



UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Aislamiento y caracterización de
microorganismos degradadores de
colágeno y estudio de la actividad
colagenolítica asociada**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad
Central de Venezuela por el Bachiller
Antonio José Zerpa Hernández como
requisito parcial para optar al título de
Licenciado en Biología

Tutor: Dr. Carolina Bernal

CARACAS, VENEZUELA
OCTUBRE - 2011

RESUMEN

El colágeno es una de las proteínas más abundantes de la naturaleza, está presente principalmente en mamíferos como fibras para-cristalinas que cumplen funciones estructurales y de soporte, siendo el colágeno de tipo I el más abundante formado por dos cadenas peptídicas $\alpha 1$ idénticas combinadas a una cadena $\alpha 2$. El colágeno forma parte del grupo de proteínas fibrilares junto a la queratina y elastina que se caracterizan por ser moléculas difíciles de degradar. Las enzimas proteolíticas son enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos de las proteínas, las proteasas específicas que catalizan la degradación del colágeno nativo a péptidos de menor tamaño se denominan collagenasas. En la naturaleza hay ciertos microorganismos que producen enzimas colagenolíticas y son capaces de degradar los residuos compuestos por colágeno. Las enzimas colagenolíticas son de interés en la industria farmacéutica y de alimentos principalmente. En este trabajo se aislaron del suelo seis microorganismos, dos de ellos fueron seleccionados como colagenolíticos por su capacidad de crecer en medios suplementados con colágeno como única fuente de carbono y nitrógeno. El primero de ellos presentó características similares a los hongos filamentosos, y fue identificado molecularmente amplificando las regiones espaciadoras transcribibles internas (ITS) del ADN ribosomal como *Neurospora crassa*, un hongo filamentoso que produce esporas de color naranja y cuya actividad colagenolítica no había sido reportada antes. El segundo microorganismo capaz de crecer en colágeno desarrolló colonias grises y micelio, en la identificación se amplificó del ADN genómico una región del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S y se identificó como *Streptomyces* sp. Este último, es un género de gran importancia en procesos industriales por su capacidad de producir compuestos con gran eficiencia, en tal sentido, se caracterizó el crecimiento de *Streptomyces* sp y la degradación de colágeno. Algunos indicadores como la alcalinización del medio, degradación de fibras completas de colágeno tipo I y un patrón electroforético de degradación a medida que se desarrolla en medios de cultivo, fueron evidencia de la capacidad colagenolítica del microorganismo y de la presencia de posibles actividades proteolíticas asociadas. Para estudiar las actividades proteolíticas se utilizaron zimogramas de gelatina y se identificaron al menos cinco bandas de actividad proteolítica (180, 80, 60, 50 y 18 kDa aproximadamente). Los zimogramas con colágeno permitieron identificar a estas proteasas como collagenasas y se seleccionaron para su caracterización solo dos actividades (180 y 18 kDa). La enzima de 180 kDa resultó ser una metalo-proteasa neutra dependiente de Ca^{2+} , como la mayoría de las collagenasas descritas. Por otra parte, la enzima de 18 kDa, resultó ser una proteasa alcalina no susceptible a la inhibición con EDTA y EGTA, por lo que es necesaria una caracterización más precisa con otros inhibidores de proteasas. Con este estudio se demuestra el potencial de la cepa colagenolítica de *Streptomyces* sp, aislada en suelo venezolano, como fuente microbiana de enzimas proteolíticas promisorias para su utilización en la industria farmacéutica y de alimentos.

INDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
El colágeno	1
Tipos de Colágeno	1
El colágeno en la naturaleza	5
Enzimas Proteolíticas	6
Clasificación de las enzimas proteolíticas	6
Exo-peptidasas	7
Endo-peptidasas	7
Serín- proteasas	7
Aspartil-proteasas	7
Cisteín-proteasas	8
Metalo-proteasas	8
Colagenasas	8
Aplicaciones de las proteasas	9
Aplicaciones de las colagenasas	10
ANTECEDENTES	12
OBJETIVOS	16
Objetivo general	16
Objetivos específicos	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Sustrato de colágeno	17
Medios de cultivo	17
Medio de almidón	18
Medio de colágeno	18
Aislamiento de los microorganismos	19
Mantenimiento de los microorganismos	20
Identificación molecular de los microorganismos aislados	21
Extracción de ADN	21
Amplificación por PCR	21
Amplificación de los espaciadores transcribibles internos ITS	22
Amplificación del gen ADNr 16S	22
Electroforesis en gel de agarosa	23
Preparación de ADN para la secuenciación	23
Secuenciación	24
Seguimiento de la degradación de Colágeno tipo I	24
Seguimiento de la degradación de las fibras de colágeno	24
Patrón electroforético de la degradación de colágeno	25
Estudio de la actividad enzimática	25
Zimogramas de gelatina	26
Zimogramas de Colágeno	26
Caracterización de las actividades enzimáticas observadas	27
Efecto del pH	27

Efecto de iones divalentes y agentes quelantes	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
Aislamiento y selección de microorganismos colagenolíticos	28
Caracterización de los microorganismos colagenolíticos aislados	31
Microorganismo “D”	31
Microorganismo “F”	36
Crecimiento de <i>Streptomyces</i> sp y degradación de colágeno Tipo I	41
Caracterización de la degradación de colágeno tipo I por <i>Streptomyces</i> sp	46
Caracterización de la actividad enzimática de <i>Streptomyces</i> sp. en medios de cultivo con colágeno tipo I	48
Caracterización de la actividad colagenolíticas de <i>Streptomyces</i> sp.	52
El efecto del pH	53
Efecto de iones y agentes quelantes	54
CONCLUSIONES	58
RECOMENDACIONES	59
BIBLIOGRAFÍA	60

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Representación gráfica de la estructura del colágeno.	3
Figura 2. Micrografía electrónica de un tendón bovino seccionado.	3
Tabla 1. Clasificación de las principales familias de colágeno.	4
Tabla 2. Microorganismos con actividad colagenolítica.	15
Figura 3. Imagen de placas de cultivo de almidón de yuca con los microorganismos aislados.	30
Tabla 3. Crecimiento de los microorganismos aislados en medios diferenciales de almidón y colágeno.	30
Figura 4. Imagen de cultivo del microorganismo D.	32
Figura 5. Imagen en lupa del microorganismo D.	33
Figura 6. Esquema de las regiones ITS.	35
Figura 7. PCR de las regiones ITS.	35
Figura 8. Alineación de la secuencia ITS.	35
Figura 9. Imagen de cultivo del microorganismo F.	37
Figura 10. Imagen en lupa del microorganismo F.	38
Figura 11. PCR del 16S ARNr.	40
Figura 12. Alineación de la secuencia 16S ARNr.	40
Tabla 4. Variación de pH en los caldos de cultivo de <i>Streptomyces</i> sp.	42
Figura 13. Imágenes a microscopio de luz de fibras de colágeno.	45
Figura 14. Imágenes a Microscopio de luz del crecimiento de <i>Streptomyces</i> sp. sobre las fibras de colágeno.	45
Figura 15. Patrón electroforético de la degradación de colágeno.	49
Figura 16. Zimograma de gelatina de los caldos de cultivo de <i>Streptomyces</i> sp	51
Figura 17. Zimogramas de colágeno de los caldos de cultivo de <i>Streptomyces</i> sp.	54
Figura 18. Efecto de pH sobre la actividad colagenolítica de <i>Streptomyces</i> sp.	59
Figura 19. Efecto de iones y agentes quelantes sobre la actividad colagenolítica de <i>Streptomyces</i> sp.	59

INTRODUCCIÓN

El colágeno

El colágeno es una de las proteínas más abundantes de la naturaleza, está presente principalmente en mamíferos como fibras para-cristalinas que cumplen funciones estructurales y de soporte en tejidos conectivos, piel, tendón, huesos, cartílagos, vasos sanguíneos y membranas basales. Estas fibras están compuestas por repetidas agregaciones del monómero conocido como tropo-colágeno, el cual consiste en tres cadenas de polipéptidos que están enrolladas en una estructura rígida de triple hélice (Figura 1). Cada cadena polipeptídica posee una masa molecular aproximada de 100 kDa y contiene alrededor de 1000 aminoácidos, en esta se repite la secuencia Gly-X-Y, siendo frecuentemente “X” prolina y “Y” hidroxiprolina, aminoácidos que limitan el ángulo de rotación de la cadena polipeptídica debido al anillo en su estructura. En el colágeno hay ausencia de cisteína y por lo tanto la formación intra- e inter-molecular de puentes disulfuro no es posible, la conformación helicoidal se mantiene por puentes de hidrógeno que se forman entre grupos NH y C=O (Pérez, 1978).

Tipos de Colágeno

Las tres cadenas polipeptídicas que se unen para formar el tropo-colágeno pueden ser idénticas (homo-trímeros), pero comúnmente las moléculas de colágeno son hetero-trímeros, en la naturaleza existen al menos 46 tipos de cadenas polipeptídicas distintas que dan origen a los 26 tipos diferentes de colágeno, estos se clasifican de acuerdo a su

complejidad, diversidad de estructura, variantes de empalme, presencia de dominios no helicoidales, montaje y función (Gelse, 2003). La tabla 1 muestra la clasificación del colágeno en familias de acuerdo a sus estructuras y a su ubicación en los diferentes tejidos.

El colágeno de tipo I es el más abundante y más estudiado en la naturaleza, está formado por dos cadenas $\alpha 1$ idénticas combinadas a una cadena $\alpha 2$. El colágeno tipo I representa más del 90% de la masa orgánica del hueso y es el principal componente de tendones, piel, ligamentos, córnea, y muchos otros tejidos intersticiales de enlace, con excepción de algunos como cartílago hialino, cerebro y cuerpo vítreo. En la mayoría de los órganos y en particular en tendones y fascias, el colágeno tipo I proporciona rigidez y resistencia a la tracción en el hueso, definiendo propiedades biomecánicas como soporte de carga, resistencia y rigidez a la torsión (Gelse, 2003).

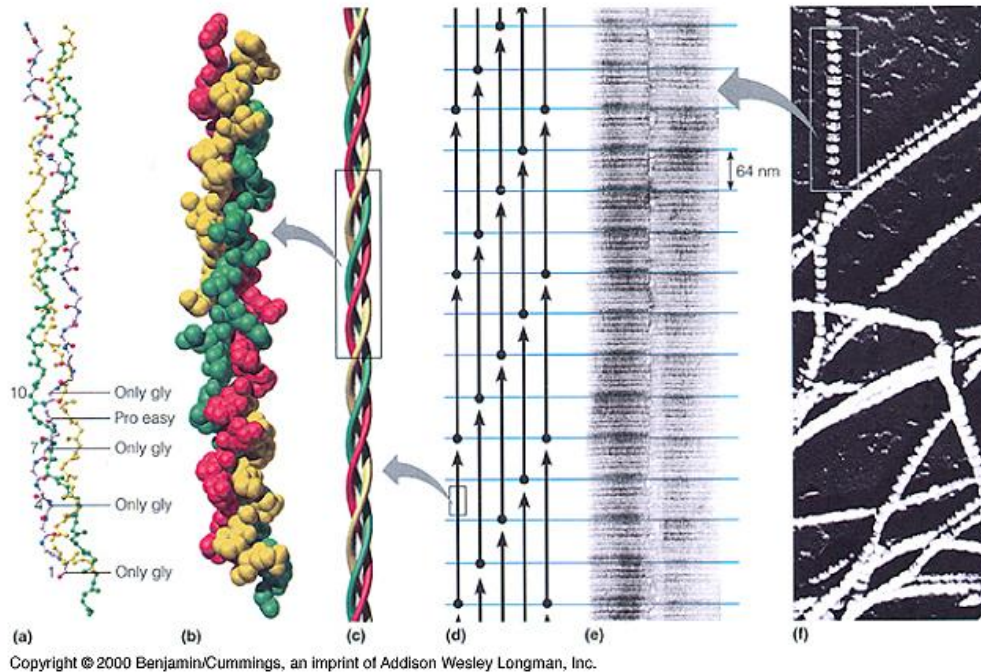


Figura 1. Representación gráfica de la estructura del colágeno. **a)** Tres cadenas polipeptídicas sencillas, donde uno de cada tres aminoácidos es glicina. **b)** Estructura tridimensional de la molécula de tropo-colágeno. **c)** Unidad básica del colágeno. **d)** Las moléculas de tropo-colágeno se unen en los extremos y lateralmente, una molécula de tropo-colágeno adyacente esta desplazada 64 nm. **e)** Fibras de colágeno. **f)** Colágeno fibrilar de piel de ternero, ampliada aproximadamente 30,000 veces.



Figura 2. Micrografía electrónica de un tendón bovino seccionado, fibras de colágeno tipo I forman las fibras gruesas que se disponen de forma paralela.

Tabla 1. Clasificación de las principales familias de colágeno.

Clasificación	Tipo	Tejido (distribución)
Colágenos de formación fibrilar	I	Hueso, dermis, tendones, ligamentos, córnea
	II	Cartílago, cuerpo vítreo, núcleo pulposo
	III	Piel, endotelio vascular, fibras reticulares (pulmones, hígado, bazo, etc.)
	V	Pulmón, córnea, hueso, membranas fetales. (junto con colágeno tipo I)
	XI	Cartílago, cuerpo vítreo
Colágeno de membrana basal	IV	Membrana basal
Colágeno microfibrilar	VI	Dermis, cartílago, placenta, pulmones, endotelio vascular, disco intervertebral
Fibrillas de anclaje	VII	Piel, unión dermis-epidermis, mucosa oral, cérvix
Colágenos que forman red hexagonal	VIII	Células endoteliales, membrana de Descement
	X	Cartílago hipertrófico
Colágenos con regiones no helicoidales	IX	Cartílago, humor vítreo, córnea
	XII	Pericondrio, ligamentos, tendones
	XIV	Dermis, tendones, pared del vaso, placenta, pulmones, hígado
	XIX	Rabdomiosarcoma humano
	XX	Epitelio de la córnea, piel embrionaria, cartílago esternal, tendón
	XXI	Pared de los vasos sanguíneos
Colágenos de trans-membrana	XIII	Epidermis, folículo de cabello, endomisio, intestino, condrocitos, pulmones, hígado
	XVII	Unión dermis-epidermis
Multiplexin, colágenos con múltiples dominios en triple hélice e interrupciones	XV	Fibroblastos, células musculares lisas, riñón, páncreas
	XVI	Fibroblastos, amnios, queratinocitos
	XVIII	Pulmones, hígado

Tomado de Gelse, 2003.

El colágeno en la naturaleza

Las proteínas fibrilares (queratina, elastina y colágeno entre otras) son moléculas de naturaleza rígida y compacta, ellas se encuentran presentes en un gran número de desechos agro-industriales (picos, patas, colas, cueros, cuernos, escamas, huesos, y otros tejidos) generados como resultado del aumento sostenido en el procesamiento de carnes, aves y peces.

Estas estructuras rígidas usualmente son resistentes a la degradación por enzimas proteolíticas comunes y en la mayoría de los casos terminan convirtiéndose en residuos difíciles de descartar. La necesidad de la agro-industria para eliminar estos desechos ha llevado a la incineración de los mismos, lo cual tiene desventajas ecológicas importantes para el planeta como la aparente pérdida de energía y la producción de gran cantidad de dióxido de carbono (Suzuki y col., 2006).

En la naturaleza vemos como estos residuos no se acumulan, lo que indica la presencia de microorganismos con la capacidad de degradarlos, en tal sentido, y en la búsqueda de una tecnología alternativa y amigable al planeta para disponer de estos desechos, se proponen procesos biotecnológicos utilizando microorganismos capaces de degradar estas proteínas estructurales (colágeno, queratina, elastina), mediante actividades enzimáticas específicas (colagenolíticas, queratinolíticas, elastinolíticas).

Enzimas Proteolíticas

Las enzimas proteolíticas o proteasas, son enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos de las proteínas, logrando la degradación de las moléculas proteicas a péptidos y aminoácidos. Las proteasas se encuentran distribuidas en una amplia diversidad de organismos como plantas, animales y microorganismos (bacterias, hongos y virus), en todos estos las proteasas están involucradas en un sin número de funciones que las hace moléculas fisiológicamente necesarias para la vida.

Los microorganismos son una excelente fuente de proteasas, preferidos debido al rápido crecimiento de los mismos, requerimiento de un espacio limitado para su cultivo, y fácil accesibilidad a la manipulación genética. Las proteasas microbianas representan aproximadamente el 40% del total de las ventas de enzimas en todo el mundo (Mala y col., 1998).

Clasificación de las enzimas proteolíticas

Debido a su vasta diversidad de acción y estructura, las proteasas han sido difíciles de clasificar, sin embargo, en la actualidad son clasificadas en base a tres criterios principales: tipo de reacciones que catalizan, naturaleza química del sitio catalítico y relación evolutiva en referencia a su estructura.

De manera general podemos observar dos grandes grupos: exo-peptidasas y endo-peptidasas, dependiendo del sitio de acción sobre el sustrato.

Exo-peptidasas

Las exo-peptidasas actúan cerca del final de la cadena polipeptídica. En base al sitio de acción en el extremo N o C terminal, ellas se clasifican como amino-peptidasas y carboxi-peptidasas respectivamente.

Endo-peptidasas

Las endo-peptidasas se caracterizan por su acción preferencial en los enlaces internos de las cadenas peptídicas lejos de los extremos N y C terminal, se dividen en cuatro subgrupos en base al mecanismo catalítico: serín-, aspartil-, cisteín- y metalo- proteasas.

Serín- proteasas

Las serín-proteasas son enzimas en las cuales el mecanismo catalítico depende del hidroxilo de un residuo de serina que actúa sobre el enlace peptídico. La actividad de las peptidasas serínicas suele ser máxima a valores de pH alcalinos, no requiriendo en general activadores, aunque los iones calcio activan algunas pro-enzimas.

Aspartil-proteasas

Las aspartil-proteasas dependen de los residuos del ácido aspártico para su actividad catalítica, están ampliamente distribuidas en vertebrados, hongos, plantas, protozoos y retrovirus. Se caracterizan por presentar un pH óptimo en el rango ácido y por ser específicamente inhibidas por pepstatina A.

Cisteín-proteasas

Las cisteín-proteasas forman junto al sustrato un complejo covalente, el dador de protones en todas las peptidasas cisteínicas es un residuo de histidina y el nucleófilo es el grupo sulfidrilo de un residuo de cisteína, se pueden activar con tioles de bajo peso molecular como tioglicolato, ditiotreitól, 2-mercaptoetanol o cisteína.

Metalo-proteasas

Las metalo-proteasas se caracterizan por el requerimiento de un ion metálico divalente para su actividad, son el tipo más diverso de proteasas, al menos 30 familias han sido reconocidas. Todas ellas son inhibidas por agentes quelantes tales como el EDTA y EGTA.

Colagenasas

A parte de la clasificación de las proteasas que fue referida anteriormente, las proteasas pueden denominarse de acuerdo a la especificidad de sustrato que ellas presenten, así por ejemplo las enzimas que degradan queratina pueden ser denominadas queratinasas y las enzimas que degradan elastina elastasas. En tal sentido, Las colagenasas son las proteasas específicas que catalizan la degradación del colágeno nativo a péptidos de menor tamaño. En los mamíferos las colagenasas forman parte de una extensa familia denominada matriz metalo-proteinasas (MMPs), caracterizadas por la dependencia del zinc para su actividad catalítica, las MMPs forman parte del mecanismo que remodela, repara y mantiene el colágeno de la matriz extracelular en los organismos superiores.

Al igual que las colagenasas de mamífero las microbianas también son metalo-proteasas en su mayoría, por ejemplo, *Clostridium histolyticum* secreta enzimas colagenolíticas dependientes de Ca^{2+} y Zn^{2+} . En contraste con las colagenasas de mamíferos que degradan el colágeno en un solo sitio, las colagenasas microbianas atacan el colágeno en múltiples sitios de la triple hélice (Wyatt y col., 2009).

El colágeno está presente en muchas de las estructuras que se generan como desechos en la industria ganadera, una alternativa para la bio-conversión de estos desechos de colágeno podrían ser su utilización como materia prima de bajo costo y fácil adquisición, al ser incorporados en bio-procesos con microorganismos colagenolíticos, donde se incluya como sustratos de fermentación (fuente de carbono y nitrógeno) el desecho, para la producción por vía biotecnológica de metabolitos microbianos de mayor valor agregado, como por ejemplo las enzimas colagenolíticas e hidrolizados protéicos.

Aplicaciones de las proteasas

La gran diversidad de proteasas y la especificidad de su acción, atrae la atención mundial para la utilización en procesos industriales que ofrezcan tecnologías más limpias y amigables al medio ambiente, en tal sentido, las proteasas tienen una amplia gama de aplicaciones, siendo las más conocidas la elaboración de detergentes, donde las proteasas microbianas constituyen un ingrediente estándar en los productos de limpieza de uso común en hogares, oficinas, etc., hasta los reactivos utilizadas para la limpieza de lentes de contactos y prótesis dentales. En la industria alimentaria las proteasas se usan para varios propósitos, como la elaboración de quesos, preparación de hidrolizados de soya,

ablandamiento de carnes, etc. Algunas proteasas han sido aprovechadas como efectivos agentes terapéuticos en la industria farmacéutica, por ejemplo, las proteasas de *Aspergillus oryzae* administradas oralmente funcionan como ayuda digestiva para corregir ciertos síndromes de deficiencia de enzimas líticas.

Las proteasas no solo se emplean en las distintas industrias también en investigación son de uso indispensable, La acción selectiva sobre enlaces peptídicos es usado para dilucidar la relación estructura-función de las proteínas, en la síntesis de péptidos, y en la secuenciación de proteínas (Mala y Col. 1998).

Aplicaciones de las colagenasas

La utilidad de las colagenasas se basa en la especificidad de su acción sobre sustratos que contienen colágeno, en la industria de alimentos, estas enzimas colagenolíticas son empleadas para ablandar la carne (Takeuchi y col., 1992). Las colagenasas de bacterias son un tipo específico de proteasas que se utilizan como aditivo en detergentes para ropa, logrando una eficiente remoción de manchas en las diferentes fibras de tejido (Harrington, 1996). También han sido empleadas como reactivos experimentales en el trabajo de laboratorio en la preparación de células aisladas de pulmones de rata (Seglen, 1979).

Adicionalmente en medicina se usan las colagenasas en el tratamiento de lesiones cutáneas donde se ha propuesto la formulación de preparados enzimáticos para la cicatrización y desbridamiento efectivo de lesiones cutáneas tales como: quemaduras de segundo y tercer grado, úlceras de miembros inferiores, en pacientes con pie diabético,

heridas traumáticas con pérdida de tejido y preparación de lesiones para injertos cutáneos entre otras (Sank y col., 1989).

En el presente trabajo se propone el aislamiento de microorganismos colagenolíticos en suelos venezolanos, a fin de identificar potenciales fuentes de enzimas colagenolíticas, las cuales pueden ser incluidas a futuro en algunos procesos industriales.

ANTECEDENTES

En los primeros años se creía que la actividad colagenolítica estaba limitada a unas pocas especies, esto en parte se debía a que las investigaciones se centraban en microorganismos asociados a enfermedades específicas que implicaban la degradación del colágeno dentro de los tejidos humanos y cuya actividad enzimática se relacionaba a la patogenicidad del microorganismo.

El estudio de microorganismos colagenolíticos y colagenasas comenzó a finales del siglo pasado con el reconocimiento de la participación de los clostridios proteolíticos en la putrefacción de tejidos y el posterior aislamiento de una enzima extracelular de *Clostridium histolyticum* que fue capaz de digerir el colágeno de tendones (MacLennan y col., 1953).

Fueron MacLennan y col., quienes en 1953 aislaron 162 cepas bacterianas provenientes de heridas y úlceras de un servicio de bacteriología, en medios líquidos de peptona examinaron la presencia de enzimas proteolíticas y colagenolíticas mediante la degradación de fibras de tendón de Aquiles de conejo. Por mucho, encontraron que el microorganismo más activo, tanto en actividad proteolítica y colagenolítica, fue *Cl. Histolyticum*.

Por otra parte, el primer hongo con actividad colagenolítica fue reportado por Rippon en 1968, se trata de *Trichophyton schoenleinii* un hongo dermatofito. Los investigadores determinaron la presencia de enzimas colagenolíticas en el caldo de cultivo midiendo el

incremento del flujo del colágeno en solución (o disminución de su viscosidad), acompañado de un aumento de la cantidad de hidroxiprolina en el medio. Rippton en 1968 confirma que se trata de una enzima extracelular que tiene acción específica sobre el colágeno y la gelatina y que además requiere de iones divalentes como el calcio o magnesio para su activación.

Con el paso de los años comenzaron a aislarse para su estudio una gran variedad de microorganismos no patógenos, presentes en la naturaleza e involucrados activamente en procesos de degradación del colágeno nativo, dentro de este grupo destacan los streptomicetos los cuales eran conocidos hasta la fecha por su gran capacidad de producir enzimas extracelulares y metabolitos secundarios.

Chakraborty y col. en 1982 aislaron una cepa de *Streptomyces* de suelo a partir de medios suplementados con colágeno de tendón de Aquiles bovino, como única fuente de carbono y nitrógeno. En 1987 estos mismos autores, utilizan esta cepa capaz de crecer en colágeno, para la producción, purificación y caracterización de colagenasas. Con este objetivo, logran purificar una enzima colagenolítica de 75 kDa (cromatografía de exclusión molecular), cuya secuencia aminoacídica fue determinada, encontrándose ausencia de cisteína y tirosina en la macromolécula.

Luego del trabajo de Chakraborty y col., varios de los *Streptomyces* han sido estudiados (Tabla 2) y se ha caracterizado la actividad colagenolítica asociada a los procesos de degradación, sin embargo es importante resaltar, que en ninguno de los casos las colagenasas comparten las mismas características, esto quizás debido a que las cepas son

distintas, además de que *Streptomyces* se caracteriza por secretar un gran número de enzimas hidrolíticas muchas de las cuales son inducibles dependiendo del sustrato que se emplee (Peczynska-Croch y Modarski, 1988).

Tabla 2. Microorganismos con actividad colagenolítica

Microorganismo		Medio de cultivo	Masa Molecular (kDa)	pH		Temperatura (°C)		Autor
				Estabilidad	Optimo	Estabilidad	Optimo	
Bacterias	<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	Colágeno de piel de cerdo Levadura			6,8–7,3	4 – 60		Gibbons y MacDonalds 1960
	<i>Achromobacter iophagus</i>	Caseína Glucosa Peptona Soya Levadura		6,2 - 8			30 – 35	Welton y Woods 1993
	<i>Clostridium perfringens</i>	Peptona Soya levadura Hígado	120	4,5 – 9	7,2		42	Matsushita y col. 1994
	<i>Bacillus subtilis</i> FS-2	Levadura Gelatina Peptona	125	5 – 10	9		40 – 50	Nagano y col. 1999
	<i>Alicyclobacillus sendaiensis</i> NTAP-1	Dextrosa de papa	40	3 – 5,5	3,9		60	Tsuruoka y col. 2003
	α -proteobacteria NW4327	Peptona Levadura	116	4 – 6	5	20 – 40	30	Mukherjee y col. 2009
Hongos	<i>Arthrobotrys amerospora</i>	Proteasa Peptona		3 – 10	7	5 – 50		Schenck y col. 1980
	<i>Rhizoctonia solani</i>	Glucosa Colágeno Peptona Caseína	66	3 – 6,5	5	4 – 40	40	Hamdy 2008
Streptomycetes	<i>Streptomyces sp. 3B</i>		112	4,5 – 10,5	7,5	20 – 50	37	Petrova y col. 2006
	<i>Streptomyces sp. 3B</i>		95	4,5 – 10,5	7,5	20 – 50	37	Petrova y col. 2006
	<i>Streptomyces parvulus</i>			8 – 10	9	4 – 50		Sakuray y col. 2009
	<i>Streptomyces exfoliatus</i> CFS 1068	Glucosa Soya	14,5	4 – 10	7	30 – 80	70	Jain y Jain 2010

OBJETIVOS

Objetivo general

El presente trabajo tiene como objetivo aislar e identificar microorganismos capaces de crecer en colágeno y caracterizar parcialmente la actividad colagenolítica del caldo de cultivo asociada con el proceso de degradación.

Objetivos específicos

- Aislar del suelo microorganismos capaces de crecer en colágeno, a partir de medios de cultivo selectivos preparados con colágeno tipo I de cola de rata.
- Identificar molecularmente los microorganismos seleccionados capaces de crecer en colágeno.
- Evaluar mediante patrones electroforéticos la degradación del colágeno por los microorganismos identificados.
- Estimar la actividad enzimática de los caldos de excreción obtenidos en cultivo con microorganismos identificados.
- Estudiar el efecto de la temperatura y pH sobre la actividad enzimática de los caldos de excreción de los microorganismos identificados.
- Identificar las diferentes actividades enzimáticas de los caldos de fermentación mediante determinación de la actividad *in situ* en zimogramas de gelatina y colágeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sustrato de colágeno

El sustrato de colágeno utilizado fue del tipo I obtenido de los tendones de colas de rata, las cuales se recolectaron como desecho en algunas unidades de investigación en la fundación IDEA.

El colágeno se obtiene de las colas de rata según la metodología de Van Bockmeer y col. (1980) con ligeras modificaciones. La cola de rata se coloca en etanol al 70% durante 2h, luego se desprende la piel, se cortan segmentos de 3 cm aproximadamente y se incuban estos en etanol al 70% por 30 minutos en solución salina estéril. Se extraen los tendones, los cuales son lavados dos veces con solución salina, y se disuelven en una solución de ácido acético glacial diluido 1:1000. Por cada gramo de tendones se añaden 100 mL de la solución de ácido acético y se mantienen en agitación constante a 4°C, durante 48h. Finalmente esta solución se centrifuga a $25.000 \times g$ a 4°C por dos horas con el fin de descartar las impurezas, las cuales quedan en el sedimento.

Se almacena a -20°C para su posterior empleo en los medios de cultivo.

Medios de cultivo

Se utilizaron varios medios de cultivo para el aislamiento, selección y mantenimiento de los microorganismos. A continuación se describen las diferentes composiciones de cada uno de ellos:

- **Medio de almidón**

Es un medio sólido que contiene almidón de yuca como fuente de carbono, se utiliza para el aislamiento y el mantenimiento de los microorganismos. Para prepararlo se disuelven los componentes en agua destilada y se completa el volumen hasta 1L. Se agita fuertemente, luego se calienta suavemente y se lleva al punto de ebullición, siempre con agitación constante. Luego de autoclavar a 15 psi de presión, 121°C por 15 min. Se sirve en placas de Petri estériles y se conserva a 4°C, hasta su utilización.

Componente	g/L
Agar	20
Almidón de yuca	10
CaCO ₃	2
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1
NaCl	1
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,001
MnCl ₂ ·7H ₂ O	0,001
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,001

- **Medio de colágeno**

Es un medio que se prepara sólido o líquido suplementado con el colágeno de los tendones de la cola de rata. El medio sólido se usa para la selección de los microorganismos capaces de crecer en colágeno y el medio líquido se usa para obtener los caldos de excreción de los microorganismos durante su crecimiento. En la preparación se disuelven los componentes en 0,5 L de la solución de colágeno al 1%, se completa con agua destilada hasta un volumen final de 1L, se calienta lentamente y se lleva al punto de

ebullición siempre con agitación constante. Luego de autoclavar a 15 psi de presión, 121°C por 15 min y se almacena a 4°C hasta su eventual uso.

Componente	g/L
Agar	20
Colágeno	5
CaCO ₃	2
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	1
NaCl	1
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,001
MnCl ₂ .7H ₂ O	0,001
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,001

Aislamiento de los microorganismos

Para obtener los microorganismos capaces de crecer en colágeno se tomaron las muestras de suelo húmedo con abundante hojarasca. Por cada muestra de suelo colectada, 3g son diluidos en 100 mL de solución salina (0,9% NaCl), se agita la mezcla y se deja en reposo 15 min para que sedimente. Del sobrenadante se realizan tres diluciones (1:10, 1:100 y 1:1000) usando solución salina estéril en un volumen final de 10 mL. Una alícuota de 0,1 mL de cada dilución se siembra en placas de cultivo con el medio sólido de almidón. Las placas se incuban a 30°C y son monitoreadas a las 48, 72, y 96 h. Las colonias representativas son aisladas, repicándolas en nuevas placas con el medio de almidón y se preservan a 4°C para su futuro uso.

En medios sólidos de colágeno como única fuente de carbono se siembran los microorganismos obtenidos en el paso anterior, aquellas especies capaces de crecer en este medio son las seleccionadas como potenciales organismos colagenolíticos.

La morfología fue evidenciada microscópicamente empleando microscopio de luz a través de la observación de preparaciones en fresco de los microorganismos aislados. Así mismo, con lupa y cámara digital se realizó un registro de la morfología de las colonias y características resaltantes.

Mantenimiento de los microorganismos

Para el mantenimiento de los microorganismos se realizan resiembras periódicas sobre medio de almidón, siguiendo las técnicas habituales de microbiología. Las placas una vez inoculadas se incuban a 30°C durante 7 días con el fin de obtener un buen crecimiento y esporulación. Las placas bien esporuladas se conservan a 4°C.

Para el mantenimiento de los microorganismos durante tiempos prolongados, se sigue el método de Hopwood y col. (1985). Este método consiste en añadir 5 mL de agua estéril o medio mineral salino sin fuente de carbono a las placas esporuladas. Se rasgan las esporas de la superficie de la placa con la ayuda de un asa de siembra, y el volumen recuperado se hace pasar a través de un tubo con algodón estéril con el objeto de separar el micelio de las esporas. Finalmente, se toman alícuotas de 200 µL del filtrado y se centrifugan en tubos eppendorf estériles de 1,5 mL a 15.000 x *g* durante 15 min y se descarta el sobrenadante. Las esporas presentes en el sedimento se resuspenden en glicerol estéril al 20% y se almacenan a -20°C.

Identificación molecular de los microorganismos aislados

- **Extracción de ADN**

Cada microorganismo se cultiva en placas de Petri durante varios días, se raspa de la superficie y una muestra se coloca en tubos eppendorf de 1,5 mL, se agregan 400µL de buffer de lisis (Tris HCl 50 mM, pH 8, EDTA 150mM, 1% SDS y 50 mM de NaCl), se tritura con un lápiz de metal y se agita en hasta obtener una solución homogénea. La muestra se incuba a 65°C por 1h, y se añade un volumen de fenol:cloroformo (1:1), se agita y se centrifuga a temperatura ambiente durante 15 min. El sobrenadante se recoge y se le añade 1 Volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se centrifuga a 10.000 x g a temperatura ambiente por 15 min. La fase acuosa se trasfiere a otro tubo de 1,5 mL y dependiendo del volumen se le agrega 0,03 volúmenes de MgA_c 3M y 0,5 volúmenes de isopropanol, Se mezcla por inversión, y se incuba a 4°C por 30 min, posteriormente se centrifuga a 14.000 rpm por 15 min, se descarta el sobrenadante y el sedimento se lava con etanol al 70% y se deja secar en Speed Vac por 15 min, luego se resuspende en 100µL de agua destilada.

- **Amplificación por PCR**

Se amplifica con el método de reacción en cadena de la polimerasa una región específica del ADN genómico extraído, el fragmento amplificado es determinado por el tipo de microorganismo aislado ya sea hongo o bacteria.

- **Amplificación de los espaciadores transcribibles internos ITS para identificar hongos**

La mezcla de reacción en un volumen final de 25 µL contiene los siguientes componentes: 25 ng del ADN templado, buffer de PCR (Tris-HCl 10 mM, pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.001% de gelatina), una concentración de 0,2 µM de cada cebador universal (U1 y U4), una concentración de 0,2 µM de cada dNTP, y 2,5 U de Taq ADN polimerasa. El tubo con la mezcla se coloca en el termo-ciclador, después de una desnaturalización de 10 min a 94°C, se efectúan 35 ciclos de: 94°C por 1 min para la desnaturalización de las hebras, 1 min a 57°C para el alineamiento de los iniciadores, y 2 min a 72°C para la extensión. Al final de los 35 ciclos le sigue una incubación de 10 min a 72°C para la extensión final.

- **Amplificación del gen ADNr 16S para identificar bacterias**

La mezcla de reacción en un volumen final de 25 µL contiene los siguientes componentes: 25 ng del ADN templado, buffer de PCR (Tris-HCl 10 mM, pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.001% de gelatina), una concentración de 0,2 µM de cada cebador (strepB y strepF), una concentración de 0,2 µM de cada dNTP, y 2,5 U de Taq ADN polimerasa. El tubo con la mezcla se coloca en el termo-ciclador, después de una desnaturalización de 10 min a 94°C, se efectúan 35 ciclos de: 94°C por 1 min para la desnaturalización de las hebras, 1 min a 55°C para el alineamiento de los iniciadores, y 2 min a 72°C para la extensión. Al final de los 35 ciclos sigue una incubación de 10 min a 72°C para la extensión final.

- **Electroforesis en gel de agarosa**

Se prepara la agarosa al 2% pesando 1g y añadiendo buffer TBE (Tris-Base, ácido bórico, EDTA) hasta un volumen final de 50 mL. Se carga en el gel 5 µL del producto de PCR se realiza la electroforesis durante 25 min a 80V. Terminada la corrida se pasa el gel por solución de bromuro de etidio y luego de un lavado con agua destilada, se captura la imagen en la cámara Gel Doc™ XR exponiendo el gel a luz UV.

- **Preparación de ADN para la secuenciación**

Un volumen de 5µl de muestra del ADN amplificado y purificado es colocado en dos baterías de tubos. La primera batería conteniendo el iniciador sentido y la segunda el iniciador anti-sentido. En cada tubo 1 µl del cebador (3.2 pmol/ µl), 2 µl de Buffer de Secuenciación 5x, 2 µl de Big Dye Reaction Mix. Se colocan los tubos en el termo-ciclador se realizan 24 ciclos: 10 s a 96°C, 5 s a 58°C, 4 min a 60°C. Luego de la amplificación, se agrega a cada tubo 50 µl de etanol 100% y 2 µl de NaAc 3M para purificar los productos. Luego de dar un toque en el vortex y deja en reposo 15 min. Se centrifuga a máxima velocidad por 20 min y se retirará el sobrenadante para agregar 200 µl de etanol 70%, se centrifuga a máxima velocidad por 5 min, se retirar el sobrenadante y se seca en Speed-vac por 15 min. Tras resuspender en 20 µl de Formamida Hi-Di y dar un toque en vortex se colocan los tubos en termo-ciclador bajo las siguientes condiciones: 5 min a 95°C, 5 min a 0°C. En este paso ya las muestras estarán listas para ser secuenciadas.

- **Secuenciación**

La secuenciación se lleva a cabo en un secuenciador ABI PRISM 310, una vez obtenida, es corregida la secuencia en el programa BioEdit sequence alignment editor para compararlas con las secuencias contenidas en la base de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Seguimiento de la degradación de Colágeno tipo I

La degradación de las fibras de colágeno fue evidenciada de dos maneras: a nivel microscópico con la observación directa del daño a las fibras de tendón de cola de rata y a través de patrones electroforéticos de los diferentes caldos de cultivo, donde se observa la degradación de las proteínas.

- **Seguimiento de la degradación de las fibras de colágeno**

Segmentos de tendones de aproximadamente 1 cm, sin disolver en medio ácido fueron colocados directamente en micro-placas de 96 pozos con medio líquido (únicamente sales). La placa se incubó 37 °C y a 400 rpm. Cada 24 horas un segmento de tendón fue retirado para ser observado minuciosamente bajo el microscopio óptico, en busca de señales de deterioro: re-arreglo de las fibras dispersión de la estructura original. Fue incluida una fibra que permaneció en medio sin el microorganismo como fibra control a cada uno de los tiempos experimentales.

En este monitoreo también se llevó a cabo el seguimiento del crecimiento del microorganismo sobre las fibras de colágeno identificando estructuras tipo como: micelio y esporas en cada campo de observación.

- **Patrón electroforético de la degradación de colágeno**

Para observar los patrones de degradación del colágeno tipo I por los microorganismos aislados se realizaron electroforesis en gel poliacrilamida en condiciones disociantes, de los diferentes caldos de cultivo en los diferentes tiempos de crecimiento en medio con colágeno.

Los geles son preparados según el método de Laemmli (1970). La electroforesis se lleva a cabo en un sistema Protean II (Bio-Rad), siguiendo las indicaciones del fabricante. El gel de apilamiento se preparará al 5% y el gel de separación en gradiente de 10 a 12 %. Se incluyó SDS 5% en el gel y buffer de corrida y β -mercaptoetanol en el buffer de muestra. La corrida electroforética se llevó a cabo a temperatura ambiente y alrededor de 80 V para el gel de apilamiento y entre 100–110 V para el gel de separación. Las bandas presentes en los geles se evidencian mediante tinción con Coomassie blue y tinción con plata (Morrissey, 1981). Se utilizó como marcados molecular el BenchMark™ Protein Ladder.

Estudio de la actividad enzimática

Para el estudio de la actividad enzimática asociada a la degradación del colágeno por los microorganismos en estudio se realizaron técnicas de zimografía, donde se acopla a geles

de poliacrilamida sustratos específicos que luego son degradados en el punto de migración electroforética por las actividades enzimáticas presentes en los caldos de cultivo. Los zimogramas fueron de dos tipos de gelatina y de colágeno.

- **Zimogramas de gelatina**

La solución de gelatina de 1mg/mL se utiliza para co-polimerizar con geles de poliacrilamida en gradiente de 10-12%. Alícuotas del caldo de cultivo son sometidas a electroforesis en los geles a 100 V, en presencia de SDS y bajo condiciones no reductoras. Luego de la electroforesis, el gel se enjuaga a 4°C con suave agitación en Triton X-100 al 2,5% por 1 h. Se lava el gel con agua destilada y se incuba en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,5 conteniendo: NaCl 0,2 M; CaCl₂ 0,5 M y ZnCl₂ 1 M para la activación de las proteínas. El gel se tiñe con azul de Coomassie y se destiñe con metanol 10% y ácido acético 7%. Como marcador de peso molecular se utilizó BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder.

- **Zimogramas de Colágeno**

Se prepara una matriz de colágeno co-polimerizando: colágeno disuelto de las colas de rata 3mg/mL con agarosa al 2%. Para lograr esto, se calienta la agarosa hasta su estado líquido y se mezcla un volumen por cada dos volúmenes de colágeno en suspensión y se vierte la mezcla entre los vidrios de la cámara Protean II (Bio-Rad). Se deja a temperatura ambiente para que co-polimerice homogéneamente.

Las muestras se someten a una electroforesis en geles de poliacrilamida, luego se enjuaga a 4°C con suave agitación en Triton X-100 al 2,5% por 1h. Se realiza un lavado con agua

destilada y se coloca en una cámara húmeda la membrana de colágeno sobre el gel de electroforesis (gel con gel), posteriormente se incuba esta preparación impregnada con buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 0,2 M; CaCl_2 0,5 M y ZnCl_2 1 M por 16 - 18h a 37°C.

Caracterización de las actividades enzimáticas observadas

Para caracterizar las actividades enzimáticas observadas en los zimogramas se utilizó la técnica de zimografía con gelatina para evidenciar el efecto del pH sobre las actividades proteolíticas y el efecto de iones divalentes y agentes quelantes.

- **Efecto del pH**

Para el efecto de pH se emplearon distintas soluciones tampón y las secciones del zimograma con actividad enzimática control fueron incubadas durante 16-18horas a 37°C para luego revelar el efecto respectivo. Para los pH 3, 4 y 5 se utilizó tampón acetato de sodio 50mM, para pH 6 y 7 fosfato de sodio 50 mM , para pH 8 y 9 Tris-HCl 50 mM y para pH 10 y 11. Glicina 50 mM.

- **Efecto de iones divalentes y agentes quelantes**

Para el efecto de iones se incubaron igualmente las secciones del zimograma pero en esta oportunidad se empleó buffer Tris-HCl 50 mM que contenía para cada caso: Fe^{2+} 6 μM , Cu^{2+} 6 μM , Mg^{2+} 6 μM , Ca^{2+} 5mM, Na^+ 5 mM, K^+ 5 mM, EDTA 10 mM y EGTA 20mM. La incubación fue por 16-18h a 37°C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento y selección de microorganismos colagenolíticos

Un suelo característico contiene entre 10^9 y 10^{10} microorganismos por gramo, lo cual puede representar más de un millón de especies de alta diversidad genética (Clegg y col., 1998; Gans y col., 2005). Esta característica hace del suelo un reservorio ideal para el aislamiento de microorganismos y en este trabajo representa el punto de partida.

Para los primeros ensayos se tomaron muestras de suelo húmedo en una zona de abundante hojarasca en las instalaciones de la Fundación Instituto de Estudios Avanzados IDEA (Carretera Nacional Hoyo de la Puerta, Estado Miranda, Venezuela).

Las muestras de suelo fueron sembradas en las placas de cultivo de almidón de yuca donde crecieron diferentes especies. Tras un proceso constante de repique al menos seis de estos microorganismos fueron aislados con éxito, estos se distinguieron por su morfología y color de las colonias, en la figura 3 se presentan las fotos de cada uno de ellos.

Para seleccionar de los microorganismos anteriores aquellos con capacidad de crecer en colágeno como única fuente de carbono y nitrógeno, se sembraron nuevamente los aislados en medios compuestos de almidón-colágeno en distintas proporciones (25, 50, 75 y 100 %).

En la tabla 3 observamos que todos los microorganismos fueron capaces de crecer en medios suplementados con colágeno entre un 25 y 75%, sin embargo, solo dos de los

microorganismos crecieron en el medios que contenía colágeno como única fuente de carbono y nitrógeno, seleccionándolos de esta manera como organismos colagenolíticos.

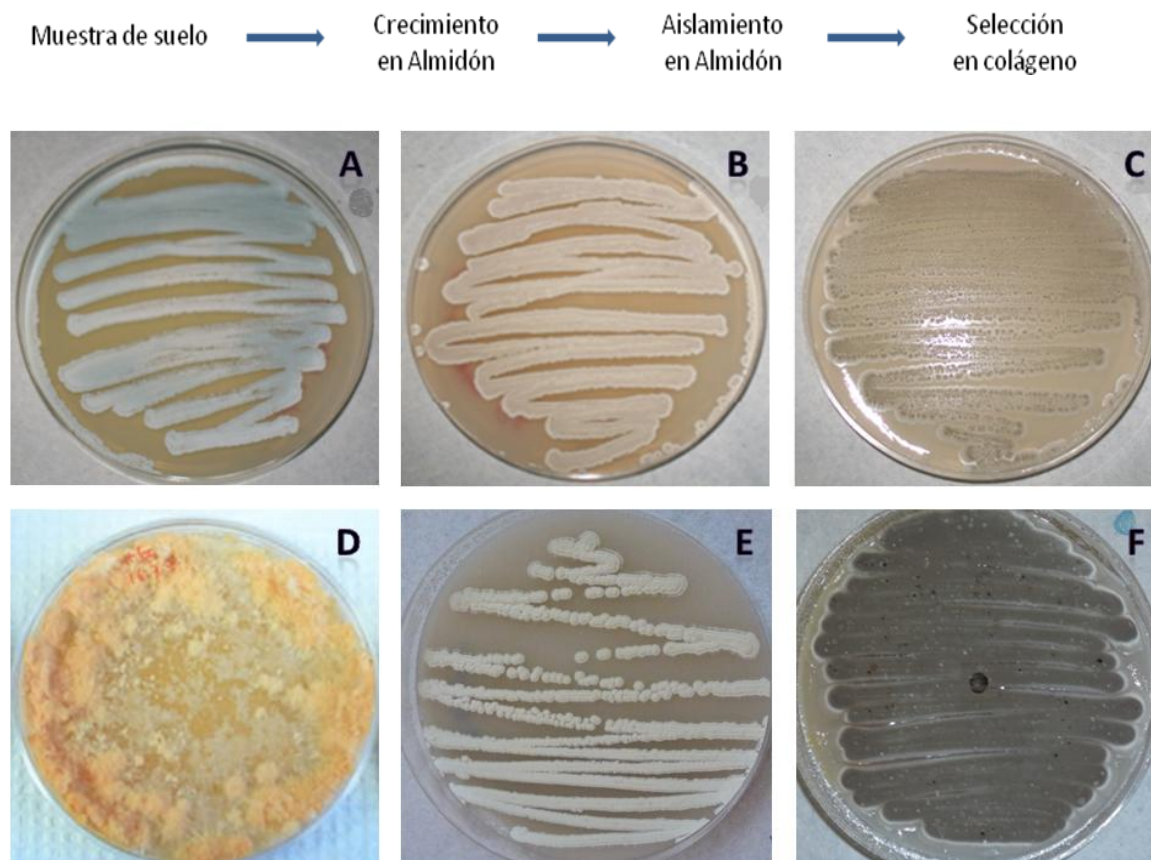


Figura 3. Imagen de placas de cultivo de almidón de yuca con los microorganismos aislados del suelo, (diferentes aislados A, B, C, D, E y F).

Tabla. 3. Crecimiento de los microorganismos aislados en medios diferenciales de almidón y colágeno (D y F microorganismos colagenolíticos). + crecimiento, - ausencia de crecimiento.

Microorganismo	Porcentaje de colágeno en el medio de cultivo (%)				
	0	25	50	75	100
A	+	+	+	+	-
B	+	+	+	+	-
C	+	+	+	+	-
D	+	+	+	+	+
E	+	+	+	+	-
F	+	+	+	+	+

El crecimiento y aislamiento de los microorganismos en el medio de cultivo fue posible ya que este contiene todas las sustancias necesarias que les permiten cubrir sus necesidades metabólicas: agua, fuente de energía y de carbono (almidón), nitrógeno y minerales. En los medios no se emplearon vitaminas o suplementos que limitaran el crecimiento de los microorganismos aislados para garantizar que el efecto fuera directo a la presencia de las fuentes de carbono y nitrógeno.

Se define una enzima inducible como la sintetizada por microorganismos en respuesta a la presencia de un inductor en el medio, el cual es usualmente el sustrato de la enzima o algún compuesto relacionado estructuralmente. Ya se ha demostrado en trabajos anteriores que las colagenasas en microorganismos como *Achromobacter isophagus* son inducibles por colágeno y por sus fragmentos desnaturalizados de alta masa molecular, la presencia de los enlaces peptídicos es indispensable para el efecto de inducción (Welton y Woods, 1972).

Al incluir colágeno como única fuente de carbono y nitrógeno en los medios de cultivo, los microorganismos deben adaptarse a un sustrato recalcitrante y no todos los aislados fueron capaces de hacerlo, solo dos de ellos lo lograron. Esto nos hace pensar en una capacidad colagenolítica de estos microorganismos en presencia de este sustrato, es decir, estos microorganismos posiblemente se ven inducidos a activar una maquinaria metabólica enzimática especializada para degradar el sustrato colagenoso en pequeños péptidos y aminoácidos que permiten el crecimiento celular. En tal sentido, Los microorganismos denominados D y F (Tabla 2) fueron los seleccionados como

microorganismos colagenolíticos para su identificación molecular y caracterización de las actividades enzimáticas asociadas.

Caracterización de los microorganismos colagenolíticos aislados

Microorganismo “D”

El primer microorganismo aislado con capacidad de crecer en colágeno (Fig. 3D y tabla 2 microorganismo D) desarrolló a las 48 horas de cultivo en placas, filamentos blancos que se extienden desde el punto de siembra hasta los bordes, a los 5 días, se observó una coloración naranja la cual se hace más intensa a los 7 días de cultivo (Figura 4).



Figura 4. Imagen de cultivo del microorganismo D, seleccionado como colagenolítico, séptimo día de crecimiento en medio con colágeno, detalle de la coloración naranja.

Observando bajo la lupa y el microscopio óptico, se distinguen para este primer microorganismo, filamentos que se unen y conforman un micelio en el sustrato y un micelio aéreo (Figura 5). En las hifas aéreas se encuentran pequeñas estructuras segmentadas, de las cuales se desprenden esporas de color naranja con mucha facilidad.

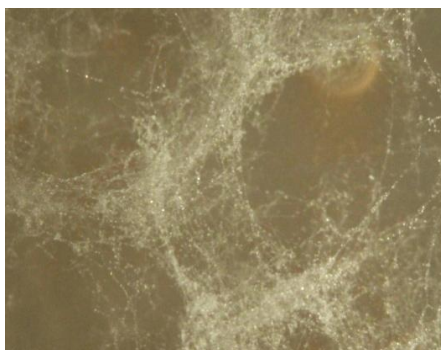


Figura 5. Imagen en lupa del microorganismo D, segundo día de crecimiento en medio con colágeno, donde se observa el detalle del micelio aéreo conformado por las hifas filamentosas.

Por el aspecto general de este microorganismo se presume que se trata de un hongo filamentoso "moho" (Pazouki, 2005).

A fin de determinar la identidad de este primer microorganismo en estudio (D) y bajo la sospecha de estar en presencia de un hongo filamentoso, se realizó la identificación molecular mediante secuenciación de los espaciadores transcribibles internos (ITS) del ADN ribosomal, metodología de elección para este tipo de microorganismos.

En los eucariotas, las regiones espaciadoras transcribibles internas (ITS) del ADN ribosomal son altamente variables en sus secuencias y tienen gran importancia para la distinción de especies de hongos que se encuentran separadas evolutivamente. El análisis de PCR utilizando los iniciadores ITS1 e ITS4 es ampliamente aceptado cuando se trata de identificar a los hongos (Martin y Rygiewicz, 2005), estos cebadores amplifican los fragmentos ITS1 e ITS2 que rodean la sub-unidad ribosomal 5,8S en los eucariotas (Figura. 6).

Empleando los cebadores ITS1 e ITS4 se realizó la PCR y el producto obtenido fue de 650 pares de bases (Figura 7), una segunda PCR se realizó para obtener por separado las hebras sencillas de ADN que amplifica cada cebador. Las muestras fueron inyectadas en el secuenciador capilar automático ABI PRISM 310 y tras editar en el programa BioEdit sequence alignment editor se obtuvo la secuencia de 622 nucleótidos.

Se realizó la comparación de la secuencia de ADN obtenida con las secuencias contenidas en la base de datos de NCBI. El mejor Alineamiento (100%) corresponde con un segmento de ADN de *Neurospora crassa*, el cual está contenido en la secuencia reportada del ARN ribosomal 18S, la región ITS 1, el gen ARN ribosomal 5.8S, la región ITS 2 y el gen del ARN ribosomal 26S (Figura.8)

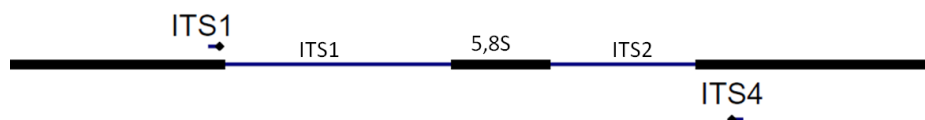


Figura 6. Esquema de las regiones ITS que separan al ADN que codifica para las sub-unidades ribosomales.

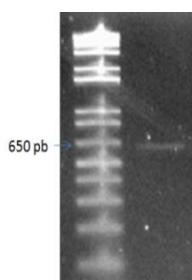


Figura 7. PCR de las regiones ITS conteniendo la sub-unidad ribosomal 5,8S. El producto obtenido es de 650 pb.

Query	1	GGTCATTTAGAGGAAGTAAAGTCGTAACAAGGCTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGAT	60
Sbjct	3616	GGTCATTTAGAGGAAGTAAAGTCGTAACAAGGCTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGAT	3675
Query	61	CATTACAGAGTTGCAAACTCCACAAACCATCGCGAATCTTACCCGTACGGTTGCCTCG	120
Sbjct	3676	CATTACAGAGTTGCAAACTCCACAAACCATCGCGAATCTTACCCGTACGGTTGCCTCG	3735
Query	121	GCGCTGGCGGTCCGAAAGGCCTTCGGGCCCTCCTGGATCCTAGGGTCTCCCGCTCGCGG	180
Sbjct	3736	GCGCTGGCGGTCCGAAAGGCCTTCGGGCCCTCCTGGATCCTCCTGGTCTCCCGCTCGCGG	3795
Query	181	GAGGCTGCCCCGCCGAGTGCCGAACTAAACTCTTGATATTTTATGTCTCTCTGAGTAAA	240
Sbjct	3796	GAGGCTGCCCCGCCGAGTGCCGAACTAAACTCTTGATATTTTATGTCTCTCTGAGTAAA	3855
Query	241	CTTTTAAATAAGTCAAACTTTCAACAACGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAC	300
Sbjct	3856	CTTTTAAATAAGTCAAACTTTCAACAACGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAC	3915
Query	301	GCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA	360
Sbjct	3916	GCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA	3975
Query	361	CGCACATTGCGCTCGCCAGTATTCTGGCGAGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCAT	420
Sbjct	3976	CGCACATTGCGCTCGCCAGTATTCTGGCGAGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCAT	4035
Query	421	CAAGCTCTGCTTGCCTTGGGGATCCGCGGCTGTCCGCGGTCCCTCAAATCAGTGGCGGG	480
Sbjct	4036	CAAGCTCTGCTTGCCTTGGGGATCCGCGGCTGTCCGCGGTCCCTCAAATCAGTGGCGGG	4095
Query	481	CTCGCTAGTCACACCGAGCGTAGTAACCTACATCGCTATGGTCGTGCGGCGGGTCTTG	540
Sbjct	4096	CTCGCTAGTCACACCGAGCGTAGTAACCTACATCGCTATGGTCGTGCGGCGGGTCTTG	4155
Query	541	CCGTAAAACCCCATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCT	600
Sbjct	4156	CCGTAAAACCCCATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCT	4215
Query	601	AAGCATATCAATAAGCGGAGGA	622
Sbjct	4216	AAGCATATCAATAAGCGGAGGA	4237

Figura 8. Alineación de la secuencia obtenida para el microorganismo en estudio con un fragmento de ADN correspondiente al hongo *Neurospora crasa*. Bases idénticas 622/622 (100%).

En efecto *Neurospora crassa* es un hongo filamentoso que en su estado asexual está compuesto de una región vegetativa y una región aérea. La región vegetativa, crece dentro de sustratos sólidos o líquidos y consiste de células filamentosas blancas que se denominan hifas. En la interface sustrato-aire se desarrolla la región esporulante que consiste de hifas aéreas cubiertas de esporas hidrofóbicas naranja denominadas macroconidios (Perkins y Turner, 1988). Estas características morfológicas particulares se corresponden con las del hongo que se ha aislado e identificado como *Neurospora crassa*.

Las especies de *Neurospora* están presentes principalmente en suelos de regiones húmedas tropicales, son capaces de aparecer en zonas devastadas por el fuego aprovechando el ambiente estéril y rico en nutrientes que proporcionan los tejidos vegetales muertos (Perkins y Turner, 1988; Jacobson y col, 2004). Se ha asociado a *Neurospora* con labores humanas, se conoce como el moho rojo del pan, tiene presencia cosmopolita en madera, industrias de contrachapado, en rastrojos quemados de caña de azúcar, soya y maní (Perkins y Davis, 2000).

Este hongo ya ha sido utilizado en estudios de laboratorio, la más famosa investigación que se llevó a cabo con *Neurospora crassa* la realizaron Beadle y Tatum en 1941, cuando delinearon el campo de la genética moderna demostrando claramente la relación entre genes y proteínas, formulando su hipótesis “Un gen una enzima”.

Por otro lado, otros autores han detectado en *Neurospora crassa* enzimas proteolíticas extracelulares neutras, alcalinas y ácidas, que requieren de la inducción por péptidos exógenos (Lindberg y col., 1982), sin embargo, hasta la fecha no hay reportes que

indiquen la actividad colagenolítica en el género *Neurospora*. Este sería el primer reporte en el cual se observa la capacidad de *Neurospora crassa* de degradar colágeno y aprovecharlo para su crecimiento.

Microorganismo “F”

El segundo microorganismo con capacidad de crecer en colágeno (Figura 3F y tabla 2 microorganismo F) se hace visible en la placa de cultivo en pequeñas colonias blancas a las 24 horas de haber sido sembrado, a las 48 horas se incrementa el tamaño de estas colonias y se observa un cambio de coloración a gris, ya a las 72 horas de cultivo, todas las colonias presentan un color gris y un olor a tierra puede ser detectado (Figura 9).



Figura 9. Imagen de crecimiento en placa con colágeno. Detalle de las colonias grises a las 72 horas de cultivo.

Con la ayuda de una lupa y bajo el microscopio óptico se observa que las colonias son de aspecto rugoso con una superficie polvosa (Figura 10).



Figura 10. Colonia de superficie rugosa y polvosa del microorganismo crecido en placas de colágeno.

La colonia observada (figura 10) está compuesta de células alargadas compactas entre sí, formando un micelio aéreo y un micelio en el sustrato. En el micelio aéreo se observaron cadenas de esporas esféricas con una pigmentación gris superficial, aquellas esporas que se habían desprendido eran las que daban el aspecto polvoso a la superficie de la colonia. Características estas que se acercan a las descritas para el género de *Streptomyces* (Dietz, 1986).

En el 2005 Taddei y col. identificaron 72 cepas de *Streptomyces* aisladas de suelos venezolanos, estas cepas tienen las mismas características morfológicas básicas del microorganismo que hemos aislado en medios de colágeno.

Streptomyces es un género muy particular que posee características morfológicas tanto de hongos como de bacterias, sin embargo, como procariota su identificación moderna se basa en la secuencia del 16S ARNr. Este método provee invaluable información genética y

ha sido utilizado para la identificación de nuevas especies aisladas de *Streptomyces* (Hassan y col., 2009).

El gen 16S ARN ribosomal se encuentra presente en todos los procariotas, sin embargo, es diferente entre los distintos microorganismos producto de las mutaciones que se van acumulando a lo largo del tiempo. Estas diferencias en las secuencias de nucleótidos reflejan la distancia evolutiva existente entre los distintos grupos y su estudio es ampliamente utilizado para la identificación y clasificación de las bacterias (Rodicio y Mendoza, 2004).

Usando como templado el ADN genómico extraído del microorganismo, se realizó la amplificación de un segmento del gen 16S ARNr utilizando los iniciadores StrpB y StrpF, el producto obtenido fue de 1000 pb aproximadamente (Figura 11), lo cual concuerda con los resultados de Hassan y col., en el 2009.

Tras purificar el producto anterior, se realizó otra PCR con los iniciadores StrpB y StrpF por separado para obtener las hebras de ADN sencillas, estas muestras se inyectaron en el secuenciador capilar automático ABI PRISM 310. Después de editar las secuencias en el programa BioEdit sequence alignment editor se pudo obtener el orden preciso de 632 nucleótidos.

Se comparó la secuencia obtenida con las secuencias almacenadas en el banco de genes de NCBI disponible en la web (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y se obtuvo una alineación perfecta con 14 fragmentos reportados del gen 16S ARNr pertenecientes a catorce cepas distintas de *Streptomyces* sp (Figura. 11).

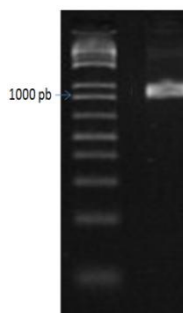


Figura 11. PCR del 16S ARNr, el producto esperado es de 1070 pb.

```

Query 1      GCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTG 60
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 316    GCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTG 375
Query 61     TAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCT 120
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 376    TAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCT 435
Query 121    AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG 180
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 436    AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG 495
Query 181    CGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGGTTGTGAAAGCCCAGGGCTTAACCCCGG 240
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 496    CGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGGTTGTGAAAGCCCAGGGCTTAACCCCGG 555
Query 241    GTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAG 300
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 556    GTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAG 615
Query 301    CGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGAT 360
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 616    CGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGAT 675
Query 361    ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCAC 420
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 676    ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCAC 735
Query 421    GCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAAC 480
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 736    GCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAAC 795
Query 481    GCATTAAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGG 540
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 796    GCATTAAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGG 855
Query 541    GGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCA 600
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 856    GGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCA 915
Query 601    AGGCTTGACATACACCGGAAAGCTTCAGAGAC 632
          |||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 916    AGGCTTGACATACACCGGAAAGCTTCAGAGAC 947

```

Figura 12 Alineación de la secuencia obtenida del microorganismo en estudio con un fragmento de la secuencia del gen ARNr 16S de la cepa *Streptomyces* sp. A300 Ydz-QZ. Bases idénticas 632/632 (100%)

Con este resultado se verifica que el género del microorganismo es *Streptomyces*, sin embargo no es posible identificar al nivel de especie, ya que las secuencias en la base de datos que se alinean pertenecen a especies de *Streptomyces* no identificadas y el fragmento obtenido no es lo suficientemente grande para distinguir diferencias marcadas entre las secuencias que son muy similares.

Para intentar llegar al nivel de especie se tendría que secuenciar el gen completo (16S ARNr) y comparar minuciosamente con las secuencias de otras especies. En este sentido, las bases de datos aun están incompletas para el estudio taxonómico ya que se estiman más de 3000 especies de *Streptomyces* cuyas secuencias no han sido reportadas, lo cual hace difícil la identificación de especies aisladas (Anderson y col., 2001). Esto indica que aun sigue siendo necesaria la combinación de técnicas fenotípicas, genotípicas y filogenéticas para la identificación de estos microorganismos.

En la revisión bibliográfica encontramos que los microorganismos del género *Streptomyces* son por lo general procariotas del suelo Gram-positivo y se distinguen por una marcada tendencia al crecimiento en micelio. En su ciclo de vida *Streptomyces* se caracteriza por: la presencia de dos tipos de micelio (aéreo y de sustrato), la alternancia entre las células vegetativas y esporas, y el desarrollo de autólisis de una sustancial parte de la población en un estado determinado del ciclo de vida (Dworkin, 2006).

Streptomyces es conocido por la gran variedad de antibióticos clínicamente útiles que producen, por lo cual ha recibido gran atención de los científicos (Manteca y col. 2005), además es considerado este género como un candidato importante para la producción de

proteínas heterólogas por tener un mecanismo eficiente para la secreción de proteínas (Anné y Van Mellaert, 1993).

La actividad proteolítica descrita para una amplia variedad de especies de *Streptomyces* se ha demostrado es de tipo extracelular. Es decir, enzimas de excreción que son altamente inducibles por sustratos específicos, de una alta tasa de producción, fáciles de recuperar en medios de cultivo, en tal sentido, para efectos del presente trabajo de investigación se decidió utilizar el aislado de *Streptomyces* sp. para un estudio más detallado de la actividad enzimática asociada a la degradación de colágeno tipo I.

Crecimiento de *Streptomyces* sp y degradación de colágeno Tipo I

El medio líquido suplementado con colágeno fue inoculado con la cepa de *Streptomyces* sp. En un inicio el medio es turbio debido a las sales y al colágeno disuelto en el, progresivamente se pierde la turbidez, a las 24 horas se observan agregados blancos de micelios los cuales se tornan grises a las 36 horas del cultivo como resultado de la esporulación. Durante el crecimiento la excreción de productos fue monitoreada y las variaciones de pH en el caldo de cultivo fueron detectadas (tabla 3).

Tabla 4. Variación de pH en los caldos de cultivo de *Streptomyces* sp.

Horas de crecimiento	0	6	12	18	24	30	36
pH del medio	7	7	7,5	8	8	8,5	8,5

Este cambio de pH hacia un pH alcalino puede ser el resultado de la descomposición de las proteínas y aminoácidos derivados produciendo amoníaco. También puede que el microorganismo esté sintetizando y excretando al medio de cultivo de compuestos. En cualquiera de los casos esta variación nos indica una evolución del cultivo donde las condiciones iniciales han cambiado como consecuencia del crecimiento del microorganismo.

A fin de reunir más evidencias al respecto de la degradación de las fibras de colágeno tipo I por *Streptomyces* sp. se realizó un monitoreo de la degradación de tendones y un seguimiento del crecimiento del microorganismo a los diferentes tiempos de cultivo a través del microscopio de luz.

En la figura 13, se muestra en la primera imagen un tendón de cola de rata sin inocular en donde se observan las microfibrillas de colágeno íntegras dispuestas en paralelo y algunas estructuras cristalinas constituyendo el tendón (figura 13A). En las siguientes imágenes a medida que transcurre el tiempo de cultivo, se visualizan cambios en la disposición de las microfibrillas de colágeno. Conforme se desarrolla el microorganismo, el micelio se vuelve más denso y va degradando las fibras a más profundidad evidenciándose daño en la estructura (Figura. 13B y C). Al quinto día de crecimiento algunas regiones del tendón se observan deterioradas y las fibras separadas (Figura 13D y E). La degradación continua hasta observarse un claro deterioro de las fibras al final del tiempo de cultivo, donde el micelio pareciera rodear las estructuras cristalinas que constituyen el tendón y ya no se evidencian estructuras completas de microfibrillas de colágeno (Figura 13F).

Por otra parte, se fue evidenciando el crecimiento del *Streptomyces* sp sobre la fibra de colágeno (Figura 14), a las 72 horas de haber sido inoculado el medio, el microorganismo invade la fibra comenzando su crecimiento en la superficie del tendón (Figura 14A). En otras aéreas se puede observar la formación del micelio característico de *Streptomyces* (Figura 14B) e inclusive la aparición de hifas segmentadas (Figura 14C).

Otros investigadores estudiando la degradación del cabello humano por *Hendersonula toruloidea*, también encontraron un aumento de pH en el medio de cultivo a medida que el microorganismo se desarrollaba caracterizado por el aumento de proteínas, péptidos y aminoácidos en los caldos de cultivo. Evans y Hose, 1975 atribuyen este resultado a la utilización del cabello como una fuente de nutrientes, ellos lograron ver y medir bajo el microscopio óptico la efectiva degradación del cabello humano (sustrato fibroso de queratina) por parte de *H. toruloidea*.

En 1978 Lecroisey y Keil lograron observar también la degradación del colágeno esta vez no directamente con los microorganismos (*Clostridium histolyticum* y *Achromobacter iophagus*) si no con sus enzimas proteolíticas secretadas. Ellos trabajaron con piel de ternero y seguían la degradación del colágeno por parte de las enzimas colagenolíticas bajo el microscopio electrónico demostrando así que la degradación de los sustratos por parte de los microorganismos implica la acción de proteasas específicas.

En resumen el crecimiento de *Streptomyces* sp., la basificación del los caldos de cultivo y la degradación de los tendones de colágeno tipo I se presentan como evidencia de que hay un posible proceso colagenolítico en desarrollo en estos medios de cultivo.

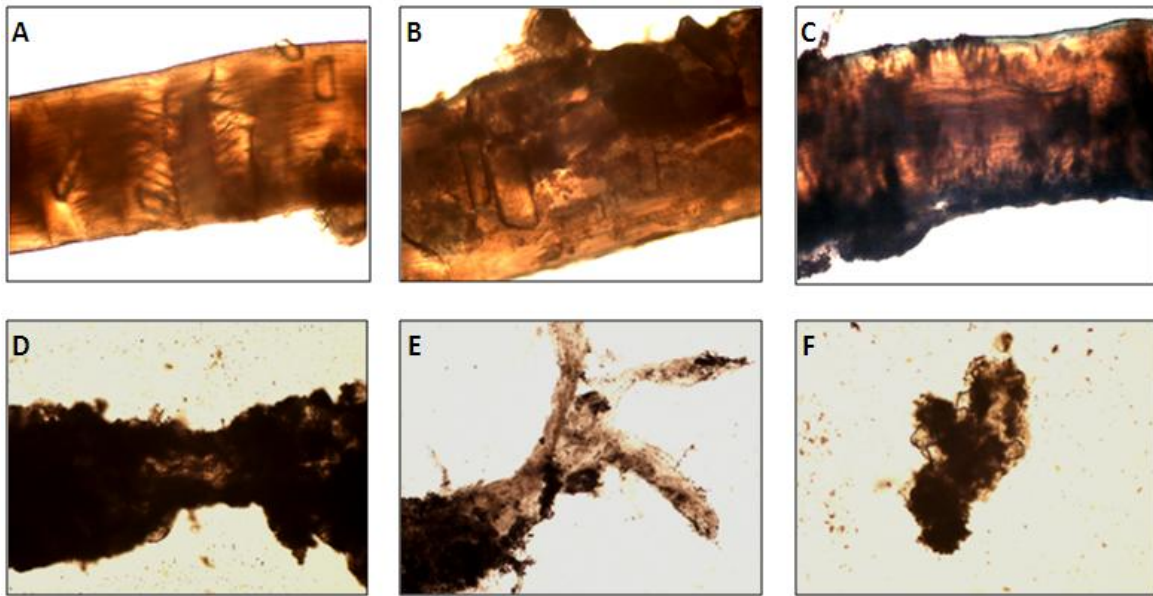


Figura 13.- Imágenes a microscopio de luz de fibras de colágeno (tendones de cola de rata) en diferentes tiempos de cultivo con *Streptomyces* sp. **A)** tiempo 0, **B)** 24 horas, **C)** 48 horas **D)** 96 horas, **E)** cinco días, **F)** siete días de cultivo.

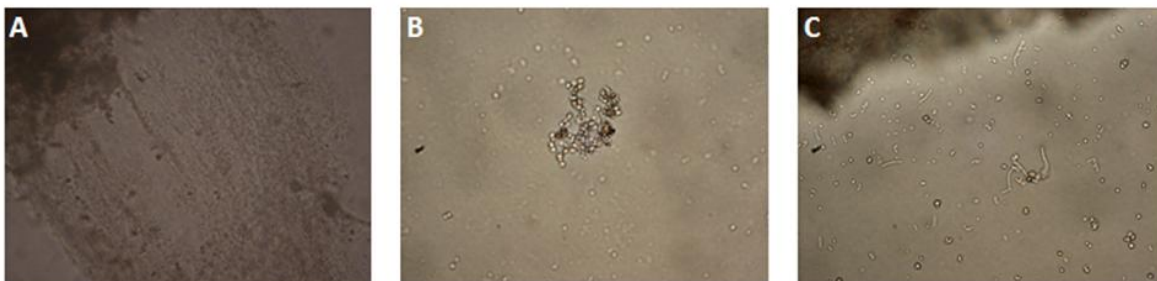


Figura 14. Imágenes a Microscopio de luz del crecimiento de *Streptomyces* sp. En medios líquidos con fibras completas de colágeno a las 72 horas de cultivo .**A)** crecimiento en la superficie de la fibra de colágeno (400x), **B)** desarrollo del micelio (600X), **C)** cadenas segmentadas del microorganismo (600X).

Caracterización de la degradación de colágeno tipo I por *Streptomyces* sp

Con la evidencia del deterioro de la fibra de colágeno en los ensayos de microscopia, se pensó en caracterizar la degradación del colágeno tipo I por *Streptomyces* sp comprobando a través de electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE), de los caldos de cultivo a diferentes tiempos, patrones de degradación específicos para este tipo de sustrato.

En la figura 15 se pueden observar los resultados. Al tiempo inicial del experimento se observa el patrón electroforético esperado para el colágeno tipo I, donde se evidencian dos bandas cercanas de masa molecular aproximada 100 kDa, estas bandas corresponden a las cadenas α_1 y α_2 del colágeno, la banda superior muestra una intensidad mayor debido a que la molécula original de tropo-colágeno contiene dos cadenas α_1 por cada cadena α_2 existente (Figura 15, Tiempo 0), también se puede apreciar una banda superior de masa molecular estimada de 200 kDa denominada cadena β , la cual corresponde a entrecruzamientos de dos de las cadenas α . Este patrón electroforético del colágeno ha sido observado anteriormente por otros autores que utilizaron diferentes fuentes, por ejemplo, desechos de cuero bovino Zhang y col. en el 2005 y regiones anatómicas del calamar gigante Torres y col. en el 2008. En cuanto a la degradación de colágeno en los diferentes tiempos de cultivo con *Streptomyces* sp, en la figura 15 se observa, en el patrón de bandas de los diferentes caldos de cultivo un cambio, a medida que transcurre el tiempo de cultivo, a las 24 horas, se observa una disminución de las bandas de alto peso molecular (200 y 100 kDa) y aparición de bandas de menor peso molecular (menores a 80

kDa), esto posiblemente producto de la degradación de las primeras. Más aun, a 30 y 32 horas de cultivo no es posible observar ninguna banda proteica, lo que puede deberse a la degradación del colágeno en aminoácidos y péptidos de muy bajo peso molecular que no pueden ser evidenciados en los geles de poliacrilamida. En este experimento se incluye como control el medio sin inocular que permaneció bajo las mismas condiciones de cultivo hasta las 36 horas (T36), se observa para esta muestra (Figura 15) un patrón de bandas proteicas similar a la condición control (Tiempo 0), con lo que concluimos que la degradación observada es producto de la acción directa del microorganismo sobre el sustrato y no de las condiciones del ensayo.

A las 32 horas de cultivo aun cuando no se visualiza ninguna banda de proteína en los geles de poliacrilamida, se sospecha de la presencia de una elevada actividad enzimática, en tal sentido y con la finalidad de observar el perfil electroforético de las proteínas de excreción, la muestra de 32 horas fue concentrada 10 veces (Figura 15, 32h, 10X). De esta manera se observó en el gel algunas de las proteínas secretadas al medio por *Streptomyces* sp., más concretamente dos bandas de alto peso molecular de aproximadamente más de 200 kDa, una banda de aproximadamente 180 kDa y otra de 45 kDa. Por otra parte se visualizan algunas otras bandas de bajo peso molecular que coinciden en su mayoría con el perfil de degradación del colágeno tipo I observado anteriormente.

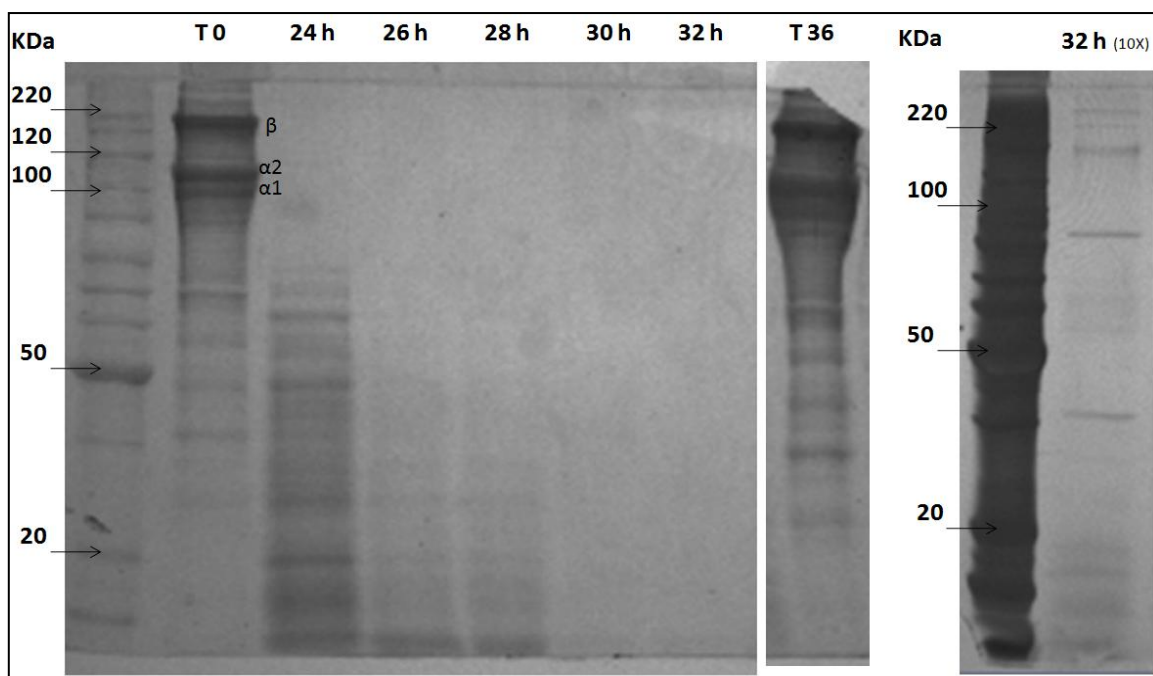


Figura 15. Patrón electroforético de la degradación de colágeno en medios de cultivo de *Streptomyces* sp. (SDS-PAGE 10-12%).

Estas metodologías electroforéticas han resultado de gran utilidad en este estudio para visualizar la degradación del colágeno y comenzar el estudio de las actividades enzimáticas asociadas a la degradación del sustrato colagenoso. En trabajos anteriores se han empleado perfiles electroforéticos para el estudio de la actividad colagenolítica de enzimas purificadas sobre sustratos específicos e incluso para evidenciar inhibición de las actividades enzimáticas (Song y col., 2006, Selent y col., 2007). Sin embargo, con este trabajo de investigación en *Streptomyces*.sp pareciera que esta metodología puede ser de utilidad en el estudio de la degradación en caldos de cultivo, punto este importante ya que en la mayoría de los procesos industriales la actividad del caldo de cultivo, sin purificar, reviste mayor importancia.

Caracterización de la actividad enzimática de *Streptomyces* sp. en medios de cultivo con colágeno tipo I

A fin de estudiar la actividad proteolítica relacionada con la degradación de colágeno por *Streptomyces* sp, se realizaron zimogramas de gelatina con los caldos de cultivo a diferentes tiempos. Los zimogramas permiten evidenciar la actividad proteolítica *in situ*, ya que se incluye en la matriz del gel gelatina como sustrato proteico que puede ser degradado por las enzimas proteolíticas que fueron secretadas al medio de cultivo por el microorganismo.

En la figura 16 podemos observar a las 24 horas de cultivo la presencia de dos actividades proteolíticas de alta masa molecular, aproximadamente 180 y 80 kDa, y sucesivamente a partir de las 26 horas de cultivo se observan otras bandas de actividad proteolítica de 60, 50 y 18 kDa aproximadamente. La intensidad de las cinco actividades es máxima a las 32 horas y están presentes al menos hasta las 36 horas de cultivo. A las 72 horas las bandas de actividades de mayor masa molecular pierden su intensidad mientras que las proteasas de masa molecular inferior siguen manteniendo su actividad.

Con el zimograma de gelatina se ha descrito una actividad secuencial de varias enzimas proteolíticas, esto se debe probablemente a la inducción secuencial que ocasiona el sustrato a medida que es degradado, en un principio son necesarias las enzimas que degraden la estructura completa del colágeno (triple hélice), con una posterior degradación de las cadenas α sencillas dando origen a los péptidos de menor tamaño que pueden inducir la excreción de otras enzimas proteolíticas. En este punto, lo que se puede

concluir es que la acción en conjunto de estas proteasas lleva a una degradación total del colágeno, sin embargo, aun se tiene poca evidencia para la descripción de un mecanismo bioquímico de degradación.

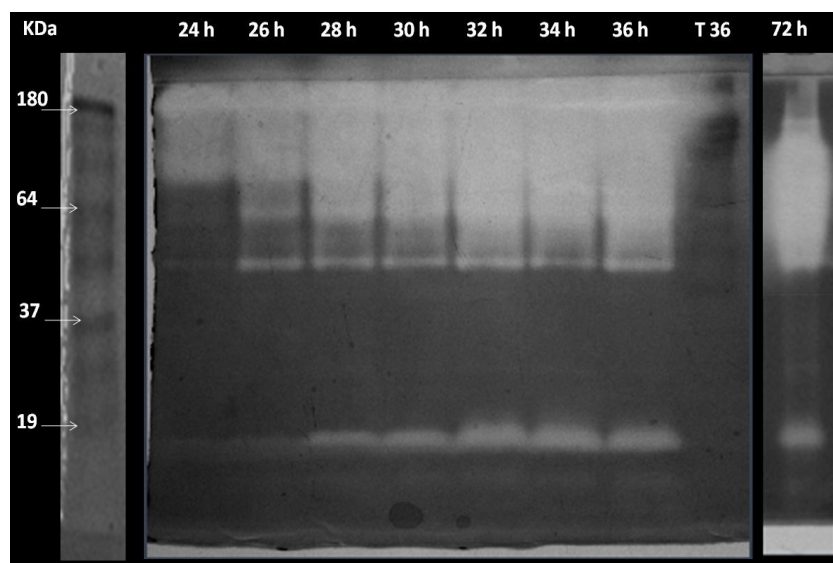


Figura 16. Zimograma de gelatina de los caldos de cultivo de *Streptomyces* sp en medios con colágeno a diferentes tiempos de cultivo (SDS-PAGE10-12%).

Pensando en un proceso secuencial podemos relacionar estos resultados de actividad proteolítica con la degradación del sustrato de colágeno (Figura 16). Las enzimas que están presentes a las 24 horas de cultivo probablemente son las principales responsables de la degradación de las proteínas de alta masa molecular observadas para el colágeno sin degradar. Por otro lado, para las 24, 26, y 28 horas donde se encuentran en los caldos péptidos pequeños, se observan otras actividades proteolíticas en el zimograma de gelatina de 60, 50 y 18 kDa aproximadamente, estas últimas probablemente han sido inducidas por algunos productos de la degradación del colágeno. Por último, a las 72 horas cuando todo el colágeno ha sido degradado las enzimas de alta masa molecular pierden

actividad, en este punto quizás estas enzimas podrían estar siendo degradadas por las proteasas de menor masa molecular las cuales mantienen su actividad constante. Este es un modelo secuencial de lo que podría estar ocurriendo en este proceso de degradación del colágeno por *Streptomyces* sp, sin embargo, serian necesarios ensayos mucho más detallados de inducción enzimática para determinar un mecanismo de acción.

Al respecto de la inducción de actividades enzimáticas, estos resultados nos llevan a pensar que posiblemente estas proteasas son de tipo colagenolítico, es decir degradan preferentemente las moléculas de colágeno y sus derivados. Trabajos anteriores sobre sustratos fibrosos similares al colágeno como fibrina, elastina y queratina abordan diferentes metodologías para determinar la especificidad de las enzimas proteolíticas observadas. Por ejemplo incubando directamente la enzima con el sustrato nativo se puede estimar por microscopia el porcentaje de fibra degradado Lecroisey y Keil, 1978. También se puede incubar la enzima con el colágeno soluble y medir de distintas maneras la actividad colagenolítica: por la disminución de viscosidad de la solución de colágeno, el incremento de residuos de hidroxiprolina (Seifter y col., 1959), aumento de aminoácidos en el medio (Adamcic y Clark, 1970). Los métodos anteriores son empleados preferentemente cuando se trata de enzimas purificadas. En el caso de caldo de cultivo, se hace más complicado el uso de estas técnicas y la estandarización de una metodología para determinar actividad colagenolítica total, en tal sentido y refiriéndonos a la bibliografía reportada se emplearon zimogramas de colágeno para estimar la actividad colagenolítica de los caldos de *Streptomyces* sp. (Kabadjova y col., 1996).

En el caso de queratinasas o actividades proteolíticas que degradan queratina, algunos trabajos de Bernal y col 2003, 2006, incluyen zimografías acoplando a los geles de electroforesis el sustrato específico, en este caso en particular queratina de plumas, y de esta manera identificar actividades proteolíticas con capacidad queratinolítica.

Basándonos en algunas de estas metodologías, se realizaron métodos para crear matrices de gel donde se pudiera acoplar como sustrato el colágeno, y de esta manera a través de la técnica de zimogramas evidenciar si las actividades proteolíticas observadas en zimogramas con gelatina (Figura 16) son actividades colagenolíticas.

En la figura 17 A, se puede observar las actividades colagenolíticas presentes en los caldos de cultivo de *Streptomyces* sp con colágeno tipo I. En el zimograma de colágeno se observan dos áreas de actividad principales que coinciden con las actividades proteolíticas en gelatina, una región de alta masa molecular (180-64 kDa aproximadamente) y otra de baja masa molecular (18 kDa aproximadamente). Aun cuando, la nitidez de la imagen del zimograma de colágeno es pobre se evidenciaron dos regiones de actividad colagenolítica.

A fin de optimizar el estudio de ambas regiones colagenolíticas y visualizar mejor las bandas de actividad de la figura 17A se estandarizaron técnicas de zimografía con diferente porcentaje de geles, cantidad de enzima y tiempos de incubación. En la Figura 17B, se ve la estandarización para la técnica donde se observa mayor nitidez en las imágenes y de donde se seleccionó una actividad de alto peso molecular (180 kDa) y otra de bajo peso molecular (18 kDa) para llevar a cabo la caracterización de las actividades colagenolíticas de *Streptomyces* sp.

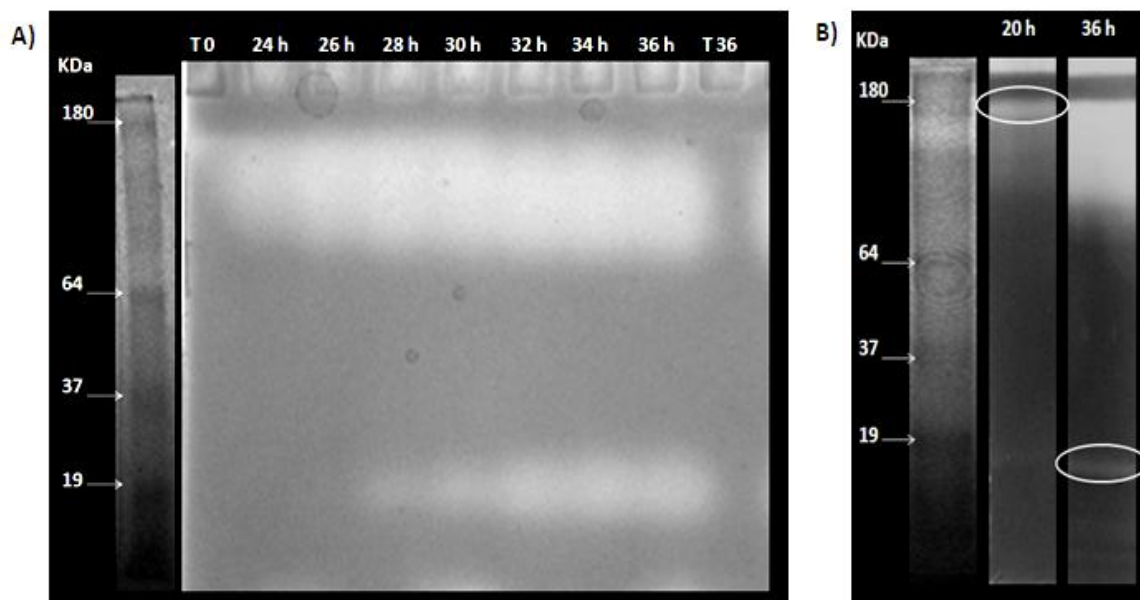


Figura 17. A) Zimograma de colágeno de los caldos de cultivo de *Streptomyces* sp a diferentes tiempos en medios con colágeno tipo I. T0 y T36 son los controles sin inocular. **B)** Optimización de la técnica de zimografía para las dos regiones de actividad. En círculo, collagenasas a caracterizar una de alto peso molecular (180 kDa) y otra de bajo peso molecular (18kDa).

Caracterización de la actividad colágenolíticas de *Streptomyces* sp.

Las enzimas colagenolíticas como vimos en la introducción de este trabajo, pueden ser empleadas en una gran variedad de procesos, sin embargo, esto dependerá de las condiciones bajo las cuales conserven su actividad, de los medios en donde conserven estabilidad y de los requerimientos de cofactores que puedan tener. La caracterización no solo permitirá distinguir el tipo de actividad proteolítica, también ayudará a establecer cuáles son las condiciones optimas en las que trabaja la enzima y en cuales procesos podría ser empleada.

Para la caracterización de las enzimas colagenolíticas de *Streptomyces* sp. se decidió trabajar con las dos regiones de actividad observadas en los ensayos de zimografía.

Seleccionando dos actividades claramente definidas una de alto peso molecular de aproximadamente 180 kDa y otra de bajo peso molecular aproximadamente 18kDa (Figura 17B).

El efecto del pH

Un factor vital para el funcionamiento de las enzimas es el pH, se debe mantener controlado los procesos industriales para garantizar la eficiencia de las enzimas empleadas.

Las regiones de actividad colagenolítica seleccionadas de los zimogramas (180 y 18 kDa aproximadamente) fueron incubadas a diferentes pH, en la figura 18 se muestra los resultados.

En la figura 18A se observa el efecto de pH para la enzima de alto peso molecular (180 kDa) de *Streptomyces* sp. El rango de actividad va desde pH 5 hasta pH 9, sin embargo es en el rango de pH 7 y 8 donde se da la mayor actividad proteolítica. Con este resultado podemos concluir que efectivamente esta actividad proteolítica es una colágenas de actividad óptima alcalina.

La figura 18B, por otra parte, nos muestra el efecto de pH en los zimogramas correspondientes a la colagenasa de menor masa molecular (18 kDa). Se observa que a pH 3 no hay actividad, esta aparece levemente a pH 4 y su intensidad va incrementando con cada unidad de pH, alcanzando su mayor actividad a pH 8 y 9 y luego disminuye progresivamente en los pH 10 y 11. A diferencia de la banda superior (180 kDa) esta

proteína tiene un rango de actividad más amplio, y su óptimo esta desplazado hacia los pH básicos.

Estos resultados no difieren mucho de los reportados por otros autores que caracterizaron parcialmente las enzimas colagenolíticas de *Streptomyces*.

En su mayoría los pH óptimos de acción de las colagenasas reportadas se aproximan a pH neutros tal es el caso de Petrova y col., en el 2006 que reportaron un par de colagenasas de la cepa de *Streptomyces* 3B, una de 116 y otra de 97 kDa, ambas enzimas mostraron actividad óptima a pH 7,5. Y adicionalmente los trabajos de Jain y Jain 2009 que caracterizan una enzima colagenolítica de *Streptomyces exfoliatus* de 14,5 kDa y encontraron que su actividad era máxima a pH 7.

Adicionalmente, aunque hay pocos reportes de colagenasas alcalinas Sukarai y col., en el 2009 purificaron una enzima colagenolítica de *Streptomyces parvulus*, de 53 kDa y estimaron que su actividad optima era a pH 9.

Efecto de Iones y agentes quelantes

Los iones pueden ser indispensables para llevar a cabo la actividad enzimática, algunas enzimas necesitan de estos cofactores para su activación. Por otro lado, sustancias como el EDTA y el EGTA se caracterizan por formar complejos con iones metálicos divalentes ocasionando una pérdida de actividad que está directamente relacionada con la falta de iones en el medio.

En la figura 19A se observa el efecto de los iones para la enzima de alto peso molecular (180 kDa) de *Streptomyces* sp. En el control (c) sin agregar ningún tipo de ion a la solución de incubación se logra apreciar una actividad colagenolítica basal, esta actividad se mantiene cuando se añaden por separado los distintos iones (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+) a excepción del ion calcio Ca^{2+} donde se aprecia un leve incremento de la actividad. Por otro lado los zimogramas incubados con EDTA y EGTA no presentaron actividad. Con estos resultados presumimos que esta actividad colagenolítica se trata posiblemente de una metalo proteasa, dependiente de iones de Ca^{2+} .

Otros autores encontraron estas mismas características en las enzimas colagenolíticas tal es el caso de los trabajos de Chakraborty y col. en 1987 que utilizando tendón de Aquiles bovino aisló una cepa denominada *Streptomyces* sp. A8, logrando purificar una enzima, en este caso, una colagenasa de 75 kDa cuya actividad incrementa en presencia de Ca^{2+} y Mn^{2+} y es inhibida por los quelantes de iones EDTA y EGTA, características que determinan a la enzima como metalo-proteasa. En otro estudio con la especie *Streptomyces exfoliatus* se detectó una enzima colagenolítica de 14,5 kDa que perdía la actividad en presencia de EDTA y EGTA.

En los zimogramas correspondientes a la proteasa de menor masa molecular (18 kDa) (Figura 19B), la actividad es constante independientemente del ion que se añada a la solución activadora (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , K^+), esta actividad no es inhibida cuando en el medio están presentes los quelantes de iones EDTA y EGTA. Con este resultado podemos concluir que esta actividad colagenolítica posiblemente es de otro tipo diferente

a las metalo-proteasas descritas para *Streptomyces* sp. Sería necesario un estudio con otros inhibidores de proteasas para determinar el tipo de proteasa presente en este caso.

Como se discutió anteriormente, muchos microorganismos son capaces de producir enzimas proteolíticas, de naturaleza colagenolítica, lo que hace interesante el estudio del género *Streptomyces* sp. es la diversidad de las proteasas extracelulares y la naturaleza de las mismas, con este estudio es evidente que no hay un patrón definido que caracterice las colagenasas de este género, que bien pueden ser metalo-proteasas alcalinas o proteasas de otra naturaleza.

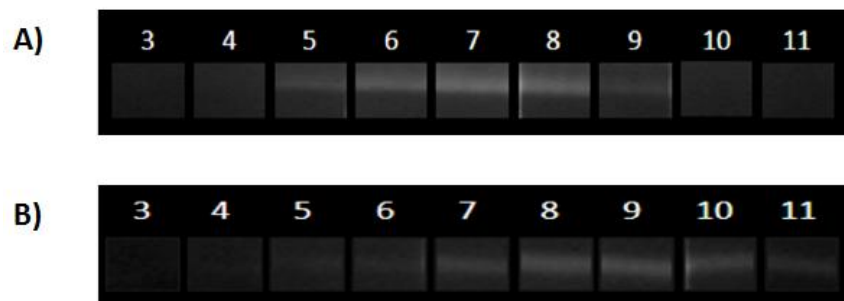


Figura 18.-Efecto de pH sobre la actividad colagenolítica de *Streptomyces* sp. Zimogramas estandarizados. A) Región de alto peso molecular. B) región de bajo peso molecular. Los numeros

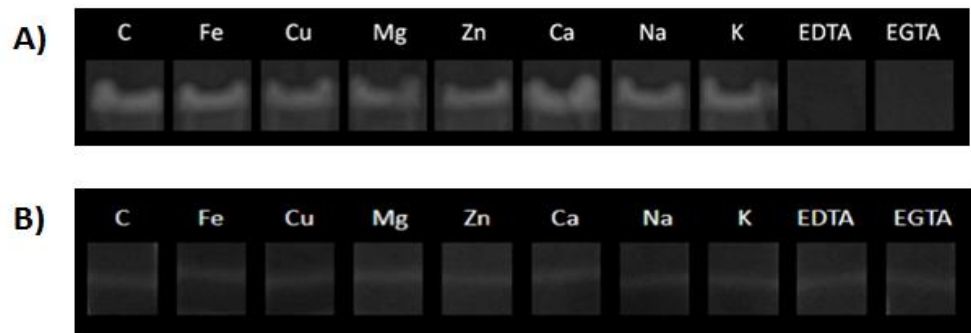


Figura 19. Efecto de iones y agentes quelantes sobre la actividad colagenolítica de *Streptomyces* sp. Zimogramas estandarizados. A) Colagenasa de alto peso molecular. B) colagenasa de bajo peso molecular.

CONCLUSIONES

- Fueron aislados del suelo venezolano dos microorganismos con capacidad de crecer en medios suplementados con colágeno, lo que los hace posible fuente de enzimas colagenolíticas. La identificación molecular reveló la identidad de los microorganismos aislados como *Neurospora crasa*, hongo y *Streptomyces* sp.
- La degradación del colágeno tipo I de fibras completas de tendón de cola de rata, el patrón electroforético de la degradación de colágeno y la alcalinización del medio evidenciaron la presencia de una actividad colagenolítica asociada a los medios de cultivo con *Streptomyces* sp.
- Los ensayos de zimografía con gelatina y colágeno fueron herramientas importantes para identificar actividad proteolítica y colagenolítica en los caldos de excreción de *Streptomyces* sp. De igual manera, fue la metodología utilizada para caracterizar en este caldo de excreción dos actividades colagenolíticas, una metalo-proteasa neutra dependientes de Ca^{2+} de aproximadamente 180kDa y una colagenasa alcalina de 18 kDa aproximadamente.
- El microorganismo colagenolítico estudiado (*Streptomyces* sp.) y las enzimas colagenolíticas asociadas a este proceso de degradación resultan fuente promisorio de colagenasas microbianas para la industria farmacéutica y de alimentos.

RECOMENDACIONES

- Con este trabajo fueron aislados dos microorganismos que constituyen una nueva fuente microbiana de enzimas colagenolíticas, en tal sentido, una de las recomendaciones es continuar los estudios de caracterización en *Streptomyces* sp. Y explorar la actividad enzimática asociada a *Neurospora crassa*.
- Secuenciar otras regiones del gen que codifica para la sub unidad ribosomal 16S de *Streptomyces* sp. y así obtener una secuencia nucleotídica más extensa que pueda ser comparable en las bases de datos y poder identificar molecularmente al microorganismo al nivel de especie.

BIBLIOGRAFÍA

- Adamcicm y Clarkd S. 1970.** Collagenolytic activity of pigmented pseudomonads. *Canadian journal of microbiology*.16: 709-71 2.
- Anderson A y Wellington E. 2001.** The taxonomy of Streptomyces and related genera. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 51:797-814.
- Awad H, El-Shahed K y El-Nakkadi A. 2009.** Isolation, screening and identification of newly isolated soil Streptomyces (Streptomyces sp. nrc-35) for β -lactamase inhibitor production. *World applied sciences journal* 7: 637-646.
- Beadle J y Tatum. 1941.** Experimental control of development and differentiations. *The american naturalist*.107-122.
- Bernal C, Vidal L, Valdivieso E, Coello N. 2003.** Keratinolytic activity of Kocuria rosea. *World journal of microbiology and biotechnology*. 19: 255-261.
- Bernal C, Cairó J y Coello N. 2006.** Purification of a novel keratinase from Kocuria rosea. *Enzyme and microbial technology*. 38:49-5
- Chakraborty R y Chandra A. 1987.** Purification and characterization of a streptomycete collagenase. *Journal of applied bacteriology*. 331-337.
- Clegg C, Ritz K, y Griffith B. 1998.** Broad-scale analysis of soil microbial community DNA from upland grasslands. *Antonie Leeuwenhoek*. 73: 9-14.
- Dietz, A. 1986.** Structure and taxonomy of Streptomyces. *The bacteria*. 9: 1–25.
- Dworkin, M. 2006.** The prokaryotes, third edition, a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology and biochemistry. *Prokaryotic life cycles*. 140-166.
- Evans E, Hose H. 1975.** In vitro degradation of human hair by Hendersonula toruloidea. *Sabouraudia*. 13:323-8.
- Gans J, Wolinsky M y Dunbar J. 2005.** Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* 309: 1387-1390.
- Gelse K y Signer T. 2003.** Collagen structure, function, and biosynthesis. *Advance drug delivery rreviews*: 1531-1546.
- Gibbons R y MacDonald J. 1961.** Degradation of collagenous substrates by Bacteroides melaninogenicus. *Journal of bacteriology*. 8: 614–621.
- Hamdy H. 2008.** Extracellular collagenase from Rhizoctonia solani: production, purification and characterization. *Indian journal of biotechnology*. 7: 333-339.

Hare P, Burden S y Woods D. 1983. Characterization of extracellular alkaline proteases and collagenase induction in *Vibrio alginolyticus*. *Journal of general microbiology*. 129: 1141-1 147.

Harrington D. 1996. Bacterial collagenases and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease. *Infection and Immunity*. 1885-1891.

Hopwood D. 1985. Genetic Manipulation of *Streptomyces*. *A Laboratory manual norwich John Innes Foundation*. 6: 67-71.

Jacobson D y Boesl C. 2004. New findings of *Neurospora* in Europe and comparisons of diversity in temperate climates on continental scales. *Fungal Genetics Newsletter*. 51-58.

Jain R y Jain 2010. Production and partial characterization of collagenase of *Streptomyces exfoliatus* CFS 1068 using poultry feather. *Indian Journal of Experimental Biology*. 48:174-8.

Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*: 680-685.

Lecroisey A y Keyl B. 1979. Differences in the degradation of native collagen by two microbial collagenases. *Biochemistry journal*. 179: 53-58.

Lindberg R. 1982. Extracellular acid proteases from *Neurospora crassa*. *Journal of bacteriology*. 150:1103-1108.

MacLennan J, Mandl I y Howes E. 1953. Bacterial digestion of collagen. *The journal of clinical investigation*: 1317–1322.

Mala, B y Aparna, M. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*. 597–635.

Manteca A, Fernandez M y Sanchez J. 2005. A death round affecting a young compartmentalized mycelium precedes aerial mycelium dismantling in confluent surface cultures of *Streptomyces antibioticus*. *Microbiology*. 151: 3689-3697.

Martin K y Rygiewicz P. 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC microbiology*. 5-28.

Matsushita O, Yoshihara K, Katayama S, Minami J, y Okabe A. 1994. Purification and characterization of a *Clostridium perfringens* 120-kilodalton collagenase and nucleotide sequence of the corresponding gene. *Journal of Bacteriology*. 176:149–156.

Morrissey J. 1981. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytic Biochemistry*. 307-310.

- Mukherjee J, Webster N y Llewellyn L. 2009.** Purification and characterization of a collagenolytic enzyme from a pathogen of the great barrier reef sponge. *Rhopaloeides odorabile. plos one journal* 4: 71-77.
- Nagano H y To A. 1999.** Purification of collagenase and specificity of its related enzyme from *Bacillus subtilis* FS-2. *Bioscience biotechnology biochemistry*. 63: 181-18
- Pazouki M y Panda T. 2000.** Understanding the morphology of fungi. *Bioprocess and Biosystems Engineerin*. 22: 127-143.
- Peczynska-Czoch y Mordarski W. 1988.** Actinomycete enzymes. *Actinomycetes in Biotechnolgy*. 246-250.
- Perkins D y Turner B. 1988.** *Neurospora* from natural populations: toward the population biology of a haploid eukaryote. *Experimental mycology*. 12: 91–131
- Perkins D. y Davis R. 2000.** Guest commentary. evidence for safety of *Neurospora* species for academic and commercial uses. *Applied and enviromental microbiology*. 60: 5107-5109.
- Pérez R. 1978.** Pathology of collagen degradation. a review. *Journal of pathology*: 508-566.
- Petrova D, Derekova A y Vlahov S. 2006.** Purification and properties of individual collagenases from *Streptomyces* sp. strain 3B. *Folia Microbiology*. 51: 93-98.
- Rippon, J. 1968.** Extracellular collagenase from *Trichophyton schoenleinii*. *Journal Bacteriology*: 43-46.
- Rodicio M y Mendoza M. 2004.** Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16s: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 22: 238-245.
- Sakurai Y. 2009.** Purification and characterization of a major collagenase from *Streptomyces parvulus*. *Bioscience biotechnology biochemical*. 73:21-28.
- Sank A, Chi M, Shima T, Reich R y Martin G. 1989.** Increased calcium levels alter cellular and molecular events in wound healing. *Surgery*, 1141–1148.
- Schenck S. 1980.** Collagenase production by nematode-trapping fungi. *Applied and environmental microbiology*. 567-570.
- Seglen, P. 1979.** Preparation of isolated rat liver cells. *Methodology of Cell*. 29–83.
- Seifter s, Gallop P, Klein L y Meilman E. 1959.** Studies on collagen. *journal of biological chemistry*. 234:285-293.

Selent J 2007. Selective Inhibition of the collagenase activity of cathepsin K. *The journal of biological chemistry*. 282:16492–16501.

Song F, Wisithphrom K, Zhou, y Windsor L. 2006. Matrix metalloproteinase dependent and independent collagen degradation. *Frontiers in bioscience*. 11: 3100 -3120.

Suzuki Y, Tsujimotoa Y, Matsuia H y Watanabe. 2006. Decomposition of extremely hard-to-degrade animal proteins by thermophilic bacteria. *Journal of bioscience and bioengineering*, 73-81.

Taddei, A y Rodríguez M. 2006. Isolation and identification of *Streptomyces spp.* from venezuelan soils: morphological and biochemical studies. I. *Microbiological research* 161: 222—231.

Takeuchi H, Shibano Y, Morihara K y Fukushima J. 1992 Structural gene and complete amino acid sequence of *Vibrio alginolyticus* collagenase. *Biochemistry Journal*. 703–708.

Torres A y Pacheco A. 2008. Caracterización parcial del colágeno extraído a partir del manto, aleta y tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). *Ciencia y tecnología alimentaria*. 6:101-108

Tsuruoka N y Nakayama T. 2003. Collagenolytic serine-carboxyl proteinase from *Alicyclobacillus sendaiensis* strain ntap-1: purification, characterization, gene cloning, and heterologous expression. *Applied and environmental Microbiology*. 162–169.

Van Bockmeer. 1980. Collagen sources. *Science Amply*. 69: 1182-1191.

Welton R y Woods D. 1973. Halotolerant collagenolytic activity of *Achromobacter iophagus*. *Journal Genetic Microbiology*: 191-196

Wyatt K, Bourne J y Torzilli P. 2009. Deformation-dependent enzyme mechanokinetic cleavage of type i collagen. *Journal Biomechemistry*. 131: 151-160.

Zhang Z, Li G y Shi B. 2005. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysates derived from bovine limed split wastes. *Journal of the society of leather technologists and chemists*. 19: 23-28.