



INFORME CIENTÍFICO-TECNOLÓGICO¹

PERIODO: mayo 2001 - abril 2003

Legajo N°: 173.311

1. **APELLIDO:** CAFFINI

NOMBRES: Néstor Oscar

2. **TEMA DE INVESTIGACION**

"Obtención de hidrolasas vegetales para ser aplicadas en procesos utilizados en tecnología de alimentos"

3. **DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA**

INGRESO: Categoría: INDEPENDIENTE Mes: JULIO Año: 1998

ACTUAL: Categoría: INDEPENDIENTE desde el mes: JULIO Año: 1998

4. **INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA**

Nombre: Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE)

Dependencia: Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas,
Universidad Nacional de La Plata

Dirección: Calle: 47 y 115 N°. s/n

Ciudad: La Plata Pcia: Buenos Aires Tel: (0221) 423 0121 int. 57

Dirección electrónica: caffini@biol.unlp.edu.ar

Cargo que ocupa: Director

5. **DIRECTOR DE TRABAJOS. (En el caso que corresponda)**

Apellido y Nombres: [Haga clic e inserte el Apellido y Nombre]

Dirección. Calle [Haga clic e inserte la Calle]

Ciudad: [Haga clic e inserte la Ciudad] Pcia: [Inserte Pcia.] Tel: [Inserte Tel.]

Dirección electrónica: [Haga clic e inserte el correo electrónico]

.....
Firma del Director (si corresponde)

.....
Firma del Investigador

Fecha: 6 de mayo de 2003

¹ Art. 11; Inc. "e"; Ley 9688 (Carrera del Investigador Científico y Tecnológico)

6. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO. Debe exponerse, en no más de una página, la orientación impuesta a los trabajos, técnicas y métodos empleados, principales resultados obtenidos y dificultades encontradas en el plano científico y material. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.

El Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE), bajo mi dirección desde su creación por el Consejo Superior de la Universidad Nacional de La Plata hace diez años, ha venido desarrollando una creciente tarea relacionada con el aislamiento, purificación y caracterización de hidrolasas vegetales, en particular proteasas, con el propósito de ampliar el conocimiento que se tiene acerca de los productos naturales de posible aplicación industrial de especies de nuestra flora.

Durante el período que abarca el presente informe (mayo de 2001 a abril de 2003) se han proseguido e intensificado los propósitos fundacionales. En este momento forman parte del LIPROVE dos investigadores de CIC y uno de CONICET, un profesional de apoyo de la CIC, dos docentes con dedicación exclusiva y uno con semidedicación, cuatro becarios de CONICET, uno de la UNLP y uno de la ANPCyT, una tesista de la Universidad Nacional de Luján y once estudiantes avanzados de Bioquímica, lo que hace un total de veinticinco (25) personas afectadas en distinto grado a tareas de investigación. Se continúa con el estudio de nuevas fuentes de fitoproteasas y se han intensificado las líneas dedicadas a su aplicación en la industria alimentaria, en la síntesis en medio orgánico, en la manufactura de cueros y en la biorremediación de efluentes industriales. Se encuentran en distintas etapas de desarrollo nueve tesis doctorales, dos de las cuales serán defendidas durante el corriente año.

En cuanto a la producción científica individual, en el período se han publicado o se encuentran en prensa nueve (9) trabajos en revistas internacionales con referato y se han presentado doce (12) comunicaciones o conferencias en distintos congresos nacionales e internacionales.

En relación a la cooperación internacional, en junio del corriente año el Coordinador Internacional del Subprograma IV del CYTED presentará un proyecto del cual el suscripto es coordinador (“Aplicación industrial de enzimas proteolíticas de vegetales superiores”), que involucra además a otros dos grupos del país, dos de España y uno de cada uno de los siguientes países: Brasil, Chile, Colombia, Cuba, Ecuador, Méjico, Portugal y Uruguay.

La formación de recursos humanos estuvo representada por la dirección de una profesional de apoyo de la CIC, un becario de CONICET, uno de la ANPCyT y otro de la UNLP, además de la dirección de dos tesis doctorales, una de las cuales será defendida el presente año.

Finalmente, la vinculación con el medio productivo se ha concretado a través de un convenio con la Cooperativa Telefónica de General San Martín, de la Provincia de Jujuy, para el desarrollo de un proceso de obtención de papaína hidrosoluble a partir de látex de mamón (*Carica papaya* L), así como la renovación de un convenio con Laboratorios Delver de La Plata para el desarrollo de un procedimiento de cuantificación de proteínas en pellets de girasol.

7. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS O PUBLICADOS EN ESTE PERIODO.
- 7.1 PUBLICACIONES. Debe hacer referencia exclusivamente a aquellas publicaciones en las que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha mención no debe ser adjuntada porque no será tomada en consideración. A cada publicación, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden que figuran en ella, lugar donde fue publicada, volumen, página y año. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparece en la publicación. La copia en papel de cada publicación se presentará por separado. Para cada publicación, el investigador deberá, además, aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del trabajo y, para aquellas en las que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.
- 7.1.1. Bruno, M.A., M.F. Pardo, N. O. Caffini and L.M.I. López. (2003) "Hieronymain I, a new cysteine peptidase isolated from unripe fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae)". *Journal of Protein Chemistry* **22**: 127-34

A new peptidase, named hieronymain I, was purified to homogeneity from unripe fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae) by acetone fractionation followed by cation exchange chromatography (FPLC) on CM- Sepharose FF. Homogeneity of the enzyme was confirmed by mass spectroscopy (MALDI-TOF), isoelectric focusing and SDS-PAGE. Hieronymain is a basic peptidase (pI > 9.3) and its molecular mass was 24,066 Da. Maximum proteolytic activity on casein (more than 90% of maximum activity) was achieved at pH 8.5-9.5. The enzyme was completely inhibited by E-64 and iodoacetic acid and activated by the addition of cysteine; these results strongly suggest that the isolated protease should be included within the cysteine group. The N-terminal sequence of hieronymain (ALPESIDWRKAGAVTEVKRQDG) was compared with twenty-five plant cysteine proteases which showed more than 50 % of identity.

- 7.1.2. Priolo, N., Arribére, Ma.C., Cortadi, A., Gattuso, M., Vairo Cavalli, S. and Caffini, N. (2003). "Morrenain b I, a papain-like endopeptidase from the latex of *Morrenia brachystephana* Griseb. (Asclepiadaceae)", *Journal of Protein Chemistry* **22**: 15-22.

A new cysteine endopeptidase (morrenain b I) has been purified and characterized from the latex of stems and petioles of *Morrenia brachystephana* Griseb. (Asclepiadaceae). Morrenain b I was the minor proteolytic component in the latex but showed higher specific activity than morrenain b II, which was the main active fraction. Both enzymes showed similar pH profiles and molecular masses, but kinetic parameters and N-terminal sequences were quite distinct, evidencing they are different enzymes instead of different forms of the same enzyme

- 7.1.3. Bruno, M.A., M.F. Pardo, N.O. Caffini and L.M.I. López (2002) "Purification of a New Endopeptidase Isolated from fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae)", *Acta Farm. Bonaerense* **21**: 51-6.

A new plant endopeptidase has been obtained from unripe fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). Crude extracts were partially purified by organic solvents fractionation: best results (90 % of proteins, 94 % of total caseinolytic activity and only 9.9 % of soluble sugars) were obtained by adding 4 volumes of cold acetone to the crude extract. This preparation (redissolved acetone precipitate, RAP) showed maximum activity (> 80%) at pH 7.3-10.7, and exhibited high thermal stability (80 % of residual activity after heating for 30 min at 60 °C). Low sodium chloride concentrations (0.2 M) does not affect caseinolytic activity, but diminishes with the increase of salt concentration (52 % of residual activity at 2.5 M NaCl). RAP showed also clotting activity and a notably preference for κ casein over α s1, α s2 and β caseins, properties that could be of interest in the cheese industry. The enzyme was completely inhibited by E-64 and iodoacetic and activated by the addition of cysteine; these results strongly suggest that the isolated protease should be included within the cysteine group, as all the other studied proteases belonging to the family Bromeliaceae. IEF-zymogram of RAP showed six bands (pI 5.9 to >9.3), most of them proteolytically actives, but only three of which (pI 6.4, 8.3 and >9.3) proved to be important. Cation exchange chromatography (FPLC) allowed the isolation of the main fraction, named hieronymain I (pI = >9.3, molecular weight = 25 kDa).

- 7.1.4. Trejo, S.A., L.M. I. López, C.V. Cimino, N.O. Caffini and C.L. Natalucci (2001) "Purification and Characterization of a new plant endopeptidase isolated from the latex of *Asclepias fruticosa* L. (*Asclepiadaceae*). *Journal of Protein Chemistry* **20**: 469-77.

Asclepias fruticosa L. is a small shrub containing latex with proteolytic activity. The crude extract (latex diluted 1:250 and ultracentrifuged) contained 276 µg of protein/ml and the proteolytic activity reached 1.2 caseinolytic units/ml. This enzyme preparation was very stable even after 2 h at 45 °C, but was quickly inactivated after 5 min at 80 °C. Chromatographic purification was achieved by FPLC using a cation exchanger (SP-Sepharose FF). Thus, a unique proteolytically active fraction could be isolated, being homogeneous by bidimensional electrophoresis and mass spectrometry ($M_r = 23,652$). The optimum pH range was achieved at pH 8.5-10.5. The enzyme activity was completely inhibited by specific cysteine peptidases inhibitors. Isoelectric focusing followed by zymogram showed the enzyme had a pI higher than 9.3. The N-terminus sequence (LPDSVDWREKGVVFIPIRNQ GK) shows a great deal of similarity to those of the other cysteine endopeptidases isolated from latices of *Asclepiadaceae* species, even when a high degree of homology could be observed with other plant cysteine endopeptidases.

- 7.1.5. Obregón, W.D., M.C. Arribére, S. Morcelle del Valle, C. Liggieri, N.O. Caffini and N.S. Priolo (2001) Two New Cysteine Endopeptidases Obtained from the Latex of *Araujia hortorum* Fruits. *Journal of Protein Chemistry* **20**: 317-25.

Two new endopeptidases were purified to homogeneity from the latex of *Araujia hortorum* fruits by a simple purification procedure involving ultracentrifugation and ion exchange chromatography. Molecular weights of araujain h II and araujain h III were 23,718 and 23546 (mass spectrometry), respectively. The isoelectric point of araujain h II was 8.9, whereas araujain h III had a pI higher than 9.3. Maximum proteolytic activity on casein was reached at pH 8.0-9.0 for both endopeptidases, which were irreversibly inhibited by iodoacetate and E-64, suggesting they belong to the cysteine protease family. Esterolytic activity was determined on N- α -CBZ-amino acid-*p*-nitrophenyl esters, and the highest k_{cat}/K_m values for the both enzymes were obtained with the glutamine derivative. The N-terminal sequences of araujain h II and araujain h III showed a high degree of homology with other plant cysteine endopeptidases.

- 7.1.6. López, L.M.I., C. Sequeiros, S.A. Trejo, M.F. Pardo, N. O. Caffini and C.L. Natalucci (2001) "Comparison of Two Cysteine Endopeptidases from *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms (*Bromeliaceae*)", *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **382**: 875-878.

Properties of two cysteine peptidases (macrodonatin I and II) isolated from fruits of *Pseudananas macrodontes* have been compared. The enzymes showed optimum pH ranges near neutrality and were inhibited by E-64 and other cysteine peptidases inhibitors. Molecular masses were 23 459 and 23 703 kDa, isoelectric points (IEF) were 6.1 and 5.9, and K_m values were 13.4 and 8.9 (Bz-Phe-Val-Arg-AMC), for macrodonatin I and II, respectively. N- α -CBZ-L-amino acid *p*-nitrophenyl esters were tested for both enzymes. The N-terminal sequences of both proteases slightly differ and showed a great deal of sequence similarity to other pineapple stem-derived cysteine endopeptidases.

- 7.1.7. Pardo, M.F., L.M.I. López, N.O. Caffini and C.L. Natalucci (2001) "Properties of a milk clotting protease isolated from Fruits of *Bromelia balansae* Mez". *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **382**: 871-874.

Unripe fruits extracts of *Bromelia balansae* Mez (*Bromeliaceae*), which principal endopeptidase was balansain I (isolated for anion exchange chromatography: pI = 5.45, molecular weight = 23 192) exhibits a pH profile with a maximum pH value around pH 9.0 and was inhibited only by cysteine peptidases inhibitors. The alanine and glutamine derivatives of N- α -carbobenzoxy-L-amino acid *p*-nitrophenyl esters was strongly preferred by the enzyme. Enzymatic hydrolysis of milk and soy proteins yield characteristic patterns at pH 9.0. The N-terminal sequence showed a very high homology (85-90%) with other known *Bromeliaceae* endopeptidases.

- 7.1.8. Vairo Cavalli, S.E., A. Cortadi, M.C. Arribére, P. Conforti, N.O. Caffini and N.S. Priolo (2001) "Comparison of two cysteine endopeptidases from latices of *Morrenia brachystephana* Griseb. and *Morrenia odorata* (Hook et Arn.) Lindley (*Asclepiadaceae*)". *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **382**: 879-883.

Properties of morrenain b II, a proteinase isolated from the latex of *Morrenia brachystephana*, were compared with those of morrenain o II, a proteinase obtained from the latex of *Morrenia odorata*. Both peptidases were purified to homogeneity by acetone precipitation followed by cation exchange chromatography. They showed pI values higher than 9.3 and similar molecular masses close to 26 kDa (SDS-PAGE). The enzymes displayed maximum proteolytic activity within an alkaline pH zone. They also exhibit esterolytic activity. The N-terminal sequences of morrenain o II and morrenain b II showed high degree of homology between each other and to other cysteine plant proteinases.

7.2 TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN. Debe hacer referencia exclusivamente a aquellos trabajos en los que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Todo trabajo donde no figure dicha mención no debe ser adjuntado porque no será tomado en consideración. A cada trabajo, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden en que figurarán en la publicación y el lugar donde será publicado. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparecerá en la publicación. La versión completa de cada trabajo se presentará en papel, por separado, juntamente con la constancia de aceptación. En cada trabajo, el investigador deberá aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del mismo y, para aquellos en los que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.

7.2.1. Sequeiros, C., L.M.I. López, N.O. Caffini and C.L. Natalucci (2003) "Phytochemical Screening for Proteolytic Activity in Patagonian Plants from Argentina". *Fitoterapia* **74**:

Six Patagonian plants were screened for proteolytic activity: *Colliguaja integerrima*, *Euphorbia collina*, *E. peplus*, and *Stillingia patagonica* (Euphorbiaceae), *Philibertia gilliesii* (Asclepiadaceae) and *Grindelia chilensis* (Asteraceae). *P. gilliesii* extracts showed the highest specific activity (at least four active basic fractions), followed by *S. patagonica* and *E. collina*. Proteolytic activity was unnoticeable in the other three species studied. Inhibition assays revealed that *P. gilliesii* and *S. patagonica* extracts contain cysteine type peptidases and that in *E. collina* serine type peptidases are present.

7.3 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION. Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo, indicando el lugar al que han sido enviados. Adjuntar copia de los manuscritos.

7.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION. Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.

7.4.1. Pardo, M.F. .R. Mercerat, M. Talleldin, C.L. Natalucci & N.O. Caffini " Proteolysis of Bovine Caseins by Enzymatic Extracts from Fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae)"

The caseinolytic activity of balansain, a cysteine-type endopeptidase obtained from unripe fruits of *Bromelia balansae* Mez (folk name: "caraguatá") was followed by tricine polyacrilamide gel electrophoresis. The enzyme degraded both types of caseins (α and β -caseins), but not in the same manner. Different hydrolysis products were quantified by SDS-PAGE and digital imaging technology. Major milk proteins can be visualized and quantitated on one gel electropherogram.

7.5 COMUNICACIONES. Incluir únicamente un listado y acompañar copia en papel de cada una. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores).

7.5.1. Bruno, Mariela A., Caffini Néstor O. and López, Laura M. I. "Purification and characterization of Hieronymain I, a cysteine peptidase from unripe fruits of *Bromelia Hieronymi* Mez (Bromeliaceae) ", XXXVIII Reunión Anual de SAIB. Carlos Paz, 4 al 9 de noviembre de 2002.

7.5.2. M.A. Bruno, M.F. Pardo, N.O. Caffini, L.M.I. López (2002)."Hieronymaina I, Una Nueva Endopeptidasa Aislada De Frutos Inmaduros De *Bromelia Hieronymi* Mez

(Bromeliaceae)". Primer Congreso Latinoamericano de Fitoquímica. Buenos Aires, mayo de 2002.

- 7.5.3. M.C.N. Saparrat, C.S. Liggieri, A.M. Arambarri, N.O. Caffini (2002). "Sistema Enzimático Ligninolítico Extracelular de *Grammothele subargentea* (Speg.) Rajch. (*Basidiomycetes*): actividad lacasa". Primer Congreso Latinoamericano de Fitoquímica. Buenos Aires, mayo de 2002.
- 7.5.4. M.F. Pardo, C.L. Natalucci, N.O. Caffini (2002). "Actividad Coagulante en Extractos de Frutos de *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae)". Primer Congreso Latinoamericano de Fitoquímica. Buenos Aires, mayo de 2002.
- 7.5.5. Liggieri, C., E.Quiroga, M.C. Arribére, N. Caffini, N. Priolo & S. Barberis (2001) "Behavior of plant proteases in aqueous-organic biphasic media". XXXVII Reunión Anual de SAIB, Carlos Paz, noviembre de 2001.
- 7.5.6. Morcelle del Valle, S., N. Priolo, S. Barberis & N. Caffini "Study of proteases in pursuit of application for catalysis in non-conventional media XXXVII Reunión Anual de SAIB, Carlos Paz, noviembre de 2001.
- 7.5.7. Bruno, M.A., M.F. Pardo, S.A. Trejo, C. Sequeiros, L.M.I. López, N.O. Caffini & C.L. Natalucci (2001) "Electrophoretic analysis of casein hydrolysates produced by plant endopeptidases". XXXVII Reunión Anual de SAIB, Carlos Paz, noviembre de 2001.
- 7.5.8. Vairo Cavalli, S., N.S. Priolo, C.L. Natalucci & N.O. Caffini" (2001) "Plant aspartic proteinases with milk clotting activity" XXXVII Reunión Anual de SAIB, Carlos Paz, noviembre de 2001
- 7.5.9. Bruno Mariela A., Pardo Marcelo F., Caffini Néstor O. y López Laura M. I. "Actividad proteolítica y coagulante de la leche de proteasas de frutos de *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae)". Jornadas Bromatológicas 2001. La Plata, noviembre de 2001.
- 7.5.10. Bruno, Mariela A., Marcelo F. Pardo, Julio R. Mercerat, Néstor O. Caffini y Laura M.I. López "Endopeptidasas de frutos de *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae): nueva estrategia de aislamiento y purificación". X Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina, Isla de Margarita – Venezuela. 23-28 de septiembre, 2001.
- 7.5.11. Cortadi, A., S. Morcelle del Valle, S. Barberis, M. Gattuso, N. Priolo and N. Caffini. "Proteases from the latex of *Funastrum clausum* (Aclepiadaceae)", 42th. Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy, Oaxaca, Mexico, julio de 2001.
- 7.6 INFORMES Y MEMORIAS TECNICAS. Incluir un listado y acompañar copia en papel de cada uno o referencia de la labor y del lugar de consulta cuando corresponda.
8. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.
 - 8.1 DESARROLLOS TECNOLÓGICOS. Describir la naturaleza de la innovación o mejora alcanzada, si se trata de una innovación a nivel regional, nacional o internacional, con qué financiamiento se ha realizado, su utilización potencial o actual por parte de empresas u otras entidades, incidencia en el mercado y niveles de facturación del respectivo producto o servicio y toda otra información conducente a demostrar la relevancia de la tecnología desarrollada.
 - 8.2 PATENTES O EQUIVALENTES. Indicar los datos del registro, si han sido vendidos o licenciados los derechos y todo otro dato que permita evaluar su relevancia.
 - 8.3 OTRAS ACTIVIDADES TECNOLÓGICAS CUYOS RESULTADOS NO SEAN PUBLICABLES (desarrollo de equipamientos, montajes de laboratorios, etc.).
9. SERVICIOS TECNOLÓGICOS. Indicar qué tipo de servicios ha realizado, el grado de complejidad de los mismos, qué porcentaje aproximado de su tiempo le demandan y los montos de facturación.

- 9.1 Desarrollo para la obtención de papaína hidrosoluble. Cooperativa Telefónica de Libertador Gral. San Martín. Desde el mes de agosto de 2002. El desarrollo es coordinado por la Dra. Laura María Isabel López, Investigadora Adjunta de CONICET. Se realizó un convenio inicial durante el año 2002 que se extendió a todo el año 2003 por el que la Cooperativa abona \$ 1.000 mensuales a la Facultad de Ciencias Exactas para el pago de los gastos que demanda la realización del servicio encomendado. El suscripto participa en reuniones con los representantes de la Cooperativa y con el personal del Liprove encargado de la ejecución de las tareas. El tiempo estimado es de 2 horas semanales.
- 9.2 Preparación de reactivos, soluciones de referencia y de calibración para la determinación de proteínas en granos de cereales y en pellets de girasol, encomendados por Laboratorios Delver de La Plata. Los servicios se prestan desde hace varios años e implicaron la validación del método y el control de calidad de los reactivos y equipos. En este momento el Laboratorio deberá abonar \$ 5.000 a la Facultad de Ciencias Exactas por el servicio encomendado. El desarrollo y los sucesivos servicios han sido coordinados por la Dra. Claudia Luisa Natalucci y el suscripto, ambos investigadores independientes de CIC. El suscripto participa en reuniones con los representantes del Laboratorio y con el personal del Liprove encargado de la ejecución de las tareas. El tiempo estimado es de 2 horas semanales, durante dos meses.

10. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:

10.1 DOCENCIA

- 10.1.1. Biología, Guía de Estudio (Ciclo Básico, Facultad de Ciencias Exactas). Editado por el Centro de Estudiantes de la Facultad de Ciencias Exactas. Años 2002 y 2003 (disponible en internet, <http://www.biol.unlp.edu.ar/biologia>).

10.2 DIVULGACIÓN

11. DIRECCION DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES. Indicar nombres de los dirigidos, Instituciones de dependencia, temas de investigación y períodos.

- 11.1. Dra. Laura María Isabel López. Ayudante Diplomado con Dedicación Exclusiva, UNLP. Tema: Fitoproteasas de aplicación industrial. Hasta el 31 de diciembre de 2002. Actualmente es Investigadora Adjunta de CONICET.
- 11.2. Dra. María Cecilia Arribére. Profesional de Apoyo Asistente de la CICIPBA. Tema: "Aislamiento y caracterización de proteasas para ser empleadas en la síntesis de péptidos en medio orgánico". Durante todo el período cubierto por el presente informe.
- 11.3. Bioqca. Mariela Anahí Bruno. Ayudante Diplomado con Dedicación Exclusiva, UNLP. Tesista. Tema: "Aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas de frutos *Bromelia hieronymi* Mez. (*Bromeliaceae*)". Durante todo el período cubierto por el presente informe.
- 11.4. Lic. Constanza Silvina Liggieri. Ayudante Diplomado con Semidedicación, UNLP. Tema: "Fitoproteasas de látex de *Asclepias curassavica* L. (*Asclepiadaceae*)". Durante todo el período cubierto por el presente informe.
- 11.5. Bioqco. Marcelo Fabián Pardo. Becario de Perfeccionamiento de la UNLP.: Tema: "Aislamiento, purificación y caracterización de proteasas vegetales destinadas a la obtención de proteínas modificadas para uso alimentario". Durante todo el período cubierto por el presente informe.
- 11.6. Bioqco. Sebastián Alejandro Trejo. Beca Mixta de CONICET: Tema: "Purificación, caracterización y expresión de endopeptidasas cisteínicas de origen vegetal, para su empleo en tecnología de alimentos. Desde el 1° de abril de 2002.

- 12. DIRECCION DE TESIS.** Indicar nombres de los dirigidos y temas desarrollados y aclarar si las tesis son de maestría o de doctorado y si están en ejecución o han sido defendidas; en este último caso citar fecha.
- 12.1. Adriana Brullo. Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas. "Aislamiento, purificación y caracterización de las endopeptidasas cisteínicas presentes en frutos de *Pseudananas macrodentes* (Morr.) Harms (*Bromeliaceae*) Finalizada la redacción.
- 12.2. Mariela Anahí Bruno. Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas. "Aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas de frutos *Bromelia hieronymi* Mez. (*Bromeliaceae*)". En ejecución.
- 13. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS.** Indicar la denominación, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo, títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas y autores de los mismos.
- 13.1. III Taller Internacional "Química de Los Productos Naturales", IV Congreso Internacional de Química, 18 de abril de 2001. La Habana, Cuba. Conferencista: "Proteasas Vegetales: Estructura y Aplicaciones".
- 13.2. Primer Congreso Latinoamericano de Fitoquímica. Miembro del Comité Organizador. Presidente del Comité Científico. Buenos Aires. Buenos Aires, mayo de 2002.
- 13.3. Jornadas del Medicamento. "Importancia del Medicamento Genérico en la Atención Sanitaria". Secretaría de Salud de la Municipalidad de Lanús. Miembro del Comité Científico. Mayo de 2002.
- 13.4. Sesión Pública Extraordinaria de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica. Conferencia de Incorporación como Académico Titular. "Biotecnología y Salud: los blancos de las proteasas y de sus inhibidores". 26 de septiembre de 2002. Buenos Aires.
- 13.4. Segundas Jornadas del Medicamento. "El Futuro de la Política de Medicamentos en la Argentina". Secretaría de Salud de la Municipalidad de Lanús. Miembro del Comité Científico. Abril de 2003.
- 14. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.** Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc.
- 15. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO.** Indicar institución otorgante, fines de los mismos y montos recibidos.
- 15.1. Proyecto: "Fitoproteasas de aplicación industrial". Otorgado por el CONICET. PIP N° 2813. Concurso 2000. Resolución 793/01. Aún no hecho efectivo.
- 15.2. Proyecto: Aplicación Industrial de Enzimas Proteolíticas de Vegetales Superiores". Otorgado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. Programa FONCYT. Código 09-09916. Años 2001 al 2003. Hecho efectivo el 50% del primer año.
- 15.3. Subsidio para el fortalecimiento institucional de los centros. Otorgado por el Directorio de la CIC. Acta 1164, diciembre de 2002. Tres mil quinientos pesos.
- 16. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.**
- 16.1. Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica. Incorporación como Académico Titular. Sección de Ciencias Biológicas, Bioquímicas y Naturales. Sesión de Claustro Académico de junio de 2001. Conferencia de incorporación: "Biotecnología y Salud: los blancos de las proteasas y de sus inhibidores", 26 de septiembre de 2002. Buenos Aires.

17. ACTUACION EN ORGANISMOS DE PLANEAMIENTO, PROMOCION O EJECUCION CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA. Indicar las principales gestiones realizadas durante el período y porcentaje aproximado de su tiempo que ha utilizado.

17.1. EVALUACIÓN DE SOLICITUDES DE SUBSIDIOS

Consejo de Investigación de la Universidad Nacional de Salta. Proyectos de Investigación. Octubre de 2001

Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. Abril de 2002. Area Tecnología de Alimentos. <http://www.agencia.secyt.gov.ar/fct/evaluadores8.html>.

Departamento de Proyectos de Ciencia y Tecnología. Programa de Desarrollo Tecnológico (PDT). Ministerio de Educación y Cultura, Montevideo, Uruguay. Agosto de 2002

17.2. EVALUACIÓN DE INFORME DE INVESTIGADORES Y SOLICITUDES DE PROMOCION

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Comisión Asesora de Ingeniería de Procesos y Productos Industriales y Biotecnología. octubre de 2002.

17.3. EVALUACIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN (PROGRAMA DE INCENTIVOS)

Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Febrero de 2003.

17.3. EVALUACIÓN DE INFORMES DE INVESTIGACIÓN (PROGRAMA DE INCENTIVOS)

Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires. Mayo de 1999, Marzo de 2000, Abril de 2001.

Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Agosto de 2002.

Consejo de Investigación. Universidad Nacional de Salta. Octubre de 2001. Junio de 2002.

Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de San Martín. abril de 2003.

18. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO. Indicar el porcentaje aproximado de su tiempo que le han demandado.

18.1. Curso de Grado. Coordinación y dictado de la asignatura Biología en el Ciclo Básico de los nuevos planes de estudio de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. Primer semestre años 2002 y 2003. Porcentaje de tiempo demandado: 17%

18.2. Curso de Posgrado. "Métodos Electroforéticos Aplicados al Estudio de las Proteínas Vegetales". Curso de perfeccionamiento teórico-práctico válido para el Doctorado, 50 horas de duración, organizado por la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. Coordinador del curso. Agosto de 2001. Porcentaje de tiempo demandado: 2,5%.

19. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES. Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período.

Acta Farmacéutica Bonaerense. ISSN 0326-2383. Publicación trimestral con referato internacional. Publica trabajos en inglés, portugués y castellano. Jefe del Comité de Redacción desde su fundación (1982). Editor desde 1990.

Consejero Superior Titular por el Claustro de Profesores de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. Desde el 1 de Mayo de 2001

20. TITULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO. Desarrollar en no más de 3 páginas. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.

20.1. TITULO: “*Aplicación industrial de enzimas proteolíticas de vegetales superiores*”

20.2. OBJETIVOS

El objetivo general del proyecto es aislar, purificar y caracterizar fitoproteasas provenientes de plantas autóctonas o cultivadas en el país o provenientes de cultivos *in vitro* y utilizarlas sobre proteínas de uso alimentario, tanto en la modificación de sus propiedades funcionales como en la elaboración de quesos, en el tratamiento de efluentes industriales y para la síntesis en medio orgánico de péptidos de interés industrial.

20.3. RESULTADOS ESPERADOS

Desde el punto de vista del aprovechamiento de recursos naturales renovables, los resultados de este proyecto ampliarán el escaso conocimiento del que se dispone sobre especies de nuestra flora potencialmente productoras de proteasas. Asimismo, el estudio de las propiedades bioquímicas y estructurales de nuevas fitoproteasas constituirá un aporte al conocimiento de este importante grupo de enzimas. Al mismo tiempo proveerá información valiosa para el análisis de procesos bioquímicos y fisiológicos (movilización de proteínas, senescencia, etc.) que transcurren en los vegetales de los que se las obtiene. Finalmente, proveerá información básica sobre parámetros de utilidad en el diseño de procesos biotecnológicos en los que puedan participar dichas enzimas.

Las proteasas son utilizadas en variados procesos tecnológicos (industrias alimentaria, farmacéutica, química, textil, de polvos detergentes, del cuero, etc.). El ensayo de las fitoproteasas en estudio en algunos de los procesos mencionados en reemplazo de las enzimas comerciales que se usan en los mismos, que habitualmente se importan, podría permitir la sustitución de éstas en los casos en los que se mejore el rendimiento, la calidad del producto obtenido o se disminuya el costo de producción.

20.4. METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO

20.4.1. Material vegetal

Es producto de compromisos de cooperación científica establecidos con distintos grupos de investigación pertenecientes a las Universidades Nacionales de Rosario y Misiones y al CENPAT e incluye distintas especies pertenecientes a las *Asclepiadaceae*, *Asteraceae*, *Caricaceae* y *Bromeliaceae*

20.4.2. Obtención de preparaciones parcialmente purificadas

Cuando las proteasas forme parte del látex, el mismo se obtendrá por incisiones del órgano vegetal que lo contenga, permitiendo su exudación. El látex exudado será recogido sobre un buffer apropiado conteniendo sustancias protectoras, manteniendo la temperatura entre 0°C y 4°C y congelado inmediatamente después de obtenido. La clarificación será llevada a cabo por centrifugación en frío. En caso en que las proteasas se encuentren localizadas en otros tejidos, los mismos serán procesados a 0-4°C en un homogeneizador de velocidad variable provisto con accesorios de corte en presencia de buffer de baja fuerza iónica conteniendo protectores adecuados y los restos vegetales serán eliminados por centrifugación. Las preparaciones crudas se someterán a una purificación inicial por precipitación acetónica, etanólica o salina fraccionada. Estas preparaciones parcialmente purificadas serán liofilizadas, previa confirmación de que el proceso no afecta la actividad de las mismas; en caso contrario serán conservadas a -20°C.

20.4.3. Caracterización de las preparaciones parcialmente purificadas

Dado que todas las enzimas proteolíticas estudiadas en nuestro laboratorio pretenden ser ensayadas en distintos procesos industriales en reemplazo de otras proteasas comerciales que actualmente se importan, y teniendo en cuenta que éstas

consisten en preparaciones prácticamente no purificadas, es esencial contar con información sobre el comportamiento de las preparaciones parcialmente purificadas.

En función de ello se determinará el efecto del pH sobre la actividad proteolítica, utilizando caseína o azocaseína y/o hemoglobina desnaturalizada como sustratos. Asimismo se verificará la estabilidad por determinación de la actividad residual de preparaciones expuestas durante lapsos variables a diferentes condiciones de pH, fuerza iónica y temperatura.

20.4.4. Purificación de las preparaciones enzimáticas

El análisis por isoelectroenfoque (IEF) de las fracciones proteolíticamente activas provenientes de la precipitación fraccionada, permitirá definir la estrategia de purificación a adoptar. De acuerdo a los puntos isoeléctricos (pI) obtenidos, las preparaciones serán purificadas mediante FPLC (cromatografía de intercambio iónico o afinidad). Si se observan dos o más fracciones no totalmente resueltas, con puntos isoeléctricos muy próximos, se recurrirá al cromatoenfoque. Una vez separadas la o las fracciones con actividad proteolítica serán luego sometidas a cromatografía de exclusión molecular. En cada etapa se establecerán el grado de purificación alcanzado y el porcentaje de recuperación de la actividad original.

20.4.5. Caracterización de las fracciones obtenidas

El peso molecular relativo se estimará por cromatografía de exclusión molecular, por SDS-PAGE y, eventualmente, por espectrometría de masas (EM). La posterior aplicación de isoelectroenfoque permitirá establecer el grado de homogeneidad y el valor del punto isoeléctrico de cada una de las fracciones activas. La presencia de actividad proteolítica en cada una de las fracciones proteicas separadas se determinará a través de la realización de zimogramas a partir de los geles provenientes de isoelectroenfoque y de SDS-PAGE.

Con el objeto de conocer la especificidad y capacidad catalítica de las proteasas en estudio, se determinarán los parámetros cinéticos en el estado estacionario empleando sustratos sintéticos y/o proteicos. Se observará la variación de los mencionados parámetros en diferentes condiciones (pH y fuerza iónica) en las que cada enzima sea estable. Mediante el empleo de inhibidores específicos de cada grupo de proteasas se determinará la K_i (app) para cada enzima, a efectos de precisar el mecanismo catalítico de las fitoproteasas en estudio.

Se analizará la composición aminoacídica y el extremo N-terminal de la(s) proteasa(s) purificada(s), así como la secuencia aminoacídica completa en los casos de mayor interés y se determinará el grado de homología con otras fitoproteasas.

20.4.6. Empleo de nuevas fitoproteasas sobre proteínas alimentarias

Las preparaciones crudas y eventualmente las fracciones parcial o totalmente purificadas serán ensayadas en diferentes condiciones (concentración de enzima, pH, temperatura y tiempo de reacción) sobre proteínas alimentarias. Se evaluarán en cada caso el grado de hidrólisis (DH), así como el índice de solubilidad de la proteína obtenida (psi) a distintos valores de pH. Los péptidos resultantes se analizarán por electroforesis en gel de poliacrilamida mono y bidimensional, y, eventualmente, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). De acuerdo a los resultados se procederá a seleccionar las condiciones más convenientes para efectuar la hidrólisis parcial de los sustratos antes mencionados.

20.4.7. Utilización de nuevas fitoproteasas en la elaboración de quesos

La capacidad coagulante de las preparaciones crudas y eventualmente las fracciones parcialmente purificadas de distintas fitoproteasas obtenidas de plantas crecidas a campo o de cultivos *in vitro* será ensayada bajo diferentes condiciones. Tanto los *starters* como la metodología en la manufactura será la empleada tradicionalmente para la obtención de los diferentes tipos de quesos, según las normas vigentes en el Código Alimentario Nacional.

Dado que los productos de degradación de la caseína afectan el rendimiento, consistencia y sabor del queso, se analizará la acción de las fitoproteasas sobre las caseínas de las distintas leches, tomando muestras a diferentes tiempos durante 24

horas y de los quesos durante su maduración (15 a 40 días según fueran de pasta blanda o semidura). El grado de proteólisis se evaluará cuantificando densitométricamente las bandas obtenidas por electroforesis en geles de poliacrilamida con urea y por HPLC fase reversa, ya que esta última técnica es particularmente importante en el estudio de estadios tardíos de la maduración de quesos, donde la electroforesis no tiene capacidad de resolución.

20.4.8. Uso de proteasas en la obtención de hidrolizados con baja alergenicidad

Los alérgenos más importantes en leche vacuna son las caseínas, la β -lactoglobulina, y la α -lactalbúmina. Las proteínas de suero de leche y las caseínas poseen ventajas nutricionales en su uso para fórmulas de infantes ya que son proteínas completas. La hidrólisis de estas proteínas producen la ruptura de enlaces a péptidos menores y con ello la desaparición de epitopes para IgE, dando lugar a un producto de alto valor nutricional e hipoalergénico.

Los péptidos resultantes se analizarán por electroforesis en geles de tricina. A los efectos de detectar el grado de alergenicidad de cada hidrolizado se procederá a la determinación de su antigenicidad por métodos inmunoenzimáticos empleando antisueros específicos, anticuerpos monoclonales específicos y sueros de individuos alérgicos. En base a los resultados obtenidos se seleccionarán los hidrolizados más adecuados y serán electrotransferidos a membranas de PDVF para su posterior análisis.

Condiciones de la presentación

La presentación deberá incluir:

- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 a 20)
- b. Una copia en soporte electrónico, la que será remitida por correo electrónico a la siguiente dirección: infinvest@cic.gba.gov.ar. Deberá realizarse en formato RTF zipeado, configurado para papel A-4 y libre de virus. Si se trabaja sobre el documento modelo, se deberán eliminar las instrucciones.
- c. En el mismo correo electrónico referido en el punto b), se deberá incluir como un segundo documento un currículum resumido (no más de dos páginas A4), consignando apellido y nombres, disciplina de investigación, trabajos publicados en el período informado (con las direcciones de Internet de las respectivas revistas) y un resumen del proyecto de investigación en no más de 250 palabras, incluyendo palabras clave.
- d. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, en una carpeta o caja, en cuyo rótulo se consignará el apellido y nombres del investigador y la leyenda "Informe Científico Período".
- e. Informe del Director de tareas (en los casos que corresponda), en sobre cerrado.

Nota: El Investigador que desee ser considerado a los fines de una promoción, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales .