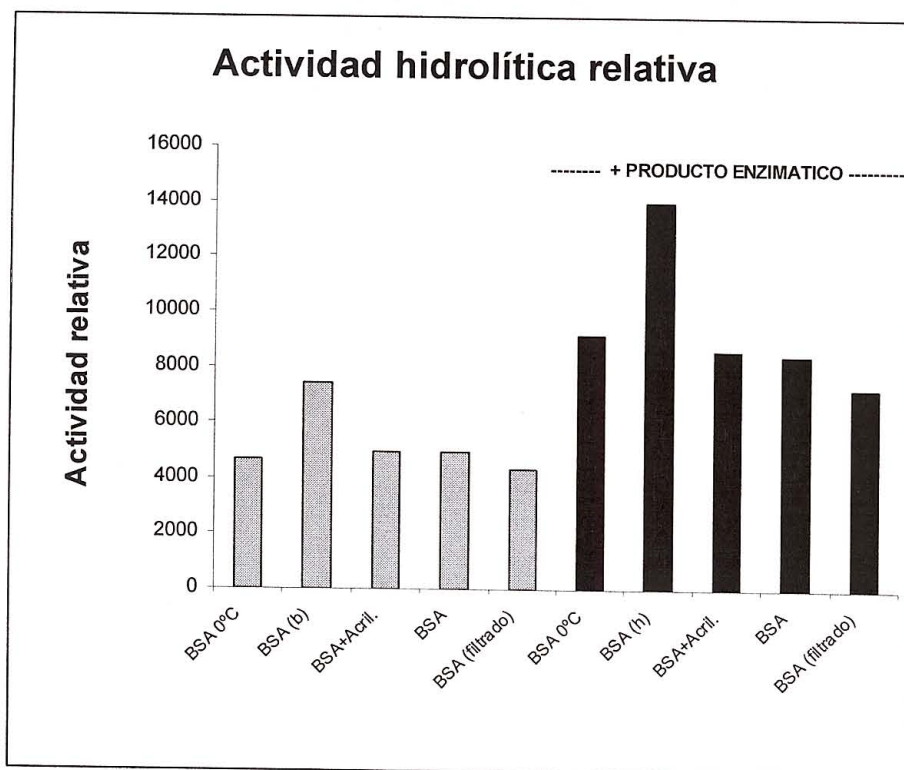
- 1 – Marcador peso molecular
- 2 – BSA 0 °C
- 3 – Producto Completo 0 °C
- 4 – Producto C 0°C
- 5 – Producto enzimático 0 °C
- 6 – BSA 37 °C
- 7 – Producto Completo 37 °C
- 8 – Producto C 37 °C
- 9 – Producto enzimático 37 °C

+BSA

Segundo Gel

- 1 – BSA 0 °C
- 2 – BSA hervido
- 3 – BSA + Acrilamida
- 4 – BSA 37 °C
- 5 – BSA 37 °C (filtrado)
- 6 – BSA 0 °C
- 7 – BSA hervido
- 8 – BSA + Acrilamida
- 9 – BSA 37 °C
- 10 – BSA 37 °C (filtrado)

+ Producto enzimático



Histograma correspondiente a la actividad hidrolítica obtenida del segundo gel electroforético (si no se indica lo contrario la temperatura es de 37°C).

La muestra analizada presenta una actividad hidrolítica moderada tanto a temperaturas bajas (0-4°C) como a temperaturas medias (30-40°C). El protocolo se planteó como la determinación hidrolítica de una proteína purificada (Albúmina de suero bovina).

Profesor José Aguilera Ávila

Director
 Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular
 Institut de Neurociències
 Universitat Autònoma de Barcelona
 Edifici M, Campus UAB, Cerdanyola del Vallés, Barcelona

Tel.: 93 581 1673, Fax: 93 581 1573, e-mail: jose.aguilera@uab.es



