



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Caracterización parcial de una proteasa alcalina a partir de hongos filamentosos implicados en el deterioro de documentos históricos.**

Prohibida la reproducción  
parcial o total de este  
documento sin previa  
autorización del autor

**Carlos Alberto Cruz Ramírez**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias  
Posgrado Interfacultades Microbiología  
Bogotá, Colombia  
2011



# **Caracterización parcial de una proteasa alcalina a partir de hongos filamentosos implicados en el deterioro de documentos históricos.**

**Carlos Alberto Cruz Ramírez**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Microbiología**

Director:

**José Fernando Mikán Venegas, M.Sc., Ph.D.**

Docente Tiempo Completo

Facultad de Medicina, Universidad Militar Nueva Granada

Codirectora:

**Sonia Amparo Ospina Sánchez, M.Sc., Ph.D.**

Profesora Asociada

Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias  
Posgrado Interfacultades Microbiología  
Bogotá, Colombia  
2011



*Dedico este trabajo a mis padres Carlos Alberto y Graciela, a mi hermano Fredy Mauricio, a mi sobrino Brayan Stev y a mi novia Diana Carolina, pues ellos son los pilares de mi vida y me han brindando la virtud necesaria para alcanzar cada logro y soportar cada derrota. Su esfuerzo incesante ha moldeado cada uno de mis pensamientos, y su amor desinteresado ha otorgado a mis actos una razón.*



## **Agradecimientos**

Agradezco el apoyo económico, técnico y logístico brindado por la Alcaldía Mayor de Bogotá – Dirección Archivo de Bogotá, a sus directivas: Francisco Osuna Currea (Director), Margoth Guerrero (Subdirectora) y Miryam Loaiza (Coordinadora), y al grupo de profesionales del laboratorio de física, química y biología: Natalia Charry, Liliana Mejía, Sonia Angélica Zambrano, Luz Stella Villaba y Dario Rodríguez, por su amistad y acompañamiento permanente en este trabajo de investigación.

Agradezco la gestión administrativa y técnica desarrollada por el Centro Internacional de Física (CIF), a su director Dr. Eduardo Posada, personal científico, y administrativo, en el marco del convenio interinstitucional de cooperación por ciencia, tecnología e innovación No. 2215100-513-2009, celebrado entre la Secretaría General de la Alcaldía Mayor de Bogotá-Dirección Archivo de Bogotá - y el Centro Internacional de Física (CIF).

Agradezco a las directivas de la Facultad de Medicina de la Universidad Militar Nueva Granada, y especialmente al personal científico y técnico del Laboratorio de Investigaciones: Martha Lucia Torres, Claudia Bernal, Dr. Fadzil Zakaria, Constanza Carretero, Tatiana Montes, Luz Begonia, Pilar Perez e Ibeth, por haber facilitado el desarrollo de esta tesis en sus instalaciones, con sus equipos, y bajo su supervisión y apoyo incondicional.

Agradezco al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, a su director y al personal científico, técnico y asistencial relacionado con este trabajo, especialmente a la laboratorista Yolanda Pardo y al estudiante de doctorado John Flórez por su acompañamiento y apoyo constante.

Agradezco al Posgrado en Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia en cabeza de la Dra. Martha Raquel Fontanilla, a sus docentes, a mis compañeros de clase,

y en especial a la asistente Socorro Prieto por su carisma, gentileza, eficiencia, y amistad. Igualmente. Agradezco a Raquel Noguera, asistente de la Dirección Doctorado en Biotecnología ofertado por la Universidad Nacional de Colombia, por su apoyo logístico y su amistad.

Finalmente, agradezco inmensamente la confianza y el apoyo que la Dra. Sonia Amparo Ospina Sánchez, codirectora de esta tesis, ha tenido para con el trabajo, como conmigo. Gracias por abrirme las puertas Profesora. Y al Dr. José Fernando Mikán Venegas, director de esta tesis, no me resta más que decirle que los agradecimientos se quedan cortos. Me siento orgulloso de que mi camino se haya cruzado con el suyo. Trabajo con uno de los mejores, y en consecuencia me esfuerzo por ser cada vez mejor. Gracias José.

## Resumen

Se ha buscado y seleccionado sistemáticamente una proteasa alcalina que pudiese ser usada en la eliminación “limpia” de proteínas residuales sobre soportes documentales con valor de patrimonio histórico de forma eficiente y económica. Se logró purificar y caracterizar parcialmente una proteasa alcalina extracelular producida por el hongo filamentoso *Eladia saccula* en medios líquidos con extracto de carne como única fuente de nitrógeno. El extracto crudo fue fraccionado con sulfato de amonio (p/v: 85%, 65% y 35%), recuperando mayoritariamente la enzima en la fracción del 35% (p/v). La proteasa alcalina fue purificada hasta la homogeneidad mediante cromatografía FPLC empleando una resina DEAE-sefarosa. Se evaluó la pureza de la enzima mediante SDS-PAGE y revelado con plata. Se evidenció una banda de aproximadamente 30kDa correspondiente a la proteasa alcalina de interés. La enzima presentó un pH óptimo de reacción de 8.3 (rango de 5.0 – 10.0), con una temperatura óptima de reacción de 60°C (rango de 30°C – 70°C), y sin reducción evidente de la actividad proteolítica por efecto de la adición de EDTA 5mM en las reacciones.

**Palabras clave: Biodeterioro, Hongo filamentoso, Proteasa.**

## **Abstract**

Studies on an alkaline protease as an efficient, environmental friendly and relatively economical remover of residual proteins for historical valuable documents were performed and was selected for this work. It was purified and partially characterized from filamentous fungi *E. saccula* in liquid medias, supplemented with meat extract as a sole nitrogen source. The raw extract was fractionated with ammonium sulphate (w/v: 85%, 65% y 35%), and the enzyme was recovered mostly in the 35% (w/v) fraction. The alkaline protease was purified using Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) equipment with DEAE.Sepharose as a resin. The purity of the enzyme was assessed through SDS-PAGE and silver staining. A band of approximately 30kDa, corresponding to the enzyme of interest, was revealed. The alkaline protease present at an optimum pH and temperature of 8.3 and 60°C respectively, without evident loss of activity when EDTA (5mM) was incorporated in the reactions.

**Keywords: Biodeterioration, Filamentous fungi, Protease.**

# Contenido

<b>RESUMEN</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>XV</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. MARCO CONCEPTUAL</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Biodeterioro</b>	<b>3</b>
1.1.1 Definición y generalidades	3
1.1.2 Microbiología asociada al proceso	6
<b>1.2 Proteasas</b>	<b>9</b>
1.2.1 Generalidades	9
1.2.2 Aplicaciones	133
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Objetivo general</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b>	<b>16</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>17</b>
<b>4. METODOLOGÍA</b>	<b>18</b>
<b>4.1 Corroboración de la actividad proteolítica de hongos filamentosos promisorios tanto en placa como en medio líquido</b>	<b>18</b>
4.1.1 Selección de hongos proteolíticos promisorios sobre medios de cultivo sólidos	18
4.1.2 Selección de hongos proteolíticos promisorios sobre medios de cultivo líquidos	19
<b>4.2 Revisión de perfiles isoenzimáticos para proteasas alcalinas de hongos filamentosos promisorios</b>	<b>22</b>
4.2.1 Proceso preparatorio IEF	22
4.2.2 Determinación del punto isoelectrico de las proteínas	23

4.2.3	Zimogramas	24
<b>4.3</b>	<b>Proceso de purificación enzimática</b>	<b>25</b>
4.3.1	Precipitación de proteínas a partir del extracto crudo mediante fraccionamiento con sulfato de amonio	25
4.3.2	Cromatografía de intercambio aniónico en columna	26
<b>4.4</b>	<b>Proceso de caracterización enzimática</b>	<b>27</b>
4.4.1	Electroforesis desnaturante reductiva en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	27
4.4.2	Isoelectroénfoque analítico en geles de poliacrilamida	28
4.4.3	Efecto del pH en la actividad de la enzima purificada	28
4.4.4	Efecto de la temperatura en la actividad de la enzima purificada.	29
4.4.5	Efecto de un quelante de iones divalentes sobre la actividad enzimática.	29
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>30</b>
5.1	Selección de hongos proteolíticos promisorios sobre medios de cultivo sólidos	30
5.2	Selección de hongos proteolíticos promisorios sobre medios de cultivo líquidos	32
5.3	Revisión de perfiles isoenzimáticos para proteasas alcalinas de hongos filamentosos promisorios	33
5.4	Proceso de purificación enzimática	42
5.5	Proceso de caracterización enzimática	45
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>49</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>62</b>
7.1	Conclusiones	62
7.2	Recomendaciones	65
<b>ANEXOS</b>	<b>67</b>	
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>89</b>	

# Lista de figuras

	PÁG.
<b>Figura 1-1:</b> Micrografía SEM de un área de decoloración celulolítica, revelando la presencia de hifas de <i>Chaetomium globosum</i> sobre la estructura de los documentos (Tomado de Szczepanowska y Cavaliere, 2000).	7
<b>Figura 1-2:</b> Distribución de la venta mundial de enzimas para el año 2006. [Tomado originalmente de Rao y colaboradores (1998), y actualizado por Shankar y colaboradores (2011)].	10
<b>Figura 1-3:</b> Efecto del proceso de “biolimpieza” y “biorestauración” obtenido mediante la aplicación de <i>Pseudomonas stutzeri</i> cepa A29 y la enzima <i>Protease</i> sobre la pintura Conversione di S. Efisio e battaglia, (Siglo XIV) en Pisa Camposanto Monumentale, (Italia) (Tomado de Ranalli <i>et al.</i> , 2005).	14
<b>Figura 4-1:</b> Determinación de halos de hidrólisis sobre agar Caseinato de Calcio al 3%(p/v). (A) diámetro de la cepa + halo de hidrolisis; (B) diámetro de la cepa (Tomado por Carlos Cruz, 2009) (Pedroza <i>et al.</i> , 2001).	19
<b>Figura 4-2:</b> Determinación de actividad proteolítica sobre azocaseína soluble (Tomado por Carlos Cruz, 2009).	21
<b>Figura 5-1:</b> Actividad proteolítica en función del crecimiento microbiano para los 32 morfotipos que presentaron tanto viabilidad como actividad enzimática positiva (halo de hidrolisis evidente).	31
<b>Figura 5-2:</b> Zimograma mediante inmersión en azocaseína para el extracto crudo del morfotipo 23D ( <i>Penicillium</i> ).	35
<b>Figura 5-3:</b> Zimograma mediante inmersión en azocaseína para los extractos crudos de los morfotipos: <b>(12D)</b> <i>Stachybotrys</i> sp.; <b>(22D)</b> , <b>(73D)</b> y <b>(64D)</b> <i>Penicillium</i> spp.; <b>(8D)</b> <i>Chaetomium</i> ; <b>(21D)</b> <i>E. saccula</i> .	37
<b>Figura 5-4:</b> Zimograma mediante <i>overgel</i> con gelatina al 0.1% (p/v) para los extractos crudos de los morfotipos 29D y 66D: <i>Penicillium</i> spp.	38

<b>Figura 5-5:</b> Zimograma mediante <i>overgel</i> de Albumina de Suero Bovino BSA al 0.1%(p/v) para el extracto crudo del morfotipo 21D ( <i>E. saccula</i> ), proveniente de cultivos líquidos sucesivos sometidos a presión selectiva continuada.	.....40
<b>Figura 5-6:</b> Zimograma mediante <i>overgel</i> de Albumina de Suero Bovino BSA al 0.1%(p/v) para el extracto crudo de los morfotipos 8D ( <i>Chaetomiun</i> ), y 12D ( <i>Stachybotrys</i> ), proveniente de cultivos líquidos sucesivos sometidos a presión selectiva continuada.	.....41
<b>Figura 5-7:</b> Cromatograma obtenido para la fracción de proteínas del 35% (fracción proteolítica positiva) correspondiente al morfotipo 21D <i>E. saccula</i> . Resina de intercambio aniónico: DEAE-Sefarosa de rápido flujo.	.....44
<b>Figura 5-8:</b> SDS-PAGE revelada con plata para las muestras del proceso de purificación con actividad proteolítica evidente.	.....45
<b>Figura 5-9:</b> Efecto del pH (5.0-10.0), temperatura (30°C-70°C), y EDTA (5mM) sobre la actividad enzimática de la proteasa purificada en azocaseína soluble.	.....47

# Lista de tablas

	PÁG.
<b>Tabla 1-1:</b> Aditivos utilizados en la fabricación del papel (Tomado de Kay Teschke y Paul Demers: <a href="http://www.mtas.es/insht/EncOIT/pdf/tomo3/72.pdf">http://www.mtas.es/insht/EncOIT/pdf/tomo3/72.pdf</a> ).	4
<b>Tabla 1-2:</b> Géneros de hongos involucrados en el biodeterioro de papel industrial, sus metabolitos y efectos (Tomado de Gallo, 1985).	8
<b>Tabla 1-3:</b> Clasificación de las proteasas respecto de su sitio de acción a lo largo de la cadena polipeptídica según el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (Tomado de Rao <i>et al.</i> , 1998).	11
<b>Tabla 4-1:</b> Condiciones de corrido empleadas para la separación de isoformas proteolíticas en geles de poliacrilamida (Tomado de Mikán, 2001).	23
<b>Tabla 5-1:</b> Hongos proteolíticos promisorios seleccionados en el <i>screening</i> en placa.	32
<b>Tabla 5-2:</b> Determinación de la actividad proteolítica específica para los extractos crudos de los hongos promisorios (23D y 55D: <i>Penicillium</i> spp.).	33
<b>Tabla 5-3:</b> Actividad proteolítica específica para los extractos crudos concentrados de los hongos promisorios <b>8D</b> <i>Chaetomium</i> , <b>12D</b> <i>Stachybotrys</i> , y <b>21D</b> <i>E. saccula</i> , sometidos a presión selectiva continuada.	39
<b>Tabla 5-4:</b> Actividad proteolítica específica obtenida tras el fraccionamiento del extracto crudo del morfotipo 21D ( <i>E. saccula</i> ) mediante la adición gradual de sulfato de amonio en tres puntos de saturación (p/v): 85%, 65%, y 35%.	43
<b>Tabla 5-5:</b> Actividad proteolítica específica para los picos resultantes de la cromatografía de intercambio aniónico, para la fracción de proteínas del 35% (fracción proteolítica positiva) correspondiente al morfotipo 21D <i>E. saccula</i> .	43

**Tabla 5-6:** Factor de purificación para las muestras de proteína con .....46  
actividades proteolíticas evidentes, obtenidas a lo largo del proceso de  
purificación.

# Introducción

La historia de la humanidad ha estado ligada a la transmisión de información mediante el empleo de diversos tipos de materiales de origen natural, sintético y semisintético (metales, papel, textiles, piedras, medios magnéticos y ópticos, etc.), los cuales han estado expuestos a deterioro tanto a nivel biológico como ambiental a lo largo del tiempo. Aunque la biodegradación es un proceso esencial en el ambiente que permite el reciclaje de materia orgánica compleja y es un componente integral del ciclo biológico (Cappitelli y Sorlini, 2005), se convierte en un proceso indeseable cuando afecta materiales, construcciones y procesos con importancia económica, histórica y cultural; en ese sentido se habla de deterioro (Eggins y Oxley, 2001). Bajo este contexto, algunos de los fondos documentales con carácter histórico custodiados por el Archivo de Bogotá, entidad encargada de la protección de los recursos documentales de la ciudad mediante su acopio, conservación y organización, han presentado biodeterioro como consecuencia de la colonización puntual de microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetos) que utilizan el papel y sus componentes como fuente de carbono y nitrógeno, mediante el empleo de sus complejos sistemas enzimáticos ocasionando deterioro sobre los soportes a nivel físico y químico dañando la estética y la técnica de registro (Villalba y Mikán, 2005; Villalba *et al.*, 2004; Mateus *et al.*, 2001).

El conocimiento que se tiene hasta ahora sobre el proceso de biodeterioro sobre soportes documentales es escaso, por lo cual se hace necesario realizar investigaciones que permitan profundizar en la fenomenología del proceso y desarrollar medidas más efectivas en cuanto a restauración y conservación del acervo documental. Por consiguiente, uno de los criterios más importantes para la recuperación de los documentos deteriorados es la identificación temprana de los agentes microbiológicos causantes del mismo, para así poder dar guía a restauradores en cómo y cuándo tales esfuerzos de restauración son requeridos (Daffonchio *et al.* 2000). En consecuencia, el

Archivo de Bogotá ha venido conformando, desde el año 2005, el cepario institucional resultado del aislamiento riguroso de morfotipos implicados en el proceso de biodeterioro, con el fin de conocer y aprovechar la diversidad biológica existente en nuestros archivos, una importante fuente de información para el entendimiento del proceso de biodeterioro, y la base para dar soluciones integrales y prácticas entorno a la problemática del microdeterioro documental.

En ese sentido, el Archivo de Bogotá ha venido buscando tratamientos alternativos para la remoción “limpia” de ciertos compuestos orgánicos residuales, como proteínas encolantes y almidones, que no solo se convierten en blanco biológico detrimental sobre los documentos, sino que también se modifican ampliamente con el tiempo volviéndose resistentes al uso común de solventes orgánicos, carbonatos y fosfatos (contaminantes y nocivos) comúnmente empleados durante las prácticas de restauración para su remoción. En ese sentido, el Archivo de Bogotá ha venido aunando esfuerzos en la búsqueda y selección preliminar de perfiles proteolíticos idóneos para la eliminación de proteínas residuales a partir de su cepario institucional (Rojas *et al.*, 2009; Cruz, 2008; Rojas, 2007). En consecuencia, este trabajo busca corroborar y actualizar la información disponible sobre la selección de hongos filamentosos con perfiles proteolíticos promisorios sobre placas selectivas a partir de la colección de microorganismos del Archivo de Bogotá, y caracterizar parcialmente una proteasa alcalina que resulte de interés con miras a la remoción específica, mínimamente intrusiva y con baja toxicidad ambiental y humana, de proteínas residuales sobre los fondos y colecciones documentales seleccionados por la entidad estatal. Adicionalmente, se busca brindar una alternativa local al empleo de proteasas comerciales importadas como la tripsina y la proteinasa K que usualmente hacen económicamente inviables los procesos de bio restauración debido a sus altos costos.

# 1. Marco conceptual

## 1.1 Biodeterioro

### 1.1.1 Definición y generalidades

Aunque la definición de biodeterioro carece de unificación entre las diferentes ramas de la ciencia, una descripción adecuada del término podría ser aquella propuesta por H. J. Hueck (2001), quien se refirió a biodeterioro como '*cualquier cambio indeseable en las propiedades de un material causado por las actividades vitales de los organismos*' (Allsopp *et al.*, 2004; Vaillant y Valentín, 1996). A la fecha se han descrito tres componentes principales del biodeterioro: los organismos implicados, la composición de los objetos heredados como parte de la memoria colectiva, y el ambiente en el que se hallan estos objetos (Florian, 2005). Este proceso biológico ocasiona daños a distintos niveles en los que la información y el valor histórico y económico de los objetos afectados se ven comprometidos de una manera seria, atentando contra el patrimonio cultural. Los cambios causados sobre diversos materiales han sido atribuidos principalmente a distintos microorganismos que emplean los componentes de dichos materiales como fuente de energía mediante el uso de una maquinaria enzimática definida (Villalba y Mikan, 2005; Villalba *et al.*, 2004). Dado que el biodeterioro involucra principalmente microorganismos, Peters (2000) propuso un nuevo concepto que es el *Microbiodeterioro*, donde se hace énfasis en el agente causal del daño.

Quizás uno de los materiales milenarios con mayor repercusión microbiodeteriográfica es el papel industrial comúnmente empleado en la generación de fondos y colecciones

documentales. El papel es básicamente una lámina constituida por un entramado tridimensional de fibras de celulosa, y por una serie de aditivos tales como colorantes, cargas minerales (para añadir blancura, disminuir porosidad etc.), y productos especiales (para aumentar la resistencia al agua, a la tracción, mejorar la textura del papel etc.) (Smook, 1990; Van Nostrand Reinhold Company, 1970) que permiten mejorar las propiedades del papel y lo hacen apto para el uso al que está destinado. Sin embargo, algunos de estos aditivos de origen orgánico como el almidón, la gelatina o la caseína con el tiempo tienden a oxidarse o a convertirse en una fuente potencial de nutrientes para los microorganismos (Allsopp *et al*, 2004). La Tabla 1-1 muestra un resumen de los diferentes aditivos utilizados en la producción del papel industrial, los cuales representan diversos grados de susceptibilidad al biodeterioro.

**Tabla 1-1:** Aditivos utilizados en la fabricación del papel (Tomado de Kay Teschke y Paul Demers: <http://www.mtas.es/insht/EncOIT/pdf/tomo3/72.pdf>)

Aditivo	Aplicado en	Finalidad y/o ejemplos de agentes específicos
<b>Aditivos más comúnmente utilizados</b>		
Talco	Extremo húmedo	Control de la mezcla extraíble* (evita la deposición y acumulación de la mezcla extraíble) Apresto (confiere más brillantez, más alisado, más opaco)
Dióxido de titanio	Extremo húmedo	Pigmento (hoja brillante, mejora impresión) Apresto (confiere más brillantez, más alisado, más opaco)
“Alumbre” (Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> )	Extremo húmedo	Precipita resina al encolar sobre las fibras Ayuda a la retención (fija aditivos a las fibras, mejora la retención de las fibras de la pasta)
Resina	Extremo húmedo	Encolado interno (resistencia penetración líquidos)
Arcilla (caolín)	Húmedo/seco	Apresto (confiere más brillantez, más alisado, más opaco) Pigmento o satinado de superficie (imparte color)
Almidón	Húmedo/seco	Encolado interno (resistencia a la penetración de líquidos) Aditivo de resistencia por vía seca (aumenta la resistencia, reduce el polvo superficie) Ayuda a la retención (aditivos para encuadernación del papel, mejora la retención de la fibra de la pasta)
Tintes y pigmentos	Húmedo/seco	p. ej., tintes ácidos, básicos o directos, lacas de color, CO <sub>3</sub> Ca, puede incluir disolventes.
Latex	Extremo seco	Adhesivo (refuerza la hoja), aditivos para encuadernación del papel, tapado de poros) Impermeabilización (resistencia a la penetración de líquidos)

Desde finales del siglo XX los esfuerzos en manufactura o restauración del papel se han dirigido, en parte, hacia el uso de materiales sintéticos como adhesivos a base de éteres de celulosa, emulsiones de acetato de polivinilo (las llamadas gomas blancas que varían en composición y propiedades), adhesivos que se colocan por presión de cintas adhesivas y etiquetas, o adhesivos termosensibles como los empleados en papeles de montaje seco, ofreciendo mayor perdurabilidad a los documentos y mayor resistencia al ataque microbiano (Andrews *et al.*, 1992). Hay que aclarar que los soportes documentales sufren un proceso normal de envejecimiento que puede ser mediado químicamente o biológicamente; en los dos casos este fenómeno depende de las condiciones ambientales, las cuales si llegan a ser adversas van a ocasionar un deterioro más acelerado.

Los documentos que presentan biodeterioro por lo general exhiben muchas alteraciones, siendo las más frecuentes las pigmentaciones y los daños mecánicos (Naranjo y Rodríguez, 2005; Florian y Manning, 2000; Gallo, 1985). Debido a lo anterior, diferentes laboratorios se han dedicado a estudiar la naturaleza, origen y evolución de dichas alteraciones, llevando a cabo investigaciones en los microorganismos que se sospecha son agentes causantes de las mismas, para luego desarrollar métodos conducentes a la restauración y conservación del acervo documental. Dentro de las alteraciones cromáticas ocasionadas por los microorganismos (bacterias, levaduras o hongos) es muy común referirse al término **foxing**, el cual se refiere a pequeñas manchas de diferentes intensidades las cuales pueden variar en color desde un rojo oxidado hasta un *beige* o el *glow*, el cual fluoresce ante luz UV (Montemartini *et al.*, 2003).

Existen dos teorías diferentes para explicar el desarrollo del *foxing* (Press, 1976): La teoría biótica que explica la presencia de manchas como producto y resultado de la actividad de los microorganismos (pigmentaciones); y la teoría abiótica que atribuye dicho fenómeno a factores de naturaleza química como el depósito de metales pesados y oxidantes. Con el biodeterioro el papel pierde fuerza, se ablanda y se hace poroso, a menudo con áreas de pérdida o adelgazamiento claramente visibles. Los casos menos severos son generalmente aparentes sólo cuando se ven contra un foco de luz, o se

evidencian por diferencias en el mojado durante un tratamiento ([AICHAW] American Institute for Conservation of Historic and Artistic Works, 1998).

### **1.1.2 Microbiología asociada al proceso**

Dentro de los factores de deterioro, los agentes microbiológicos son la principal causa del detrimento de las colecciones bibliográficas. Su desarrollo en ambientes propicios de temperatura y humedad relativa, les permite utilizar el soporte documental como sustrato (Guerrero, 1996). De los agentes microbiodeteriorantes involucrados en el proceso, los hongos y las bacterias filamentosas causan los mayores daños (Vaillant y Valentín, 1996). Los géneros microbianos de mayor incidencia y prevalencia en el biodeterioro del patrimonio documental son *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Alternaria* y *Fusarium*, y bacterias como *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus* y *Streptomyces* (Lugauskas *et al.*, 2003; Das *et al.*, 1997).

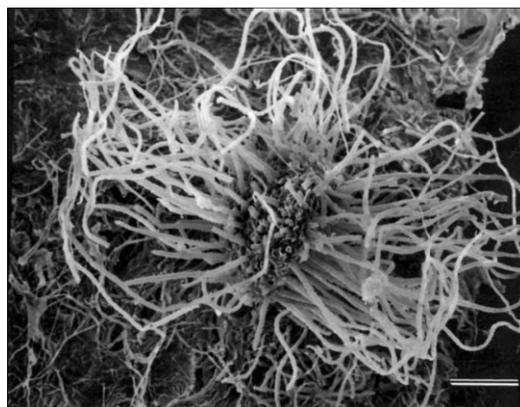
Así mismo, se han reportado más de 308 especies de hongos, agrupadas en 132 géneros diferentes (Ciferri, 1999; Das *et al.*, 1997; Zyska, 1997; Pineda y Saldarriaga, 1992). Sin embargo, las estadísticas muestran que cerca de un 60% de las afecciones son atribuidas a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, debido a su carácter generalista en la catálisis de un amplio espectro de sustratos. Los hongos filamentosos que se han especializado en uno u otro tipo de sustrato, como el caso de *Eladía saccula*, han sido vagamente reportados en el campo del biodeterioro documental. De hecho, a la fecha, y de acuerdo con la revisión realizada por el autor, solo existe un reporte reciente sobre la incidencia de este hongo filamentoso sobre documentos históricos si no en el país, quizás en el mundo entero (Rojas *et al.*, 2009). Este micromicete, poco reportado, fue descrito por primera vez como agente biodegradante sobre suelo forestal y deteriorante de edificaciones en la República Checa (Kubátová, 1989).

Vaillant y Valentín (1996) clasifican los hongos con base en su acción y sus actividades en el soporte:

1. Hongos que se encuentran permanentemente en el papel, cuyas hifas penetran en las fibras y producen desintegración total. En este grupo se ubican los altamente celulolíticos.
2. Hongos que asimilan ciertos componentes específicos, los cuales son principalmente los aditivos adicionados al papel, como ceras, parafinas, almidones, proteínas y caucho.
3. Hongos cuya presencia en el papel depende de la microbiota circundante.
4. Ciertos representantes casuales. Los microorganismos que no son capaces de sobrevivir en ambientes específicos, pueden aparecer sobre los soportes como consecuencia de la presencia de sustancias orgánicas contaminantes como saliva y otras secreciones orgánicas, derivadas de su manejo inadecuado.

Varios estudios han buscado establecer la diversidad de hongos que pueden llegar a afectar el papel industrial, sobre todo aquella diversidad que lleva tiempo desarrollándose sobre diferentes colecciones históricas. Es el caso del estudio llevado a cabo por Szczepanowska y Cavaliere (2000), basado en el biodeterioro de documentos almacenados en baúles de hierro del siglo XVIII y del siglo XIX ocasionado por hongos principalmente pertenecientes a los géneros *Chaetomium*, *Aspergillus* y *Penicillium*, mediante la producción de pigmentaciones y estructuras como cuerpos fructíferos y micelio (Figura 1-1).

**Figura 1-1:** Micrografía SEM de un área de decoloración celulolítica, revelando la presencia de hifas de *Chaetomium globosum* sobre la estructura de los documentos (Tomado de Szczepanowska y Cavaliere, 2000).



Según lo mencionado, los hongos filamentosos causantes del ataque generan diferentes indicadores de deterioro tales como la destrucción mecánica y la pigmentación. Esto se debe a que las estructuras fructíferas e hifas, y los metabolitos producidos por los microorganismos generan diferentes efectos sobre los polímeros en los que se desarrollan (celulosa, hemicelulosas, almidones y proteínas) (Arai, 2000; Berner *et al.*, 1997; Sand, 1997). En ese sentido, el deterioro microbiológico es llevado a cabo principalmente por reacciones de oxidación mediadas por diferentes enzimas sustrato-específicas, producción de metabolitos secundarios como ácidos secretados sobre los soportes, amarillamiento y resquebrajamiento del papel, oxidación de tintas, perforaciones del soporte y manchados de diferentes texturas, colores y tonalidades (Tabla 1-2).

**Tabla 1-2:** Géneros de hongos involucrados en el biodeterioro de papel industrial, sus metabolitos y efectos (Tomado de Gallo, 1985).

<b>Genero</b>	<b>Metabolito</b>	<b>Actividad Deteriorante</b>
<i>Alternaria</i>	Proteasas y amilasas.	Manchas miceliarias de color pardo. Degradación del soporte.
<i>Aspergillus</i>	Amilasas, celulasas, glucosa oxidasa, ácido Cítrico, ácido Láctico, fumarato y malato.	Manchas miceliarias de diferentes colores. Acidificación.
<i>Cephalosporium</i>	Lactato, succinato, y ácido Fórmico.	Manchas miceliarias de color pardo oliváceo.
<i>Chaetomium</i>	Celulasas.	Manchas pigmentarias de tono rosa y crema.
<i>Fusarium</i>	Celulasas.	Manchas rosadas, decoloración y afección a las fibras de celulosa.
<i>Penicillium</i>	Lipasas, celulasas, proteasas, oxalato y lactato.	Manchas miceliarias de color verde. Degradación de fibras.
<i>Phoma</i>	Celulasas, proteasas y acetato.	Manchas miceliarias de color pardo oscuro y afección a las fibras de celulosa.
<i>Trichoderma</i>	Celulasas.	Manchas miceliarias de color oliváceo y debilitación de fibras.

Aunque los agentes biodeteriorantes emplean sus enzimas hidrolíticas como principales “herramientas” biológicas para colonizar con éxito los soportes documentales, resulta potencialmente útil el empleo de dichas macromoléculas en estado puro para la remoción y el recambio de diferentes aditivos empleados durante la manufactura o la restauración previa del papel, evitando así la generación de pigmentaciones o daños mecánicos ocasionados por la actividad vital de los microorganismos. Entre dichas enzimas se encuentran principalmente las celulasas, lipasas, xilanasas, amilasas y **proteasas** que se usan, por ejemplo, en la eliminación de adhesivos proteicos que contienen principalmente colágeno como las colas derivadas de animales (Andrews *et al.*, 1992).

## 1.2 Proteasas

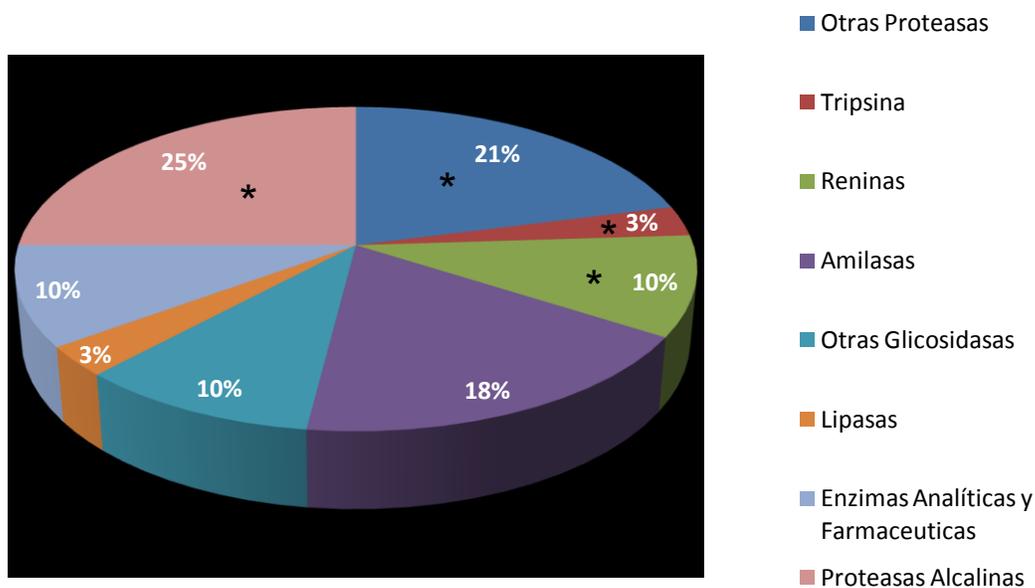
### 1.2.1 Generalidades

La enzimología ha mostrado una expansión y desarrollo sin precedentes durante los últimos tres siglos debido al papel fundamental que juegan las enzimas no solo en el metabolismo de los seres vivos, sino también en el desarrollo industrial y tecnológico de las naciones. Recientemente, la atención de la comunidad académica y científica mundial sobre la investigación básica y aplicada en enzimas ha retornado a la caracterización fisicoquímica de estas proteínas, y a su interacción con otras macromoléculas y micromoléculas (ej. sustratos, activadores, inhibidores, etc.), luego del “boom” de la biología molecular desde mediados del siglo pasado (Copeland, 2000). Bajo este contexto, las proteasas se han constituido en uno de los tres grandes grupos de enzimas objeto de estudio en la actualidad, dadas sus aplicaciones tanto biológicas como comerciales. De hecho, el mercado internacional de enzimas industriales - 75% hidrolíticas, de las cuales el 60% corresponde a proteasas - ascendía a 1.7-2 billones de dólares / año en el 2006, manteniendo su tendencia de participación en el mercado hasta nuestros días (Figura1-2) (Shankar *et al.*, 2011; Hajji *et al.*, 2010; Rao *et al.*, 1998).

Este grupo de enzimas se encarga de catalizar la hidrólisis total de enlaces peptídicos, tanto a nivel del grupo amino inicial, como del grupo carboxilo terminal (Bourgaize *et al.*, 2000). La clasificación de estas enzimas suele ser laboriosa debido a su enorme diversidad de acción y estructura; por tanto, actualmente se clasifican con base en tres

critérios generales: (i) tipo de reacción catalizada, (ii) naturaleza química del sitio catalítico, y (iii) relación evolutiva con referencia a su estructura. El Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular basa la clasificación de las proteasas respecto de su sitio de acción a lo largo de la cadena polipeptídica (Tabla 1-3).

**Figura 1-2:** Distribución de la venta mundial de enzimas para el año 2006. Los asteriscos (\*) indican la porción correspondiente a la venta de proteasas [Tomado originalmente de Rao y colaboradores (1998), y actualizado por Shankar y colaboradores (2011)].



*Grosso modo*, las proteasas se subdividen en dos grandes grupos: (i) exopeptidasas que catalizan los enlaces peptídicos proximales a los grupos carboxilo o amino terminal del sustrato, (ii) endopeptidasas que catalizan aquellos enlaces peptídicos distales a los grupos terminales del sustrato. Estos dos grupos generalmente actúan de manera sinérgica y concordante: las primeras produciendo una serie de extremos carboxi o amino-terminales, y las segundas actuando mayoritariamente sobre los fragmentos de péptidos formados (Kudryavtseva *et al.*, 2008). Posteriormente, se reconocen cuatro subgrupos con base en los grupos funcionales presentes en el sitio activo: (i) proteasas serina, (ii) proteasas asparticas, (iii) proteasas cisteína y (iv) metaloproteasas (Rao *et al.*, 1998).



de acción específicos. Sin embargo, Godfrey y West (1996) manifiestan que la inhabilidad de las proteasas tanto animales como vegetales para cubrir la demanda mundial ha generado un creciente interés en las proteasas de origen microbiano. De hecho, la diversidad bioquímica de los microorganismos, y su susceptibilidad a la manipulación genética representan una excelente fuente de enzimas (Rao *et al.*, 1998). Rao y colaboradores (1998) y Morihara y Oda (1993), mencionan que las proteasas con aplicaciones industriales generalmente provienen de bacterias, hongos y virus.

Las proteasas más comerciales, principalmente neutras y alcalinas activas en pHs que van desde los 6.0 hasta los 13.0, son producidas por bacterias del género *Bacillus* con una amplia termotolerancia y una alta tasa de reacción enzimática (Genckal y Tari, 2006). Sin embargo, el punto de quiebre en su producción radica en la necesidad de métodos intensivos y costosos de filtración para obtener preparados enzimáticos libres de bacterias. Entre los hongos, los organismos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Conidiobolus*, *Arthrobotrys*, *Trichoderma* y *Cephalosporium* lideran la producción de proteasas, tanto ácidas como neutras y alcalinas (pH 4.0-11.0), con ventajas sobre sus homologas bacterianas que van desde una amplia especificidad por el sustrato hasta la obtención de una alta concentración de enzimas en los medios de fermentación, la factibilidad en los procesos de producción debido a que el micelio puede ser fácilmente removido por técnicas de filtración menos intensivas, la realización de procesos de modificación pos-traduccionales como la glicosilación y la sulfatación, y la estabilidad como hospederos para el desarrollo de la tecnología de ADN recombinante (Hajji *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2005; Iwashita, 2002; Anwar y Saleemuddin, 1998). En ese sentido, trabajos como el de Phadtare y colaboradores (1997) ejemplifican la producción de proteasas alcalinas a partir de hongos filamentosos (*Conidiobolus coronatus*) como alternativa a la producción bacteriana, debido a que el proceso productivo era más rentable en términos económicos y tecnológicos.

## 1.2.2 Aplicaciones

Actualmente existe una demanda creciente por el hallazgo de proteasas específicas, eficientes y económicas para ser utilizadas en formulaciones industriales a nivel de procesamiento de alimentos, detergentes, textiles, papel, y en aplicaciones biomédicas y bioenergéticas en materia de blancos terapéuticos, síntesis de péptidos y producción de biocombustibles. De allí, quizás uno de los principales motores que impulsan la búsqueda estas enzimas sea la industria de los detergentes en donde se buscan proteasas que trabajen de forma óptima en pHs alcalinos extremos (pH 9.0-12.0), en temperaturas superiores a 40°C, con una amplia especificidad por el sustrato, y en presencia de varios surfactantes, tensoactivos, y oxidantes, reduciendo considerablemente el uso de fosfatos en los detergentes (Abidi *et al.*, 2007; Hajji *et al.*, 2007; Saeki *et al.*, 2007; Anwar y Saleemuddin, 1998).

Haciendo especial énfasis en el campo de la restauración y conservación de documentos y obras de arte con indicadores de biodeterioro, se están realizando esfuerzos encaminados a brindar tratamientos alternativos a las técnicas físicas y químicas tradicionales en las que los compuestos orgánicos residuales y las sales son removidas mediante el empleo de carbonatos y solventes orgánicos de amplio impacto ambiental y salubre. Desde hace 25 años se han venido empleando enzimas en la conservación del papel para la remoción de adhesivos residuales o soportes secundarios que contribuyen, con el tiempo, en el deterioro de dicho material (Decoux, 2002; Andrews *et al.*, 1992). Con el tiempo algunos aditivos empleados en la fabricación del papel (ej. encolantes) se modifican ampliamente y se vuelven resistentes al uso común de solventes. En ese sentido, existe una demanda creciente por el desarrollo de métodos biológicos que busquen contrarrestar dicha problemática. De hecho, la ventaja de la bio restauración mediante el empleo de microorganismos o enzimas, comparada con los métodos tradicionales, radica en que este método es altamente específico, mínimamente intrusivo, y presenta baja toxicidad ambiental y humana (Cappitelli *et al.*, 2006; Ranalli *et al.*, 2005; Decoux, 2002).

Trabajos como el de Ranalli y colaboradores (2005) o el de Andrew y colaboradores (1992), basados en el empleo de proteasas purificadas o capas de algodón enriquecidas

con microorganismos sobre pinturas o documentos alterados por la presencia de encolantes de origen animal, han mostrado una alta eficiencia en cuanto a la remoción de dichos residuos (Figura 1-3). Otros trabajos relacionados como el de Abidi y colaboradores (2008) basado en la obtención de proteasas alcalinas a partir del hongo *Botrytis cinerea* como biodetergente reflejan el potencial de estas enzimas en la eliminación de proteínas residuales de forma eficiente y económica.

**Figura 1-3:** Efecto del proceso de “biolimpieza” y “biorestauración” obtenido mediante la aplicación de *Pseudomonas stutzeri* cepa A29 y la enzima *Protease* sobre la pintura *Conversione di S. Efisio e battaglia*, (Siglo XIV) en Pisa Camposanto Monumentale, (Italia) (arriba y abajo, antes y después del tratamiento, respectivamente) (Tomado de Ranalli *et al.*, 2005).



Varios restauradores han empleado preparaciones de tripsina para la remoción de adhesivos debido a su especificidad. Sin embargo, y atendiendo la necesidad de encontrar proteasas de amplio espectro capaces de catalizar cualquier adhesivo proteico, algunos restauradores han optado por emplear la Proteasa Tipo V producida por *Streptomyces griseus* y comercializada por *Sigma Chemical Corporation* con resultados satisfactorios a 40°C pH 7.45. Sin embargo, la baja especificidad de esta proteasa invoca ciertas medidas cautelares, por ejemplo cuando se emplea cerca o sobre fotografías

cuya emulsión es principalmente gelatina, o sobre pergamino cuyas fibras se componen principalmente de colágeno (Segal y Cooper, 1977).

Por otra parte, en el campo de la bioquímica, la biología molecular y el cultivo de tejidos las proteasas juegan un papel importante debido a su actividad en la disociación de células de mamífero en cultivos primarios (Shankar *et al.*, 2011), mantenimiento de líneas celulares, ejecución de reacciones enzimáticas, digestión de proteínas para la generación de péptidos específicos objeto de patente, y remoción de contaminantes en preparaciones de ácidos nucleicos, entre otros (Chiplonkar *et al.*, 1985). A pesar del auge de proteasas alcalinas comerciales como la tripsina de origen animal y la proteinasa K de origen microbiano, de alto costo comercial en el mercado Colombiano, resulta interesante y potencialmente útil la búsqueda de nuevas enzimas en hongos nativos como alternativa económica para la ejecución de investigación básica y aplicada en países como el nuestro.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo general**

Purificar y caracterizar bioquímicamente una proteasa alcalina con potencial uso biotecnológico a partir de un hongo filamentoso promisorio, implicado en la degradación del patrimonio documental en el Archivo Histórico de Bogotá.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Corroborar y/o actualizar la actividad proteolítica de hongos filamentosos involucrados en el deterioro de documentos históricos tanto en placa como en medio líquido.
- Determinar los perfiles isoenzimáticos para proteasas alcalinas de hongos filamentosos seleccionados.
- Purificar la enzima hidrolítica de interés mediante cromatografía de intercambio iónico y/o filtración por gel.
- Caracterizar la enzima purificada en términos de punto isoeléctrico, peso molecular, pH de reacción óptimo, temperatura de reacción óptima y efecto de un quelante sobre la actividad de la enzima purificada.

### **3.Hipótesis**

La búsqueda y selección de proteasas alcalinas obtenidas a partir de hongos filamentosos involucrados en el deterioro de documentos históricos puede conllevar al hallazgo de un perfil isoenzimático adecuado para la purificación y caracterización parcial de hidrolasa(s), de forma eficiente y simplificada, con posible(s) aplicación(es) biotecnológica(s), especialmente en el campo de la conservación y restauración de documentos mediante la remoción puntual de sustancias orgánicas residuales.

## **4. Metodología**

### **4.1 Corroboración de la actividad proteolítica de hongos filamentosos promisorios tanto en placa como en medio líquido**

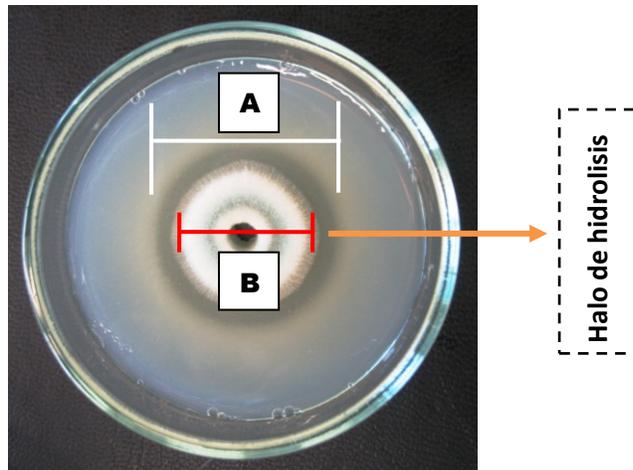
Los aislamientos de hongos filamentosos mantenidos en el cepario del laboratorio de Física, Química y Biología de la Dirección Archivo de Bogotá, provenientes de muestreos ambientales y documentales realizados mediante asistencia técnica a los diferentes Archivos de Gestión Distrital, representativos de procesos de biodeterioro, y conservados en estado puro en agua estéril a 4°C mediante la técnica de cultivos monospóricos (Ho y Ko, 1997), fueron recuperados en caldo Sabouraud suplementado con jugo V8 por un término de 24 horas a 28°C con una agitación constante de 150rpm. Los hongos fueron transferidos a placas Sabouraud pH 5.5 incubadas por 5-7 días a 28°C para la obtención de biomasa y la consecución de inóculos microbianos (Rojas *et al.*, 2009). La formulación de los medios de cultivo empleados se encuentra descrita en el Anexo A.

#### **4.1.1 Selección de hongos proteolíticos promisorios sobre medios de cultivo sólidos**

Se actualizó y corroboró la actividad proteolítica de cada hongo filamentosos viable mediante la inoculación de placas de agar Caseinato de Calcio al 3%(p/v) (Merck) pH 7.2 con 100 µL de una suspensión de  $10^6$  propágulos/mL (obtenida a partir de cultivos en Agar Sabouraud de 8 días de incubación) en pozo central teniendo en cuenta la metodología propuesta por Rojas (2007), Hankin y Anagnostakis (1975), Cowan y Daniel (1982), y Montville (1983). Los cultivos fueron realizados por triplicado e incubados por 72 horas a 28°C con el fin de observar directamente halos de hidrólisis que reflejaran las actividades hidrolíticas en cada placa. Los halos de degradación y el diámetro de las colonias fueron medidos con un calibrador (Mitutoyo) con el fin de calcular el tamaño de los halos de hidrólisis (Rojas, 2007). Se calculó el tamaño de los halos de hidrólisis aplicando la formula  $A-B=C$ , como se observa en la Figura 4-1; donde A hace referencia al diámetro de la colonia mas el halo de hidrólisis, B es el diámetro de la colonia y C es el resultado de la diferencia de las dos medidas y equivalente al halo de degradación o de hidrólisis

que formó el microorganismo (Pedroza *et al.*, 2001). Con base en los datos graficados se seleccionaron los morfotipos que presentaron las actividades hidrolíticas más altas.

**Figura 4-1:** Determinación de halos de hidrólisis sobre agar caseinato de calcio al 3%(p/v). (A) diámetro de la cepa + halo de hidrolisis; (B) diámetro de la cepa (Tomado por Carlos Cruz, 2009) (Pedroza *et al.*, 2001).



#### 4.1.2 Selección de hongos proteolíticos promisorios sobre medios de cultivo líquidos

Se verificó la producción de proteasas extracelulares en los morfotipos seleccionados en el *screening* en placa, mediante la inoculación de medios líquidos (30mL) en *erlenmeyers* de 100mL, bajo tres fases de fermentación: obtención de biomasa, inducción a estrés nutricional e inducción de proteasas (Rojas *et al.*, 2009; Cooper y Wood, 1980). La formulación de los medios líquidos mencionados a continuación se encuentra descrita en el Anexo A. *Grosso modo*, la producción de biomasa se realizó mediante la inoculación de 30mL de caldo Sabouraud con 100 $\mu$ L de una suspensión de  $10^5$ - $10^6$  propágulos/mL incubando a 28°C por 5 días con una agitación constante de 150rpm. El micelio resultante fue recuperado asépticamente mediante filtración en papel y transferido a un Medio Mínimo de Sales (30mL) incubando a 28°C por 24 horas y 150rpm, con el fin de generar condiciones de estrés nutricional en los microorganismos e inducir expresión génica en la siguiente etapa del cultivo. Finalmente, la biomasa fue recuperada y transferida a 30mL de Medio Mínimo de Sales suplementado con Extracto de Carne al

0.1%(p/v) incubando a 28°C por 3-4 días y 150rpm. La biomasa resultante fue separada del extracto crudo mediante filtración en papel y conservada en congelación a -70°C. El extracto crudo fue clarificado mediante centrifugación a 4500rpm por 10 minutos a 4°C, y conservado en congelación a -20°C para análisis posterior.

#### ▪ **Determinación de la concentración total de proteínas**

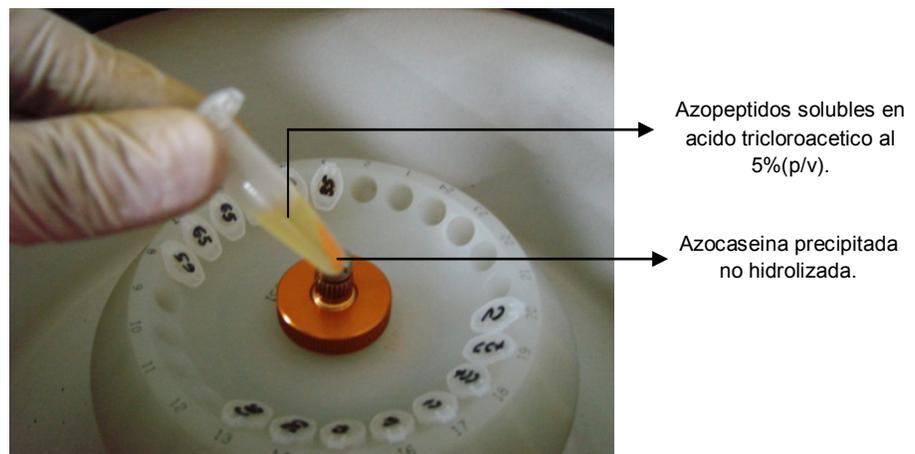
Se determinó el contenido de proteínas totales en los extractos crudos obtenidos con anterioridad empleando el método de Bradford modificado (Stoscheck, 1990; Bradford, 1975). Este método se basa en la unión a pH básico de los grupos trifenilmetano y sulfonato aniónicos a las estructuras no polares de las proteínas y a los residuos catiónicos de la cadena polipeptídica (arginina y lisina), respectivamente. Estas uniones entre los grupos del colorante *Coomassie* y la proteína forman un complejo de color azul que puede ser fácilmente cuantificado mediante espectrofotometría a 595-630nm. En todos los casos se mezclaron: 10µL de la solución de proteína, 20µL de NaOH 1M y 200µL del colorante en placas de 96 pozos fondo plano. La mezcla fue equilibrada a temperatura ambiente por 5 minutos, y se determinó su absorbancia a 630nm en un lector ELISA Pioway Biomedical Microplate Reader M3000 contra los blancos apropiados (generalmente agua desionizada o tampón de baja fuerza iónica). Se construyó una curva de calibración utilizando albúmina de suero bovino (BSA, Sigma) y lisozima (LY, Sigma) como estándares manejando un rango de concentración de proteínas entre 0.06 – 2.5µg/µL (Anexo B).

#### ▪ **Determinación de la actividad proteolítica sobre un sustrato cromogénico hidrosoluble: Azocaseína**

Se cuantificó la actividad proteolítica en los extractos crudos mediante la metodología descrita por Charney y Tomarelli (1947) e Iversen y Jargensen (1995), empleando Azocaseína (Sigma) como sustrato de reacción. Se preparó una solución de azocaseína al 1.5%(p/v) en bicarbonato de sodio 0.1M pH 8.3 para efectuar las digestiones enzimáticas. La reacción se desarrolló pipeteando 20µL de la muestra de proteínas en 200µL de la solución sustrato, permitiendo la incubación de la mezcla por 60 minutos a 45°C en baño María. La reacción enzimática se detuvo mediante la adición de 200µL de

una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 5%(p/v). Los tubos fueron equilibrados a 4°C por 30 minutos, y centrifugados a 8000rpm por 20 minutos a la misma temperatura. Finalmente, se dispusieron 200µL de cada sobrenadante [azopeptidos solubles en ácido (Figura 4-2)] en una placa de 96 pozos fondo plano, y se efectuaron las lecturas de absorbancia en un lector ELISA Pioway Biomedical Microplate Reader M3000 a 405nm.

**Figura 4-2:** Determinación de actividad proteolítica sobre azocaseína soluble. Se resalta la presencia de azopeptidos solubles en ácido susceptibles de cuantificación en espectrofotometría, y la presencia de azocaseína precipitada no hidrolizada (Tomado por Carlos Cruz, 2009).



Para este método se construyeron tres curvas de calibración con miras a la determinación de Unidades Equivalentes de Enzima ( $U_{eq}$ ) empleando proteinasa K (Sigma, Cat. P6556) como referencia, debido a la inhabilidad inmediata para determinar un producto de reacción fácilmente cuantificable tras realizar reacciones proteolíticas sobre azocaseína. En consecuencia, se elaboró una curva estándar de tirosina bajo diferentes concentraciones del aminoácido para determinar las  $\mu$ moles de tirosina liberadas positivas para *Folin & Ciocalteu* (Folin y Ciocalteu, 1927), una curva patrón de actividad proteolítica sobre caseína a diferentes concentraciones de proteinasa K empleando *Folin & Ciocalteu* como revelante de los productos de reacción enzimática, y una curva estándar de actividad proteolítica sobre azocaseína a diferentes concentraciones de la enzima patrón. Las tres curvas fueron desarrolladas bajo las mismas condiciones experimentales (Ej. temperatura de reacción=45°C; pH de la reacción=8.3; tiempo de reacción=60min.; equipos; reactivos; proporcionalidad de volúmenes: vol.

sustrato/reacción=200 $\mu$ L, vol. extracto enzimático/reacción=20 $\mu$ L, etc.), según corresponda. La formulación de las curvas patrón y la metodología empleada para la determinación de las Unidades Equivalentes de proteinasa K ( $U_{eq}$ ) se encuentra descrita en el Anexo C. Para efectos de este trabajo se definió una Unidad Equivalente de proteinasa K ( $U_{eq}$ ) como la cantidad de enzima que libera 1 $\mu$ mol de tirosina positiva para *Folin & Ciocalteus* por minuto de reacción, bajo las condiciones experimentales del ensayo.

## **4.2 Revisión de perfiles isoenzimáticos para proteasas alcalinas de hongos filamentosos promisorios**

Se analizó el perfil isoenzimático de proteasas mediante isoelectroénfoque analítico en geles de poliacrilamida (IEF) para los extractos crudos que presentaron actividades hidrolíticas evidentes sobre azocaseína, como tercer filtro selectivo que condujese a la elección acertada de una proteasa alcalina que pudiese ser purificada y caracterizada en el menor número de pasos posibles haciendo el proceso eficiente y económico. Los geles de poliacrilamida fueron preparados empleando una solución pre-disuelta de acrilamida-bisacrilamida PlusOne ReadySol IEF T40 C3 (Pharmacia-Biotech), y anfolitos en el rango de pH 3 a 10 (Pharmalyte, Pharmacia-Biotech). Para preparar un gel de poliacrilamida de 125x105x0.4mm (con capacidad para 24 muestras), fueron requeridos 20mL de la solución. La solución de gel fue preparada mediante la mezcla de los componentes en la proporción y el orden mostrado en el Anexo D.

### **4.2.1 Proceso preparatorio IEF**

El proceso preparatorio antes del corrido fue el siguiente: el circulador termostático (MultiTem III, Pharmacia) fue programado a 10°C por 20 minutos. Se ubicaron macerados de NaOH en ambos lados del tanque de electroforesis (LKB Bromma 2117 Multiphor, Pharmacia) con el fin de reducir el CO<sub>2</sub> en contacto con el gel evitando la tendencia del gradiente a desplazarse hacia la región básica (Ficha técnica 17047101PL, 2002; Amersham). Se aplicó una leve capa de agua desionizada (1-2mL) sobre la placa de electroforesis y se dispuso la guía milimetrada evitando la formación de burbujas. Adicionalmente, se aplicó una capa de agua desionizada sobre la guía milimetrada y se posicionó cuidadosamente el gel de poliacrilamida sobre dicha superficie, evitando la

formación de burbujas. Las tiras de electrodo fueron cortadas de acuerdo a la longitud exacta del gel, empapadas uniformemente con 3mL de una solución de NaOH 1M (tira correspondiente al cátodo) y una solución de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1M (tira correspondiente al ánodo). Las condiciones de corrido se encuentran descritas en la Tabla 4-1. Se evitó la formación de condensación sobre la cobertura de la cámara mediante chequeos periódicos cada 10-20 minutos con el propósito de evitar corto circuitos.

**Tabla 4-1:** Condiciones de corrido empleadas para la separación de isoformas proteolíticas en geles de poliacrilamida (Tomado de Mikán, 2001).

	Voltios	Miliamperios	Vatios	Tiempo (min)	Observaciones
Precorrido	1000	8	8	30	Formación del gradiente de pH
Corrido I	2200	8	8	45	Siembra de muestras y marcador de pI sobre la superficie en el centro del gel, remoción de exceso de sal, y primer fase de movilización de proteínas (isoformas pequeñas)
Corrido II	2200	8	8	45	Segunda fase movilización de proteínas (isoformas grandes)
Focalización	3000	8	8	30	Completar la migración de aquellas proteínas que aun no han alcanzado su pI

#### 4.2.2 Determinación del punto isoelectrico de las proteínas

La sección del gel que contiene 10µL del marcador de proteínas (Broad range pI markers, Pharmacia) fue cortada y fijada por 60 minutos en una solución ácido tricloroacetico (TCA) (Merck) al 10%(p/v), 5-ácido sulfosalicílico (Carlo Erba) al 5%(p/v) y metanol al 40%(v/v). Luego se realizó un lavado por 20 minutos en una solución etanol (Merck) al 40%(v/v) y ácido acético (J. T. Baker) al 10%(v/v), y luego se equilibró el gel por 10 minutos en la solución decolorante [etanol al 30%(v/v), y ácido acético al 8%(v/v)]. Los marcadores fueron teñidos por 15 minutos en azul *Coomassie* R-250 (Sigma) al 0.5%(p/v) disuelto en la solución decolorante y precalentado a 60°C. Finalmente, el gel se sometió a lavados sucesivos en la solución de decoloración hasta obtener un fondo claro. Para la estimación del punto isoelectrico se determinó la distancia de cada marcador pI al cátodo

y se graficó contra su correspondiente  $pI$  (Anexo E). Una vez obtenida la gráfica, se realizó una conversión de la distancia al cátodo de las proteínas de interés, reveladas mediante zimogramas, a punto isoeléctrico ( $pI$ ) mediante el empleo de la ecuación de la curva.

### 4.2.3 Zimogramas

La actividad proteolítica en gel se detectó mediante el método de Peyronel y Cantera (1995), incubando el gel de proteínas post-isoelectroénfoque en una solución de azocaseína (Sigma) al 1.5%(p/v) disuelta en tampón bicarbonato de sodio 0.1M pH 8.3 a 45°C por 60 minutos en baño María. Posterior a la incubación se realizó un lavado con agua desionizada por 1 minuto, y se fijó el gel en una solución de TCA al 12.5%(p/v) a 45°C por 60 minutos. De nuevo se efectuó un lavado con agua desionizada por 1 minuto para luego revelar las zonas claras de hidrólisis en un fondo naranja oscuro sumergiendo el gel en una solución NaOH 1N.

Igualmente, se realizaron algunas modificaciones al método anteriormente descrito sobreponiendo el gel de proteínas post-isoelectroénfoque con un gel sustrato compuesto de gelatina comercial o albumina de suero bovino al 0.1%(p/v), disuelta en tampón bicarbonato de sodio 0.1M pH 8.3 y agarosa (Sigma) al 1.5%(p/v). La mezcla del *overgel* fue sometida a baño María con agitación constante hasta que la agarosa y la gelatina, o la albumina, estuvieran disueltas por completo, para luego empacarla en un casete de vidrios precalentados con espaciadores de 0.75mm. Se permitió la formación del gel a temperatura ambiente por lo menos durante una hora. El gel sustrato fue superpuesto evitando la formación de burbujas y asegurando un contacto estrecho con el gel de interés. Luego de incubar a 45°C por 30 minutos, el gel sustrato fue retirado y fijado en una solución etanol al 40%(v/v), ácido acético al 10%(v/v) disueltos en agua destilada por 60 minutos. El gel fue teñido empleando la coloración azul *Coomassie* enunciada en la Sección 4.2.2, hasta que se visualizaran zonas claras de hidrólisis en el gel.

## 4.3 Proceso de purificación enzimática

### 4.3.1 Precipitación de proteínas a partir del extracto crudo mediante fraccionamiento con sulfato de amonio

Se realizaron fermentaciones microbiológicas tendientes a la obtención de 1L de extracto crudo para el morfotipo seleccionado dado su desempeño proteolítico sobre azocaseína soluble y sobre IEF analítico, siguiendo la metodología descrita en la Sección 4.1.2. El extracto crudo fue equilibrado a 0°C en baño con hielo antes de iniciar el procedimiento. La precipitación total de proteínas fue llevada a cabo siguiendo el método descrito por Scopes (1982) mediante la adición gradual de sulfato de amonio de alta pureza (DBH) con agitación suave hasta alcanzar el 85%(p/v) de saturación a 0°C (559g de sulfato de amonio/litro de solución), ajustando el pH a 7.0 con NH<sub>4</sub>OH de ser necesario. Luego, se permitió la equilibración de la mezcla por 30 minutos antes de efectuar la centrifugación a 11000rpm por 10 minutos en una centrifuga pre-enfriada a 0°C. El sobrenadante fue descartado y el precipitado empleado para el fraccionamiento.

Se preparó una solución saturada al 65(p/v) y 35%(p/v) de sulfato de amonio para un volumen equivalente a 1/10 del volumen del extracto crudo inicial. La sal fue adicionada gradualmente con agitación constante hasta alcanzar el punto de saturación deseado ajustando el pH a 7.0 con NH<sub>4</sub>OH a 0°C de ser necesario. El *pellet* proveniente de la precipitación total de proteínas fue diluido en la solución de sulfato de amonio al 65%(p/v), permitiendo la equilibración de la mezcla por 30 minutos antes de efectuar la centrifugación a 11000rpm por 10 minutos en una centrifuga pre-enfriada a 0°C. El sobrenadante resultante fue recuperado y conservado a 0°C, y el precipitado fue resuspendido en la solución de sulfato de amonio al 35%(p/v), equilibrando y centrifugando nuevamente. El sobrenadante obtenido fue de nuevo conservado y el precipitado fue resuspendido en tampón fosfato de potasio 2mM pH 7.42 manejando la misma relación de volumen que las soluciones anteriores. Los sobrenadantes obtenidos fueron dializados contra tampón fosfato de potasio 2mM pH 7.42 a 4°C por 48 horas bajo agitación suave con recambios frecuentes de tampón de diálisis (cada 2-3 horas). Finalmente, los volúmenes obtenidos de la diálisis fueron liofilizados y analizados en cuanto a concentración de proteínas y actividad proteolítica sobre azocaseína soluble

siguiendo los procedimientos enunciados en la Sección 4.1.2, con el fin de identificar la fracción en la que se encontraba mayoritariamente la proteasa de interés.

### **4.3.2 Cromatografía de intercambio aniónico en columna**

La proteasa alcalina fue purificada hasta la homogeneidad empleando un sistema de Cromatografía Líquida de Doble Flujo para Proteínas (FPLC, BioRad), y una resina de intercambio aniónico (DEAE-sefarosa de rápido flujo), con base en la metodología empleada por Cruz (2008). La resina fue completamente regenerada y empacada en una columna de 35cm X 2cm, alcanzando un volumen de empaque de aproximadamente de 35mL. La resina fue equilibrada realizando lavados sucesivos con tampón de inicio [tampón fosfato de potasio 25mM pH 8.9 (Anexo F)] a una tasa de flujo de 3mL/min alcanzando ~25psi. Todo el procedimiento cromatográfico se llevó a cabo a temperatura ambiente manejando una tasa de flujo constante de 2mL/min alcanzando ~15psi, recolectando muestras de 2 mL/min /tubo.

La muestra de proteínas liofilizada correspondiente al sobrenadante de la fracción saturada con sulfato de amonio al 35%(p/v) (Sección 4.3.1) (fracción en la que se recuperó mayoritariamente la proteasa alcalina de interés) fue re-suspendida en 1mL de tampón de inicio alcanzando una relación de concentración respecto del extracto crudo inicial de 1/1000. Se emplearon las siguientes fases de corrido: (i) Equilibrar la resina con 2 volúmenes de columna (CV) de tampón de inicio; (ii) Disponer 500µL de muestra en el *loop* de carga del equipo y arrastrar hacia la resina con 0.5CV de tampón de inicio; (iii) Eluir las proteínas no retenidas en la matriz con 2CV de tampón de inicio; (iv) Eluir las proteínas retenidas en la matriz empleando 2CV de un gradiente lineal de sal de 0 a 1M NaCl disuelto en tampón de inicio. Finalmente, se reunieron los volúmenes de las fracciones bajo los picos, según correspondiese, con base en el cromatograma que el equipo recrea en la computadora mediante el análisis continuo del pH, la absorbancia a 280nm, y la conductividad de la muestra una vez ha pasado por el intercambiador iónico. El *pool* de proteínas eluidas mediante el empleo del gradiente lineal de sal fue sometido a diálisis contra tampón fosfato de potasio 2mM pH 7.42 por 24 horas a 4°C. Las muestras de proteína fueron concentradas mediante liofilización, resuspendidas en 500µL de agua desionizada, y sometidas a análisis en cuanto a concentración de proteínas y actividad

proteolítica sobre azocaseína siguiendo los procedimientos enunciados en la Sección 4.1.2, con el fin de identificar el pool en el que se encontraba la proteasa alcalina de interés.

## **4.4 Proceso de caracterización enzimática**

### **4.4.1 Electroforesis desnaturalante reductiva en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Se utilizó el método de tampón discontinuo de Laemmli (1970) en geles de poliacrilamida para observar la pureza y las propiedades de las proteínas obtenidas a lo largo del proceso de producción y purificación enzimática mediante el empleo de aditivos y métodos de tinción específicos. El gel de separación consistió de tampón Tris-HCl 0.375M pH 8.8, acrilamida-Bis acrilamida T12 – C2.6, SDS al 10%(p/v) y glicerol, y se empacó en el sistema modular Mini-Protean (Bio-Rad) en espaciadores de 0.75mm. Una vez el gel de separación estuvo completamente polimerizado, se prosiguió a la preparación del gel de concentración compuesto de tampón Tris-HCl 0.125M pH 6.8, acrilamida-Bis T3.7 – C2.45, y SDS al 10%(p/v). Se inició la polimerización de los geles mediante el empleo de persulfato de amonio al 10%(p/v) (APS, Sigma) y N, N, N', N'-tetraetilmetilendiamina al 10%(v/v) (TEMED, Sigma). La preparación de los componentes utilizados durante la formulación de las soluciones está descrita en el Anexo G, y las proporciones y el orden de mezcla están enunciados en el Anexo H.

Luego de ensamblar el casete y determinar el volumen de gel de separación requerido para dejar un centímetro de gel de concentración en la parte superior del dispositivo, se preparó y empacó la solución de monómeros correspondiente al gel de separación, e inmediatamente después se dispuso una fina capa de agua desionizada sobre la mezcla permitiendo la polimerización anóxica del gel a temperatura ambiente por una hora. Finalmente, la capa de agua desionizada fue retirada y la solución correspondiente al gel de concentración fue dispuesta en el dispositivo (sobre el gel de separación) ubicando la peinilla de 10 pozos en la parte superior del casete.

El tampón de carga estaba compuesto de Tris-HCl 0.08 M pH 6.8, SDS al 10%(p/v), glicerol al 12.5%(v/v) y azul de bromofenol al 0.002%(v/v). Como agente reductor de los enlaces bisulfuro en las proteínas se empleó  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma) en una relación de 50:1000 volúmenes de tampón de carga, y ditioneitol al 1.5%(p/v). La mezcla fue preparada como se muestra en el Anexo G, y el volumen obtenido fue alicuotado y congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$ . La mezcla de tampón de carga con muestra de proteínas dependió básicamente de la cantidad en masa de proteína requerida para abordar los métodos de tinción. Como regla general se buscó ajustar la cantidad de proteína a 800-1000ng/pozo para tinción con azul Coomassie, y a 50-250ng/pozo para tinción con plata. La mezcla fue pre-calentada a  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos empleando un termociclador (Mastercycler, Eppendorf) para lograr una desnaturación completa de la muestra. Finalmente, la mezcla se aplicó en forma homogénea sobre su pozo correspondiente y se corrió a 25mA en los pozos, 16mA en el gel de concentración y 8mA en el gel de separación, hasta que el frente de corrido alcanzó la base de este último gel (generalmente 2-3 horas).

Las proteínas separadas fueron reveladas mediante tinción con plata manejando el método descrito por Rabilloud *et al* (1988), o mediante coloración con azul *Coomassie* R-250 (Sigma). Para la estimación del peso molecular relativo de las proteínas se determinó, en el gel de separación, la distancia de corrido (cm) de cada marcador de proteínas respecto del frente de corrido (Rfs), y se graficó el logaritmo de dicho valor contra el logaritmo del peso molecular teórico respectivo (Anexo I). Una vez obtenida la gráfica, se realizó una conversión de las Rfs de las proteínas de interés, a peso molecular relativo (kDa) mediante el empleo de la ecuación de la curva.

#### **4.4.2 Isoelectroénfoque analítico en geles de poliacrilamida**

Para la determinación del punto isoeléctrico de la proteasa purificada se manejó la misma metodología propuesta en la Sección 4.2.

#### **4.4.3 Efecto del pH en la actividad de la enzima purificada**

Se evaluó la actividad enzimática de la proteína purificada sobre azocaseína soluble al 1.5%(p/v) disuelta en los siguientes sistemas tampón [50mM] (Shankar *et al.*, 2011; Genckal y Tari, 2006; Adinarayana *et al.*, 2003): tampón Citrato (pH 5.0); tampón Fosfato

(pH 6.5); tampón Tris-Cl (pH 8.0 & 8.5); tampón Bicarbonato (pH 8.3); tampón Glicina-NaOH (pH 9.0 & 10.0); tampón Carbonato-Bicarbonato (pH 9.5). La formulación de los tampones enunciados con anterioridad se encuentra descrita en el Anexo J. Las reacciones fueron incubadas a 45°C por 45 minutos, tiempo después del cual se estimó la actividad de la enzima. Los ensayos se realizaron por triplicado y los datos resultantes fueron graficados para estimar el valor de pH en el que enzima presenta la actividad enzimática más alta.

#### **4.4.4 Efecto de la temperatura en la actividad de la enzima purificada.**

Se realizaron reacciones enzimáticas con la proteína purificada sobre azocaseína soluble al 1.5%(p/v) disuelta en tampón bicarbonato de sodio 0.1M pH 8.3 (pH óptimo) mediante incubación en baño María a 30°C, 37°C, 45°C, 52°C, 60°C, 70°C por un periodo de 45 minutos (Shankar *et al.*, 2011; Genckal y Tari, 2006; Adinarayana *et al.*, 2003). Los ensayos fueron realizados por triplicado y los datos resultantes fueron graficados para estimar la temperatura óptima en la que la enzima presenta la actividad enzimática más alta.

#### **4.4.5 Efecto de un quelante de iones divalentes sobre la actividad enzimática.**

Se determinó el efecto de un quelante de cationes divalentes (*ethylene diamine tetra acetic acid* [EDTA]) sobre la actividad enzimática de la proteína purificada, pre-incubando la enzima con el agente quelante 5mM a 4°C por 60 minutos (Savitha *et al.*, 2011; Adinarayana *et al.*, 2003). Luego, se efectuó la reacción enzimática sobre azocaseína soluble al 1.5%(p/v) disuelta en tampón bicarbonato de sodio 0.1M pH 8.3 (pH óptimo) + EDTA 5mM, incubando a 60°C (temperatura óptima) por 45 minutos. Se emplearon como controles de reacción proteinasa K (Sigma) [0.2µg/µL] y tripsina (Gibco) [0.5µg/µL]. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los datos resultantes fueron graficados para estimar el efecto del EDTA sobre la actividad enzimática.

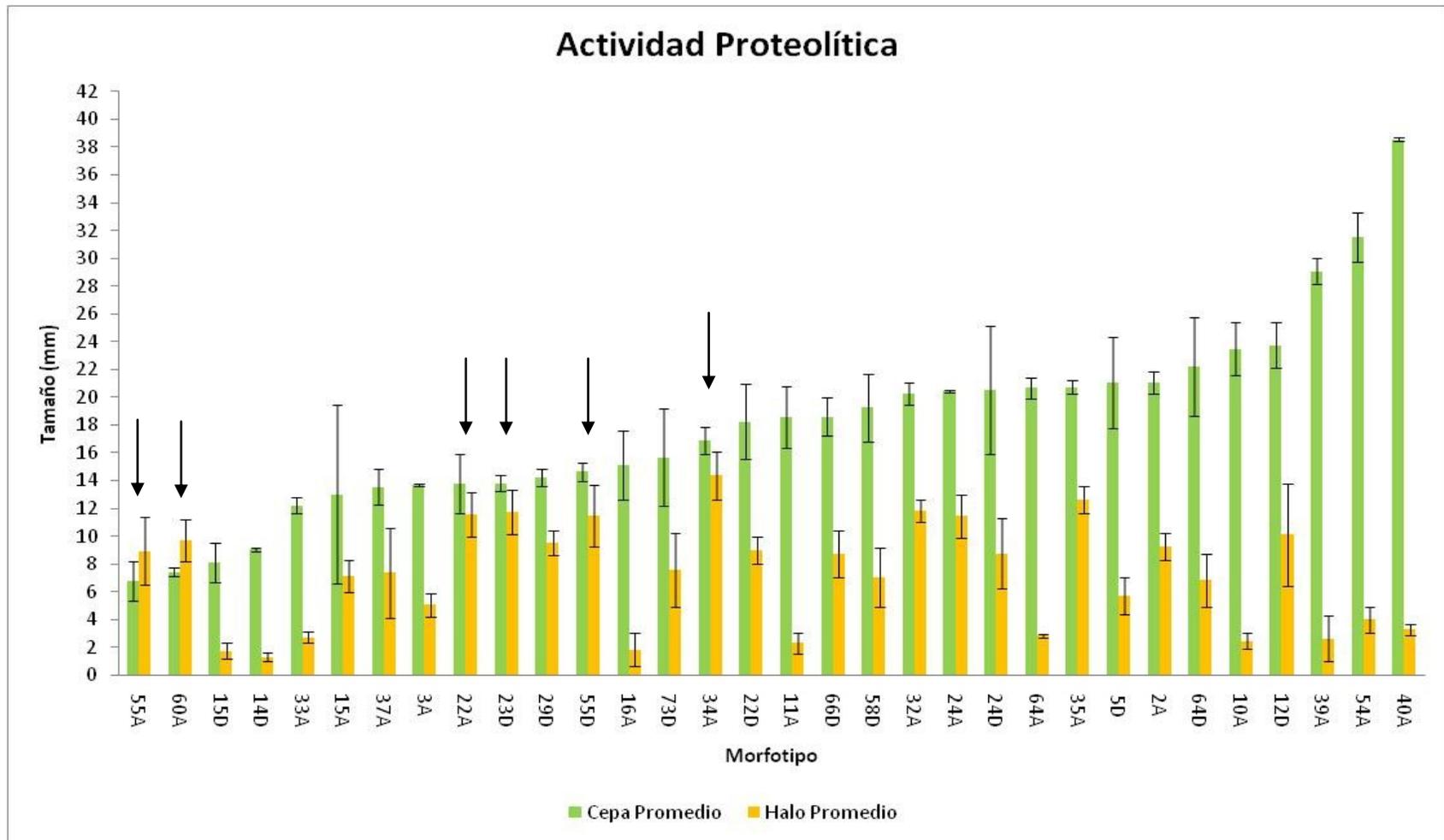
## **5. Resultados**

### **5.1 Selección de hongos proteolíticos promisorios sobre medios de cultivo sólidos**

Se evaluó la actividad proteolítica de 74 morfotipos viables provenientes del cepario institucional del Archivo de Bogotá mediante la inoculación de placas de agar Caseinato de Calcio, para la estimación de halos de hidrólisis que permitieran inferir el perfil proteolítico de cada morfotipo en la población de estudio. En la Figura 5-1 se observa el consolidado de los morfotipos viables que presentaron actividad proteolítica mediante la formación de halos de hidrólisis. De ellos, se seleccionaron los morfotipos cuyo tamaño del halo excedía, igualaba, o era ligeramente inferior al tamaño de la cepa (Tabla 5-1); esto con el objeto de optimizar el proceso de purificación y caracterización enzimática, bajo el supuesto de que a menor biomasa, menor fuente de proteínas y otros metabolitos contaminantes, y a mayor halo de hidrólisis, mayor producción de la enzima objeto de estudio.

Los morfotipos que fueron evaluados y no se encuentran representados en la Figura 5-1, representan aquellos que: (i) aunque presentaron crecimiento sobre las placas de agar Caseinato de Calcio no se evidenciaron halos de hidrólisis, posiblemente debido a la metabolización de otros componentes del medio de cultivo diferentes del sustrato inductivo, para la actividad enzimática objeto de estudio, indicando, en un plano preliminar, el carácter generalista o especialista de los hongos deteriorantes; (ii) dichos morfotipos presentaron baja esporulación durante la obtención de biomasa en placas de Sabouraud.

**Figura 5-1:** Actividad proteolítica en función del crecimiento microbiano para los 32 morfotipos que presentaron tanto viabilidad como actividad enzimática positiva (halo de hidrólisis evidente). Las flechas indican los morfotipos promisorios con mayor actividad proteolítica (halo de hidrólisis) en relación al tamaño de la cepa, en la población de estudio. A= ambiental; D=documental. Las barras muestran la desviación estándar del promedio de tres replicas  $\pm$  DS.



**Tabla 5-1:** Hongos proteolíticos promisorios seleccionados en el *screening* en placa. Nótese la prevalencia de hongos filamentosos ambientales promisorios. Los morfotipos proteolíticos documentales resaltados fueron seleccionados para la evaluación preliminar de actividades proteolíticas en medio líquido, en búsqueda de proteasas alcalinas promisorias.

	<b>Morfotipo</b>	<b>Genero</b>	
<b>Proteolíticos Promisorios</b>	22A	<i>Penicillium</i>	
	<b>Hongos Ambientales</b>	34A	<i>Stachybotrys</i>
	55A	NN	
	60A	NN	
<b>Hongos Documentales</b>	<b>23D</b>	<i>Penicillium</i>	
	<b>55D</b>	<i>Penicillium</i>	

A pesar de la prevalencia de hongos proteolíticos promisorios provenientes de muestreos ambientales, se prosiguió solo con los morfotipos de naturaleza documental debido a que este grupo de organismos está directamente relacionado con el biodeterioro sobre los soportes objeto de estudio. En ese sentido, se abordó el siguiente objetivo específico fundamentado en la producción y evaluación de actividades proteolíticas promisorias en medio líquido, para el grupo de hongos documentales seleccionados.

## 5.2 Selección de hongos proteolíticos promisorios sobre medios de cultivo líquidos

Los morfotipos 23D (*Penicillium* sp.) y 55D (*Penicillium* sp.) fueron cultivados en medios líquidos en tres fases de fermentación: obtención de biomasa, inducción a estrés nutricional e inducción de proteasas. Los extractos crudos resultantes fueron evaluados en cuanto al contenido de proteínas totales por el método de Bradford modificado, y a su actividad proteolítica sobre azocaseína soluble. En la Tabla 5-2 se reportan las actividades específicas (entiéndase por actividad enzimática específica a la razón existente entre la actividad de la enzima y la concentración de proteínas) para los extractos crudos

obtenidos tras las fermentaciones propuestas, destacándose la actividad enzimática específica del morfotipo 23D sobre la escasa actividad específica del morfotipo 55D.

**Tabla 5-2:** Determinación de la actividad proteolítica específica para los extractos crudos de los hongos promisorios (23D y 55D: *Penicillium* spp.). Se destaca la actividad específica reportada para el morfotipo 23D sobre la baja actividad específica encontrada en el morfotipo 55D. Se muestra el promedio de dos replicas  $\pm$  DS.

Muestra	Actividad Proteolítica (Ueq / $\mu$ L)	Concentración de proteínas ( $\mu$ g / $\mu$ L)	Actividad Específica (Ueq / mg proteína)
23D	0.0043 $\pm$ 0.04	2.3575 $\pm$ 0.05	1.8275
55D	0.0007 $\pm$ 0.03	2.9710 $\pm$ 0.05	0.2292

El extracto crudo del morfotipo 23D presentó una actividad proteolítica evidente y una alta concentración de proteínas, en comparación con el extracto crudo del morfotipo 55D que, aunque presentó una alta concentración de proteínas, no reflejó una actividad enzimática evidente tras el método evaluado. Este último evento, incongruente con los resultados obtenidos en el *screening* en placa en donde se evidenció actividad proteolítica positiva para este morfotipo, se pudo ver explicado por: (i) silenciamiento de factores de transcripción que intervienen en la expresión de genes implicados con la catálisis de proteínas extracelulares para la obtención de aminoácidos esenciales y péptidos de menor complejidad; (ii) cambios fenotípicos como consecuencia de la naturaleza sólida o líquida del medio de cultivo.

### 5.3 Revisión de perfiles isoenzimáticos para proteasas alcalinas de hongos filamentosos promisorios

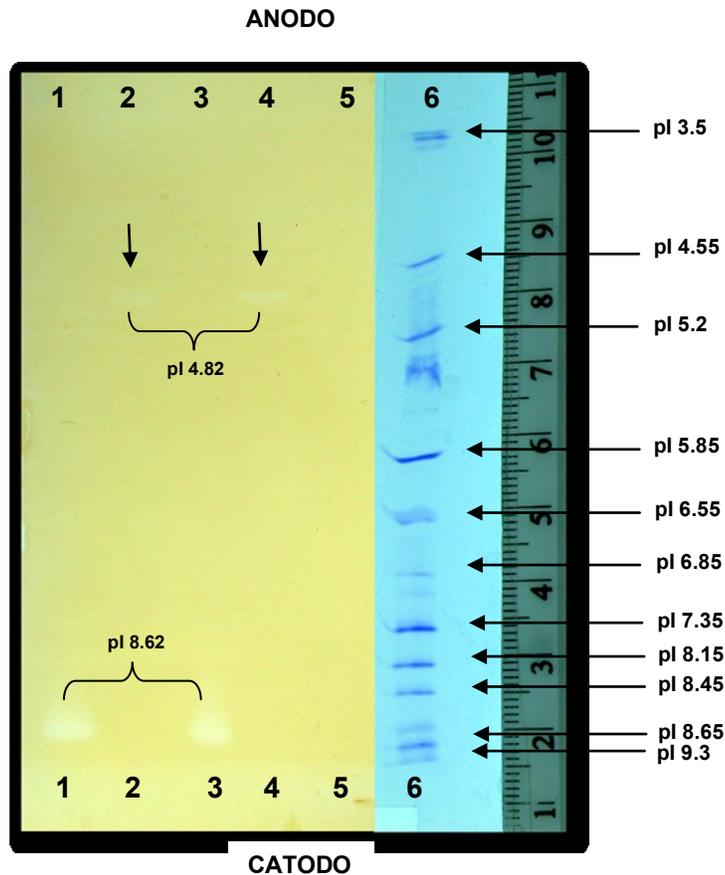
Se prosiguió con la determinación preliminar del perfil isoenzimático para proteasas en el extracto crudo del morfotipo 23D, con el objeto de observar el número y la distribución de isoformas existentes en un gradiente de pH establecido con base en su punto isoeléctrico ( $pI$  = valor de pH en el que la proteína tiene una carga eléctrica neta igual a cero). Esto lo que finalmente permite es: (i) Identificar el carácter generalista o especialista del hongo

evaluado para una actividad enzimática específica, siendo generalista aquel hongo que presenta numerosas isoformas a lo largo del gradiente de pH o hacia pHs específicos (alcalinos o ácidos) (pH 3.0 a 10.0), y especialista aquel que presenta pocas isoformas distribuidas a lo largo del gradiente o hacia un pH específico (Cruz, 2008); (ii) Seleccionar la isoforma de interés a purificar y caracterizar con base en los objetivos del estudio.

Del isoelectroénfoque se observó una isoforma proteolítica evidente hacia el rango ácido de pH ( $pI = 4.81$ ), tal y como se observa en la Figura 5-2. De este gel analítico se pudo inferir que el hongo filamentoso 23D es posiblemente un hongo especialista en la catálisis de proteínas sobre documentos en ambientes ácidos. Los resultados obtenidos para este morfotipo son promisorios debido a que la ocurrencia de una sola isoforma hacia el extremo ácido de pH no solo facilitaría su proceso de purificación tanto en términos económicos como en tiempo de ejecución, sino que también genera alternativas en el campo de la restauración de documentos y obras de arte, por ejemplo, para la remoción de adhesivos de origen animal bajo condiciones ácidas (propias de los documentos deteriorados).

Sin embargo, teniendo en cuenta el objetivo principal de este trabajo de investigación, consistente en la búsqueda de una proteasa alcalina activa y estable en condiciones básicas de pH, (recordemos que, en su mayoría, los procesos de restauración del acervo documental se llevan a cabo bajo condiciones alcalinas), se siguieron aunando esfuerzos que permitiesen identificar dichas proteasas alcalinas en los demás hongos filamentosos “documentales” que mostraron actividad proteolítica evidente en el *screening* en placa descrito en la Figura 5-1: Morfotipos **12D** (*Stachibotrys*), **22D**, **29D**, **64D**, **66D** y **73D** (*Penicillium* spp.). Igualmente, y en vista de la situación, se decidió corroborar la presencia de proteasas básicas de dos hongos filamentosos seleccionados en un trabajo previo en el Archivo de Bogotá en el periodo comprendido entre el año 2007-2008, conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$  en estado de biomasa congelada: Morfotipos **8D** (*Chaetomium*), y **21D** (*Eladia saccula*) (Rojas *et al.*, 2009; Cruz, 2008; Rojas, 2007).

**Figura 5-2:** Zimograma mediante inmersión en azocaseína para el extracto crudo del morfotipo 23D (*Penicillium*). **(2 y 4)** Réplicas extracto crudo morfotipo 23D [2.36µg/µL] (volumen de siembra de izquierda a derecha, respectivamente: 2µL y 4µL); **(1 y 3)** Réplicas control positivo actividad enzimática Proteinasa K (Merck) [0.2µg/µL] (volumen de siembra de izquierda a derecha, respectivamente: 2µL y 1µL); **(5)** 2µL Control negativo universal tampón fosfato de sodio 25mM pH 7.0; **(6)** 10µL Marcador pl de amplio rango (Amersham). Se destaca la isoforma resultante para el morfotipo 23D con pl de 4.81 (rango ácido de pH).



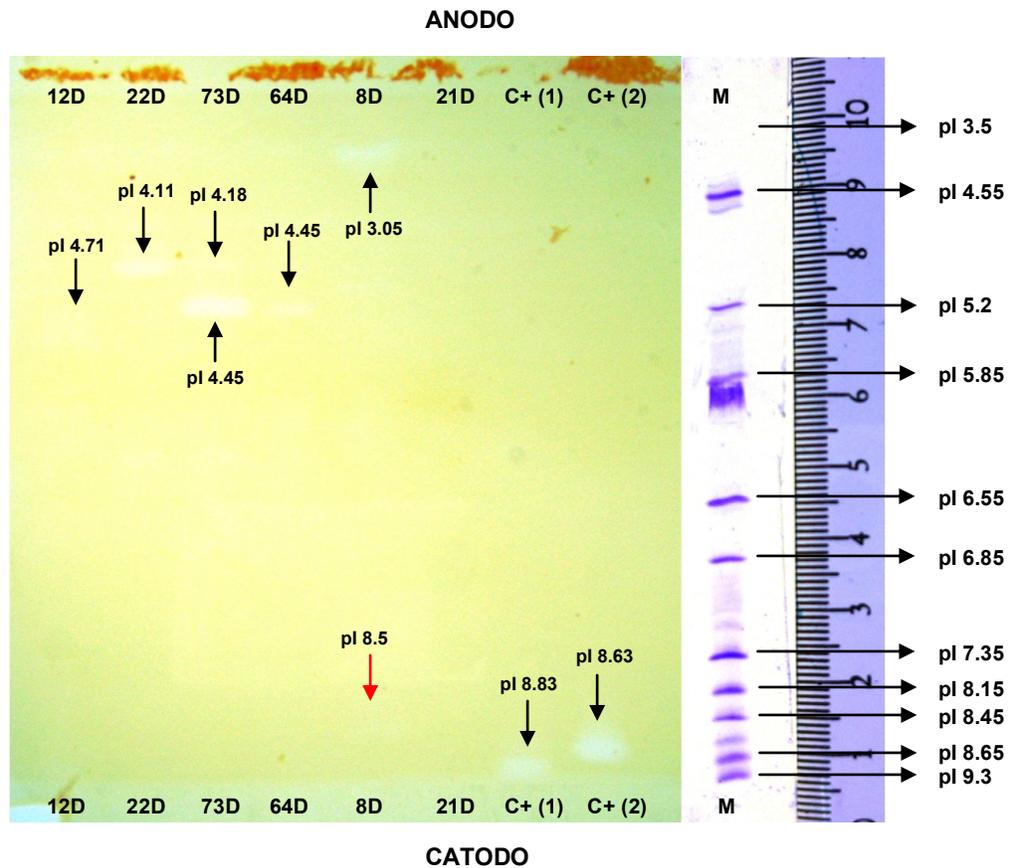
En consecuencia, se obtuvieron los extractos crudos (~30mL/morfotipo) para los ocho morfotipos mencionados con anterioridad bajo el mismo esquema metodológico empleado hasta el momento. Dichos extractos fueron dializados contra agua desionizada por 2 días a 4°C con el objeto de eliminar el exceso de sales que pudiesen interferir durante la ejecución del isoelectroénfoque. Posteriormente las muestras fueron concentradas mediante liofilización por 1-2 días, resuspendidas en 1/100 del volumen inicial con agua desionizada, y analizadas cualitativamente [es decir, a mayor color, mayor actividad enzimática (amarillo) y mayor concentración de proteínas (azul)] en cuanto actividad

enzimática sobre azocaseína soluble y concentración de proteínas totales mediante el método de Bradford modificado (ver Anexo K). Se destaca la actividad proteolítica evidente en siete de los ocho morfotipos evaluados, exceptuando el morfotipo 21D (*E. saccula*) que refleja una disminución considerable en su actividad proteolítica respecto de lo reportado por Rojas y colaboradores (2009) posiblemente debido al estrés ocasionado por el método de conservación, y a la carencia de condiciones de cultivo selectivas más fuertes que buscaran eliminar el silenciamiento génico por regulación de factores de transcripción durante el proceso de producción de las proteasas de interés.

Posteriormente, se desarrollaron isoelectroénfoques analíticos en geles de poliacrilamida con el fin de observar las isoformas para proteasas evidentes en las regiones ácidas o básicas de pH. La Figura 5-3 muestra las isoformas resultantes para seis de los ocho morfotipos evaluados: 12D, 22D, 73D, 64D, 8D, y 21D. Como se observa, se siguen presentando isoformas proteolíticas en el rango ácido de pH, a excepción quizás del morfotipo 8D que parece mostrar una isoforma muy tenue hacia el extremo alcalino de pH. Se destaca que el morfotipo 21D no presentó ninguna isoforma evidente en el gel, como era de esperarse, demostrando una vez más que requiere de condiciones selectivas más fuertes para lograr recuperar la producción de proteasas alcalinas que este hongo altamente promisorio mostró en el pasado.

Se desarrollaron nuevos ensayos de zimografía para los extractos crudos de los dos morfotipos restantes (29D y 66D: *Penicillium* spp.) mediante la superposición de *overgeles* (geles de agarosa al 1.25%(p/v) suplementados con sustratos proteicos específicos como caseína, gelatina, albumina, etc.) sobre los geles de IEF una vez concluido el corrido electroforético (Cruz, 2008). Este cambio metodológico buscó mayor visibilidad de las isoformas que se observaban tenues en los ensayos de zimografía mediante inmersión del gel en una solución de azocaseína. En la Figura 5-4 se presentan las isoformas proteolíticas resultantes para los morfotipos 29D y 66D en donde se manifestó más claramente la “tendencia” microbiana hacia la secreción de isoformas ácidas. Se destacan la resolución y claridad de las isoformas obtenidas en el registro fotográfico.

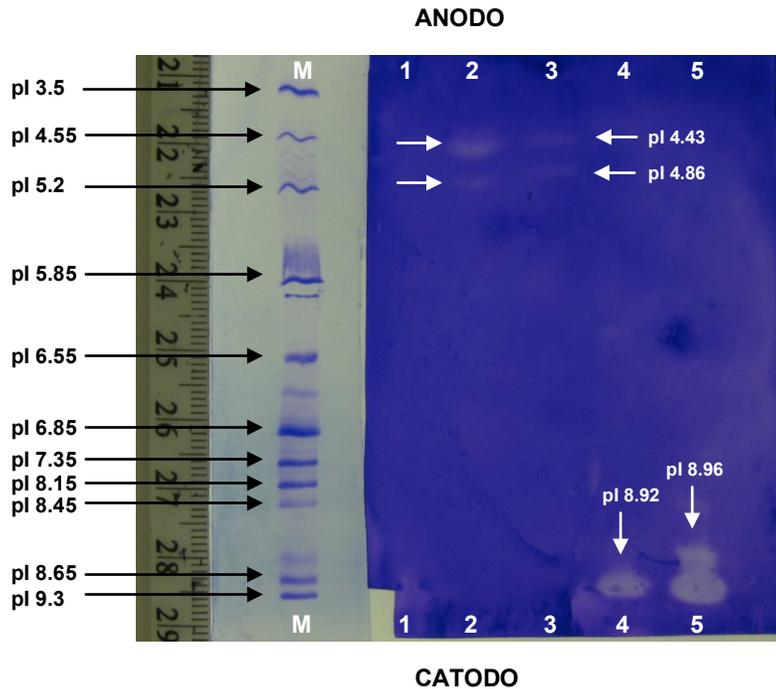
**Figura 5-3:** Zimograma mediante inmersión en azocaseína para los extractos crudos de los morfotipos: **(12D)** *Stachybotrys*; **(22D)**, **(73D)** y **(64D)** *Penicillium* spp.; **(8D)** *Chaetomium*; **(21D)** *E. saccula*. En todos los casos se sembraron 5µL de muestra. **(C+ 1)** 2µL Control positivo Extracto *E. saccula* 2008 \* [0.013µg/µL]; **(C+ 2)** 1.5µL Control positivo Proteinasa K (Sigma) [0.2µg/µL]; **(M)** 10µL Marcador pl de amplio rango (Amersham). Las flechas indican la presencia de isoformas evidentes en el gel de poliacrilamida. Se destaca la presencia totalitaria de isoformas proteolíticas hacia la región ácida de pH para todos los morfotipos evaluados. Sin embargo, se presume de la existencia de una isoforma alcalina tenue para el morfotipo 8D (Flecha roja).



(\*) Extracto crudo de *Eladía saccula* (alicutado y conservado a -70°) positivo para actividad proteolítica sobre azocaseína soluble, obtenido por Cruz (2008).

Debido a la prevalencia de isoformas proteolíticas hacia el rango ácido de pH en los hongos evaluados, y teniendo en cuenta los objetivos de esta investigación, se decidió someter a presión selectiva a aquellos morfotipos que en estudios previos (Rojas *et al.*, 2009) habían presentado, de una u otra manera, isoformas alcalinas promisorias y que por diversas razones (estrés fisiológico por el método de conservación, represión catabólica, etc.) han dejado de sintetizarlas.

**Figura 5-4:** Zimograma mediante *overgel* con gelatina al 0.1% (p/v) para los extractos crudos de los morfotipos (29D) y (66D): *Penicillium* spp. De izquierda a derecha: (M) 10μL Marcador pl de amplio rango (Amersham); (1) 2μL Control negativo agua desionizada; (2) 5μL Extracto crudo 29D; (3) 5μL Extracto crudo 66D; (4) 2μL Control positivo Extracto *E. saccula* 2008 [0.013μg/μL]; (5) 1.5μL Control positivo Proteinasa K (Sigma) [0.2μg/μL]; Las flechas indican la presencia de isoformas evidentes en el gel de poliacrilamida. Se destaca la presencia totalitaria de isoformas proteolíticas hacia la región acida de pH para los dos morfotipos evaluados (2 isoformas / morfotipo).



En consecuencia, se iniciaron cultivos líquidos sucesivos (3 sub-cultivos / morfotipo) con Extracto de Carne al 0.1%(p/v) como única fuente de carbono y nitrógeno, bajo condiciones alcalinas (pH 8.0), para los siguientes morfotipos: **8D** *Chaetomium*, **12D** *Stachybotrys*, y **21D** *E. saccula*, con el fin de reactivar el gen o los genes involucrados en la síntesis de proteasas básicas que se hubiesen silenciado después de introducir los morfotipos al cepario, bajo el supuesto de que los hongos se verían forzados a crecer a expensas de la fuente exógena de energía (extracto de carne), para lo que deberían producir y secretar proteasas al medio que les permitiesen catabolizar dichos compuestos y sobrevivir.

Cada sub-cultivo fue incubado a 28°C por 8 días con una agitación constante de 150rpm. Luego del tercer sub-cultivo se inició el esquema de producción de proteasas bajo tres

fases de fermentación: obtención de biomasa, inducción a estrés nutricional e inducción de proteasas, tal y como se venía haciendo hasta el momento. La selección de los morfotipos evaluados obedeció a que: (i) el morfotipo 8D había mostrado una isoforma proteolítica alcalina leve en ensayos analíticos anteriores; (ii) el morfotipo 12D era un hongo que, aunque en zimogramas anteriores había mostrado solo una isoforma proteolítica ácida, ha sido ampliamente descrito sobre soportes documentales por lo que era importante considerarlo; (iii) el morfotipo 21D no solo había presentado un alto potencial para la producción de una proteasa alcalina extracelular extrema susceptible de patente en trabajos previos (Rojas *et al.*, 2009), sino que además era novedoso en el campo del biodeterioro documental.

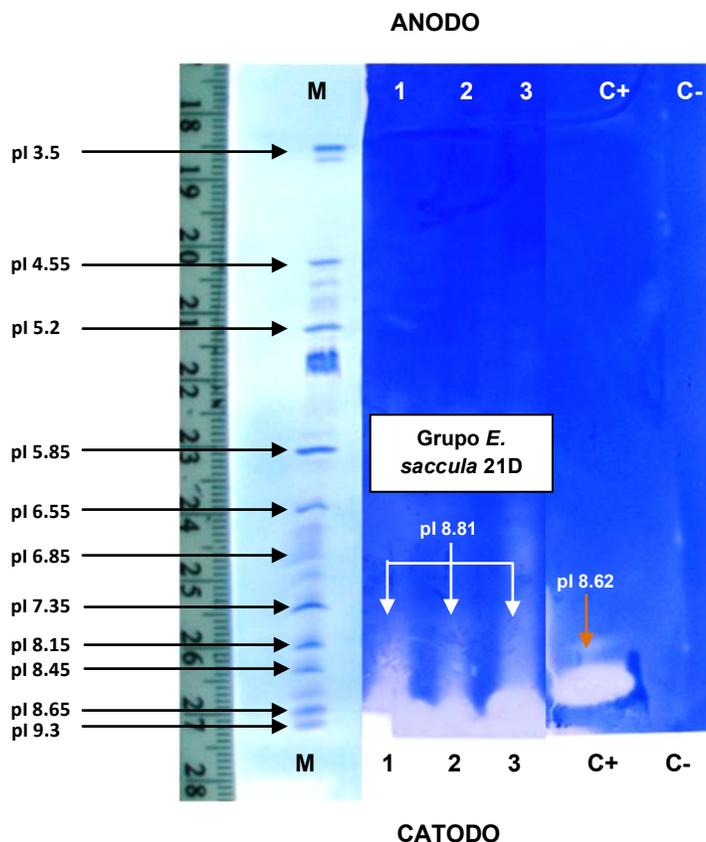
Durante el desarrollo de los cultivos líquidos se observó un crecimiento microbiano “evidente” para todos los hongos seleccionados, infiriéndose por consiguiente que dichos microorganismos estaban haciendo uso de sus complejos sistemas enzimáticos (proteasas) para asimilar el sustrato que se les había suministrado, y en consecuencia se podía esperar la presencia de diversas isoformas proteolíticas en los geles de isoelectroénfoque. Finalmente, se procedió con la estimación de las actividades proteolíticas y la concentración de proteínas para los extractos crudos obtenidos en el último ciclo de fermentación, luego de haber dializado y concentrado mediante liofilización. En la Tabla 5-3 se reportan las actividades específicas resultantes para los extractos crudos evaluados, destacándose la actividad proteolítica evidente en los tres morfotipos objeto de estudio.

**Tabla 5-3:** Actividad proteolítica específica para los extractos crudos concentrados de los hongos promisorios **8D** *Chaetomium*, **12D** *Stachybotrys*, y **21D** *E. saccula*, sometidos a presión selectiva continuada. Se muestra el promedio de tres replicas  $\pm$  DS.

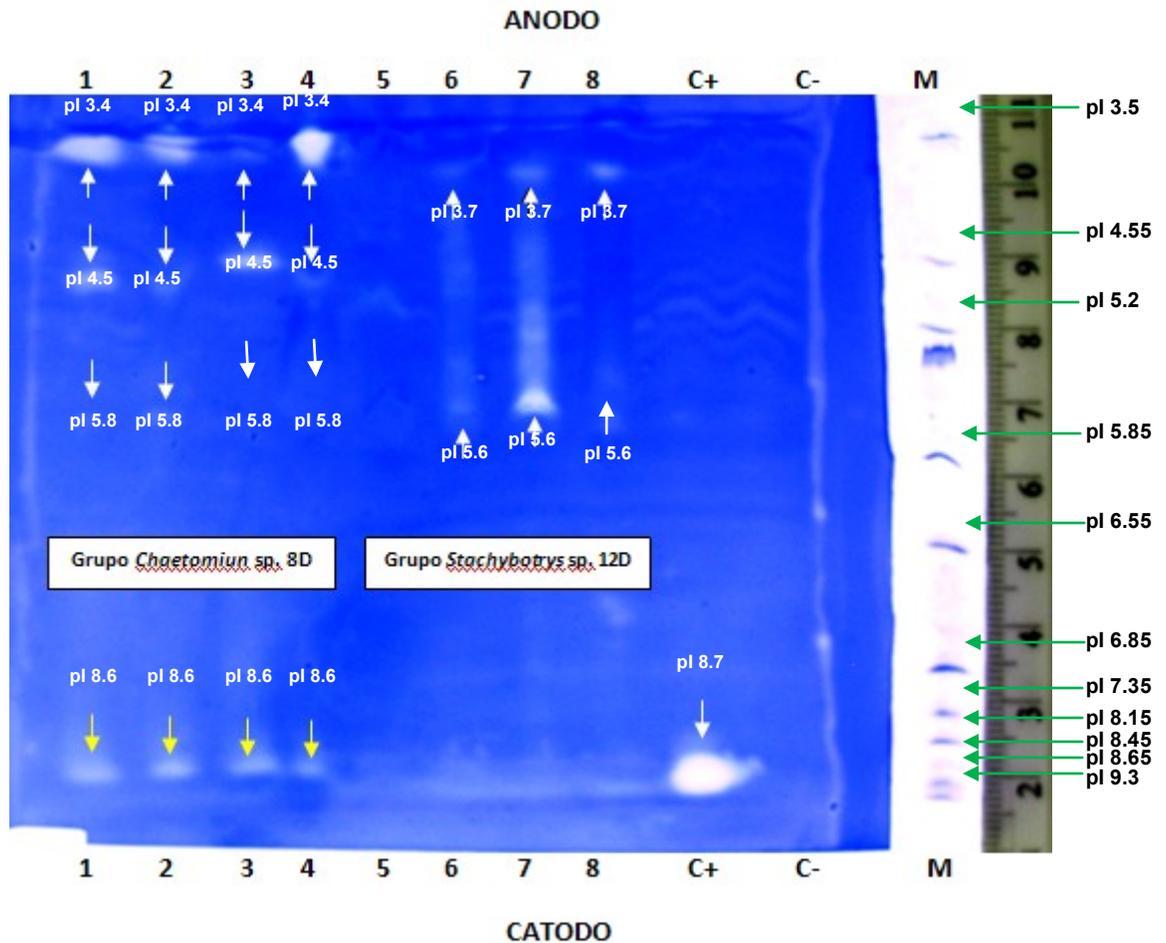
Muestra	Actividad Proteolítica (Ueq / $\mu$ L)	Concentración de proteínas ( $\mu$ g / $\mu$ L)	Actividad Específica (Ueq / mg proteína)
8D	0.0226 $\pm$ 0.09	1.4844 $\pm$ 0.02	15.2268
12D	0.0379 $\pm$ 0.09	2.7753 $\pm$ 0.07	13.6546
21D	0.0371 $\pm$ 0.06	1.0854 $\pm$ 0.04	34.2217

Los análisis de isoelectroénfoque permitieron dilucidar la recuperación y/o “amplificación” de la expresión de proteasas hacia la región alcalina de pH en dos de los géneros evaluados: *Chaetomiun* y *Eladia*. Las Figuras 5-5 y 5-6 revelan el perfil isoenzimático obtenido para las muestras en mención. En la Figura 5-5 se observan las isoformas resultantes para el morfotipo 21D (*E. saccula*) por triplicado, resaltándose la presencia de una sola isoforma proteolítica extrema de pI=8.8. En contraste, en la Figura 5-6 se observa el perfil isoenzimático resultante para los morfotipos 8D (*Chaetomiun*), y 12D (*Stachybotrys*), con 4 y 3 réplicas, respectivamente. Se destaca la presencia de 4 isoformas evidentes para el género *Chaetomiun* (pIs: 3.4, 4.5, 5.8 y 8.6), y dos isoformas ácidas evidentes para el género *Stachybotrys* (pIs: 3.7 y 5.6).

**Figura 5-5:** Zimograma mediante *overgel* de Albumina de Suero Bovino BSA al 0.1%(p/v) para el extracto crudo del morfotipo 21D (*E. saccula*), proveniente de cultivos líquidos sucesivos sometidos a presión selectiva continuada. **(M)** 10µL Marcador pI de amplio rango (Amersham); **(1-3)** De izquierda a derecha: 1µL, 1.5µL y 2µL Extracto crudo 21D [1.08µg/µL]; **(C+)** 1.5µL Control positivo Proteinasa K (Sigma) [0.2µg/µL]; **(C-)** 2µL Control negativo agua desionizada. Nótese la recuperación de una sola isoforma proteolítica extrema de pI=8.8 (flechas blancas) para el morfotipo 21D.



**Figura 5-6:** Zimograma mediante *overgel* de Albumina de Suero Bovino BSA al 0.1%(p/v) para el extracto crudo de los morfotipos 8D (*Chaetomiun*), y 12D (*Stachybotrys*), proveniente de cultivos líquidos sucesivos sometidos a presión selectiva continuada. (1-4) De izquierda a derecha: 2µL, 1.5µL, 1µL, 1.5µL extracto crudo 8D [1.48µg/µL]; (5) Espaciador; (6-8) De izquierda a derecha: 0.5µL, 2µL, 1µL extracto crudo 12D [2.77µg/µL]; (C+) 1.5µL Control positivo Proteinasa K (Sigma) [0.2µg/µL]; (C-) 2µL Control negativo agua desionizada; (M) 10µL Marcador pl de amplio rango (Amersham). Las flechas indican la ubicación de isoformas evidentes a lo largo del gradiente de pH. Se destaca la presencia de una isoforma extrema en el rango alcalino de pH de pl=8.6 para el morfotipo 8D (Flechas amarillas).



Con el objetivo de purificar y caracterizar parcialmente una proteasa alcalina extrema, a partir de fermentaciones de mayor volumen, se seleccionó el perfil isoenzimático alcalino del morfotipo 21D (*E. saccula*) sobre el perfil del morfotipo 8D (*Chaetomiun*), debido a que: (i) La presencia de una sola isoforma “alcalina” extrema facilitaba el proceso de purificación mediante cromatografía de intercambio iónico, reduciendo las probabilidades de contaminación cruzada con otras proteínas residuales reduciendo la resolución y calidad del método; (ii) El desarrollo de biomasa durante los cultivos líquidos era

cualitativamente menor en contraste con su homólogo 8D, lo que facilitaba los procesos de recuperación del extracto crudo mediante filtración; (iii) El morfotipo 21D (*E. saccula*) ha sido escasamente reportado en el campo del biodeterioro documental, en contraste con su homólogo 8D que ha sido ampliamente reportado como agente biodeteriorante.

## 5.4 Proceso de purificación enzimática

La biomasa resultante de los cultivos líquidos bajo presión selectiva para el morfotipo 21D (*E. saccula*), fue empleada para inocular placas de Extracto de Carne al 0,1%(p/v) como única fuente de carbono y nitrógeno, bajo condiciones alcalinas (pH 8.0), para la obtención de inóculos microbianos. Los medios fueron incubados a 28°C por 15 días debido al desarrollo rezagado del hongo dada la especificidad del sustrato. Posteriormente, se produjo aproximadamente 1L de extracto crudo mediante cultivos líquidos en tres fases de fermentación: crecimiento, inducción a estrés nutricional e inducción de proteasas. El extracto crudo resultante fue sometido a fraccionamiento mediante la adición gradual de sulfato de amonio en diferentes porcentajes de saturación a 0°C [(p/v): 85%, 65% y 35%]. Las fracciones obtenidas, junto con una alícuota del extracto crudo, fueron dializadas extensivamente contra tampón fosfato de potasio 2mM pH 7.42 por 3 días a 4°C, concentradas a 1/100 respecto del volumen inicial del extracto crudo mediante liofilización y re-suspendidas en el mismo sistema tampón. Se logró recuperar la proteasa alcalina mayoritariamente en el sobrenadante y en el precipitado de la fracción del 35%. En la Tabla 5-4 se reportan las actividades proteolíticas específicas para las fracciones evaluadas.

En consecuencia, se sometieron alícuotas de 500µL de la fracción del 35% a purificación mediante cromatografía de intercambio aniónico empleando una resina DEAE-sefarosa de rápido flujo. La estrategia de purificación se basó en el procedimiento empleado por Cruz (2008), y consistió en equilibrar la muestra con un tampón de pH similar a su punto isoeléctrico, de tal manera que la proteína de interés adquiriera una carga eléctrica neta igual a cero reduciendo al mínimo su capacidad de intercambio iónico con la resina.

**Tabla 5-4:** Actividad proteolítica específica obtenida tras el fraccionamiento del extracto crudo del morfotipo 21D (*E. saccula*) mediante la adición gradual de sulfato de amonio en tres puntos de saturación (p/v): 85%, 65%, y 35%. Se destaca la alta actividad específica en la fracción del 35%(p/v). Se muestra el promedio de tres replicas  $\pm$  DS.

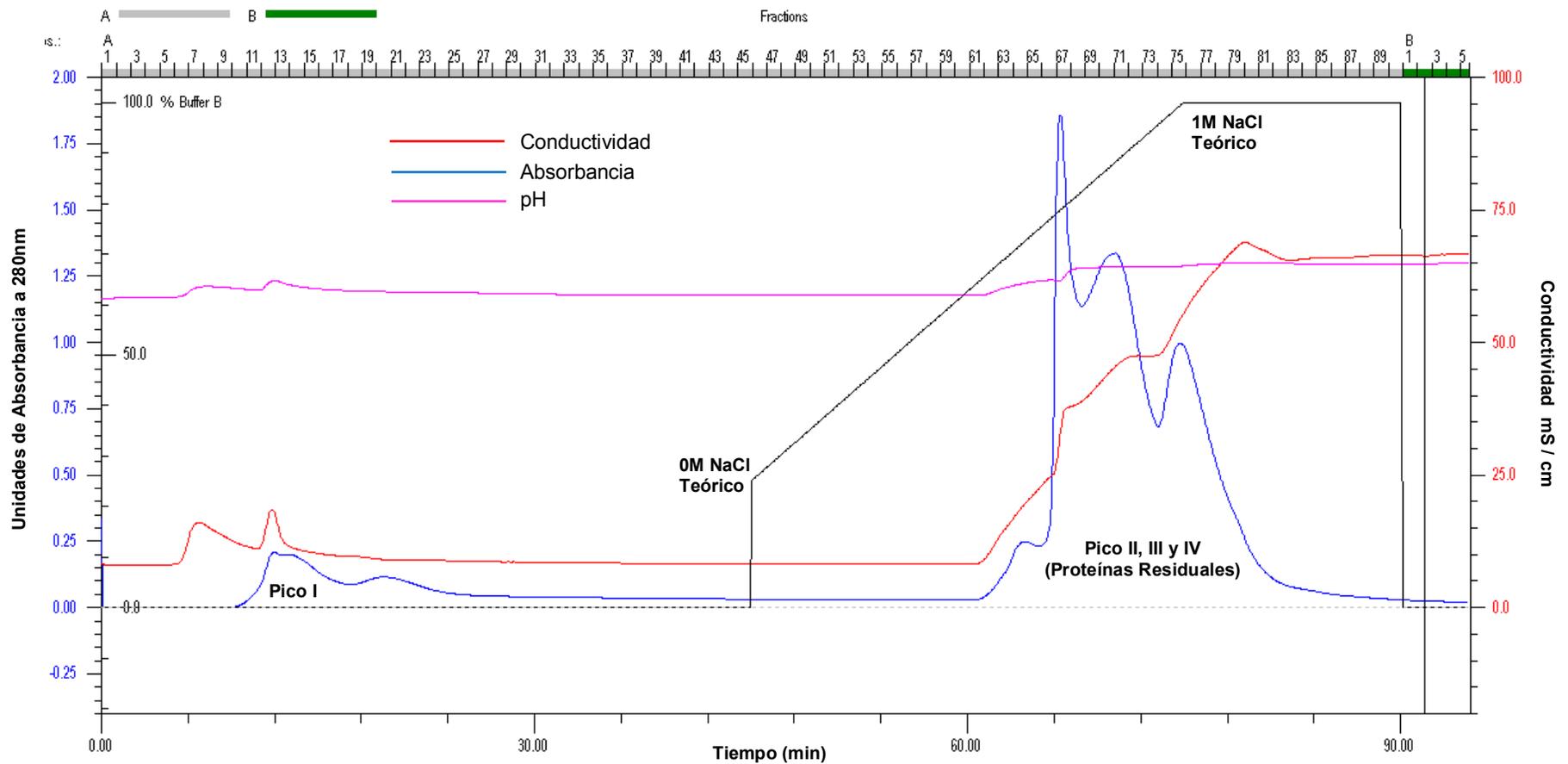
Muestra	Actividad Proteolítica (Ueq / $\mu$ L)	Concentración de proteínas ( $\mu$ g / $\mu$ L)	Actividad Específica (Ueq / mg proteína)
Extracto Crudo	0.0215 $\pm$ 0.02	0.5687 $\pm$ 0.004	37.8183
65%	-	0.1157 $\pm$ 0.01	-
35%	0.0151 $\pm$ 0.02	0.3128 $\pm$ 0.01	48.2837

La Figura 5-7 muestra el cromatograma obtenido tanto para el sobrenadante como para el precipitado de la fracción del 35%, observándose en ambos casos un primer pico correspondiente a las proteínas que no se unieron a la columna (Pico I), y tres picos subsecuentes representativos de las proteínas eluidas mediante el incremento gradual de la fuerza iónica en el tampón con NaCl (0M-1M) (Pico II, III y IV). Las fracciones de cada pico fueron mezcladas, dializadas, concentradas mediante liofilización, y re-suspendidas en 1mL de agua desionizada, con el fin de evaluar su actividad enzimática y concentración de proteínas. En la Tabla 5-5 se encuentran tabuladas las actividades específicas para los picos resultantes en la cromatografía de intercambio iónico. Se destaca la actividad proteolítica específica evidente en el pico I, respecto de la actividad específica nula en los picos II, III y IV (proteínas residuales).

**Tabla 5-5:** Actividad proteolítica específica para los picos resultantes de la cromatografía de intercambio aniónico, para la fracción de proteínas del 35% (fracción proteolítica positiva) correspondiente al morfotipo 21D *E. saccula*. Se destaca la actividad específica evidente en el Pico I (proteasa purificada), en contraste con la actividad específica nula en los Picos II, III, y IV (proteínas residuales). Se muestra el promedio de tres replicas  $\pm$  DS.

Muestra	Actividad Proteolítica (Ueq / $\mu$ L)	Concentración de proteínas ( $\mu$ g / $\mu$ L)	Actividad Específica (Ueq / mg proteína)
Pico I	0.0187 $\pm$ 0.04	0.0624 $\pm$ 0.002	298.8655
Picos II, III & IV	-	0.1280 $\pm$ 0.01	-

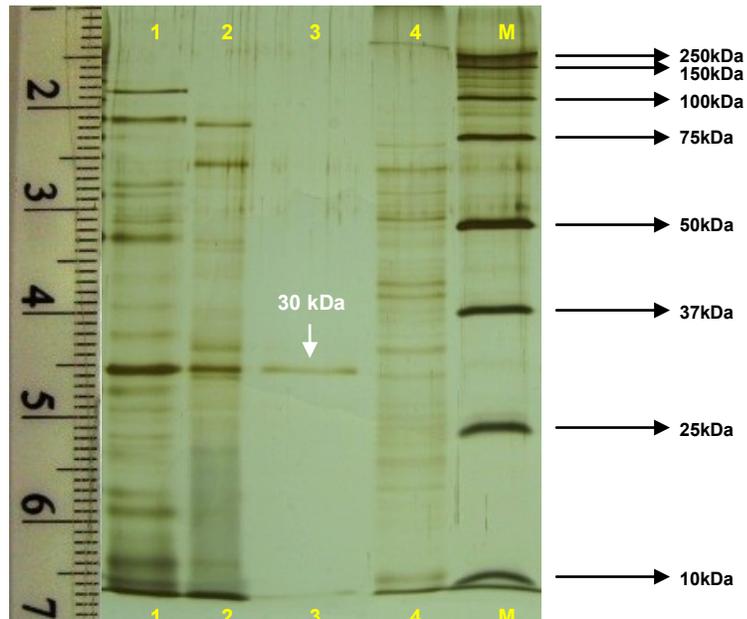
**Figura 5-7:** Cromatograma obtenido para la fracción de proteínas del 35% (fracción proteolítica positiva) correspondiente al morfotipo 21D *E. saccula*. Resina de intercambio aniónico: DEAE-Sefarosa de rápido flujo. **(Pico I)** proteínas no unidas a la columna eluidas con tampón de inicio; **(Picos II, III, y IV)** proteínas residuales unidas a la columna y eluidas mediante incremento de la fuerza iónica con un gradiente lineal de NaCl en tampón de inicio de 0M-1M.



## 5.5 Proceso de caracterización enzimática

Se determinó el peso molecular relativo de la proteasa purificada y el grado de pureza de las proteínas recuperadas a lo largo del proceso de purificación, positivas para actividad proteolítica, mediante electroforesis desnaturante/reductiva en geles de poliacrilamida teñidos con plata, empleando un tiempo de exposición de revelado de 10 minutos. En la Figura 5-8 se observa el perfil de proteínas presentes en el extracto crudo, en la fracción del 35%, y en los picos cromatográficos (I), (II, III y IV). Se destaca la pureza y/o presencia de una sola banda en el pico I, correspondiente a la proteasa alcalina purificada, con un peso molecular relativo de 30kDa. En consecuencia, se estableció el factor de purificación para las muestras recuperadas a lo largo del proceso de purificación, positivas para actividad proteolítica (Tabla 5-6).

**Figura 5-8:** SDS-PAGE revelada con plata para las muestras del proceso de purificación con actividad proteolítica evidente. **(1)** Extracto crudo 21D (*E. saccula*) [0.57 $\mu$ g/ $\mu$ L]; **(2)** Fracción con sulfato de amonio al 35%(p/v) 21D [0.31 $\mu$ g/ $\mu$ L]; **(3)** Pico I (proteasa purificada) [0.06 $\mu$ g/ $\mu$ L]; **(4)** Pico II, III, y IV (Proteínas residuales cromatografía de intercambio aniónico eluidas con el gradiente de NaCl) [0.13 $\mu$ g/ $\mu$ L]; **(M)** Marcador de peso molecular (Biorad). La flecha blanca indica la presencia de la proteasa alcalina objetivo purificada con un peso molecular relativo de 30kDa.

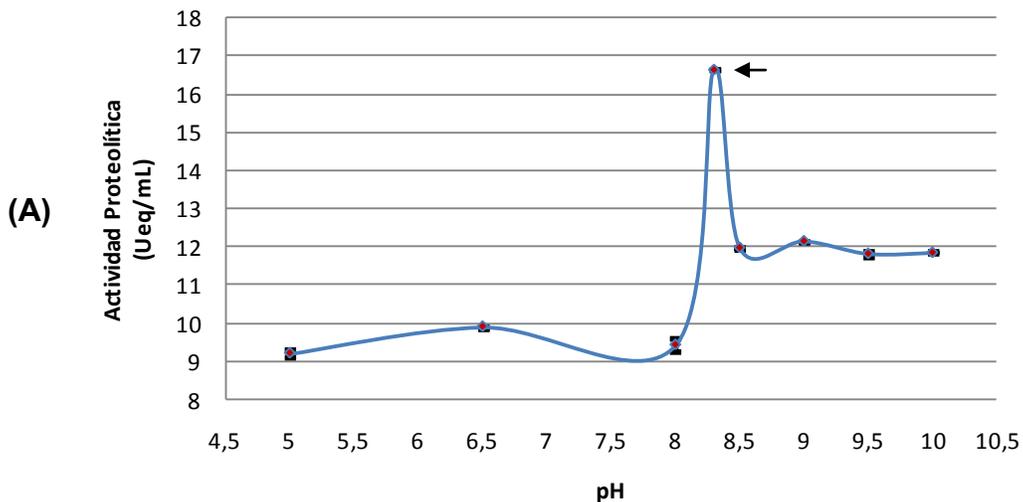


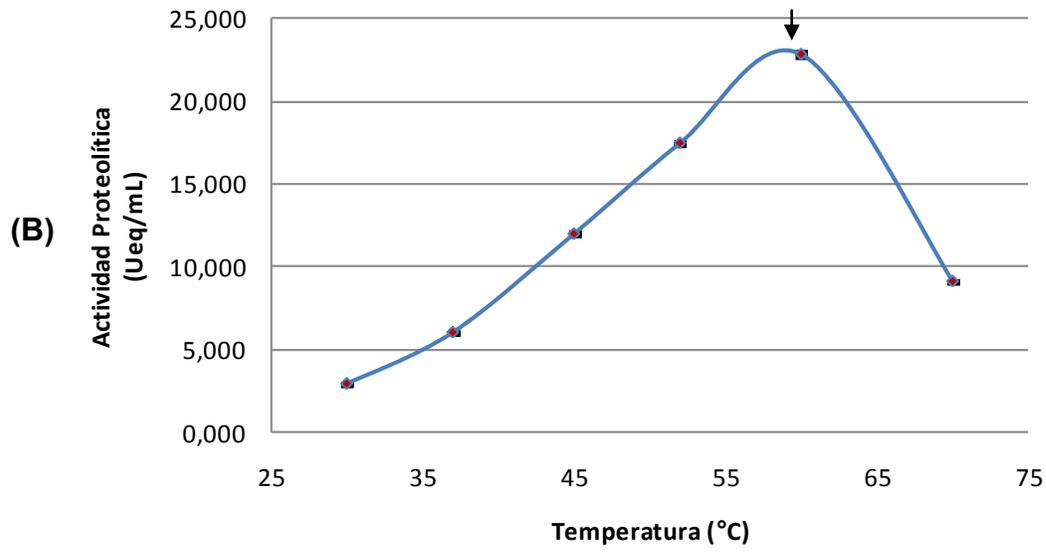
**Tabla 5-6:** Factor de purificación para las muestras de proteína con actividades proteolíticas evidentes, obtenidas a lo largo del proceso de purificación. Se muestra el promedio de tres replicas  $\pm$  DS.

<b>Muestra</b>	<b>Actividad Proteolítica (Ueq / <math>\mu</math>L)</b>	<b>Concentración de proteínas (<math>\mu</math>g / <math>\mu</math>L)</b>	<b>Actividad Específica (Ueq / mg proteína)</b>	<b>Factor de Purificación</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
Extracto Crudo	0.0215 $\pm$ 0.02	0.5687 $\pm$ 0.004	37.8183	1.0	100
Fracción Sulfato de Amonio 35%	0.0181 $\pm$ 0.02	0.3128 $\pm$ 0.01	58.0036	1.5	84.2
Cromatografía de intercambio aniónico DEAE Sefarosa (Pico I)	0.0156 $\pm$ 0.04	0.0624 $\pm$ 0.002	250.1744	6.6	72.5

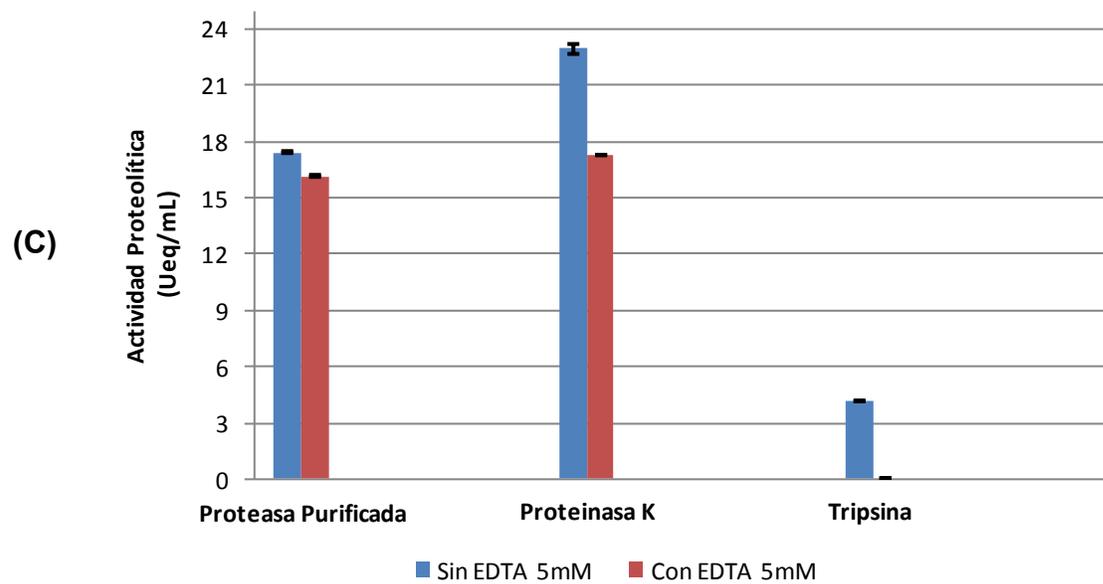
Finalmente, se estableció el efecto del pH, la temperatura y el EDTA en la actividad de la proteasa purificada sobre azocaseína soluble con miras a establecer los puntos óptimos de catálisis. En la Figura 5-9 se describe el efecto de dichas variables, encontrándose que: (i) la actividad proteolítica fue evidente en los ocho valores de pH evaluados siendo los de menor actividad enzimática los pHs 5.0-8.0, y los de mayor actividad enzimática los valores de pH 8.3-10, destacándose el punto de pH 8.3 (tampón bicarbonato) como el valor de pH óptimo de reacción; (ii) a pH óptimo, la actividad proteolítica aumenta gradualmente a medida que incrementa la temperatura de reacción de 30°C a 60°C, siendo este último punto el valor de temperatura óptima de catálisis; en puntos de temperatura superiores al óptimo (ej. 70°C) se observó una reducción evidente de la actividad enzimática; (iii) a pH y temperatura óptimos, no se observó un efecto inhibitorio considerable del EDTA 5mM sobre la actividad de la proteasa purificada, como si lo hubo sobre la tripsina [0.5µg/µL] (control positivo de inhibición con EDTA).

**Figura 5-9:** Efecto del pH (5.0-10.0), temperatura (30°C-70°C), y EDTA (5mM) sobre la actividad enzimática de la proteasa purificada en azocaseína soluble. **(A)** Efecto del pH de reacción bajo los sistemas tampón: Citrato (pH 5.0), Fosfato (pH 6.5), Tris-Cl (pH 8.0 & 8.5), Bicarbonato (pH 8.3), Glicina-NaOH (pH 9.0 & 10.0), Carbonato-Bicarbonato (pH 9.5). **(B)** Efecto de la temperatura de reacción a 30°C, 37°C, 45°C, 52°C, 60°C, y 70°C sobre la actividad enzimática. **(C)** Efecto del EDTA (5mM) sobre la actividad de la enzima purificada empleando como control positivo Tripsina [0.5µg/µL], y como control negativo Proteinasa K [0.2µg/µL]. Se destaca el valor de pH óptimo de reacción de 8.3 (tampón Bicarbonato), la temperatura óptima de 60°C, y el efecto mínimo del EDTA 5mM sobre la actividad de la enzima purificada (flechas). Las barras muestran la desviación estándar del promedio de tres replicas ± DS.





### Efecto EDTA



## 6. Discusión

El papel que desempeñan los hongos filamentosos en los procesos de biodeterioro documental ha sido poco documentado. Ahora se sabe que estos microorganismos pueden inducir serios daños en distintos materiales como consecuencia de su actividad bioquímica y mecánica (Berner *et al.*, 1997). Por lo tanto, no solo la penetración del sustrato por estructuras filamentosas como las hifas puede producir fisuras y daños en las capas del material, sino que también se genera oxidación y reducción de diferentes elementos orgánicos (proteínas, almidones, sales, etc.) por la secreción de metabolitos como enzimas y ácidos orgánicos e inorgánicos que perjudican considerablemente el patrimonio cultural.

Usualmente durante los procesos de restauración de obras de arte y documentos se hace necesaria la eliminación selectiva de ciertos materiales de naturaleza proteica como la cola de origen animal, la clara y la yema de huevo, y la caseína. Los métodos que tradicionalmente se han venido empleando para la remoción de estos compuestos se basan en la utilización de reactivos ácidos o alcalinos poco específicos y generadores de condiciones extremas de pH, así como el empleo de diversos solventes orgánicos nocivos para el operario y el ambiente. En ese sentido la tendencia actual a la hora de desarrollar un protocolo de limpieza se basa en la identificación físico-química de los componentes de la obra a ser removidos, y en la elección de un método de limpieza controlable y específico para cada caso en particular. Bajo este contexto, la utilización de proteasas para la fragmentación y remoción de sustancias de origen proteico se convierte en una alternativa viable a los procesos tradicionales de limpieza sin afectar la estabilidad de la obra (Castiñeyra *et al.*, 2004; Decoux, 2002; Segal y Cooper, 1977).

En ese orden de ideas, se planteó un diseño experimental encaminado no solo a recuperar e identificar los hongos filamentosos involucrados en los procesos de biodeterioro documental con actividades proteolíticas promisorias, sino también a caracterizar parcialmente una de estas enzimas con miras a la remoción “limpia” de compuestos proteicos residuales. Varios de los géneros microbianos empleados en esta investigación han sido previamente reportados en estudios relacionados con el biodeterioro de diversos tipos de materiales (Rojas *et al.*, 2009; Gorbushina *et al.*, 2004; Florian y Manning, 2000; Jellison y Jasalavich, 2000; Szczepanowska y Cavaliere, 2000; Zyska, 1997). Por ejemplo, géneros como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Alternaria*, y *Cladosporium*, han sido ampliamente documentados no solo como agentes biodeteriorantes de pinturas, productos a base de poliuretano, materiales empleados en la fabricación y restauración del papel, etc., sino también como productores industriales de enzimas como proteasas, amilasas y celulasas (Baraznenok *et al.*, 1999; Berner *et al.*, 1997; Das *et al.*, 1997).

La determinación de la actividad proteolítica sobre placas de agar Caseinato de Calcio libre de lactosa no solo permitió la selección de aislados con potencial proteolítico, sino que también permitió dilucidar la distribución del perfil catalítico en la población de estudio. Sin embargo, y aunque se atendieron las recomendaciones enunciadas por Cruz (2008), Kudryavtseva y colaboradores (2008), Wang y colaboradores (2005) y Vermelho y colaboradores (1996) referentes a la no inclusión de sacáridos en los medios de cultivo para evitar la represión por catabólito y la generación de ácidos que pudiesen afectar la viabilidad de las cepas, de 74 morfotipos viables evaluados solo el 43.2% de los aislados presentaron actividades proteolíticas evidentes bajo las condiciones experimentales establecidas. Muchos de los hongos filamentosos viables, aparentemente negativos para actividad proteolítica extracelular, presentaron un crecimiento miceliar estéril sin generación de halos de hidrólisis, o no presentaron crecimiento sobre las placas selectivas.

Este escenario sugiere que: (i) Los hongos filamentosos que no se desarrollaron sobre los medios proteolíticos selectivos se encuentran especializados en otro tipo de sustratos orgánicos (ej. almidón, celulosa, lípidos, citrato), o inorgánicos (ej. fosfato, nitrato,

sulfato), y en consecuencia no presentan la batería enzimática requerida para la catálisis extracelular de proteínas, o presentaban un alto nivel de estrés biótico por las condiciones de conservación a las que se encontraban sometidos en el cepario del Archivo de Bogotá (discos de medio conservados en agua estéril a 4°C por cerca de 4 años, muchas veces sin reactivaciones periódicas para evaluar viabilidad celular), generando baja adaptabilidad inmediata a las condiciones selectivas del medio; (ii) Aquellos hongos filamentosos que fueron capaces de crecer sobre las placas selectivas en donde la única fuente de carbono y nitrógeno era la caseína, sin producción evidente de proteasas extracelulares, lo hacían a expensas de reservas endógenas de energía, o mediante la asimilación de sales incluidas en el medio de cultivo, o a través de proteasas fuertemente asociadas a la pared celular.

Autores como Iwashita (2002), Reichard y colaboradores (2000) y Monod y colaboradores (2002), sugieren que la ausencia de las enzimas extracelulares en los medios de cultivo podría ser explicada tanto por una secreción limitada, como por la presencia de una alta capacidad de retención de las enzimas en la pared celular de los hongos, debido posiblemente a eventos pos-traduccionales, a la asociación de estas enzimas con polisacáridos extracelulares solubles que buscan estabilizar dichas macromoléculas, o a modificaciones en el péptido señal que permite la secreción enzimática. Paralelamente, en otros trabajos relacionados, como el de Dienes y colaboradores (2007) o el de Busconi y colaboradores (1984), basados en la búsqueda de proteasas alcalinas aisladas del hongo filamentoso *Trichoderma reesei* o de músculo esquelético del pez ártico de agua dulce *Micropogon opercularis*, respectivamente, se reporta el enmascaramiento de la actividad proteolítica debido a la presencia de altos niveles de inhibidores endógenos, o a la regulación genética ocasionada como respuesta a las condiciones de pH o la fuente de nitrógeno.

Se debe considerar que no siempre los polisacáridos empleados en los medios de cultivo afectan la producción de proteasas. Patil y Shastri (1985) en su trabajo relacionado con la purificación de proteasas a partir de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl concluyen que la suplementación de fructosa en el medio de cultivo Czapek Dox-salvado de trigo, incrementa la actividad y la producción de proteasas alcalinas posiblemente debido a la

interacción con las enzimas o al efecto mínimo sobre las características secretorias de la membrana. Otros trabajos, como el de Dienes y colaboradores (2007), o el de Ebeling y colaboradores (1974), igualmente reportan la producción de proteasas extracelulares en presencia de glucosa al 2-4%(p/v) como única fuente de carbono, a partir del hongo filamentoso *Trichoderma reesei*, o como incentivo en la producción de proteinasa K a partir del hongo *Tritirachium álbum* mediante la inclusión del sacárido hasta una concentración del 1%(p/v), respectivamente.

A pesar de las limitaciones enunciadas durante el *screening* en placa, y atendiendo el filtro selectivo de trabajos como el de Genckal y Tari (2006), en donde de 84 aislados del genero *Bacillus*. recuperados de efluentes alcalinos de la industria del cuero en Turquía se escogieron solo tres aislados con actividades proteolíticas promisorias (colonias I18, L18 y L21), se seleccionaron los morfotipos 23D y 55D (*Penicillium* spp.) debido a que el tamaño del halo de hidrólisis excedía el tamaño del crecimiento de la cepa, lo que optimizaba el proceso de purificación y caracterización enzimática ulterior teniendo en cuenta que, a menor biomasa menor fuente de proteínas y otros metabolitos contaminantes, y a mayor halo de hidrólisis mayor producción proteolítica extracelular. En consecuencia, se desarrollaron cultivos líquidos preliminares que condujeran a la obtención de extractos crudos para su análisis bioquímico.

Se conoce que las proteasas se producen principalmente en la fase estacionaria de los microorganismos y por tanto la producción es regulada por el estrés de carbono y nitrógeno. En tal sentido, la producción de proteasas extracelulares es una manifestación de la limitación nutricional en el inicio de dicha fase de crecimiento, teniendo en cuenta que la producción también se ve fuertemente influenciada por la generación de biomasa durante la fase exponencial (Abidi *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2002; Ebeling *et al.*, 1974). Teniendo en cuenta que el crecimiento de los hongos y la producción de enzimas se ven afectados por un amplio rango de parámetros, incluyendo el radio C/N en el medio de cultivo, inóculo, pH, agitación y aireación, temperatura, etc., con incidencia directa sobre la expresión génica y la morfología de los microorganismos, se manejó un esquema de producción de proteasas extracelulares bajo tres fases de fermentación: generación de biomasa sobre un medio rico en peptona y glucosa como fuentes de carbono y nitrógeno

(caldo Sabouraud), seguido de un sometimiento a estrés nutricional, culminando con una fase inductiva sobre extracto de carne como única fuente de carbono y nitrógeno.

Esta estrategia está soportada por estudios relacionados como el de Beg y colaboradores (2002), citado por Gupta y colaboradores (2002), los cuales concluyen que la producción de proteasas para *Bacillus mojavensis* se vio incrementada en cerca de cuatro veces cuando se empleaban métodos de fermentación de *semi-batch* o *fed-batch* a través de la separación de la fase de inducción de biomasa y producción de proteasas mediante el empleo de una fase de represión nutricional durante el crecimiento del microorganismo. Así mismo, Naidu y Lakshmi Devi (2005), citados por Savitha y colaboradores (2011), reportaron un incremento significativo en la producción de proteasas alcalinas extracelulares a partir de la bacteria *Bacillus* sp. K30, mediante la inclusión de extracto de carne en los medios de cultivo inductivos como fuente de carbono y nitrógeno, sobre fuentes orgánicas como el almidón, salvado de arroz, caseína, extracto de levadura y triptona.

Como era de esperarse según los resultados del *screening* en placa, el extracto crudo del morfotipo 23D presentó actividad proteolítica evidente (4.3Ueq/mL); sin embargo, sorpresivamente, el extracto crudo del morfotipo 55D no presentó actividad enzimática (0.7Ueq/mL) a pesar de haber sido uno de los principales productores de proteasas mediante la estimación de halos de hidrólisis durante el *screening* en placa. Al respecto, Wang y colaboradores (2005), Pandey (2003), e Iwashita (2002), mencionan que dada la naturaleza de los hongos filamentosos por desarrollarse sobre la superficie de plantas y animales o inmersos en matrices complejas como el suelo, se puede esperar que la producción de proteínas extracelulares se vea favorecida por el empleo de sistemas de fermentación sólidos en contraste con los sistemas líquidos. De hecho, la diferencia en las condiciones de cultivo puede alterar la expresión de genes y afectar fenotipos como el crecimiento y desarrollo, la producción de micotoxinas, y la generación de enzimas. En ese sentido, los autores manifiestan que varias de las enzimas producidas en fermentaciones líquidas generalmente se encuentran asociadas a la pared celular del micelio, mientras que en condiciones sólidas generalmente se encuentran secretadas en el medio de cultivo.

Debido a la ocurrencia de isoformas ácidas en el morfotipo 23D, se decidió realizar una búsqueda general por isoformas proteolíticas en los demás hongos filamentosos “documentales” que mostraron actividad proteolítica evidente en el *screening* en placa, así como en los morfotipos 8D (*Chaetomium* sp.) y 21D (*E. saccula*) que habían mostrado un alto potencial proteolítico alcalino en un trabajo previo desarrollado en el Archivo de Bogotá (Cruz, 2008), teniendo en cuenta las observaciones propuestas por Kunert y Kopecek (2000) sobre si las isoformas reveladas sobre los geles eran verdaderas isoenzimas (producto de genes individuales o de una familia de genes), o eran formas originadas por modificaciones pos-traduccionales de la misma proteasa.

Luego de obtener los extractos crudos y evaluar los perfiles isoenzimáticos, mediante isoelectroénfoque analítico, para los ocho morfotipos proteolíticos seleccionados, se pudo determinar la idoneidad de dichos perfiles para la purificación de una proteasa de características alcalinas a bajo costo, y para la determinación del carácter generalista o especialista de los hongos evaluados sobre la catálisis de compuestos orgánicos de base proteína sobre los documentos históricos. De los ocho morfotipos evaluados seis presentaron isoformas con puntos isoelectrónicos predominantemente ácidos [12D (*Stachybotrys*), 22D, 29D, 64D, 66D y 73D (*Penicillium* spp.)], y solo dos presentaron una isoforma de punto isoelectrónico alcalino extremo [8D (*Chaetomium*), y 21D (*Eladia saccula*)]. En este punto se destacó la recuperación en la producción de proteasas extracelulares para el morfotipo 21D (*E. saccula*) con una actividad específica de 34.2Ueq/mg, y el incentivo en la producción de las mismas en los morfotipos 8D (*Chaetomium*) y 12D (*Stachybotrys*), con 15.22Ueq/mg y 13.65Ueq/mg, respectivamente, mediante la ejecución de cultivos líquidos selectivos continuados (presión de selección).

Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos recientemente por el equipo profesional de Químicos del laboratorio de Física, Química y Biología del Archivo de Bogotá, cuyas investigaciones (reporte interno) concluyen que los documentos que han sufrido envejecimiento acelerado como consecuencia de su exposición a agentes físicos como los rayos UV (simulación de documentos deteriorados) presentan una disminución gradual de pH hacia niveles ácidos, lo que finalmente favorece el desarrollo microbiano sobre los soportes, y consigo la producción de enzimas específicas que les permitan

colonizar microambientes heterogéneos circundantes. Autores como Kudryavtseva y colaboradores (2008) expresan que la mayoría de proteasas extracelulares, en el caso de los Basidiomicetos, presentan pHs óptimos ácidos, lo que sugiere el desarrollo de una característica evolutiva que les permite catalizar la hidrólisis de proteínas en ambientes ácidos usualmente presentes sobre diversos materiales en descomposición. Es bien conocido que los hongos en general tienden a acidificar los medios de cultivo mediante la acumulación de ácido cítrico o ácido oxálico a pH 2-6, y a controlar el nivel de ácido mediante la biosíntesis de de-carboxilasas para prevenir la acumulación de altas cantidades de ácido oxálico, según sus necesidades fisiológicas.

Teniendo en cuenta el empleo de proteasas alcalinas en la industria de los detergentes y las características deseadas de las proteasas objeto de estudio en términos de catálisis y remoción de proteínas residuales en ambientes alcalinos, se seleccionaron los morfotipos 8D y 21D con miras al proceso de purificación y caracterización parcial. Recordemos que el pH afecta la ionización de los aminoácidos, lo que dictamina la conformación de la estructura primaria y secundaria de la enzima, controlando por ende su estabilidad y actividad enzimática. En ese sentido, entre más lejano se encuentre el pH de la solución del pI de la proteína, mayor será la tendencia a la desnaturalización por: (i) reducción de la cisteína en condiciones alcalinas extremas; (ii) hidrólisis de los enlaces peptídicos proximales, generalmente, al ácido aspártico en condiciones ácidas extremas; (iii) repulsión electrostática intramolecular en zonas de la proteína con alta densidad de carga (positiva o negativa); (iv) competencia por sitios de unión a cofactores catiónicos debido al incremento en la concentración de hidroxilos, hidróxidos o hidrogeniones, según corresponda (Savitha *et al.*, 2011; Vesterberg, 1990; Garfin, 1990).

Shankar y colaboradores (2011) y Gupta y colaboradores (2002), coinciden en afirmar que una de las principales características para la selección de una proteasa a incluir en un detergente es su punto isoeléctrico. Es bien conocido que las proteasas tienen un mejor desempeño cuando el valor de pH de la solución detergente se aproxima al punto isoeléctrico de la enzima. Por ejemplo, la Savinasa y la Esperasa, dos proteasas alcalinas comercializadas por Novo Nordisk, poseen puntos isoeléctricos extremos (pI

11.0), y en consecuencia pueden contrarrestar los altos valores de pH propios de los detergentes.

La presencia de isoformas tanto ácidas como alcalinas para el morfotipo 8D (*Chaetomium* sp.), no solo favorecía su respuesta a las condiciones microambientales cambiantes de los soportes, sino que lo convertía en candidato potencial para la purificación de la isoforma alcalina de interés, o de alguna isoforma ácida extrema que resultara promisoría. Sin embargo, autores como Ebeling y colaboradores (1974), en su trabajo sobre la purificación de la proteinasa K (enzima referente) a partir del hongo *Tritirachium album*, son concluyentes al mencionar que la separación de las isoformas contaminantes de la proteinasa K por métodos cromatográficos resulta ser laboriosa y difícil debido a la similitud en las características de las enzimas (peso molecular y punto isoeléctrico). En ese sentido, se eligió el extracto crudo del morfotipo 21D (*Eladia saccula*) para la purificación de la proteasa alcalina, dado que su perfil isoenzimático único facilitaba la exclusión de la mayoría de proteínas contaminantes en un solo paso cromatográfico, haciendo el proceso eficiente y económico.

Tras fraccionar el extracto crudo del morfotipo 21D mediante la adición gradual de sulfato de amonio, se pudo determinar que la proteasa alcalina de interés se encontraba mayoritariamente representada tanto en el sobrenadante como en el precipitado de la fracción de sulfato de amonio al 35%(p/v) [lo que sugería una solubilidad parcial de la enzima en ese punto de saturación], con un factor de purificación del 1.5, y un rendimiento del 84.2%, respecto del extracto crudo inicial. Luego de someter esta fracción a cromatografía de intercambio aniónico sobre una resina DEAE-Sefarosa, se logró recuperar la proteasa alcalina de interés en el *pool* de proteínas que no presentó afinidad iónica a la columna con una actividad específica de 250U<sub>eq</sub>/mg, un factor de purificación de 6.6, y un rendimiento del 72.5%, respecto del extracto crudo inicial.

La baja afinidad iónica por la resina se debió a la manipulación de las condiciones del tampón en el que se encontraba disuelta la proteasa y del tampón de elusión, de tal forma que presentara un valor de pH similar al punto isoeléctrico de la enzima de interés

( $pI=8.81$ ), generando una carga eléctrica neutra que evitara el intercambio iónico con la columna (Cruz, 2008). Al respecto, autores como Shankar y colaboradores (2011), en su trabajo sobre la purificación y caracterización de una proteasa alcalina producida por el hongo *Beauveria* sp. MTCC 5184 recuperado a partir de excremento bovino, concluyen que la purificación de la proteasa alcalina de interés mediante cromatografía de intercambio catiónico empleando una resina CM-sefarosa ocasionaba una fuerte afinidad iónica de la enzima por la resina, por lo que se requería incrementar la fuerza iónica de la fase móvil hasta una concentración de NaCl 1M para lograr eluir la enzima, lo que hacía tedioso y costoso el procedimiento debido a la necesidad de diálisis extensiva. En consecuencia, los autores optaron por purificar la enzima mediante cromatografía de intercambio aniónico a través de una resina DEAE-celulosa en donde la proteasa no se unía a la matriz y era fácilmente eluida en las primeras etapas del proceso sin necesidad de incrementar la fuerza iónica, mientras que las proteínas contaminantes se unían fuertemente a la resina.

A la fecha se han reportado numerosos trabajos relacionados con la purificación de proteasas a partir de hongos filamentosos (Abidi *et al.*, 2007; Barata *et al.*, 2002; Basten *et al.*, 2002; Benito *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2002; Palmieri *et al.*, 2001; Conesa *et al.*, 2000; etc.). Sin embargo, hay que hacer claridad en el hecho de que, debido a la multiplicidad de metodologías y definiciones de Unidad Enzimática, se hacen difíciles y poco precisas las comparaciones entre investigaciones.

Quizás, uno de los factores comunes más visibles en la mayoría de trabajos de purificación sea la utilización de mínimo dos procedimientos cromatográficos para obtener, en estado puro, la enzima objeto de estudio, si se compara con este trabajo de Maestría en el que se logró purificar una proteasa alcalina en un solo paso cromatográfico. Es el caso del trabajo desarrollado por Ebeling y colaboradores (1974) en donde se purificó la proteinasa K mediante fraccionamiento con sulfato de amonio, cromatografía de exclusión por tamaño empleando una resina Sephadex G75, y cromatografía de intercambio iónico empleando una resina DEAE-Sephadex, alcanzando un factor de purificación de 16, un rendimiento del 28% respecto de la actividad proteolítica en el extracto crudo; o el trabajo de Abidi y colaboradores (2007) en donde se

aisló una tiol-proteasa alcalina denominada Prot1 producida por *Botrytis cinerea*, luego de ejecutar cuatro procedimientos cromatográficos, obteniendo un factor de purificación final de 30, con un rendimiento del 6.3%. En este trabajo, por ejemplo, los autores definieron las Unidades de enzima como la cantidad de enzima requerida para generar un incremento en  $A_{440}$  de 0.1 en 30 minutos a 60°C, sobre azocaseína, lo que claramente difiere de la definición de Unidad elaborada en esta tesis.

Otros trabajos como el de De Marco y Felix (2002) citados por Savitha y colaboradores (2011) basado en la purificación de una proteasa producida por el hongo filamentoso *Trichoderma harzianum* mediante precipitación con sulfato de amonio y cromatografía hidrofóbica (columna fenil-sefarosa), reportan factores de purificación de 1.2 y 4.06, y rendimientos del 80% y 27%, respectivamente. Hajji y colaboradores (2010 y 2007), en su investigación sobre la purificación de una proteasa alcalina tanto recombinante como silvestre, producida por el hongo *A. clavatus* ES1 mediante precipitación con acetona, exclusión por tamaño con una resina Sephadex G-100, y cromatografía de intercambio iónico empleando una resina CM-sefarosa, obtuvieron un factor de purificación de 7.5 para la enzima natural, y un rendimiento final del 32% y 29%, respectivamente.

Finalmente, se determinó la pureza y el peso molecular relativo de la fracción de proteínas provenientes de la cromatografía de intercambio aniónico, positiva para actividad proteolítica, mediante SDS-PAGE y revelado con plata. Como resultado se obtuvo una única banda de aproximadamente 30kDa, representativa de la proteasa alcalina purificada, concordante con una única isoforma proteolítica revelada sobre geles de poliacrilamida con un punto isoeléctrico de 8.8, demostrando homogeneidad de la preparación y reflejando la posible naturaleza monomérica de la enzima. Este resultado fue sorprendente debido a que eventos como la auto-proteólisis, la asociación de la enzima con otras proteínas del cultivo o con otras proteínas sintetizadas por el hongo (ej. inhibidores), y la interacción con productos del sustrato, hubiesen podido ocurrir dando origen, generalmente, a productos de bajo peso molecular contaminantes (en el rango de 18-28kDa) (Kunert y Kopecek, 2000).

Cabe resaltar que, tanto el peso molecular relativo de la enzima purificada en este trabajo, como su punto isoeléctrico, se encuentran dentro de los rangos reportados para proteasas alcalinas (PM que oscilan entre 15kDa - 47kDa y puntos isoeléctricos que van desde 7.0-10.0) (Shankar *et al.*, 2011; Abidi *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007 citado por Savitha *et al.*, 2011). Es el caso de la proteasa alcalina producida por *Aspergillus clavatus* ES1 de 32 kDa (Hajji *et al.*, 2007), la proteinasa K producida por *T. album* de 29kDa y pI 8.9 (Ebeling *et al.*, 1974), las proteasas serina extracelulares producidas por los hongos *Graphium putredinis* y *Trichoderma harzianum* de 31.2kDa y 33kDa, respectivamente (Savitha *et al.*, 2011), la proteasa alcalina producida por *A. fumigatus* de aproximadamente 32kDa y pI 8.6 (Kunert y Kopecek, 2000), la proteasa acida producida por el hongo comestible *Cordyceps sinensis* de 43kDa y pI 5.3 (Bi *et al.*, 2011), la tiol-proteasa alcalina denominada Prot 1 producida por *Botrytis cinerea* de 43kDa (Abidi *et al.*, 2007), la proteasa producida por *Beauveria*, de 29kDa y pI 9.3 (Shankar *et al.*, 2011), o la proteasa alcalina producida por el hongo nematofago *Clonostachys rosea* con un punto isoeléctrico de 10.5 (Zhao *et al.*, 2005 citados por Shankar *et al.*, 2011), entre otros.

La proteasa purificada en este trabajo presentó un pH óptimo de 8.3, y una temperatura óptima de 60°C. Este último evento es concordante con las aseveraciones de Pandey (2003) en donde se manifiesta que los materiales sólidos (ej. papel) en donde usualmente se desarrollan los hongos filamentosos presentan baja conductividad térmica por lo que la remoción de calor es bastante lenta. De hecho, en ocasiones la acumulación de calor es tan alta ( $\geq 60^{\circ}\text{C}$ ) debido a la transferencia de oxígeno a medida que avanza la asimilación de nutrientes, que tiende a desnaturar los productos formados y acumulados en el soporte. Al respecto cabe destacar que la enzima purificada en este trabajo presentó valores de pH y temperatura óptimos de reacción en los rangos reportados para proteasas alcalinas (pH de reacción óptimo en el rango de 7.0-9.0, y temperatura de reacción óptima de 35-60°C). (Shankar *et al.*, 2011; Abidi *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007 citado por Savitha *et al.*, 2011). Es el caso de la proteasa alcalina producida por el hongo filamentoso *Aspergillus clavatus* ES1 con un pH óptimo de 8.5, y una temperatura óptima de 50°C (Hajji *et al.*, 2007), las proteasas aisladas del hongo *Tritirachium album* denominadas "R" y "T", cuyos pHs óptimos se encontraban en el rango de 7-10, o de 9-12, y con una temperatura óptima en el rango de 55-60°C, respectivamente (Samal *et al.*,

1990 citado por Anwar y Saleemuddin, 1998), las proteasas serina extracelulares producidas por los hongos *Graphium putredinis* y *Trichoderma harzianum* con pHs óptimos de 7.0 y 8.0, y temperaturas óptimas de 50°C y 60°C, respectivamente (Savitha *et al.*, 2011), o la proteasa alcalina producida por *Botrytis cinerea* con pH y la temperatura óptimos de 9.0, y 60°C, respectivamente (Abidi *et al.*, 2007).

Finalmente, la proteasa purificada no presentó una reducción significativa de su actividad catalítica ante la inclusión de EDTA 5mM en las reacciones enzimáticas, reteniendo la actividad proteolítica en un 93% respecto del tratamiento sin EDTA, lo que a primera vista sugiere que no se trata de una metalo-proteasa. Los controles empleados en este ensayo (proteínasa K y tripsina) presentaron el comportamiento esperado: La proteínasa K presentó una reducción en su actividad catalítica del 25% respecto de la enzima sin quelante; en contraste, la tripsina presentó una reducción significativa en su actividad proteolítica del 100% respecto de la enzima sin EDTA. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Ebeling y colaboradores (1974) en donde se concluye que la proteínasa K no se ve afectada por la inclusión de EDTA en las reacciones enzimáticas.

Estos resultados concordaron con trabajos como el de Moreira y colaboradores (2007), basado en la purificación parcial de una queratinasa a partir del hongo patógeno de plantas *Myrothecium verrucaria*, en donde se menciona que la actividad proteolítica mostró una inhibición parcial por la incorporación de EDTA 5mM en las reacciones, lo que indicaba que el EDTA podría estar quelando cationes divalentes indispensables en la estabilidad de la enzima. Otros trabajos como el de Savitha y colaboradores (2011) reportan la retención en la actividad enzimática residual de sus proteasas purificadas hasta en un 92% en presencia de EDTA 5mM, lo que sugiere que las enzimas no requieren de cofactores catiónicos divalentes haciéndolas altamente atractivas para ser incluidas como aditivos en los detergentes en donde usualmente se emplean agentes quelantes como suavizantes y para la remoción de tintas. Estos mismos autores, sumados a Hajji y colaboradores (2007), mencionan que en la mayoría de los casos los cationes divalentes (ej.  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ , y  $Co^{2+}$ ) toman parte integral en la estabilización de la estructura enzimática y son requeridos para la protección contra la desnaturación térmica. De hecho, Jaouadi y colaboradores (2010) mencionan que las proteasas serina

presentan dos sitios de unión a calcio, por lo que la remoción de este metal del ambiente catalítico se asocia con la reducción en la termoestabilidad de la enzima.

## 7. Conclusiones y recomendaciones

### 7.1 Conclusiones

De 74 morfotipos viables evaluados, aislados tanto del ambiente como de documentos con indicadores de biodeterioro custodiados en los diferentes archivos del Distrito, solo el 43.2% presentaron actividades proteolíticas evidentes mediante la formación de halos de hidrólisis evidentes sobre placas de agar Caseinato de Calcio al 3%(p/v), posiblemente debido a la especialidad en la catálisis de otro tipo de sustratos, al estrés inducido como consecuencia de los métodos de conservación empleados en el Archivo de Bogotá, generando baja adaptabilidad inmediata a las condiciones selectivas del medio, o a la secreción limitada o nula de proteasas al medio de cultivo por asociación de las enzimas con la pared celular de los hongos.

Luego de haber seleccionado los morfotipos proteolíticos positivos durante el *screening* en placa, representativos de aislados documentales, y de haber inducido la producción de proteasas extracelulares en medios líquidos bajo tres fases de fermentación: crecimiento, estrés nutricional, e inducción enzimática, se analizó el perfil isoenzimático de los extractos crudos mediante isoelectroénfoque analítico, encontrándose que, de 10 morfotipos evaluados [8D (*Chaetomiun*), 12D (*Stachibotrys*), 21D (*E. saccula*), 22D, 23D, 29D, 55D, 64D, 66D y 73D (*Penicillium* spp.)], solo los morfotipos 8D y 21D presentaron una isoforma alcalina, de punto isoeléctrico 8.6 y 8.8, respectivamente, acorde con los objetivos de esta tesis; los demás morfotipos presentaron únicamente isoformas hacia el rango ácido de pH con puntos isoeléctricos que van desde 3.0-6.0. La presencia de isoformas tanto ácidas como alcalinas en el morfotipo 8D denota un carácter generalista en la catálisis de ciertos componentes y aditivos del papel de base proteína en un amplio rango de pHs; en contraste, la presencia de una sola isoforma alcalina en el morfotipo

21D indica el carácter especialista de este hongo en la metabolización de proteínas en ambientes predominantemente básicos, teniendo en cuenta que la distribución de isoformas hacia una región específica de pH no necesariamente indica una actividad proteolítica óptima en dichas condiciones, pero si una mayor estabilidad estructural.

La presencia de una única isoforma alcalina extrema presente en el extracto crudo del morfotipo 21D lo hacía idóneo para la purificación, a bajo costo, de una proteasa básica mediante fraccionamiento con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio aniónico empleando una resina DEAE-Sefarosa de rápido flujo, en comparación con el extracto crudo del morfotipo 8D en donde la presencia de isoformas tanto ácidas como alcalinas, hacían más laborioso y difícil el esquema de purificación planteado. La proteasa alcalina producida por el morfotipo 21D fue recuperada mayoritariamente tanto en el precipitado como en el sobrenadante de la fracción de sulfato de amonio saturado al 35%(p/v), lo que indica una solubilidad parcial de la enzima en este punto de saturación, sin pérdida drástica de actividad.

La estrategia de purificación mediante cromatografía de intercambio aniónico, basada en la solubilización de la enzima en un tampón de pH similar a su punto isoeléctrico, de tal manera que la proteasa de interés adquiriera una carga eléctrica neta igual a cero reduciendo al mínimo su capacidad de intercambio iónico con la resina, permitió la purificación aparentemente completa de una proteasa alcalina monomérica de ~30kDa sin necesidad de diálisis extensivas, a juzgar por la visualización de una sola banda en geles de poliacrilamida desnaturantes revelados con plata. La enzima purificada presentó una actividad específica de 250U<sub>eq</sub>/mg, un factor de purificación de 6.6 veces, y un rendimiento del 72.5%, respecto del extracto crudo inicial, lo que indica la efectividad del esquema de purificación propuesto sin pérdida sustancial de la enzima de interés.

La proteasa purificada mostró una actividad enzimática óptima sobre azocaseína soluble al 1.5%(p/v) en reacciones cuyo pH había sido ajustado a 8.3 mediante el empleo de una solución de bicarbonato de sodio 0.1M, y cuya temperatura de incubación había sido ajustada a 60°C en baño María. Igualmente la enzima purificada no reflejó pérdida de

actividad enzimática evidente por la inclusión de EDTA 5mM en las reacciones, y presentó un punto isoeléctrico aparente de 8.8 sobre geles de poliacrilamida revelados mediante zimografía sustrato-específica, a través del empleo de *overgeles* de gelatina o albúmina de suero bovino al 0.1%(p/v) teñidos con azul *Comassie*, que evidentemente permitían la visualización clara de isoformas a lo largo del gradiente de pH establecido, en comparación con los zimogramas que tradicionalmente se venían empleando basados en la inmersión del gel de corrido en una solución de azocaseína al 1.5%(p/v).

Todos los datos compilados en esta tesis lo que finalmente sugieren es la idoneidad de la proteasa alcalina purificada para ser incluida en los tratamientos correctivos o preventivos dirigidos a la remoción específica de aditivos del papel de base proteína en ambientes alcalinos, a manera de detergente. Sin embargo, su inclusión efectiva en los procesos de restauración del patrimonio documental de la ciudad dependerá exclusivamente del criterio de los restauradores en cómo y cuándo se requiere de un método preventivo o correctivo específico y mínimamente intrusivo, teniendo en cuenta aspectos como la estabilidad de los componentes de la obra, la estabilidad de la enzima y su residualidad, entre otros.

## 7.2 Recomendaciones

Se recomienda reevaluar el método de conservación de los hongos filamentosos disponibles en el cepario institucional del Archivo de Bogotá, y optar por otros métodos como la liofilización, criopreservación en nitrógeno líquido, conservación en papel filtro, entre otros, o en su defecto se recomienda reactivar periódicamente las cepas para evaluar tanto viabilidad como actividades enzimáticas específicas mediante crecimiento en medios enriquecidos y/o selectivos.

Respecto del *screening* en placa se recomienda seguir empleando el agar caseinato de calcio al 3%(p/v) por cuanto permite la visualización clara de halos de hidrólisis sin necesidad de tinciones laboriosas y evita problemas por represión catabólica debido a la presencia de lactosa en los medios de cultivo. Sin embargo, se recomienda incluir glucosa o sucrosa en los medios de cultivo, en bajas concentraciones [ $\sim 0.02\%$ (p/v)], para evaluar el efecto inductivo o represivo de esta fuente de carbono sobre el desarrollo microbiano y la secreción de proteasas. Igualmente, se aconseja evaluar diferentes fuentes de proteína, combinaciones de sales, condiciones ambientales (pH, agitación, temperatura, etc.) que busquen optimizar el proceso de producción de proteasas extracelulares en medios líquidos selectivos.

En relación al fraccionamiento con sulfato de amonio, se recomienda incluir dos o tres puntos de saturación por debajo del 35%(p/v) para evaluar la recuperación de proteasas en estas fracciones. Igualmente, durante el proceso de purificación se recomienda ensayar una resina de intercambio catiónico (ej. CM-Sefarosa) para evaluar la eficiencia del método y la resolución de los picos manejando un gradiente continuo o discontinuo de NaCl 0.0-1.0M.

Se recomienda completar la caracterización bioquímica de la proteasa alcalina purificada, con el fin de clasificarla y emplearla como modelo para el *screening* de otras proteasas o enzimas de naturaleza diferente con actividades promisorias, en términos de: (i) ensayos de inhibición con diferentes compuestos químicos (ej. PMSF, e-64, Pepstatina, etc.) que permitan clasificar la enzima con base en su sitio activo (proteasa serina, tiol-proteasa, ácido aspártico-proteasa, etc.); (ii) efecto de cationes divalentes sobre la actividad y

estabilidad enzimática; (iii) efecto de solventes orgánicos (ej. metanol, etanol, isopropanol, butanol, acetonitrilo, etc.) sobre la actividad proteolítica; (iv) cinética enzimática ( $K_m$ ,  $K_{cat}$ ,  $K_m/K_{cat}$ ). Igualmente se aconseja secuenciar la proteasa alcalina con miras a su análisis bioinformático (homología, pI y peso molecular teórico, estructura, entre otros).

Finalmente se recomienda iniciar ensayos de inclusión controlada de la proteasa alcalina en las prácticas de restauración del Archivo de Bogotá sobre aditivos de base proteína, para evaluar la eficiencia del proceso en términos de fragmentación y remoción de dichos compuestos, bien sea mediante el empleo de capas de algodón humedecidas con la enzima, o mediante la fijación de la proteasa a soportes tridimensionales tipo gel o hidrogel, que pudiesen ser superpuestas sobre las áreas afectadas. Igualmente, se destaca que la enzima purificada podría ser empleada en cultivos celulares para la generación de péptidos señal que induzcan adherencia o diferenciación *in vitro*, como alternativa al empleo de proteasas alcalinas comerciales como la tripsina o la proteinasa K; también podría ser empleada en preparaciones enzimáticas industriales para digerir sustratos complejos para alimentación animal y humana.

## A. Anexo: Formulación medios de cultivo por componentes.

Medio de cultivo	Componentes	(g/L)
<b>Agar Sabouraud pH 6.0</b>	Peptona (bacteriológica)	<b>30</b>
	Glucosa	<b>2</b>
	Agar agar	<b>15</b>
	<i>Ajustar pH con tampón citrato 0.1M</i>	
<b>Caldo Sabouraud + Jugo V8 pH 6.0</b>	Peptona (bacteriológica)	<b>30</b>
	Glucosa	<b>2</b>
	Jugo V8 comercial	<b>178mL</b>
	<i>Ajustar pH con tampón citrato 0.1M</i>	
<b>Caldo Sabouraud pH 8.0</b>	Peptona (bacteriológica)	<b>30</b>
	Glucosa	<b>2</b>
		<i>Ajustar pH con tampón Tris-Cl 0.1M</i>
<b>Medio Mínimo de Sales pH 8.0</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<b>1</b>
	NaNO <sub>3</sub>	<b>2</b>
	MgSO <sub>4</sub>	<b>0.5</b>
	Tris base	<b>3.03</b>
	Solución de elementos traza (°)	<b>10mL</b>
	<i>Ajustar pH con HCl 1M</i>	
<b>Solución de elementos traza (°) pH 7.9</b>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	<b>1</b>
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	<b>0.5</b>
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	<b>0.02</b>
	MnCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	<b>0.02</b>
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	<b>0.01</b>
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	<b>0.01</b>
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	<b>0.003</b>
	Acido Cítrico	<b>0.526</b>
	Acido Bórico	<b>0.526</b>
<b>Medio Mínimo de Sales + Extracto de Carne pH 8.0</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<b>1</b>
	NaNO <sub>3</sub>	<b>2</b>
	MgSO <sub>4</sub>	<b>0.5</b>
	Tris base	<b>3.03</b>
	Extracto de carne	<b>5</b>
	Solución de elementos traza (°)	<b>10mL</b>
	<i>Ajustar pH con HCl 1M</i>	

- Autoclavar todos los medios de cultivo a 121°C (~15psi) por 10 minutos.

## B. Anexo: Curva patrón para la determinación de la concentración de proteínas totales

### **REACTIVO DE BRADFORD:**

Azul Coomassie G-250	10mg
Etanol 95%(v/v)	5mL
Ácido Fosfórico 85%(v/v)	10mL

\* Completar volumen a 100mL con agua desionizada.

### **PREPARACIÓN DEL REACTIVO DE BRADFORD:**

Disolver 100mg de azul Coomassie G-250 en 50mL de etanol al 95%(v/v). Agregar 100mL de ácido fosfórico al 85%(v/v). Completar volumen a 100mL con agua desionizada e inmediatamente filtrar dos veces. Proteger el reactivo de la luz directa y almacenar en un recipiente de plástico a 4°C.

### **STOCK PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN:**

Preparar un *stock* de proteínas compuesto por Albúmina de Suero Bovino (BSA) (Gibco) y Lisozima (Sigma) a una concentración final de 2.5µg/µL en tampón fosfato de sodio 50mM pH 6.0.

### **CURVA DE CALIBRACIÓN:**

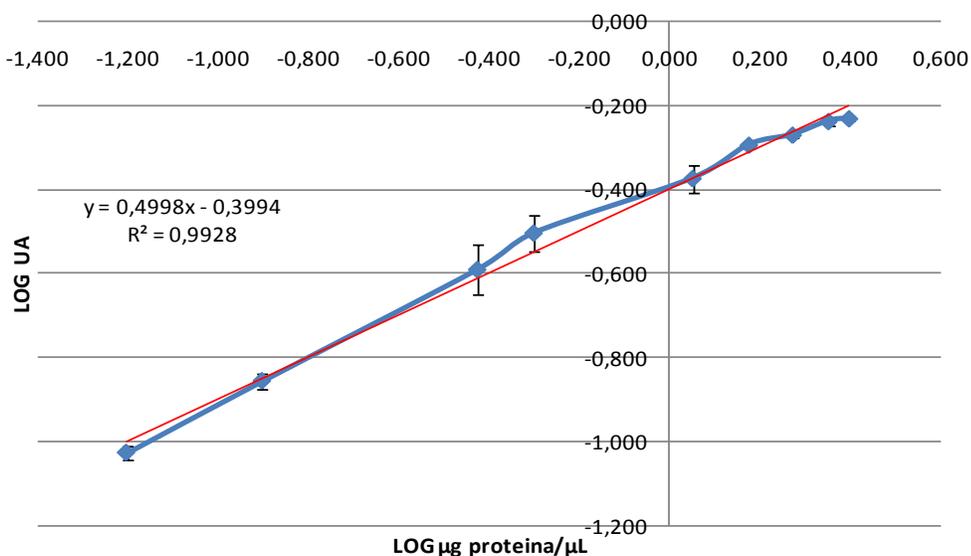
- Realizar diluciones del patrón de proteínas tomando de 5µL a 200 µL de muestra y completado a un volumen final de 200µL con tampón fosfato de sodio 50mM pH 6.0, según corresponda.
- Disponer 10µL/pozo de cada dilución de la solución patrón de proteínas en una placa ELISA de 96 pozos fondo plano.
- Adicionar 20µL/pozo de NaOH 1N.
- Añadir 200µL/pozo del reactivo de Bradford.
- Equilibrar 10 minutos a temperatura ambiente, y determinar la absorbancia (UA) de las muestras a 630nm mediante espectrofotometría en un lector ELISA.

**Datos utilizados para construir la curva patrón de proteínas:**

Punto	µg proteína/µL	UA1	UA 2	UA 3	UA Promedio Corregida	LOG µg proteína/µL	LOG UA Corregida
1	0,0625	0,410	0,396	0,378	0,094	-1,204	-1,028
2	0,125	0,445	0,456	0,419	0,139	-0,903	-0,857
3	0,1875	0,531	0,524	0,522	0,225	-0,727	<b>-0,648</b>
4	0,25	0,544	0,532	0,510	0,228	-0,602	<b>-0,643</b>
5	0,375	0,590	0,593	0,489	0,256	-0,426	-0,591
6	0,5	0,646	0,632	0,565	0,313	-0,301	-0,504
7	0,75	0,699	0,704	0,702	0,401	-0,125	<b>-0,397</b>
8	1,125	0,702	0,761	0,709	0,423	0,051	-0,374
9	1,5	0,811	0,801	0,816	0,508	0,176	-0,294
10	1,875	0,834	0,844	0,837	0,537	0,273	-0,270
11	2,25	0,880	0,888	0,872	0,579	0,352	-0,237
12	2,5	0,891	0,890	0,886	0,588	0,398	-0,231
<b>Blanco</b>	-	0,300	0,295	0,308			

Los datos en **negrita** representan puntos “atípicos” eliminados de la recta durante la regresión lineal.

**Linealización de la curva patrón de proteínas**  
(Barras de error = D.S. de tres replicas)



Utilizar la ecuación de la recta para determinar la concentración de proteínas en las muestras de concentración desconocida, reemplazando el valor de (y) (Logaritmo UA de la muestra de concentración desconocida a 630nm), calculando el valor de (x) (Logaritmo de la concentración de proteína), y finalmente calculando el antilogaritmo de este número.

## C. Anexo: Curvas patrón para la determinación de Unidades Equivalentes ( $U_{eq}$ ) de actividad proteolítica

### REACTIVOS:

- Sustratos: (i) Azocaseína (Sigma) al 1.5%(p/v) disuelta en tampón bicarbonato de sodio 0.1M pH 8.3; (ii) Caseína soluble en álcalis (Merck) al 1.5%(p/v) disuelta en tampón bicarbonato de sodio 0.1M pH 8.3.
- Estándar Enzima Patrón: Proteinasa K obtenida de *Tritirachium álbum* (Sigma, Cod. P6556) [ $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ].
- Acido Tricloroacético (TCA) (Sigma) al 5%(p/v).
- Estándar de Tirosina 1.1mM disuelta en bicarbonato de sodio 0.1M pH 8.3.
- Colorante Folin & Ciocalteu (1 volumen de colorante por 16 volúmenes de agua destilada).
- Hidróxido de sodio (NaOH) 500mM.

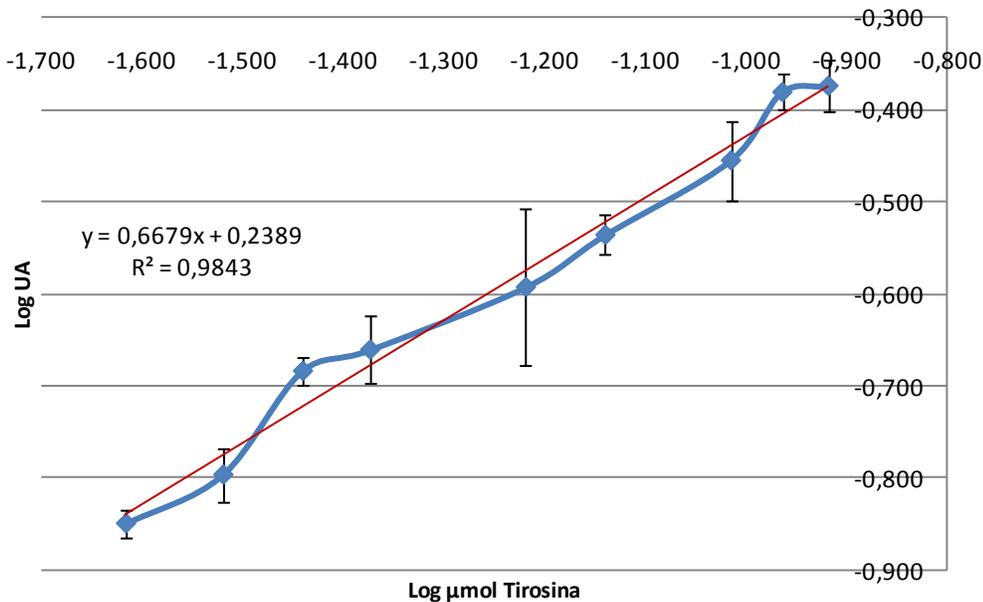
### CURVA PATRÓN DE TIROSINA:

- A partir del estándar de tirosina 1.1mM generar diluciones para los siguientes puntos de concentración (mM) completando a un volumen final de  $50\mu\text{L}$  con bicarbonato de sodio 0.1M pH 8.3: 1.100, 0.990, 0.880, 0.660, 0.550, 0.385, 0.330, 0.275, 0.220.
- Adicionar  $50\mu\text{L}$  de TCA al 5%(p/v) a cada punto de concentración sobre una placa ELISA de 96 pozos fondo plano.
- Agregar  $200\mu\text{L}$  de NaOH 500mM por pozo.
- Agitar suavemente y adicionar  $60\mu\text{L}$  de Folin & Ciocalteu por pozo.
- Equilibrar 15 minutos a temperatura ambiente.
- Determinar la absorbancia (UA) de las muestras a 630nm mediante espectrofotometría en un lector ELISA.

**Datos utilizados en la construcción de la curva patrón de tirosina para la determinación de Unidades Equivalentes ( $U_{eq}$ ) de actividad proteolítica:**

Punto	Tirosina (mM)	Tirosina ( $\mu$ mol)	UA 1	UA 2	UA 3	UA corregida	Log $\mu$ mol Tirosina	Log UA corregida
1	1,100	0,121	0,489	0,459	0,515	0,423	-0,917	-0,374
2	0,990	0,109	0,468	0,472	0,503	0,416	-0,963	-0,381
3	0,880	0,097	0,455	0,369	0,423	0,351	-1,014	-0,455
4	0,660	0,073	0,368	0,331	0,369	0,291	-1,139	-0,536
5	0,550	0,061	0,354	0,383	0,224	0,255	-1,218	-0,593
6	0,385	0,042	0,292	0,315	0,243	0,218	-1,373	-0,661
7	0,330	0,036	0,276	0,255	0,285	0,207	-1,440	-0,684
8	0,275	0,030	0,191	0,238	0,245	0,160	-1,519	-0,797
9	0,220	0,024	0,220	0,189	0,210	0,141	-1,616	-0,850
<b>Blanco</b>			<b>0,064</b>	<b>0,065</b>	<b>0,066</b>			

**Linealización de la curva patrón de tirosina para la determinación de Unidades Equivalentes ( $U_{eq}$ ) de actividad proteolítica.**  
(Barras de error = D.S. de tres replicas)



### **CURVA PATRÓN DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA SOBRE CASEÍNA:**

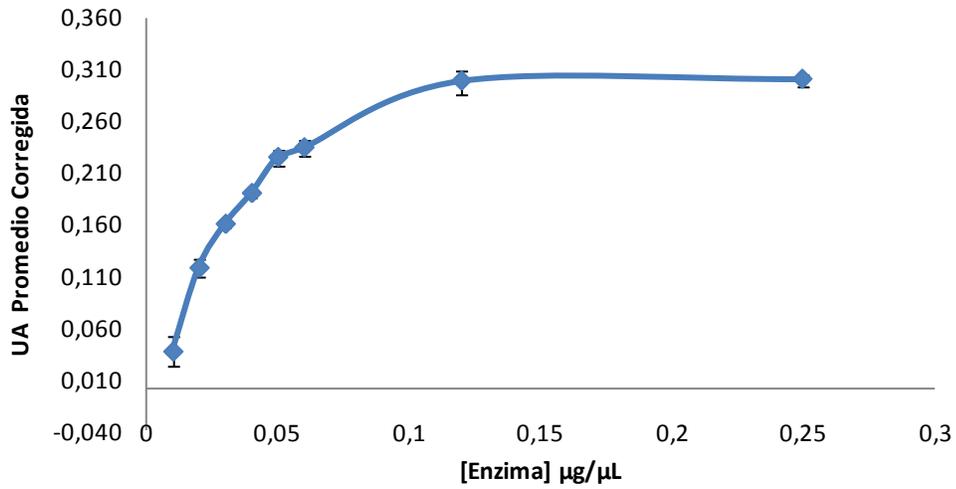
- A partir del estándar de proteinasa K [ $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ], generar diluciones para los siguientes puntos de concentración [ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ]: 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.12, 0.25.
- En tubos *ependorf* de 1.5mL estériles agregar 200 $\mu\text{L}$  de caseína al 1.5%(p/v) disuelta en bicarbonato de sodio 0.1M pH 8.3.
- Agregar 20 $\mu\text{L}$  de cada dilución de la enzima patrón por tubo, por triplicado.
- Fomentar la digestión enzimática incubando la mezcla a 45°C por 60 minutos en baño María.
- Detener la reacción enzimática adicionando 200 $\mu\text{L}$  de TCA al 5%(p/v) por tubo.
- Conservar los tubos a 4°C por 15 minutos.
- Centrifugar los tubos a 8000rpm por 20 minutos a 4°C.
- Recuperar 50 $\mu\text{L}$  del sobrenadante (azopeptidos y aminoácidos solubles en ácido), y disponer dicho volumen sobre placas ELISA 96 pozos fondo plano.
- Adicionar 100 $\mu\text{L}$  de NaOH 500mM por pozo.
- Agitar y agregar 30 $\mu\text{L}$  del colorante *Folin & Ciocalteu* por pozo.
- Equilibrar 15 minutos a temperatura ambiente.
- Determinar la absorbancia de las muestras a 630nm mediante espectrofotometría en un lector ELISA.

### **Datos utilizados en la construcción de la curva patrón de caseína para la determinación de Unidades Equivalentes ( $U_{eq}$ ) de actividad proteolítica:**

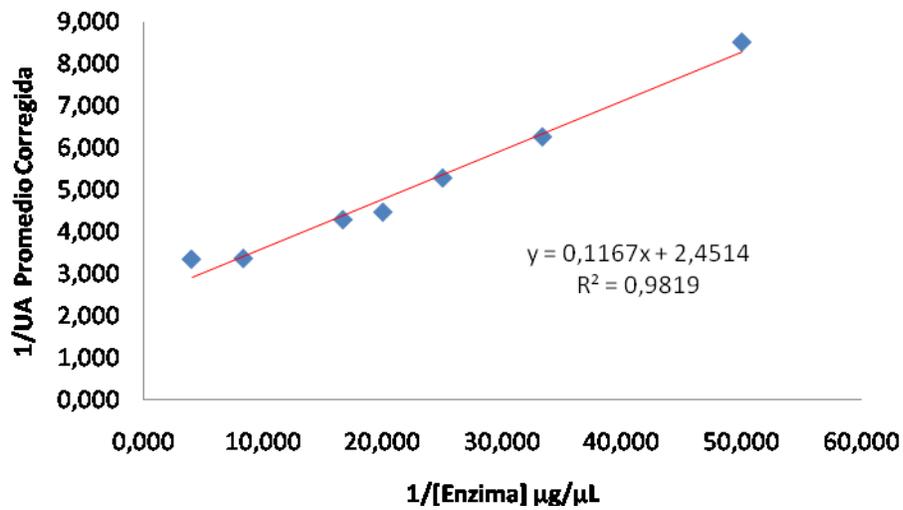
Punto	[Enzima] $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	UA 1	UA 2	UA 3	UA Promedio Corregida	1/[Enzima] $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	1/UA
<b>1</b>	0,01	0,106	0,132	0,131	0,037	<b>100,000</b>	<b>27,273</b>
<b>2</b>	0,02	0,203	0,213	0,195	0,117	50,000	8,523
<b>3</b>	0,03	0,247	0,248	0,243	0,160	33,333	6,263
<b>4</b>	0,04	0,277	0,278	0,272	0,189	25,000	5,282
<b>5</b>	0,05	0,301	0,316	0,314	0,224	20,000	4,464
<b>6</b>	0,06	0,314	0,317	0,328	0,233	16,667	4,286
<b>7</b>	0,12	0,373	0,383	0,396	0,298	8,333	3,359
<b>8</b>	0,25	0,383	0,392	0,382	0,299	4,000	3,341
<b>Blanco</b>		0,074	0,088	0,097			

Los datos en **negrita** representan puntos “atípicos” eliminados de la recta durante la regresión lineal.

**Curva patrón de caseína para la determinación de Unidades Equivalentes ( $U_{eq}$ ) de actividad proteolítica.**  
 (Barras de error = D.S. de tres replicas)



**Linealización por dobles recíprocos (Lineweaver Burk Plot) de la curva patrón de caseína para la determinación de Unidades Equivalentes ( $U_{eq}$ ) de actividad proteolítica.**



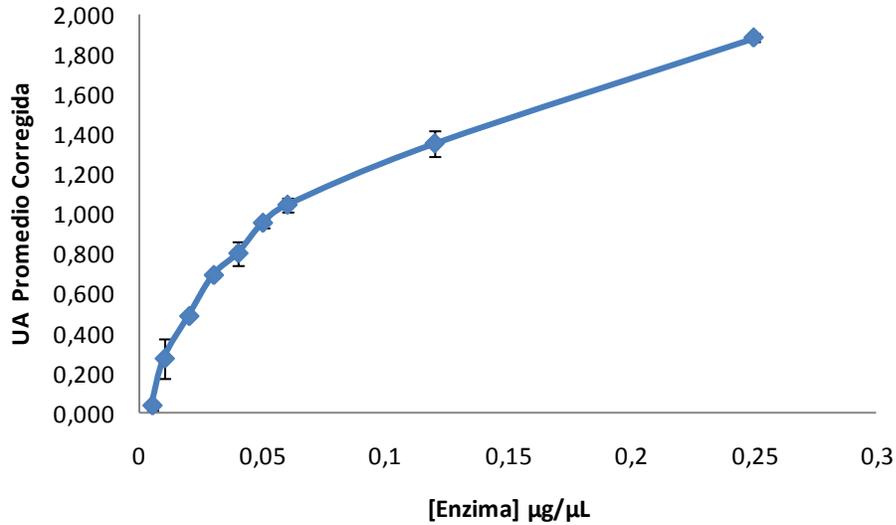
### **CURVA PATRÓN DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA SOBRE AZOCASEINA:**

- A partir del estándar de proteinasa K [ $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ], generar diluciones para los siguientes puntos de concentración [ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ]: 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.12, 0.25.
- En tubos *ependorf* de 1.5mL estériles agregar 200 $\mu\text{L}$  de azocaseina al 1.5%(p/v) disuelta en bicarbonato de sodio 0.1M pH 8.3.
- Agregar 20 $\mu\text{L}$  de cada dilución de la enzima patrón por tubo, por triplicado.
- Fomentar la digestión enzimática incubando la mezcla a 45°C por 60 minutos en baño María.
- Detener la reacción enzimática adicionando 200 $\mu\text{L}$  de TCA al 5%(p/v) por tubo.
- Conservar los tubos a 4°C por 15 minutos.
- Centrifugar los tubos a 8000rpm por 20 minutos a 4°C.
- Recuperar 200 $\mu\text{L}$  del sobrenadante (azopeptidos y aminoácidos solubles en ácido), y disponer dicho volumen sobre placas ELISA 96 pozos fondo plano.
- Determinar la absorbancia de las muestras a 405nm mediante espectrofotometría en un lector ELISA.

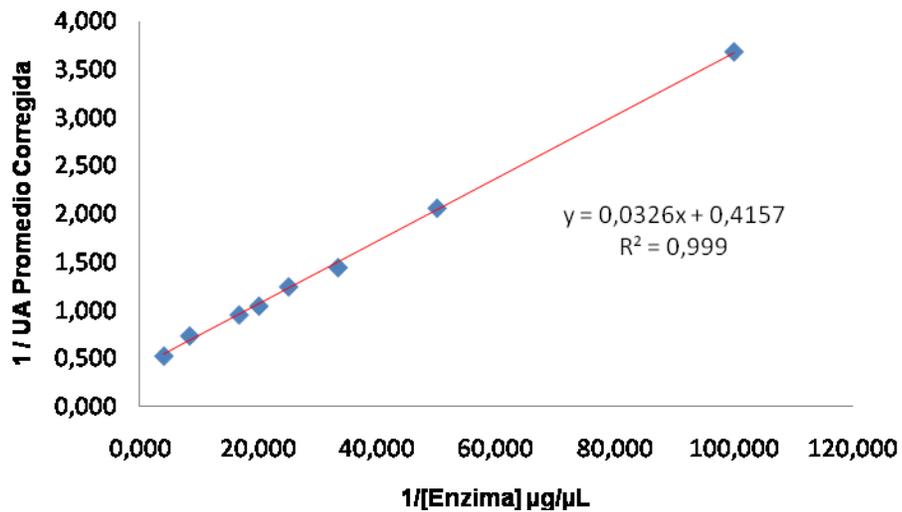
### **Datos utilizados en la construcción de la curva patrón de azocaseina para la determinación de Unidades Equivalentes ( $U_{eq}$ ) de actividad proteolítica:**

Punto	[Enzima] $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	UA 1	UA 2	UA 3	UA Promedio Corregida	1/[Enzima] $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	1/UA
1	0,01	0,392	0,287	0,481	0,272	100,000	3,681
2	0,02	0,602	0,595	0,603	0,485	50,000	2,062
3	0,03	0,793	0,813	0,813	0,691	33,333	1,446
4	0,04	0,859	0,910	0,980	0,801	25,000	1,248
5	0,05	1,048	1,097	1,062	0,954	20,000	1,048
6	0,06	1,174	1,186	1,119	1,045	16,667	0,957
7	0,12	1,425	1,482	1,512	1,354	8,333	0,739
8	0,25	1,987	2,021	1,993	1,885	4,000	0,530
Blanco		0,116	0,113	0,116			

**Curva patrón de azocaseína para la determinación de Unidades Equivalentes ( $U_{eq}$ ) de actividad proteolítica.**  
 (Barras de error = D.S. de tres replicas)



**Linealización por dobles recíprocos (Lineweaver Burk Plot) de la curva patrón de azocaseína para la determinación de Unidades Equivalentes ( $U_{eq}$ ) de actividad proteolítica.**



**PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACION DE UNIDADES DE ENZIMA EQUIVALENTES ( $U_{eq}$ ):**

***Bajo los siguientes supuestos:***

Una Unidad de Enzima es la cantidad de proteinasa K requerida para generar un  $\Delta_{405nm}$  de 0,0326 unidades de absorbancia (UA) por minuto de reacción (este número corresponde a la pendiente de la recta producida tras linealizar por dobles recíprocos (Lineweaver Burk Plot) la curva patrón de azocaseína), luego de ejecutar reacciones enzimáticas sobre azocaseína siguiendo las mismas condiciones experimentales enunciadas en la construcción de la curva patrón de actividad proteolítica sobre azocaseína.

Una Unidad de Enzima es la cantidad de proteinasa K requerida para generar un  $\Delta_{630nm}$  de 0,1167 unidades de absorbancia (UA) por minuto de reacción (este número corresponde a la pendiente de la recta producida tras linealizar por dobles recíprocos (Lineweaver Burk Plot) la curva patrón de caseína), luego de ejecutar reacciones enzimáticas sobre caseína siguiendo las mismas condiciones experimentales enunciadas en la construcción de la curva patrón de actividad proteolítica sobre caseína.

***De manera general tenemos que:***

1U proteinasa K  $\rightarrow$   $\Delta_{405nm}$  0,0326UA  $\rightarrow$  1min. Reacción  $\rightarrow$  Azocaseína  $\rightarrow$  45°CX60min.

1U proteinasa K  $\rightarrow$   $\Delta_{630nm}$  0,1167UA  $\rightarrow$  1min. Reacción  $\rightarrow$  Caseína  $\rightarrow$  45°CX60min.

***Obteniendo la equivalencia:***

$$\Delta_{405nm} 0,0326UA \sim \Delta_{630nm} 0,1167UA$$

**Por tanto, para determinar a cuanto equivale 1UA resultante de reacciones sobre azocaseína, en términos de UA resultantes de reacciones sobre caseína, tenemos la siguiente igualdad:**

$$\frac{\Delta_{405\text{nm}} 0,0326\text{UA}}{\Delta_{405\text{nm}} 0,0326\text{UA}} \sim \frac{\Delta_{630\text{nm}} 0,1167\text{UA}}{\Delta_{405\text{nm}} 0,0326\text{UA}}$$

↓

$$1\text{UA sobre azocaseína} \sim 3.579\text{UA sobre caseína}$$

**Teniendo en cuenta que tanto las UA resultantes de la curva patrón de caseína como de la curva patrón de tirosina se determinaron bajo las mismas condiciones experimentales, se pudo determinar la cantidad ( $\mu\text{mol}$ ) equivalente de tirosina liberadas por minuto de reacción, con base en la ecuación de la recta resultante de la linealización de la curva patrón de tirosina**

$$\text{(Log. } \mu\text{mol tirosina)} = \frac{\text{(Log. } 3.579\text{UA)} - (0.2389)}{(0.6679)}$$

↓ *Antilogaritmo del resultado*

$$2.961\mu\text{mol tirosina}$$

**Por tanto obtenemos la siguiente equivalencia global:**

$$1\text{UA sobre azocaseína} \sim 3.579\text{UA sobre caseína} \sim 2.961\mu\text{mol tirosina/minuto}$$

**Ejemplo:**

Si se obtiene un dato de absorbancia de 0.788 referente a la actividad enzimática corregida, la operación necesaria para realizar la conversión a Unidades equivalentes de proteinasa K, es:

$$\begin{array}{lcl} 1\text{UA sobre azocaseína} & \sim & 2.961\mu\text{mol tirosina liberadas/minuto} \\ 0.788\text{ UA sobre azocaseína} & \sim & X \end{array}$$

De esta manera podemos transformar los datos de absorbancia obtenidos en las reacciones proteolíticas sobre azocaseína soluble desarrolladas a lo largo de este trabajo de investigación, a Unidades equivalentes de proteinasa K (Sigma) (Ueq) por  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático, teniendo en cuenta que definimos **una Unidad Equivalente (Ueq) de proteinasa K como la cantidad de enzima que libera  $1\mu\text{mol}$  de aminoácidos positivos para Folin por minuto de reacción a  $45^\circ\text{C}$  empleando azocaseína como sustrato.**

## D. Anexo: Formulación del gel para isoelectroénfoque horizontal (IEF)

Reactivo	Volumen (mL)
Solución ReadySol IEF T4 C3	3.0
Agua desionizada	14.115
Glicerol	2
Anfolitos	0.8
10% (p/v) TEMED	0.015
10% (p/v) APS	0.07
<b>Volumen Total</b>	<b>20.0</b>

### **Procedimiento:**

- Limpiar los vidrios del casete con Triton X-100 o con acetona fría (-20°C) empleando una gaza estéril.
- Remover el detergente y/o el solvente orgánico con abundante agua desionizada.
- Agregar 1mL de Repel Silano (Sigma) sobre la superficie del vidrio que irá en contacto con el gel (vidrio con empaques) de forma uniforme hasta lograr una fina capa hidrofóbica que evite la adherencia del gel al vidrio.
- Fijar el Repel Silano con etanol al 70%(v/v), para luego lavar de nuevo con agua desionizada.
- Ubicar el acetato para IEF sobre el vidrio restante con ayuda de agua desionizada, de manera tal que la parte hidrofílica del papel quede en contacto con el gel.
- Formar el casete con ayuda de pinzas de presión en los extremos del dispositivo, y ubicar el montaje en un sitio nivelado.
- Verter la solución del gel anteriormente descrita en el dispositivo con ayuda de una jeringa y un pipeteador electrónico.
- Agregar una fina capa de agua desionizada sobre la mezcla permitiendo la polimerización anóxica del gel a temperatura ambiente por 1 hora.
- Mantener el dispositivo a 4°C por una hora adicional, antes de desensamblar el casete y retirar el gel.
- Conservar el gel en cámara húmeda a 4°C por 24 horas antes de su utilización.

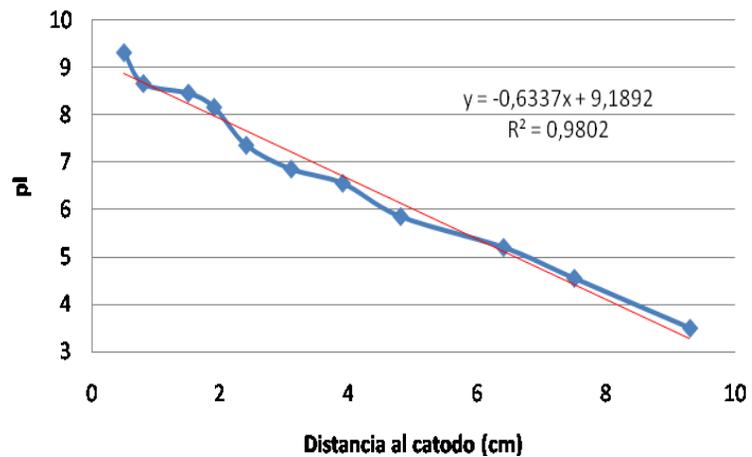
## E. Anexo: Curvas de calibración para la determinación de puntos isoeléctricos relativos (pI)

Kit de calibración de pI de amplio rango Pharmalyte 3-10 (Amersham)

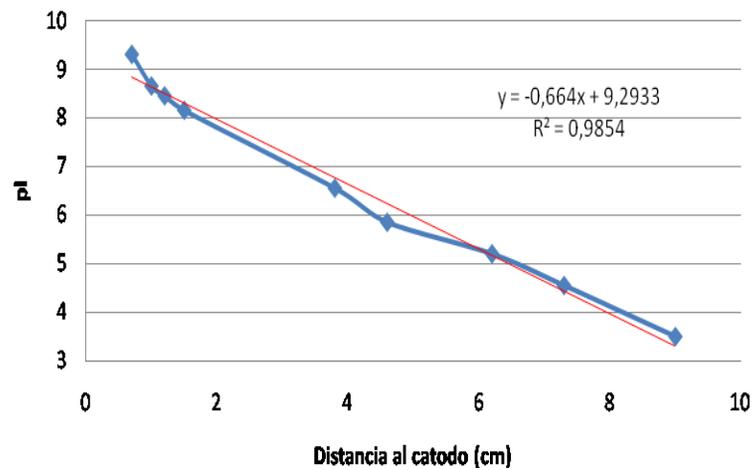
Marcador	pI	Distancia al cátodo (cm)				
		FIGURA 5-2	FIGURA 5-3	FIGURA 5-4	FIGURA 5-5	FIGURA 5-6
<i>trypsinogen</i>	9,3	0,5	0,7	0,6	0,7	0,7
<i>lentil lectin-based band</i>	8,65	0,8	1	0,9	1	0,9
<i>lentil lectin-middle band</i>	8,45	1,5	1,2	1,9	1,7	1,3
<i>lentil lectin-acidic band</i>	8,15	1,9	1,5	2,2	2	1,5
<i>myoglobin-basic band</i>	7,35	2,4	<b>2</b>	2,6	2,6	<b>1,9</b>
<i>myoglobin-acidic band</i>	6,85	3,1	<b>2,5</b>	<b>3,1</b>	3,4	<b>2,5</b>
<i>human carbonic anhydrase <math>\beta</math></i>	6,55	3,9	3,8	4,1	4	4
<i>bovine carbonic anhydrase <math>\beta</math></i>	5,85	4,8	4,6	5,3	5	5,2
<i><math>\beta</math>-lactoglobulin A</i>	5,2	6,4	6,2	6,5	6,7	6,9
<i>soybean trypsin inhibitor</i>	4,55	7,5	7,3	7,3	7,7	7,9
<i>amyloglucosidase</i>	3,5	9,3	9	8	9,4	9,6

Los datos en **negrita** representan puntos "atípicos" eliminados de la recta durante la regresión lineal.

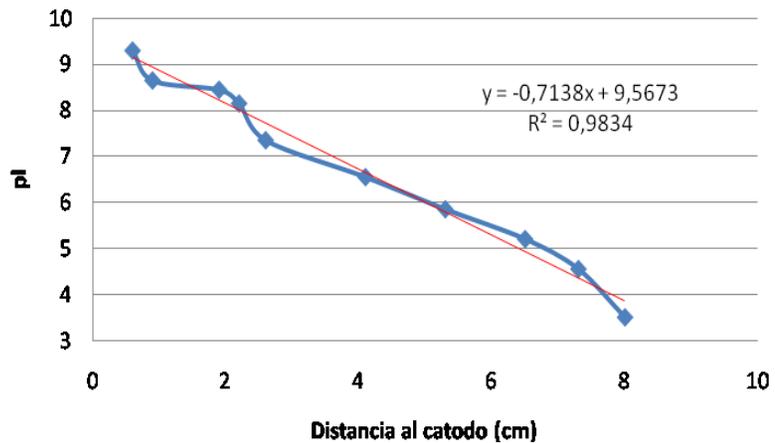
**FIGURA 5-2**



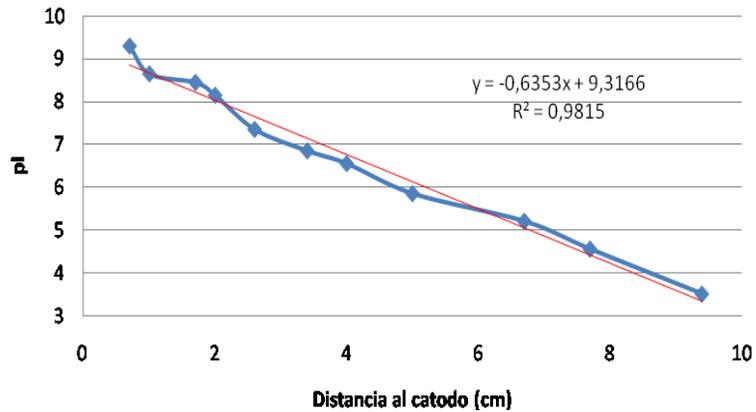
**FIGURA 5-3**



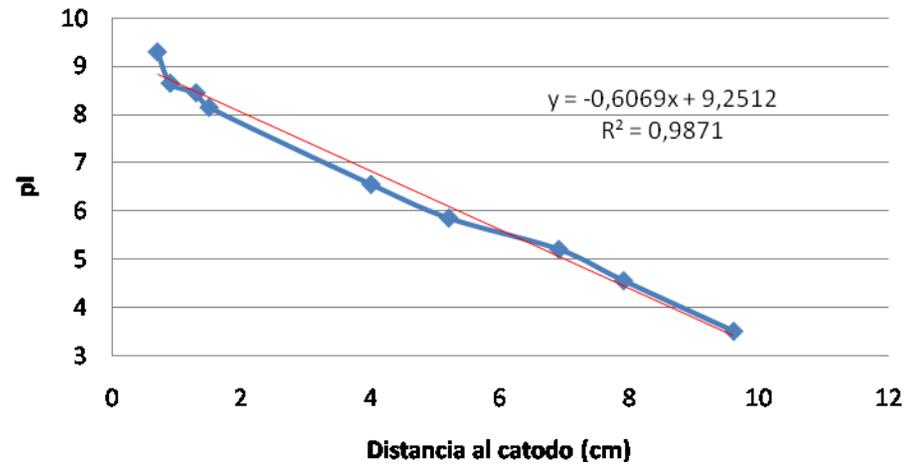
**FIGURA 5-4**



**FIGURA 5-5**



**FIGURA 5-6**



**Curvas de calibración para la determinación de pls relativos sobre geles de poliacrilamida.**

Los puntos isoeléctricos relativos desconocidos se calculan con base en la ecuación de la recta resultante para cada caso particular. Se debe despejar el valor de (y) referente al punto isoeléctrico, empleando en (x) la distancia al cátodo resultante para cada isoforma revelada en el gel.

## **F. Anexo: Formulación tampón fosfato de potasio para cromatografía de intercambio aniónico**

**Solución A:**  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2mM (pH 9.3)

**Solución B:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2mM (pH 5.7)

**Solución C:**  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  500mM

### ***PROCEDIMIENTO:***

- A 250mL de la solución A adicionar 57.14mL de la solución B para obtener un **tampón fosfato de potasio 2mM pH 7.42.**
- A 250 mL de tampón fosfato de potasio 2mM pH 7.42 adicionar 45mL de la solución C para obtener un tampón ~77mM fosfato de potasio pH 8.9. Diluir este tampón en agua destilada calculando la proporción adecuada para obtener un **tampón fosfato de potasio 25mM pH 8.9.**

## G. Anexo: Soluciones *stock* para electroforesis de proteínas sobre geles de poliacrilamida desnaturantes y reductivos

<b>Tampón Tris-Cl 1.5M pH 8.8</b> <b>Volumen total 100mL</b>	Disolver 18.2g Tris base en 80mL de agua desionizada. Ajustar pH a 8.8 con HCl y completar volumen a 100mL con agua. Conservar a 4°C
<b>Tampón Tris-Cl 0.5M pH 6.8</b> <b>Volumen total 100mL</b>	Disolver 6.1g Tris base en 80mL de agua desionizada. Ajustar pH a 6.8 con HCl y completar volumen a 100mL con agua. Conservar a 4°C
<b>Tampón de carga Tris-Cl 0.08M pH 6.8</b> <b>Volumen Total 5mL</b>	Mezclar 0.4mL de Tampón Tris-Cl 0.5M pH6.8, 1mL de SDS al 10% (p/v), 0.625g de glicerol, 0.5mg de azul de bromofenol, 250µL β-mercaptoetanol, y 75mg ditiotreitól. Completar a 5mL con agua desionizada, alicuotar y conservar a -20°C.
<b>Tampón de tanque Tris 25 mM – Glicina</b> <b>192mM pH 8.3</b> <b>Volumen Total 500 mL</b>	Mezclar 1.51g de Tris base, 7.2g de Glicina y 0.5g de SDS. Completar volumen con agua desionizada.

El tampón de carga y de tanque descritos en la tabla son para el manejo de muestras bajo condiciones desnaturantes. Si se desea realizar una electroforesis nativa simplemente hay que reemplazar el volumen de SDS, β-mercaptoetanol y ditiotreitól por agua desionizada, según corresponda.

## H. Anexo: Formulación de geles de poliacrilamida en sistema tampón discontinuo para electroforesis de proteínas

Reactivos	Gel de separación (T12 C2.59)	Gel de concentración (T3.69 C2.45)
Agua desionizada	1.168mL	1.087mL
Tris-Cl 0.5M pH 6.8	-	0.187mL
Tris-Cl 1.5M pH 8.8	1mL	-
Acrilamida 40%(p/v)	1.168mL	0.135mL
Bisacrilamida 2%(p/v)	624mL	0.068mL
SDS 10%(p/v)	0.04mL	0.015mL
Glicerol	0.4mL	-
APS 10%(p/v)	0.02mL	0.007mL
TEMED 10%(p/v)	0.02mL	0.007mL
<b>Volumen Total</b>	<b>4mL</b>	<b>1.5mL</b>

Los datos registrados en la tabla son para la elaboración de un gel bajo condiciones desnaturalantes. Para la preparación de un gel nativo simplemente hay que sustituir el volumen de SDS por agua desionizada.

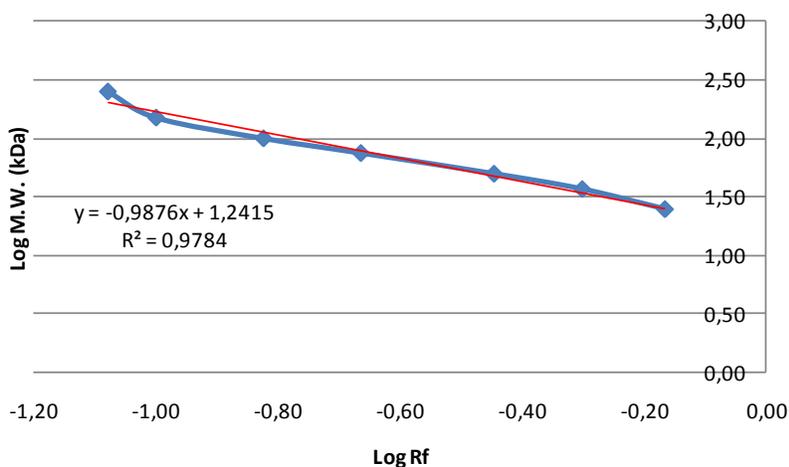
# I. Anexo: Curva de calibración para determinación del peso molecular relativo de las proteínas.

Marcadores de peso molecular (BioRad)

M.W. (kDa)	Distancia de corrido en gel de separación (cm)	Rf	Log Rf	Log M.W. (kDa)
<b>250</b>	0,5	0,08	-1,08	2,40
<b>150</b>	0,6	0,10	-1,00	2,18
<b>100</b>	0,9	0,15	-0,82	2,00
<b>75</b>	1,3	0,22	-0,66	1,88
<b>50</b>	2,15	0,36	-0,45	1,70
<b>37</b>	3	0,50	-0,30	1,57
<b>25</b>	4,1	0,68	-0,17	1,40
<b>10</b>	5,5	0,92	<b>-0,04</b>	<b>1,00</b>

Los datos en **negrita** representan puntos "atípicos" eliminados de la recta durante la regresión lineal.

Curva de calibración para marcadores de peso molecular (BioRad)



Calcular los pesos moleculares relativos desconocidos despejando el valor de **(y)** en la ecuación de la recta, empleando en **(x)** el logaritmo de las Rfs calculadas para cada banda. Luego, calcular el antilogaritmo del resultado obtenido en la ecuación anterior para determinar el peso molecular relativo de cada banda en términos de kDa.

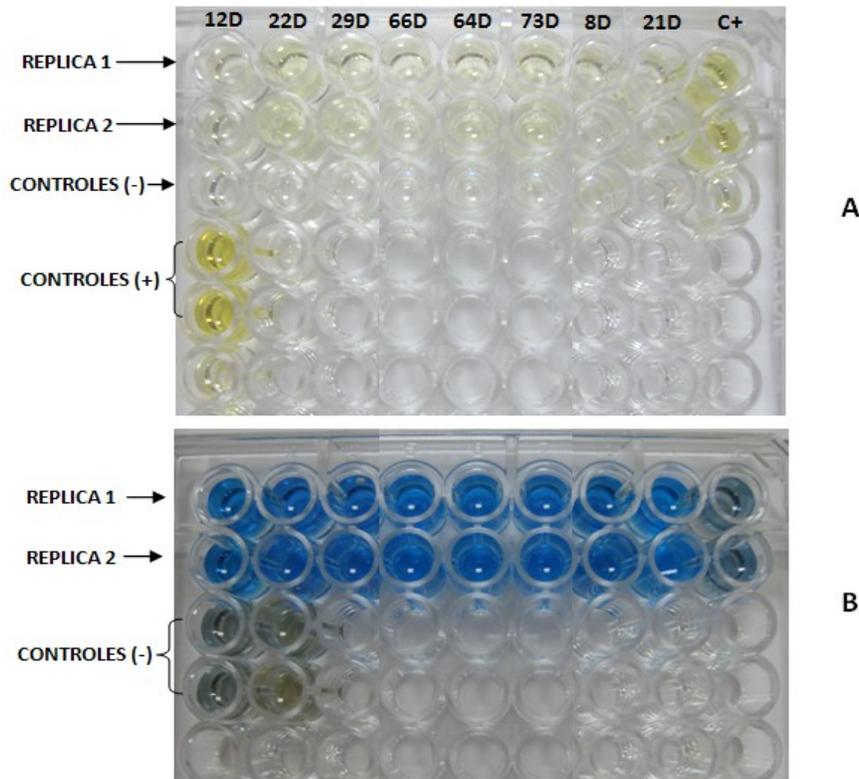
## J. Anexo: Formulación de sistemas tampón empleados en la determinación del pH óptimo de catálisis enzimática.

---

<b>Tampón Citrato 50mM pH 5.0</b>	Mezclar 50mL de una solución citrato de sodio di-hidratado (P.M. 294.10) 50mM pH 8.1 a 19.01°C, con 26mL de una solución ácido cítrico anhidro (P.M. 193.13) 50mM pH 2.43 a 18.5°C.
<b>Tampón Fosfato 50mM pH 6.5</b>	Mezclar 50mL de una solución fosfato de potasio monobásico (P.M. 136.09) 50mM pH 4.5 a 19°C, con 24mL de una solución fosfato de potasio dibásico anhidro (P.M. 174.18) 50mM pH 8.96 a 19.4°C.
<b>Tampón Tris-Cl 50mM pH 8.0</b>	Mezclar 50mL de una solución Tris ultrapure (P.M. 121.14) 50mM pH 10.1 a 18.2°C, con 32.5mL de una solución ácido clorhídrico 37% (P.M. 36.46) 50mM pH 1.6 a 17.7°C.
<b>Tampón Tris-Cl 50mM pH 8.5</b>	Mezclar 50mL de una solución Tris <i>ultrapure</i> (P.M. 121.14) 50mM pH 10.1 a 18.2°C, con 10mL de una solución ácido clorhídrico 37% (P.M. 36.46) 50mM pH 1.6 a 17.7°C.
<b>Tampón Glicina-NaOH 50mM pH 9.0</b>	Mezclar 50mL de una solución glicina <i>ultrapure</i> (P.M. 75.07) 50mM pH 6.3 a 18.05°C, con 7mL de una solución hidróxido de sodio (P.M. 40.00) 50mM pH 12.3 a 18.6°C.
<b>Tampón Carbonato-Bicarbonato pH 9.5</b>	Mezclar 50mL de una solución bicarbonato de sodio (P.M. 84.01) 50mM pH 8.23 a 17.5°C, con 20mL de una solución carbonato de sodio (P.M. 105.99) 50mM pH 10.96 a 17.6°C.
<b>Tampón Glicina-NaOH 50mM pH 10.0</b>	Mezclar 50mL de una solución glicina <i>ultrapure</i> (P.M. 75.07) 50mM pH 6.3 a 18.5°C, con 31mL de una solución hidróxido de sodio (P.M. 40.00) 50mM pH 12.3 a 18.6°C.

---

## K. Anexo: Reporte cualitativo de actividad enzimática y concentración de proteínas para los morfotipos 12D, 22D, 29D, 66D, 64D, 73D, 8D y 21D.



**A:** Determinación de la actividad enzimática para los extractos crudos de los hongos proteolíticos documentales faltantes, sobre placas de 96 pozos fondo plano tras reacciones catalíticas en azocaseína. (12D) *Stachybotrys*; (22D), (29D), (66D), (64D) y (73D) *Penicillium* spp.; (8D) *Chaetomium*; (21D) *E. saccula*; (C+) Control positivo Proteinasa K (Sigma) [0,2µg/µL]; (C-) Controles negativos según corresponda (muestras sometidas a desnaturación por calor a 95°C por 5 minutos). Nótese que, cualitativamente, todos los extractos crudos tratados muestran actividad proteolítica evidente (amarillo) en mayor o menor grado en comparación con los controles negativos.

**B:** Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford modificado para los extractos crudos de los hongos proteolíticos documentales faltantes, sobre placas de 96 pozos fondo plano. (12D) *Stachybotrys*; (22D), (29D), (66D), (64D) y (73D) *Penicillium* spp.; (8D) *Chaetomium*; (21D) *E. saccula*; (C+) Control positivo Proteinasa K (Sigma) [0,2µg/µL]; (C-) Controles negativos (Replicas control negativo universal tampón fosfato de sodio 25mM pH 7.0). Nótese que, cualitativamente, todas las muestras indican una alta concentración de proteínas (azul) en comparación con los controles negativos (coca-cola tenue).

## Bibliografía

**Abidi, F.**, Limam, F., Nejb, M. (2008) Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: Assay as biodetergent. *Process Biochemistry*. Article in Press.

**Abidi, F.**, Limam, F., Nejb Marzouki, M. (2007) Purification and characterization of an alkaline protease Prot 1 from *Botrytis cinérea*: Biodetergent catalyst assay. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **141**: 361-376.

**Adinarayana, K.**, Ellaiah, P., Prasad, D. S. 2003. Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *AAPS PharmSciTech*. **4**(4): 1-9.

**[AICHAW]** American Institute for Conservation of Historic and Artistic Works. (1998) Catálogo de conservación de papel del American Institute for Conservation. Fascículo 2: Hongos. CONSERVAPLAN. Documentos para Conservar N° 14, 1998. Biblioteca Nacional de Venezuela. 49 p.

**Allsopp, D.**, Seal, K., Gaylarde, C. (2004) Introduction to biodeterioration. Cambridge: Cambridge University Press. 233 p.

**Andrews, T.**, Andrews, W., Baker, C. (1992) An investigation into the removal of enzymes from paper following conservation treatment. *Journal of the American Institute for Conservation*. **31**(3): 313-323.

**Anwar, A.**, Saleemuddin, M. (1998) Alkaline proteases: a review. *Bioresource Technology*. **64**: 175-183.

**Arai, H.** 2000. Foxing caused by fungi: twenty-five years of study. *International Biodeterioration and Biodegradation* **46**:181-188.

**Barata, A. R.**, Andrade, M. H., Rodriguez, R. D., Castro, I. M. (2002) Purification and characterization of an extracellular trypsin-like protease of *Fusarium oxysporum* var. *Mini*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **94**(4): 304-308.

**Baraznenok, V. A.,** Becker, E. G., Ankudimova, N. V., Okunev, N. N. (1999) Characterization of neutral xylanases from *Chaetomium cellulolyticum* and their biobleaching effect on eucalyptus pulp. *Enzyme and Microbial Technology*. **25**: 651.

**Barrett, A. J.,** Rawlings, N. D., Woessner, J. F. (2003) The handbook of proteolytic enzymes, 2nd ed. Academic Press. ISBN 0-12-079610-4.

**Basten, D.,** Dekker, P., Schaap, P. (2003) Aminopeptidase C of *Aspergillus niger* is a novel phenylalanine aminopeptidase. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**(2): 1246–1250.

**Benito, J. M.,** Rodriguez, M., Nuñez, F., Asensio, M., Bermudez, M. E., Cordoba, J. J. (2002) Purification and characterization of an extracellular protease from *Penicillium chrysogenum* Pg222 active against meat proteins. *Applied And Environmental Microbiology*. **68**(7): 3532–3536.

**Berner, M.,** Wanner, G., Luhitz, W. (1997) A comparative study of the fungal flora present in medieval wall paintings in the chapel of the Castle Herberstein and in the Parish Church of St Georgen in Styria, Austria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **40**(1): 53-61.

**Bi, B.,** Wang, X., Wu, H., Wei, Q. (2011) Purification and characterization of a novel protease from *Cordyceps sinensis* and determination of the cleavage site motifs using oriented peptide library mixtures. *Food Chemistry*. **126**: 46–53.

**Bourgaize, D.,** Jewell, T. R., Buiser, R. G. (2000) Biotechnology: demystifying the concepts. San Francisco, CA. Benjamin/Cummings, Inc.

**Bradford, M.** (1975) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**: 248-254.

**Busconi, L.,** Fob, E., Martone, C., Trucco, R., Sanchez, J. (1984) Identification of two alkaline proteases and a trypsin inhibitor from muscle of white croaker (*Micropogon opercularis*). *FEBS Letters*. **176**(1): 211-214.

**Cappitelli, F.,** Principi, P., Sorlini, C. (2006) Biodeterioration of modern materials in contemporary collections: can biotechnology help? *TRENDS in Biotechnology*. **24**(8): 350-354.

**Cappitelli, F.,** Sorlini, C. (2005) From papyrus to compact disc: the microbial deterioration of documentary heritage. *Critical Reviews in Microbiology*. **31**: 1–10.

**Charney, J.**, Tomarelli, R. M. (1947) A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *Journal of Biological Chemistry*. **171**(2): 501-505.

**Castiñeyra, I.**, Ferrer, S., San Andres, M. (2004) Estudio de la especificidad de varios preparados enzimáticos de proteasas mediante SDS-PAGE. Departamento de pintura-restauración, Facultad de Bellas Artes. Universidad Complutense de Madrid. En el marco del proyecto 06/HSE/0045/2004 titulado "La utilización de enzimas proteolíticas en procesos de limpieza de obras de arte".

**Chiplonkar, J. M.**, Gangodkar, S. V., Wagh, U.V. (1985) Applications of alkaline protease from *Conidiobolus* in animal cell culture. *Biotechnology Letters*. **7**(9): 665-668.

**Ciferri, O.** (1999) Microbial degradation of paintings. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**(3): 879–885.

**Conesa, A.**, Van Den Hondel, C., Punt, P. J. (2000) Studies on the production of fungal peroxidases in *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**(7): 3016–3023.

**Cooper, R. M.**, Wood, R. K. S. (1980) Cell wall degrading enzymes of vascular wilt fungi. III. Possible involvement of endo-pectin lyase in *Verticillium* wilt of tomato. *Physiol. Plant Pathol.* **16**: 285-300.

**Copeland, R. A.** (2000) Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. Second Edition. John Wiley & Sons, Inc., Publication.

**Cowan, D. A.**, Daniel, R. M. (1982) A modification for increasing the sensitivity of the casein-agar plate assay: a simple semiquantitative assay for thermophilic and mesophilic proteases. *J Biochem Biophys Methods*. **6**: 31-7.

**Cruz, C. A.** (2008) Purificación y caracterización parcial de proteasas alcalinas a partir de hongos filamentosos implicados en la degradación del patrimonio documental en el Archivo Distrital de Bogotá. Tesis de Pregrado. Universidad Militar Nueva Granada. Bogotá, Colombia.

**Daffonchio, D.**, Bonfio, S., Zanardini, E., Abbruscato, P., Realini, M., Urzi, C., y Sordini C. (2000) Molecular tools applied on the study of deteriorated artworks. Capítulo de *Of Microbes and Art. The Role of Microbial Communities in the Degradation and Protection of the Cultural Heritage*. Editores Ciferri, O., Tiano, P. y G. Mastromerri. Primera Edición. Springer. 39-49.

**Das, M. K. L.**, Prasad, J. S., Ahmad, S. K. (1997) Endoglucanase production by paper-degrading mycoflora. *Letters in Applied Microbiology*. **25**: 313 – 315.

**Decoux, S.** (2002) Enzymes used for adhesive removal in paper conservation: a literature review. *Journal of the Society of Archivists*. **23**(2): 187-195.

**Dienes, D.,** Börjesson, J., Häagglund, P., Tjerneld, F., Lidén, G., Réczey, K., Stalbrand, H. (2007) Identification of a trypsin-like serine protease from *Trichoderma reesei* QM9414. *Enzyme and Microbial Technology*. **40**: 1087–1094.

**Ebeling, W.,** Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H., Lang, H. (1974) Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *Eur. J. Biochem*. **47**: 91-97.

**Eggins, H. O.,** Oxley, T. A. (2001) Biodeterioration and Biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*. **48**: 12-15.

**Florian, M. L.** (2005) The four components of biodeterioration and of preservation of our collective memory. Forum Bestandserhaltung.

**Florian, M. L.,** Manning, L. (2000) SEM analysis of irregular fungal fox spots in an 1854 book: population dynamics and species identification. *International Biodeterioration & Biodegradation*. **46**: 205.

**Folin, O.,** Ciocalteu, V. (1927) On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem*. **73**: 627-650.

**Gallo, F.** (1985) Biological factors in deterioration of paper. ICCROM. Roma, Italia. 89p.

**Garfin, D. E.** (1990) Methods in Enzymology. Academic Press, San Diego, CA. Volume 182; Chapter 35.

**Genckal, H.,** Tari, C. (2006) Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats. *Enzyme and Microbial Technology*. **39**: 703–710.

**Guerrero, H.** (1996) La conservación del patrimonio documental. Memorias Quinto Seminario. Sistema Nacional de Archivos. Archivo General de la Nación - Colombia, Bogotá. D.C. 79-89p.

**Godfrey, T.,** West, S. (1996) Industrial enzymology, New York, N.Y. Macmillan Publishers Inc. 2nd ed. p. 3.

**Gorbushina, A.,** Heyrman, J., Dornieden, T., Gonzalez-Delvalle, M., Krumbein, W. E., Laiz, L., Petersen, K., Saiz-Jimenez, C., Swings, J. (2004) Bacterial and fungal diversity and biodeterioration problems in mural painting environments of St. Martins church (Greene-Kreiensen, Germany). *International Biodeterioration & Biodegradation*. **53**: 13.

- Gupta, R.**, Beg, Q. K., Khan, S., Chauhan, B. (2002) An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl Microbiol Biotechnol.* **60**: 381–395.
- Hajji, M.**, Hmidet, N., Jellouli, K., Vallaeys, T., Nasri, M., Sellami-Kamoun, A. (2010) Gene cloning and expression of a detergent stable alkaline protease from *Aspergillus clavatus* ES1. *Process Biochemistry*. Article in Press-PRBI-8988.
- Hajji, M.**, Kanoun, S., Nasri, M., Gharsallahm, N. (2007) Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. *Process Biochemistry.* **42**: 791–797.
- Hankin, L.**, Anagnostakis, S. L. (1975) The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycology.* **67**: 597–607.
- Ho, W. C.**, Ko, W. H. (1997) A simple method for obtaining single-spore isolates of fungi. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **38**: 41-44.
- Hueck, H. J.** (2001) The biodeterioration of materials - An appraisal. *International Biodeterioration & Biodegradation.* **48**: 5-11.
- Iversen, S. L.**, Jorgensen, M. H. (1995) Azocasein assay for alkaline protease in complex fermentation broth. *Biotechnology Techniques.* **9**(8): 573-576.
- Iwashita, K.** (2002) Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* **94**(6): 530-535.
- Jaouadi, B.**, Abdelmalek, B., Fodil, D., Zohra, F., Rekik, H., Zaraï, N., Bejar, S. (2010) Purification and characterization of a thermostable keratinolytic serine alkaline proteinase from *Streptomyces* sp. strain AB1 with high stability in organic solvents. *Bioresource Technology.* **101**: 8361–8369.
- Jellison, J.**, C. Jasalavich. (2000) A review of selected methods for the detection of degradative fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation.* **46**: 241.
- Kubátová, A.** (1989) *Eladia saccula* (Dale) G. Smith, a new micromycete for Czechoslovakia. *Czech Mycology.* **44**(1): 20-25.
- Kudryavtseva, O. A.**, Dunaevsky, Y. E., Kamzolkina, O. V., Belozersky, M. A. (2008) Fungal proteolytic enzymes: features of the extracellular proteases of xylotrophic Basidiomycetes. *Microbiology.* **77**(6): 643–653.
- Kunert, J.**, Kopecek, C. (2000) Multiple forms of the serine protease Alp of *Aspergillus fumigatus*. *Mycoses.* **43**: 339–347.

**Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.

**Lugauskas, A.**, Levinskaite, L., Peciulyte, D. (2003) Micromycetes as deterioration agents of polymeric materials. *International Biodeterioration & Biodegradation*. **52**: 233-242.

**Mateus, J.**, Peña, D., Peña G., Rojas, A., Rojas, J., Zambrano, S., Martinez, M., Florez, C., Santander, M. (2001) Seguimiento y control de biodeterioro microbiológico en documentos de interés histórico en el Archivo General de la Nación. *Universitas Scientiarum*, Revista de la Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. **9**(1): 37-46.

**Mikan, J. F.** (2001) Arabinoxylan degrading enzymes of the wheat pathogen *Stagonospora nodorum*. Thesis PhD. The University of Bath, U. K.

**Monod, M.**, Capoccia, S., Lechenne, B., Zaugg, C., Holdom, M., Jousson, O. (2002) Secreted proteases from pathogenic fungi. *Int. J. Med. Microbiol.* **292**: 405 – 419.

**Montemartini, C. A.**, Ferroni, A., Salvo, V. S. (2003) Isolation of fungal species from test samples and maps damaged by foxing, and correlation between these species and the environment. *International Biodeterioration & Biodegradation*. **51**: 167 – 173.

**Montville, T. J.** (1983) Dual-Substrate plate diffusion assay for proteases. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 200-204.

**Moreira, F. G.**, de Souza, C. G., Costa, M. A., Reis, S., Peralta, R. M. (2007) Degradation of keratinous materials by the plant pathogenic fungus *Myrothecium verrucaria*. *Mycopathologia*. **163**:153–160.

**Morihara, K.**, Oda, K. (1993) Microbial degradation of proteins. Microbial degradation of natural products. VCH Publishers. Weinheim, Germany. *In* W. Guenther (ed.), p. 293–364.

**Naranjo, J.**, Rodríguez, M. (2005) Principales síntomas de deterioro encontrados en los documentos que atesora el Archivo Nacional de la República de Cuba. Archivo Nacional de la República de Cuba. Recuperado de [http://www.arnac.cu/cons\\_result.htm](http://www.arnac.cu/cons_result.htm)

**Palmieri, G.**, Blanco, C., Cennamo, G., Giardina, P., Marino, G., Monti, M., Sannia, G. (2001) Purification, characterization, and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**(6): 2754–2759.

**Pandey, A.** (2003) Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. **13**: 81–84.

- Patil, M.**, Shastri, N.V. (1985) Purification and properties of proteases produced by *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, regulation of production by fructose. *J. Biosci.* **9**(1 & 2): 1–11.
- Pedroza, A. M.**, Matiz, A., Gomez, D. (2001) Manual de laboratorio: Introducción a la biotecnología. Pontificia Universidad Javeriana. 27-32p.
- Peters, D.** (2000) An alternative to foxing? oxidative degradation as a cause of cellulosic discolouration. *Papier Restaurierung.* **1**: 801-806.
- Peyronel, D. V.**, Cantera, A. M. (1995) A simple and rapid technique for postelectrophoretic detection of proteases using azocasein. *Electrophoresis.* **16**: 1894-1897.
- Phadtare, S.**, Rao, M., Deshpande, V. (1997) A serine alkaline protease from the fungus *Conidiobolus coronatus* with a distinctly different structure than the serine protease subtilisin Carlsberg. *Arch Microbiology.* **166**: 414–417.
- Pineda, F.**, Saldarriaga, Y. (1992) Determinación de hongos y bacterias que deterioran los documentos de la universidad de Antioquia. Tesis de grado. Universidad de Antioquia Medellín.
- Press, R. E.** (1976) Observations on the foxing paper. *International Biodeterioration Bulletin.* **12**(1): 27–30.
- Rabilloud, T.**, Carpentier, G., Tarroux, P. (1988) Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis.* **9**: 288-291.
- Ranalli, G.**, Alfano, G., Belli, C., Lustrato, G., Colombini, M. P., Bonaduce, I., Zanardini, E., Abbruscato, P., Cappitelli, F., Sorlini, C. (2005) Biotechnology applied to cultural heritage: biorestitution of frescoes using viable bacterial cells and enzymes. *Journal of Applied Microbiology.* **98**: 73–83.
- Rao, M.**, Tanksale, A., Ghatge, M., Deshpande, V. (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **2**: 597-635.
- Reichard, U.**, Cole, G. T., Hill, T. W., Rachel, R., Monod, M. (2000) Molecular characterization and influence on fungal development of ALP2, a novel serine proteinase from *Aspergillus fumigatus*. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**: 549 – 558.

**Rojas, J. A.** (2007) Caracterización isoenzimática de proteasas, amilasas y purificación parcial de proteasas de hongos filamentosos causantes de biodeterioro de papel industrial. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia.

**Rojas, J. A.,** Cruz, C. A., Mikán, J.F., Villalba, L. S., Cepero de Garcia, M. C., Restrepo, S. (2009) Isoenzyme characterization of proteases and amylases and partial purification of proteases from filamentous fungi causing biodeterioration of industrial paper. *International Biodeterioration & Biodegradation*. **63**: 169–175.

**Saeki, K.,** Ozaki, K., Kobayashi, T., Ito, S. Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **103**(6): 501–508.

**Sand, W.** (1997) Microbial mechanisms of deterioration of inorganic substrates--a general mechanistic overview. *International Biodeterioration & Biodegradation*. **40**(2): 183-190.

**Savitha, S.** Sadhasivam, S., Swaminathan, K., Huei Lin, F. (2011) Fungal protease: Production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. **42**: 298–304.

**Scopes, R. K.** (1982) Protein purification: principles and practice. Springer-Verlag Berlin.

**Segal, J.,** Cooper, D. (1977) The use of enzymes to released adhesives. *The Paper Conservator*. **2**: 47-50.

**Shankar, S.,** Rao, M., Laxman, R. (2011) Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp. *Process Biochemistry*. **46**: 579–585.

**Smook, G. A.** (1990) Tratamientos Superficiales. Manual Para Técnicos de Pulpa y Papel. Atlanta: TAPPI Press. p. 280.

**Stoschek, C. M.** (1990) Increased uniformity in the response of the Coomassie Blue G protein assay to different proteins. *Analytical Biochemistry*. **184**: 111-116.

**Szczepanowska, H.,** Cavaliere, A. (2000) Fungal deterioration of 18th and 19th century documents: a case study of the Tilghman Family Collection. *International Biodeterioration & Biodegradation*. **46**: 245:249.

**Vaillant, M.,** Valentín, N. (1996) Principios básicos de la conservación documental y causas de su deterioro. Madrid: Ministerio de Educación y Cultura. 185 p.

**[VNR]** Van Nostrand Reinhold Company. (1970) Handbook of Pulp and Paper Technology. New York. Litton Educational Publishing. 723 p.

**Vermelho, A.**, Meirelles, M., Lopes, A., Gonçalves, S., Chaia, A., Branquinha, M. (1996) Detection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. **91**(6): 755-760.

**Vesterberg, O.** (1990) *Methods in Enzymology*. Academic Press, San Diego, CA. Volume 182; Chapter 33.

**Villalba, L. S.**, Mikan, J. F. (2005) Degradación del Archivo General de Colombia: actividades hidrolíticas y caracterización isoenzimática de poblaciones microbianas aisladas del patrimonio documental. *Revista Internacional del Patrimonio Histórico*. **3**: 60-65.

**Villalba, L. S.**, Mikan, J. F., Sanchez, J. (2004) Actividades hidrolíticas y caracterización isoenzimática de poblaciones microbianas aisladas del patrimonio documental del Archivo General de Colombia. *Nova*. **2**(2): 50-58.

**Wang, L.**, Ridgway, D., Gu, T., Moo-Young, M. (2005) Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnology Advances*. **23**: 115–129.

**Zyska, B.** (1997) Fungi isolated from library materials: A review of the literature. *International Biodeterioration & Biodegradation*. **40**(1): 43-5.