

# ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD DE VARIOS PREPARADOS ENZIMÁTICOS DE PROTEASAS MEDIANTE SDS-PAGE

Isabel Blasco Castiñeyra, Sonsoles de la Viña Ferrer y Margarita San Andrés Moya. Departamento de Pintura-Restauración Facultad de Bellas Artes. Universidad Complutense de Madrid, C/ Greco nº 2 (28040) Madrid. E-mail: [msam@art.ucm.es](mailto:msam@art.ucm.es)

## INTRODUCCIÓN

Durante algunos procesos de restauración de obras de arte policromadas, puede ser 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 de la leche. Los métodos tradicionales más eficaces para la eliminación de este tipo de sustancias son los basados en la utilización de reactivos ácidos o alcalinos. Éstos presentan como principales inconvenientes su escasa especificidad y las condiciones extremas de pH (Burnstock and Learner, 1992).

Por otra parte, la tendencia actual a la hora de elaborar una estrategia de limpieza de una obra de arte se basa en los siguientes principios:

- Caracterización físico-química de los componentes de la obra con el fin de identificar las sustancias que van a ser eliminadas y las que deben permanecer inalteradas.

- Diseño de un protocolo de limpieza *coherente* y *concreto* para cada caso, teniendo en cuenta las ventajas e inconvenientes de la metodología seleccionada.

Una de las principales exigencias es que el resultado del procedimiento empleado sea *controlable* y lo más *selectivo* posible. Dentro de este contexto, la utilización de enzimas proteolíticas para la fragmentación y eliminación de sustancias proteicas, puede ser una alternativa a los métodos tradicionales de limpieza (Blasco et al 2005). Las enzimas poseen la ventaja de eliminar de forma específica ciertos materiales, actuando en un medio acuoso y en unas condiciones de pH compatibles con la estabilidad de la obra (Blasco, 2004).

Sin embargo, aunque son numerosos los trabajos en los que se ha utilizado esta metodología para la eliminación de sustancias proteicas (Segal and Cooper, 1977; Grattan et al, 1987; Makes, 1981, 1984, 1987; Stingari, 1990; Buttazoni et al, 1999), son escasos aquellos de los que se puedan extraer conclusiones generales, que sugieran una metodología de trabajo que permita un control del proceso fiable y reproducible. Dentro de éstos hay que destacar el de Buttazoni et al, 1999 en el que proponen la utilización de la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida para el control del efecto de las proteasas utilizadas sobre un barniz de clara de huevo. No obstante, la

metodología no está explicada de forma precisa y en los resultados expuestos sólo se presenta un esquema de la electroforesis realizada. En una de las calles de la electroforesis se muestra el producto obtenido después de la acción de la papaína sobre el barniz de clara envejecida, pero no aparece la imagen electroforética de éste barniz antes de su fragmentación con la enzima, por lo que no es posible comparar su efecto.

En el campo de la restauración de obras sobre papel, existen algunos trabajos en los que se persigue el desarrollo de una metodología sencilla y reproducible para la eliminación de adhesivos de almidón mediante la utilización de  $\alpha$ -amilasas. Concretamente, en La Albertina se ha diseñado y patentado una papeta para la eliminación de este tipo de sustancias, que puede ser almacenada durante un tiempo considerable y reactivada, simplemente, con la aplicación de humedad (Schwarz et al 1999; Schwarz, 2000).

Diseñar una metodología que permita controlar de forma global el proceso de fragmentación de los diferentes materiales presentes en las obras de arte, mediante la utilización de preparados enzimáticos, implicaría la necesidad de utilizar numerosas técnicas de análisis. Por este motivo conviene estudiar, de forma independiente, la eliminación de los materiales de diferente naturaleza (proteica, lipídica, hidratos de carbono...). Dentro de este contexto, nuestro grupo de investigación está trabajando en el diseño de una metodología, que permita comprobar el efecto de distintas enzimas proteolíticas sobre los aglutinantes proteicos habituales de las obras de arte policromadas: cola, caseína y clara y yema de huevo. Con el fin de analizar éste efecto se ha utilizado la técnica de análisis de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)(1). Esta técnica permite comprobar, tanto el grado de especificidad de las distintas enzimas, como su eficacia a la hora de eliminar este tipo de sustancias. Una primera etapa del estudio ha consistido en la identificación de los patrones electroforéticos de los aglutinantes (gelatina, cola, caseína y clara y yema de huevo) sin envejecer, antes y después de la acción de ciertos preparados enzimáticos. El análisis de los primeros resultados obtenidos ha sido revelador y de gran interés para desarrollar un procedimiento eficaz y específico de control del proceso de fragmentación de estas sustancias (Blasco et al 2004).

Continuando en esta línea de investigación, en este trabajo se presentan los resultados obtenidos de la utilización de diferentes preparados enzimáticos utilizados habitualmente para otras áreas de investigación y, además, se ha analizado el efecto del preparado comercializado por CTS, diseñado para su aplicación específica en procesos de restauración de obras de arte.

## **METODOLOGÍA**

El planteamiento del que se parte para el desarrollo de la metodología experimental seguida en este trabajo, es llevar a cabo una *proteolisis controlada* de los sustratos. Este proceso, consiste en la incubación de las sustancias proteicas (gelatina, cola, caseína y clara y yema de

huevo) con los preparados enzimáticos, durante un tiempo determinado y en condiciones de pH y temperatura controladas, todo ello con el fin de producir una fragmentación (hidrólisis) parcial de las mismas. Las proteínas en disolución acuosa se incuban con los distintos preparados enzimáticos durante 10-20 minutos a temperatura ambiente (23°C-25°C). La reacción se detiene con la adición de un inhibidor de enzimas proteolíticas seguida de una desnaturalización de las muestras (con agentes desnaturalizantes y baño maría 10 minutos). Posteriormente, los productos obtenidos en la reacción enzimática son analizados mediante un método de análisis que permite separar proteínas y péptidos en función de su masa molecular y de su carga: la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (Laemli, 1970) que ha sido descrita previamente (Blasco et al, 2004). Este método nos permite ver si las proteínas han sido fragmentadas al comparar el patrón electroforético de los aglutinantes proteicos (los sustratos) con la de los péptidos obtenidos después de la proteólisis (el producto de la reacción). Las fracciones de mayor masa molecular migran más lentamente a través del entramado del gel y quedan en la zona superior, mientras que los fragmentos de menor tamaño se desplazan hacia la zona inferior, cerca de la zona de máxima migración, denominada frente de la electroforesis.

Los materiales utilizados y las condiciones experimentales han sido los siguientes:

**Proteínas:**

Gelatina: Bactogelatina DIFCO 0143-01; Cola animal: comercial, suministrada en perlas; Caseinato sódico SIGMA C-8654; Clara y yema de huevo: huevo de gallina.

**Enzimas:**

1-Colagenasa tipo XI (*Clostridium histolyticum*) SIGMA (C-7657).

Actividad:>1200 unidades (2) de digestión de colágeno por mg sólido

2-Tripsina SIGMA Tipo II-S (de pancreas porcino) T-7409.

Actividad: 1.000- 2.000 BAEE unidades por mg.

3- $\alpha$ -Quimotripsina SIGMA tipo VII (de pancreas bovino) C-3142.

Actividad: 40-60 unidades por mg sólido

4-Proteasa tipo XVII B SIGMA (V-8) (*Staphylococcus aureus*) P-

2922. Actividad:500-1.000 unidades por mg sólido

5-Subtilisina (*Bacillus licheniformis*) SIGMA P-5380. Actividad:7-15 unidades por mg sólido

6-MIX-ENZIMAS CTS: enzima + tampón (sin especificar)

**Condiciones de proteólisis seguida de electroforesis:** concentración de sustrato: 0,4-0,8 mg ml<sup>-1</sup>; concentración de enzima (todas excepto el preparado de CTS): 0,02 mg ml<sup>-1</sup> ; medio de incubación: agua destilada; tiempo de incubación 20 min. Como el preparado de CTS incluye los componentes del tampón es imposible calcular la concentración de enzima, por lo que se han ensayado varias

concentraciones con un tiempo de incubación de 10 min (recomendado por la casa comercial).

**Equipo de electroforesis:** cubeta BioRad, modelo Miniprotean 3 cell y fuente de alimentación BioRad PAC 300.

**Condiciones de electroforesis:** 150-175 V; temperatura ambiente; 1 hora

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se exponen los resultados correspondientes al producto de la reacción de los diferentes preparados enzimáticos sobre los patrones de los aglutinantes proteicos, siempre comparando este resultado con la imagen electroforética antes de su fragmentación.

Excepto el preparado enzimático de la casa comercial CTS, que sí ha sido diseñado de forma específica para su utilización en procesos de restauración, los demás son preparados diseñados con fines biomédicos o bioquímicos.

### Hidrólisis con $\alpha$ -quimotripsina

La  $\alpha$ -quimotripsina es una enzima que fragmenta las proteínas, preferentemente, en la zona adyacente a los grupos carboxilo de los enlaces peptídicos en los que participan aminoácidos aromáticos (tirosina, triptófano, fenilalanina y leucina) (Barrett et al, 1998). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 1.

(Figura 1)

Como puede verse en esta figura, en estas condiciones de ensayo (20 min de incubación a T<sup>a</sup> ambiente), la quimotripsina hidroliza todas las fracciones de la caseína, fragmenta también las proteínas de la clara de huevo y algunas fracciones de las de la yema de huevo. Respecto a la cola y la gelatina, en ambos casos se observa que existe un cierto grado de hidrólisis, aunque la señal no desaparece totalmente, como ocurre con otros preparados enzimáticos.

### Hidrólisis con la Proteasa tipo XVII B (V8)

Esta enzima, aislada de la especie *Staphylococcus aureus*, muestra preferencia a hidrolizar las proteínas en zonas adyacentes al grupo carboxilo terminal de los aminoácidos ácidos (aspártico y glutámico).

(Figura 2)

Como puede verse en la figura 2 este preparado enzimático tiene un efecto hidrolítico sobre la gelatina, la cola, algunas fracciones de las proteínas de la yema de huevo y la caseína. En este último caso el grado de hidrólisis es menor que el obtenido, en las mismas

condiciones de ensayo, con la quimotripsina (fig. 1). Por otra parte, los resultados obtenidos mediante electroforesis, indican que la clara de huevo no es fragmentada por este preparado enzimático.

### **Hidrólisis con subtilisina**

De los preparados enzimáticos seleccionados, la subtilisina es la enzima que muestra una menor especificidad en cuanto a la zona de hidrólisis, ya que tiene preferencia a fragmentar las proteínas en las zonas adyacentes a aquellos aminoácidos de cadena lateral voluminosa y sin carga. Debido a esta característica, en la figura 3, se ve claramente que todos los sustratos son fragmentados por la acción de esta enzima, llegando a desaparecer totalmente en algunos casos, como la cola, la gelatina y la caseína. Respecto a su efecto sobre las proteínas de la clara y la yema de huevo, como puede verse en la figura 3, este preparado enzimático hidroliza todas las fracciones, que desaparecen prácticamente en el caso de la yema de huevo.

(Figura 3)

### **Hidrólisis con tripsina y colagenasa**

Los resultados del efecto de éstas enzimas sobre los aglutinantes proteicos, analizados en anteriores publicaciones (Blasco et al, 2004), muestran que ambas enzimas son capaces de fragmentar la gelatina, la cola y la caseína logrando una digestión casi total. Sin embargo, en las condiciones ensayadas, no hidrolizan, las proteínas de la clara y la yema del huevo. Sólo se observa un pequeñísimo efecto de la colagenasa sobre algunas fracciones de la yema de huevo.

En el cuadro 1 se muestra un resumen de los resultados obtenidos con los preparados enzimáticos puros sobre los diferentes patrones de los aglutinantes proteicos.

	<b>Quimotripsina</b>	<b>XVIIIB (V8)</b>	<b>Subtilisina</b>	<b>colagenasa</b>	<b>Tripsina</b>
<b>Gelatina</b>	+	+	++	++	++
<b>Cola</b>	+	+	++	++	++
<b>Clara</b>	+	-	++	-	-
<b>Yema</b>	+	+	++	*	-
<b>Caseína</b>	++	+	++	++	++

Cuadro 1. Efecto de los diferentes preparados enzimáticos sobre los aglutinantes proteicos. + (hidrólisis apreciable), (++)hidrólisis significativa), (-) no se aprecia hidrólisis, (\*) hidrólisis muy escasa

## **Hidrólisis con el preparado enzimático de la casa comercial CTS**

El preparado enzimático comercializado por CTS (PE-CTS), es una mezcla de enzimas purificadas y seleccionadas diseñadas para ser utilizadas en una solución viscosa con un espesante celulósico. En las especificaciones técnicas aportadas por la casa comercial se indica que “son adecuadas para la eliminación de sustancias proteicas como caseínas, colas y gelatinas animales, albúminas y huevo”. Respecto a la caseína señalan que el preparado enzimático actúa sobre la caseína como tal, pero no sobre el caseinato cálcico utilizado como aglutinante.

Las condiciones de uso recomendadas por la casa comercial son:

- El tiempo de aplicación debe estar comprendido entre 1-10 minutos para evitar que el gel se seque sobre la obra.
- El tampón necesario para mantener la solución en un intervalo de pH entre 6-8 está contenido en la mezcla liofilizada.
- La temperatura de trabajo se encuentra en un intervalo comprendido entre 20 y 40°C, en el que la enzima muestra un máximo de actividad. La actividad disminuye lentamente a los 20°C y desaparece totalmente a los 10°C.

Teniendo en cuenta estas recomendaciones, se realizaron las proteólisis controladas con las siguientes condiciones operativas:

- Tiempo de incubación 10 minutos
- Temperatura de trabajo: para algunas concentraciones de enzima, se han ensayado dos temperaturas distintas, ambas dentro del intervalo de máxima actividad: 26°C y 36°C.
- Concentración de enzima: el hecho de que el preparado enzimático liofilizado incluya los componentes del tampón, dificulta el cálculo de la concentración de enzima que se utiliza. Se han ensayado diferentes concentraciones del preparado enzimático liofilizado en un rango comprendido entre los 0,1 mg.ml<sup>-1</sup> y la concentración recomendada por la casa comercial de 10 mg.ml<sup>-1</sup>.

Teniendo en cuenta que la concentración de enzima recomendada por CTS es para trabajar con el preparado enzimático en una solución acuosa sobre un sustrato sólido (fase heterogénea) y nuestras condiciones de ensayo se iban a desarrollar con el sustrato y la enzima en disolución acuosa (fase homogénea), se utilizó, como primera aproximación, una concentración de enzima menor que la recomendada. Los resultados obtenidos al incubar los diferentes patrones con una concentración de preparado liofilizado de 0,1 mg.ml<sup>-1</sup>, se muestran en la figura 4.

(Figura 4)

En estas condiciones, el preparado enzimático digiere totalmente la cola, la gelatina y la caseína.

Como la clara de huevo no se hidrolizaba en esas condiciones, y en la yema solo se modificaban algunas bandas, se realizaron ensayos utilizando distintas concentraciones de este preparado, hasta llegar a la recomendada por la casa comercial. Los resultados obtenidos se resumen en el cuadro 2.

	Concentración del preparado liofilizado (mg.ml <sup>-1</sup> )											
	0,1	0,16	0,32	0,48	0,64	0,8	1	2	4	6	8	10
Caseína	++											
Cola	++											
Gelatina	++											
Clara	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Yema	*	*	*	*	*	*	*	+	+	+	+	+

Cuadro 2. Efecto del preparado enzimático de CTS sobre los patrones de los aglutinantes proteicos. En las columnas se muestran las concentraciones de enzima ensayadas (0,1-10 mg.ml<sup>-1</sup>). + (hidrólisis apreciable), (++)hidrólisis significativa), (-) no se aprecia hidrólisis, (\*) hidrólisis de algunas bandas

Del resultado de los datos obtenidos, puede concluirse que el preparado enzimático tiene los siguientes efectos sobre los diferentes sustratos:

-la caseína, la cola y la gelatina sufren una hidrólisis total desde concentraciones de 0.1 mg.ml<sup>-1</sup>.

-La clara de huevo solo presenta un cierto grado de hidrólisis a la concentración recomendada por CTS (10 mg.ml<sup>-1</sup>), aunque la interpretación de los resultados se ve dificultada por la imagen electroforética de la propia enzima a las elevadas concentraciones utilizadas.

-La yema de huevo muestra un cierto grado de hidrólisis, principalmente de la fracción de mayor masa molecular, a todas las concentraciones ensayadas. Sin embargo, a partir de una concentración de 2 mg.ml<sup>-1</sup> se ven afectadas también otras fracciones, tal y como puede observarse en la figura 5, que muestra los resultados obtenidos de la incubación de la clara y la yema de huevo a la concentración recomendada por CTS.

(Figura 5)

Con el fin de comprobar el efecto del incremento de la temperatura durante la incubación con éste preparado enzimático se realizaron otros dos ensayos utilizando como sustrato la clara y la yema de huevo. Las concentraciones de enzima utilizadas se encuentran dentro del intervalo de 0,16 y 1 mg.ml<sup>-1</sup> y las temperaturas a las que se realizaron las incubaciones fueron 26 y 36 °C. Los resultados obtenidos muestran que este incremento de diez grados en la temperatura de incubación, no aporta variaciones significativas en los resultados obtenidos mediante electroforesis.

## CONCLUSIONES

1- La técnica de análisis de electroforesis en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes, resulta adecuada para el control del proceso de fragmentación de los aglutinantes de naturaleza proteica ocasionado por la acción de enzimas proteolíticas. Por tanto, utilizando esta técnica se cumplen las exigencias de *control* de los procedimientos de limpieza empleados, que exigen las tendencias actuales de intervención sobre obras de arte.

2- La cola y la caseína han sido los sustratos más susceptibles a la digestión por parte de las enzimas proteolíticas estudiadas y en las condiciones ensayadas.

3- La clara y la yema de huevo muestran mayor resistencia a la hidrólisis en las mismas condiciones ensayadas, exceptuando el caso del preparado de subtilisina.

4- El preparado enzimático de subtilisina es el que tiene mayor efecto hidrolítico sobre los patrones de los aglutinantes proteicos. Por este motivo sería adecuado para eliminar sustancias de esta naturaleza, siempre que no existan otros materiales proteicos que no deban ser eliminados. Es decir, que no sea necesaria una eliminación selectiva de sustancias proteicas.

5- Del análisis de los resultados obtenidos se observa que el preparado de la casa comercial CTS fragmenta totalmente la cola, la gelatina y la caseína utilizando una concentración de enzima de  $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$ . No obstante, hay que señalar que estos resultados se han obtenido con el sustrato en disolución acuosa.

Su efecto sobre las proteínas de la clara y la yema de huevo es menos agresivo. Concretamente, actúa sobre las fracciones de mayor masa molecular de las proteínas de la yema, a partir de concentraciones de enzima de  $2 \text{ mg.ml}^{-1}$ , y sobre las proteínas de la clara de huevo sólo a la concentración recomendada por la casa comercial ( $10 \text{ mg.ml}^{-1}$ ).

6- En el intervalo de concentración de enzima comprendido entre  $0,16-1 \text{ mg.ml}^{-1}$ , el preparado enzimático de CTS tiene el mismo efecto sobre la clara y la yema de huevo en las condiciones de temperatura ensayadas:  $26^{\circ}\text{C}$  y  $36^{\circ}\text{C}$ .

## NOTAS

(1)- Del inglés Polyacrilamide Gel Electrophoresis (PAGE), en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS)

(2)-Para la definición de unidades ver catálogo de la casa comercial SIGMA

## AGRADECIMIENTOS

-A la Dirección General de Investigación de la Consejería de Investigación de la Comunidad de Madrid como entidad financiadora del proyecto investigación 06/HSE/0045/2004 titulado “La utilización de enzimas proteolíticas en procesos de limpieza de obras de arte. Optimización de las variables que influyen en su eficacia y especificidad”.

-A CTS ESPAÑA, por la información y material suministrado.

## BIBLIOGRAFÍA

BARRETT, A. J., RAULINGS, N.D. AND WOESSNER, J.F Ed. *Handbook of proteolytic enzymes*. San Diego. Academic Press, 1998

BLASCO, I «Trabajo de investigación para la obtención del Diploma de Estudios Avanzados (DEA)». Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (CC Biológicas). Departamento de Pintura-Restauración (Facultad de Bellas Artes). UCM, 2004

BLASCO, I; DE LA VIÑA, S Y SAN ANDRÉS, M, «Fundamentos y antecedentes de la utilización de enzimas en tratamientos de limpieza» *PH53 Boletín del Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico*, abril 2005, 53, especial criterios, p. 24-34.

BLASCO, I; DE LA VIÑA, S Y SAN ANDRÉS, M, «La utilización de enzimas proteolíticas en procesos de limpieza de policromías. Importancia de la realización de estudios previos de caracterización de los preparados enzimáticos» *XV Congreso de Conservación y Restauración de Bienes Culturales*, Murcia, 21-24 octubre, 2004 [pendiente de publicación]

BURNSTOCK, A AND LEARNER, T. «Changes in the surface characteristics of artificially aged mastic varnishes after cleaning using alkaline reagents» *Studies in Conservation*, 1992, vol 37, nº3. 165-184.

BUTTAZZONI, N; CASOLI, A; CREMONESI, P; ROSSI, P «Preparazione e utilizzo di gel enzimatici, reagenti per la pulitura di opere policrome» *Progetto Restauro*, 1999, vol 7, nº16, p. 11-19.

GRATTAN, D; ST HILAIRE, J; BURGESS, H AND MC CAWLEY, C. «The characterization of enzymes for use in paper Conservation» *Conservation of library and archive materials and the Graphic Arts*. Ed. G. Petherbridge, Butterworths, London, 1987, 15-25.

LAEMMLI «Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4» *Nature*, 1970, 227, p. 680-685.

MAKES, F «Enzymatic consolidation of paintings» *ICOM 6<sup>th</sup> triennial Meeting*, Ottawa, 1981, p. 81/2/7-1, 81/2/7-7.

MAKES, F «Enzymatic Removal of lining paste from paintings» *ICOM 7<sup>th</sup> Triennial Meeting*, Copenhagen, September 1984, 10-14, 84.2.26-84.2.30.

MAKES, F «Analysis and conservation of the picture “Rudolph II” by G. Arcimboldi» *ICOM Committee for Conservation*. Sidney, Australia, 1987, p. 173-178

SCHWARZ, I; BLÜHER, A; BANIK, G; THOBOIS, E & MAURER, K-H «The development of a Ready-For-Use Poultice For Local Removal of Starch Paste by Enzymatic Action» *Restaurator*, Germany, 1999, p. 225-244.

SCHWARZ, I «A Pre-Packaged  $\alpha$ -Amylase Poulticing System: Albertina-Kompresse» *The Book and Paper Group The American Institute for Conservation*, 2000, vol 19, p. 19-26

SEGAL, J AND COOPER, D. « The use of enzymes to release adhesives» *Paper Conservator*, 1977, 2, p.47-50.

STINGARI, C. «Vincent Van Gogh’s triptych of Trees in Blossom, Arles (1888). Part I. Examination and treatment of the altered surface coatings» *Cleaning Retouching and Coatings. Technology and practice for Easel Paintings and Polychrome sculpture. Preprints of the contributions to the Brussels Congress*, International Institute for Conservation of Historic and Artistic Works, London, 3-7 September, 1990, p. 126-130

## **PIES DE FIGURAS**

Fig. 1 - Proteolisis con quimotripsina (QT). Gel 12%.

1 gelatina; 2 gelatina + QT; 3 clara de huevo; 4 clara de huevo + QT; 5 caseína; 6 caseína + QT; 7 yema de huevo; 8 yema de huevo + QT; 9 cola; 10 cola + QT.

Fig.2 – Proteolisis con Proteasa tipo XVII (V-8). Gel 12 %.

1 gelatina; 2 gelatina + V-8; 3 clara de huevo; 4 clara de huevo + V-8; 5 caseína; 6 caseína + V-8; 7 yema de huevo; 8 yema de huevo + V-8; 9 cola; 10 cola + V-8.

Fig. 3 – Proteolisis con subtilisina (ST). Gel 12%.

1 gelatina; 2 gelatina + ST; 3 clara de huevo; 4 clara de huevo + ST; 5 caseína; 6 caseína + ST; 7 ST (a mayor concentración); 8 cola; 9 cola + ST; 10 yema de huevo; 11 yema de huevo + ST.

Fig. 4 – Proteolisis con el preparado enzimático de CTS (PE-CTS).

Gel 9%. Concentración del preparado  $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$ . Temperatura de incubación  $26^{\circ}\text{C}$ .

1 cola; 2 cola + PE-CTS; 3 clara de huevo; 4 clara de huevo + PE-CTS; 5 caseína; 6 caseína + PE-CTS; 7 marcadores de masa molecular; 8 PE-CTS (a mayor concentración); 9 gelatina; 10 gelatina + PE-CTS; 11 yema de huevo; 12 yema de huevo + PE-CTS.

Fig 5 - Proteolisis con el preparado enzimático de CTS (PE-CTS).

Gel 9%. Concentración del preparado  $10 \text{ mg.ml}^{-1}$ . Temperatura de incubación  $26^{\circ}\text{C}$ .

1 clara de huevo; 2 clara de huevo + PE-CTS; 3 yema de huevo; 4 yema e huevo + PE-CTS; 6 PE-CTS ( $10 \text{ mg.ml}^{-1}$ )