

BIO-PULITURA: PROTEASI DA ORGANISMI MARINI

F. Palla¹, M. Cammarata¹, M. Salamone²⁻³, M. Sebastianelli⁴, A. Cuttitta³, L. Tutino³,
M.G. Parisi¹, N. Billeci¹, G.Gherzi⁵

¹Dipartimento di Biologia Ambientale e Biodiversità (DAB), Università degli Studi di Palermo, Via Archirafi 38, 90123 Palermo, Italy - franco.palla@unipa.it.

²CNR U.O.S. Capo Granitola, Istituto per l'Ambiente Marino Costiero, Campobello di Mazara (TP), Italy;

³ABIELS.r.l., Sede Legale, via del mare n.3, Campobello di Mazara (TP), c/o IAMC-CNR; Sede Operativa/Amministrativa, c/o Consorzio ARCA incubatore d'impresa, Viale delle Scienze, Edificio 16, 90128 Palermo

⁴ Restauratore, Museo Diocesano di Palermo, Italy.

⁵Dipartimento di Scienze e Tecnologie Molecolari e Biomolecolari, Università degli Studi di Palermo, Viale delle Scienze Ed.16, 90128 Palermo, Italy.

Riassunto

La pulitura, azione che permette la rimozione di strati soprapposti dalla superficie di un manufatto, è una delle prime e più importanti fasi attuate in interventi di restauro conservativo. Questa deve essere eseguita in modo da non causare danni irreversibili, quindi effettuata in modo selettivo, differenziando l'azione tra zone diverse e rimuovendo strati successivi di deposito senza agire in modo diretto con i materiali originali della superficie. In questo studio sono state utilizzate nuove idrolasi isolate da organismi marini la cui attività proteasica è stata saggiata in laboratorio, su diversi substrati (gelatina e caseina) e la cui peculiarità è di essere attivi in un *range* di temperature compreso tra 4°C e 37°C. Questo studio inter-disciplinare presenta i risultati di test di rimozione di strati soprapposti, le cui componenti idrosolubili sono state risolte mediante cromatografia per esclusione molecolare ad alta pressione SEC-HPLC (BioSuite 250 – 10 µm SEC 7,5 x 300 mm Waters), seguita da analisi elettroforetica su gel di acrilamide (SDS-PAGE 15%) e colorazione delle bande tramite *silver staining*. Le indagini rilevano la presenza di molecole proteiche di peso molecolare compreso tra 20 - 90 kDa. A differenza di quelle in commercio, attive a temperature prossime ai 37°C, le proteasi utilizzate in questo studio hanno permesso di operare una rimozione controllata di strati soprapposti, agendo con valori di temperatura corrispondenti a quelli dell'ambiente in cui sono state utilizzate (19-25.5°C). I test di pulitura sono stati condotti su opere eterogenee, realizzate in epoche diverse e sottoposte a diverse modalità di conservazione; al fine di eseguire la caratterizzazione biochimica e molecolare di queste proteasi, e di valutare l'effettiva applicabilità nella reale pratica quotidiana del restauro e su strati so-

prammessi di diversa genesi. Questo permetterà di implementare i protocolli di bio-pulitura coerentemente con i principi del restauro conservativo.

Parole chiave: bio-cleaning, proteasi, rimozione strati soprammessi, restauro conservativo

Abstract

One of the first and most important steps during the conservative restoration of artifact, is the action of cleaning, which allows to take out organic layers such as animal glue or other protein mixtures, that cover the original surface. Cleaning must be performed carefully and in a selective way, making distinction between different areas, with the aim to not damage irreversibly the surface of the object, and removing the deposits without acting directly with the original materials of the surface. In this study have been used hydrolyses isolated from marine organisms, whose peculiarity is to be active in a range of temperatures between 4 ° C and 37 ° C.

Their protease activity was examined under laboratory conditions, on different substrates such as gelatin and casein. This interdisciplinary study presents the results obtained cleaning with this hydrolyses, whose water-soluble components were solved by molecular exclusion chromatography, high pressure SEC-HPLC (BioSuite 250 to 10µm x 300 mm Waters SEC 7.5), followed by acryl amide gel electrophoresis (SDS-PAGE 15%) and silver staining of the bands.

The investigations revealed the presence of protein molecules, whose weight was between 20 and 90 kDa. Unlike the commercial one, the proteases used in this study, are active at temperatures close to 37 °C, and this allowed to carry out the removal of the protein layer in a controlled way, acting at the same temperature of the environment were the objects are exposed (19-25.5 °C). Cleaning tests were performed on different typologies of surface, subjected to different storage conditions, with the aim of performing the biochemical and molecular characterization of these proteases, and so to test the real applicability for the removal of different organic layers, in restoration projects.

It will improve the knowledge concerning bio-cleaning procedures, respecting the aim of conservative restoration.

Keywords: bio-cleaning, protease, secondary layers removal, conservative restoration

Introduzione

I primi tentativi di pulitura mediante l'uso di enzimi risalgono al 1970 e furono realizzati, inizialmente su manufatti di natura cartacea e dopo su opere policrome (tele e tavole), ma rimasero esperienze isolate. Wendelbo [1] riportava il trattamento enzimatico, Tripsina in tampone fosfato a pH 8.0, per 10 minuti a 40°C, di colle animali che in libri avevano prodotto l'adesione di alcune pagine. Segal e Cooper [2] eseguirono un duplice trattamento enzimatico per la rimozione da pergamene, di adesivi a base di amido e proteine, rispettivamente con Amilasi (in tampone fosfato pH 7.0, incubando a 38°C sino a 60 minuti) e con proteasi microbica (in tampone fosfato a pH 7.5 incubando a 40°C). Makes, nel 1982, riportava la prima applicazione su tele dipinte l'uso di amilasi e proteasi per la rimozione di colla di pasta dal retro di un dipinto a olio [3] e, nel 1988, l'uso di una miscela di enzimi per la rimozione di un legante proteico/oleoso da una superficie pittorica [4]. La rimozione di una spessa patina proteica dalla superficie di un dipinto a olio su tela, fu riportato nel 1994 da Bellucci e Cremonesi [5], che utilizzarono proteasi e lipasi microbica, entrambi in forma gelificata a pH 8.0. Sempre nello stesso anno Bonomi [6], descrive la rimozione di una patina proteica da una scultura policroma in terracotta, mediante l'uso di proteasi in soluzione acquosa riscaldata a 40°C. In letteratura sono riportate alcune esperienze di bio-pulitura, che hanno previsto l'azione diretta di batteri e l'uso di enzimi purificati. Sorlini e collaboratori [7, 8], hanno realizzato la bio-pulitura di affreschi del Camposanto Monumentale di Pisa, ricorrendo a cellule batteriche vitali del genere *Pseudomonas*, ceppo *P. stutzeri* A29, in grado di degradare la colla in tempi rapidi, riducendo al minimo il rischio d'alterazione dei pigmenti, con un'efficienza compresa tra 80-90%. L'operazione è stata eseguita su diverse zone dell'affresco, mantenendo i batteri sulla superficie per un periodo di 10-12 ore alla temperatura compresa tra 28-30°C. Questi batteri eterotrofi sono capaci di degradare la maggior parte della sostanza organica, mentre per la rimozione della colla residua è stata utilizzata la proteasi *Type-XIX*. Questa metodologia prevede che alla fine del trattamento, i batteri applicati siano rimossi dalla superficie, per evitare il possibile innesco di processi deteriogeni a carico dei pigmenti. In questo studio l'azione "distruttiva" conseguente al metabolismo di batteri di *P. stutzeri*, è stata utilizzata con successo per idrolizzare gli strati soprammessi di colle proteiche presenti sulle superfici degli affreschi. L'impiego di *P. stutzeri* è stato riportato anche da Bosch Roig et al. [9], per la bio-pulitura di dipinti murali. Attualmente, proteine enzimatiche come le Amilasi possono essere sia d'origine animale (amilasi pancreatica, ptialina della saliva) sia di derivazione batterica (*Bacillus sp.*) o fungina (*Aspergillus sp.*); le Lipasi da tessuti animali (pancreas), da tessuti vegetali (germi di avena e frumento), da specie batteriche come *Bacillus* e da funghi come *Aspergillus* e *Penicillium*; Pepsina, Tripsina e le Proteasi possono essere estratte sia da pancreas e

stomaco di animali, sia da microrganismi come *Bacillus* e *Aspergillus*. L'utilizzo razionale di un enzima o di una miscela enzimatica, richiede informazioni sulla natura del materiale da rimuovere (proteine, amidi, oli e grassi), sull'attività idrolitica e sulla specificità d'azione dell'enzima, sulla temperatura, pH e concentrazioni saline ottimali per il corretto funzionamento [10]. Le idrolasi, utilizzate in questo studio, isolate da organismi marini, hanno permesso di rimuovere strati proteici (principalmente colle animali) in condizioni di "temperatura ambiente" (19-25,5°C), cioè senza riscaldare né la soluzione enzimatica né la superficie su cui è stata applicata. I saggi di pulitura sono stati eseguiti su porzioni di arredi lignei policromi. Noi ipotizziamo che questi enzimi permetteranno di definire dei protocolli di bio-pulitura coerenti con i principi del restauro conservativo.

Materiali e metodi

L'efficacia degli enzimi estratti da organismi marini è stata saggiata su alcuni manufatti policromi appartenenti al XVII e XVIII secolo, denominati SL1, CM1, SGA1. I test di pulitura sono stati eseguiti per rimuoverne strati soprammessi di natura proteica, come di colle di origine animale frequentemente utilizzate in passato allo scopo di "rinnovare" la presentazione estetica del manufatto.

Caratterizzazione delle macromolecole proteiche che compongono lo strato soprammesso: High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Microframmenti di strato soprammesso, omogeneizzati mediante Ultra – Turrax in ghiaccio per 5 minuti, sono stati disciolti in dH₂O (P/V) e dopo centrifugazione (epENDORF microfuge) a 13000 rpm per 20 minuti è stato recuperato il supernatante. L'analisi quantitativa delle proteine è stata condotta secondo il metodo Bradford (1976) utilizzando come standard l'albumina sierica bovina (BSA, in concentrazione da 0,1 mg/ml a 10 mg/ml). I profili di separazione dei campioni sono stati ottenuti utilizzando una colonna di silice ad esclusione di peso molecolare, BioSuite 250 - 10 Tm SEC– 7,5x300 mm Waters (stabile da pH 2,5 a 8). La pressione di esercizio era pari a 350 psi (24 atmosfere circa). Aliquote da 200µl di ciascun campione sono state inserite nelle colonne cromatografiche mediante un iniettore manuale reodine, e la lettura è stata eseguita contemporaneamente a 280nm e 220 nm (mAU), per 30 minuti in TBS (NaCl 150 mM, TRIS HCl 10mM pH 7,4) [11].

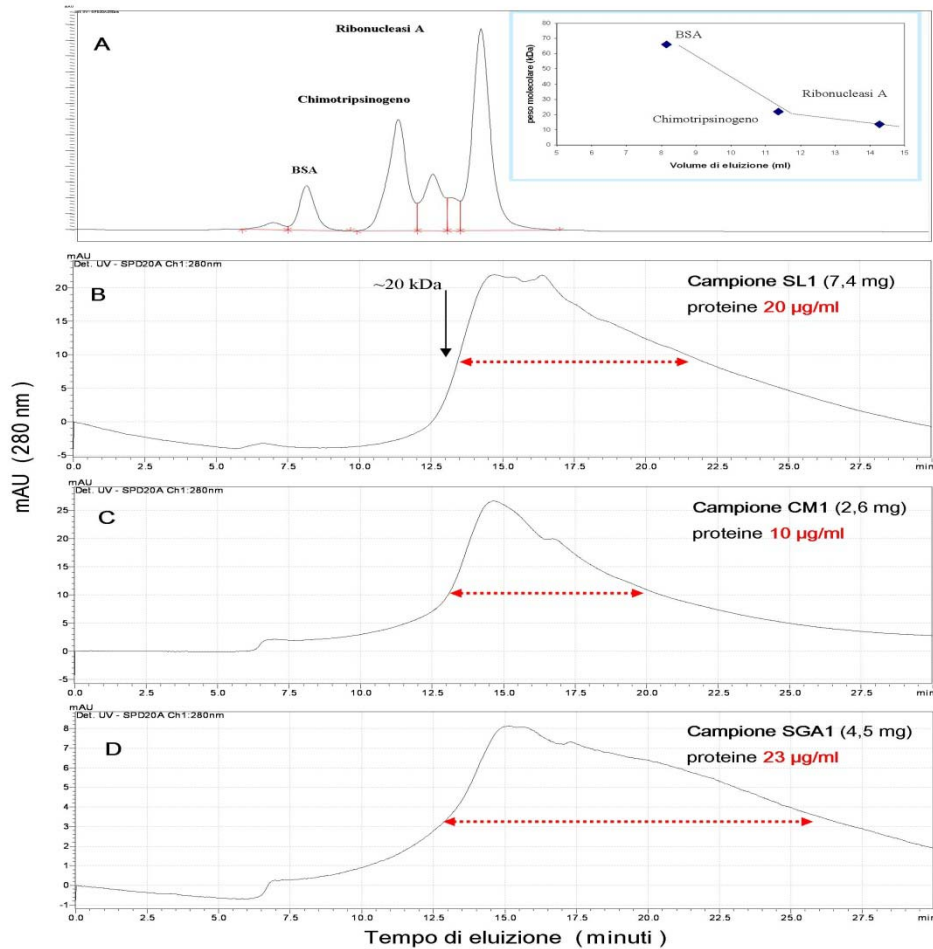


Fig 1. Profili di purificazione HPLC ottenuti utilizzando una colonna a esclusione di peso molecolare, BioSuite 250 10 µm (Waters); A: Standard; B: eluizione del campione SL1 ;C: eluizione del campione CM1; D: eluizione del campione SGA1.

Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS

L'elettroforesi SDS-PAGE è stata eseguita, secondo il metodo di Laemmli [12], su gel di Acrilammide al 10% (p/v) in un apparato mini protean (BIO-RAD). Dopo la migrazione a 190 V per 45 minuti, il gel è stato colorato con soluzione Coomassie (2 gr. Blu di Coomassie, 500 ml Metanolo, 100 ml Acido acetico, 400 ml acqua distillata). In seguito decolorato in una miscela di Acido acetico 10 %, Metanolo 40 %, acqua distillata 50 %. Il Peso molecolare delle proteine è stato determinato utilizzando il marker standard 66,0-20,0 kD della Sigma [11].

Zimogramma su gelatina

Per lo zimogramma (Fig. 2), metodo elettroforetico per la misurazione dell'attività proteolitica è stato utilizzato un gel SDS-PAGE impregnato di gelatina, degradata dall'attività enzimatica estratta da organismi marini, durante il periodo d'incubazione. Il gel dopo la corsa elettroforetica è stato immerso in una soluzione di TRIS-HC (50 mM, pH 7.4), contenente 1.5% Triton X-100, 0.02% Na Azide, 2 mM CaCl₂. La colorazione è stata eseguita con blu di Coomassie R250, al fine di svelare la presenza di bande bianche su fondo blu scuro, che evidenziano un'attività proteolitica [13].

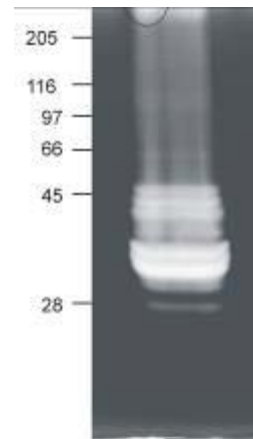


Fig. 2. Zimografia su gelatina; 2 mg di proteine della miscela enzimatica sono stati caricati sul gel, per la valutazione dell'attività gelatinolitica a 4°C.

Misura dell'attività protesica

L'attività proteasica è stata determinata con il metodo di Kembhavi et al. [14] utilizzando come substrato la caseina. Un'aliquota di 0,5 ml di estratto enzimatico è stata aggiunta a 0,5 ml di 100 mM TRIS-HCl (pH 8,0) contenente 1% Caseina, e incubata per 15 min a temperatura ambiente. La reazione è stata interrotta mediante l'aggiunta di 0,5 ml di acido Tricloro-acetico al 20%. La miscela, mantenuta a temperatura ambiente per 15 minuti e stata centrifugata a 13.000 rpm (15 minuti), rimuovendo il precipitato. Sono stati misurati i valori di assorbanza a 280 nm sia dei campioni sia di soluzioni standard di tirosina (per disegnare la relativa curva standard). L'attività di un'unità di proteasi è stata definita come la quantità di enzima necessaria per idrolizzare 1 mg per millilitro in 1 minuto di tiroxina, a temperatura ambiente (20°C).

Test di attività enzimatica

La valutazione dell'attività enzimatica è stata eseguita saggiando la capacità delle proteasi di digerire sia la gelatina sia la caseina, in modo da evidenziare la presenza di diverse classi di enzimi [13]. La zimografia ha permesso di individuare il numero di enzimi presenti e il loro peso molecolare. Per valutare l'attività proteasica è stata utilizzata come substrato la caseina, digerita in funzione del tempo in condizioni di temperatura ambiente (20°C), Fig. 3.

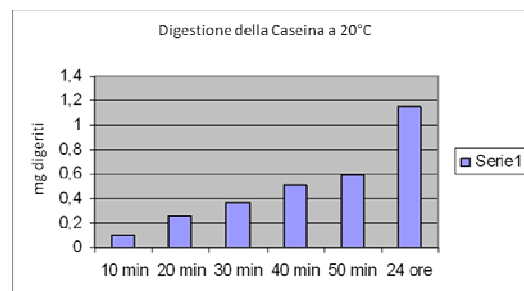


Fig. 3. Istogramma della digestione enzimatica di caseina a temperatura ambiente; quantità di caseina digerita in funzione del tempo.

Saggi di bio-pulitura

Le proteasi, a una concentrazione di 1mg/ml, sono state utilizzate in soluzione acquosa contenente 10mM TRIS-HCl pH 8.0 e adoperando un gel supportante (Klucel G al 5%). Il ricorso alla soluzione in forma gelificata garantisce un'applicazione selettiva e controllabile, considerando che la viscosità del gel permette una notevole riduzione dell'apporto di umidità sulla superficie. I tasselli di pulitura (circa 4 cm²) sono stati realizzati sia con la soluzione di reazione contenente l'enzima (E) sia con la sola soluzione di reazione (C=controllo negativo), per 5 e 10 minuti. I risultati migliori, confrontati con il controllo negativo, sono stati ottenuti applicando la soluzione enzimatica per dieci minuti, come riportato per il manufatto SG1 in Fig. 4.

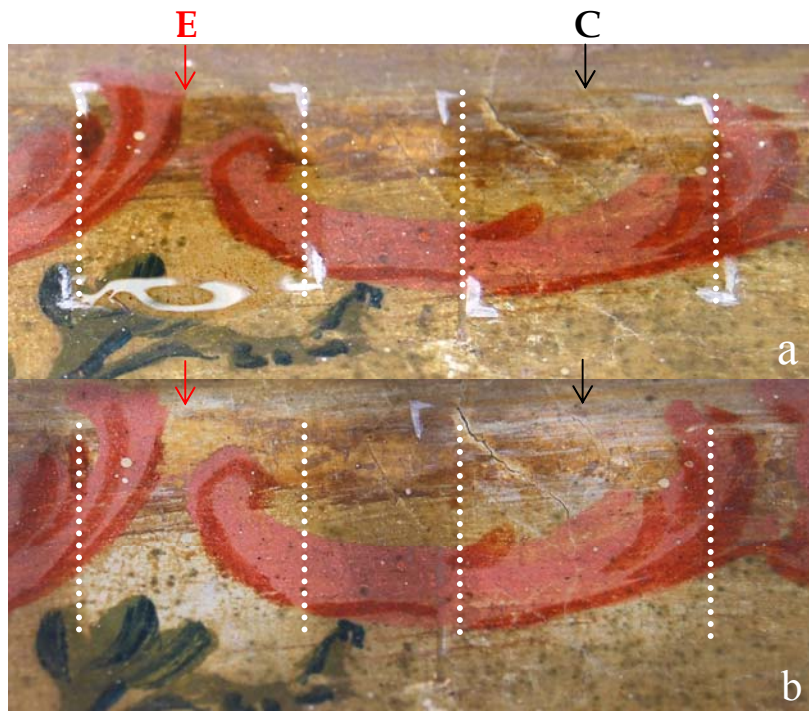


Fig. 4. SG1- test di bio-pulitura: E= soluzione di reazione + enzima; C= soluzione di reazione. I tasselli nella parte superiore della figura (a) corrispondono all'applicazione delle soluzioni E - C, mediante Klucel G al 5%; quelli nella parte inferiore della figura (b) mostrano l'effetto delle soluzioni E - C dopo 10' di applicazione. Le soluzioni contenenti Klucel sono state rimosse mediante tampone imbibito con acqua distillata.

Risultati e Conclusioni

Questo studio interdisciplinare presenta i risultati dei test di rimozione degli strati soprammessi di natura proteica (colla animale), le cui componenti idrosolubili sono state caratterizzate mediante cromatografia per esclusione molecolare ad alta pressione SEC-HPLC (BioSuite 250 – 10 µm SEC 7,5 x 300 mm Waters), seguita da analisi elettroforetica su gel di acrilamide (SDS-PAGE 15%) e colorazione delle bande tramite *silver staining*. Le indagini, condotte utilizzando campioni di pochi milligrammi, rilevano la presenza di molecole proteiche con concentrazione

compresa tra 24 e 110 µg/ml, peso molecolare tra 20-35 kDa e in misura minore tra 60-90 kDa. I risultati dell'attività enzimatica, eseguiti saggiando la capacità di digerire sia la gelatina sia la caseina, sono stati condotti rispettivamente alla temperatura di 4°C e ambiente (20°C).

I saggi di pulitura riportati in questo studio hanno avuto lo scopo di valutare il possibile utilizzo di proteasi isolate da organismi marini per la rimozione di colle animali, che alteravano la corretta lettura di alcuni manufatti lignei decorati. Il loro utilizzo è stato eseguito alle temperature degli ambienti in cui i manufatti erano conservati (19-25,5°C), secondo i criteri del restauro moderno: compatibilità con i materiali costitutivi originali; minimo intervento; selettività e controllabilità dell'azione di pulitura (per rendere l'operazione meno invasiva); effettiva applicabilità del prodotto come mezzo pulente sotto il profilo pratico ed economico (costi e dei tempi di lavorazione). L'utilizzo della cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) ha consentito di definire sia la natura degli strati presenti sulla superficie dei manufatti, sia il protocollo (concentrazione enzimatica/tempi) più idoneo per la rimozione biologica degli stessi. L'applicazione di queste proteasi ha permesso la rimozione dello strato soprammesso in tempi ridotti e soprattutto in un intervallo di temperatura coincidente con quella ambientale. Questa caratteristica costituisce un elemento innovativo rispetto ai prodotti attualmente in commercio, permettendone l'uso nelle condizioni ambientali del luogo di provenienza o di custodia dell'opera.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano il Museo Diocesano di Palermo. La ABIEL srl, Spin-Off dell'Università degli Studi di Palermo - CNR di Mazara del Vallo, Trapani.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- [1] WENDELBO O., FOSSE B., 1970 - *Protein "surgery". A restoring procedure applied on paper*, Restaurator, 1, 245-248.
- [2] SEGAL J. & COOPER D., 1977 - *The use of enzymes to release adhesives*, Paper Conservator, 2, 47-50.
- [3] MAKES F., 1982 - *Enzymatic consolidation of a painting: seventeenth century landscape from Skokloster Palace*, in Contribution of the Washington Congress, IIC, London, 25-30.
- [4] MAKES F., 1988 - *Enzymatic consolidation of the portrait of Rudolf II with a multi-enzyme preparation isolated from Antarctic krill*, Goteborg Studies on Conservation 1, Acta Universitatis Gothoburgensis, Goteborg, Sweden.
- [5] BELLUCCI R., CREMONESI P., 1994 - *L'uso degli enzimi nella conservazione e nel restauro dei dipinti*, Kermes 21, 45-64.
- [6] BONOMI R., 1994 - *Utilizzo degli enzimi per il restauro di una scultura in terracotta policroma*, in OPD Restauro, 6, 101-107.

- [7] RANALLI G., BELLI C., BARACCHINI C., CAPONI G., PACINI P., ZANARDINI E., SORLINI C., 2003 - *Deterioration and bioremediation of fresco: A case-study*, in C. Saiz-Jmenez ed., *Molecular Biology and Cultural Heritage*. Balkema Publisher, Lisse, the Netherland, 243-246.
- [8] RANALLI G., BELLI C., ALFANO G., LUSTRATO G., COLOMBINO M.P., BONADUCE I., ZANARDINI E., ABBRUSCATO P., CAPITELLI F., SORLINI C., 2005 - *Biotechnology applied to cultural heritage: bio-restoration of frescoes using viable bacterial cells and enzymes*. *J. Applied Microbiology* 98, 73-83.
- [9] BOSCH ROIG P., MONTES ESTELLES R., REGIDR ROS J.L., SORIANO SANCHO P., DOMENECH CARBO M.T., 2011 - *Bio-cleaning of wall paintings with bacteria*, in *Proceedings of 15th International Biodeterioration & Biodegradation Symposium*, BOKU-VIT-FEMS 19-24 September 2011, Vienna, Austria.
- [10] CREMONESI P., 1999 - *L'uso degli enzimi nella pulitura di opere policrome*, Padova, ed. il Prato.
- [11] PATRICOLO E., CAMMARATA M., D'AGATI P., 2001 - *Presence of thyroid hormones in ascidian larvae and their involvement in metamorphosis*, *J. Experimental Zoology* 290, 426-430
- [12] LAEMMLI U.K. (1970) *Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4*, *Nature* 227, 680 - 685
- [13] SAMBROOK J., MACCALLUM P., RUSSELL D., 2001 - *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Third Edition), CSH Press, USA
- [14] KEMBHAVI A.A., KULKARNI A., PANT A. 1993 - *Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from Bacillus subtilis NCIM No.64*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38: 83-92.