

PERIODO: Junio de 1999 – Mayo de 2001.

Legajo N°: 173.311

1. APELLIDO: CAFFINI
NOMBRES: Néstor Oscar
2. TEMA DE INVESTIGACION. (Debe adjuntarse copia del plan de actividades presentado con el informe anterior)
"Obtención de hidrolasas vegetales para ser aplicadas en procesos utilizados en tecnología de alimentos"
El Plan de actividades presentado en el informe anterior se incluye en el punto 6.
3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA
INGRESO: Categoría: Independiente. Mes: Septiembre. Año: 1993
Acta 1002 del Directorio, 29 de septiembre de 1993.
Designación: 7 de julio de 1998 (Decreto 2168/98)
ACTUAL: Categoría: Independiente Mes: Septiembre Año: 1993.
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
Ciudad: La Plata Pcia.: Buenos Aires Tel: (0221) 4230121, 123 5333, 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:
Dirección. Calle
Ciudad: Pcia: Tel:
Dirección electrónica:
6. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.
(Debe exponerse la orientación impuesta a los trabajos, técnicas y métodos empleados, principales resultados obtenidos y dificultades encontradas en el plano científico y material)

6.1 Plan a desarrollar durante período 1999-2001 (informe anterior)

Aislamiento, purificación y caracterización de nuevas fitoproteasas.

Este aspecto está relacionado a sendos convenios de cooperación establecidos con las Universidades Nacionales de Rosario, Misiones y Luján y el Centro Nacional Patagónico (CENPAT). Se continuarán estudiando las proteasas presentes en el látex de especies de *Asclepiadaceae* y *Euphorbiaceae*, en frutos de especies de *Bromeliaceae* y en flores de especies de *Compositae* que crecen en el país.

Acción de fitoproteasas sobre las propiedades funcionales de proteínas alimenticias

Se continuará con el proyecto referido a la hidrólisis parcial de proteínas alimentarias (en esta primera etapa concentrados de soja) por medio de las fitoproteasas aisladas en el LIPROVE, tanto en lo que respecta al análisis del grado de hidrólisis obtenido como a la evaluación de los productos solubles e insolubles. El proyecto constituye un trabajo en colaboración con el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), por el cual se espera lograr

mejoras en las propiedades funcionales de los concentrados de soja, lo que incrementaría su valor agregado.

\Síntesis de péptidos por acción de fitoproteasas en medio orgánico

Se trata de un tema nuevo, que se está realizando en forma paralela con investigadores de la Universidad de San Luis y de la Universidad Católica de Valparaíso, Chile. El proyecto incluye el ensayo de reacciones de síntesis en medio orgánico catalizados por fitoproteasas aisladas en el LIPROVE con el propósito de obtener péptidos bioactivos y/o productos de aplicación industrial.

6.2 Resultados obtenidos

El látex de *Funastrum claussum* (Jacq.) Schlechter (*Asclepiadaceae*) contiene abundante cantidad de enzimas proteolíticas. Las mismas fueron detectadas mediante ensayos histoquímicos *in situ*, realizados en cortes transversales frescos de tallos de acuerdo al método del film-sustrato de Fratello. Por medio de incisiones superficiales de órganos vegetativos aéreos, se obtuvo el látex de aspecto blanquecino que se recibió en buffer fosfatos 0,1 M de pH 6,5 conteniendo EDTA y cisteína 5 mM, como protectores. Mediante centrifugación a 16.000 x g durante 30 minutos se separaron restos insolubles y se obtuvo un sobrenadante conteniendo las proteasas, lo que constituyó el denominado extracto crudo. Este extracto crudo mostró marcada actividad caseinolítica en el rango de pH 8,0-8,5 y en presencia de cisteína 12 mM. Las proteasas se purificaron por cromatografía de intercambio catiónico (CM Sepharose CL-6B Fast Flow, buffer de elución ácido cítrico-fosfato de sodio 55 mM de pH 6,6, gradiente de NaCl 0,2-0,7 M), obteniéndose tres fracciones proteolíticamente activas, una de las cuales eluye antes de aplicar el gradiente salino. La fracción que eluyó en último lugar fue total e irreversiblemente inhibida por E-64 y de modo reversible por HgCl₂, evidenciando que pertenece a la familia de las proteasas cisteínicas. La masa molecular relativa obtenida mediante SDS-PAGE fue de 24 kDa y el pI (IEF) superior a 9,3. Posteriormente, el extracto crudo fue ultracentrifugado a 100.000 x g y atrapado en geles de poliacrilamida, con el objeto de inmovilizar la enzima para ser ensayada en reacciones de síntesis en medios orgánicos. Actualmente se está poniendo a punto la separación de las proteasas mediante FPLC utilizando como intercambiador SP Sepharose con buffer cítrico fosfato 55 mM de pH 6,2 y un gradiente de ClNa 0-1 M.

Del látex de frutos de *Araujia hortorum* Fourn. (*Asclepiadaceae*) se obtuvieron tres proteasas *araujiaina h I*, *araujiaina h II* y *araujiaina h III*. El látex recogido en buffer ácido cítrico-fosfato de sodio 55 mM de pH 6,4 y ultracentrifugado a 100.000 x g rinde un extracto crudo conteniendo enzimas proteolíticas. Al someter el extracto crudo a IEF las proteasas mostraron puntos isoeléctricos alcalinos, por lo que se resolvió purificar dichas enzimas por cromatografía de intercambio catiónico (CM Sepharose Fast Flow, buffer de elución ácido cítrico-fosfato de sodio 55 mM de pH 6,4, gradiente de NaCl 0,0-0,6 M). De este modo se obtuvieron tres fracciones proteolíticamente activas. El análisis por SDS-PAGE reveló que las fracciones I, II y III eran homogéneas, con masas moleculares de 24.031, 23.718 y 23.545, respectivamente, determinadas por espectroscopía de masas (EM). Las tres fracciones poseen máxima actividad caseinolítica en un rango de pH entre 8,0 y 9,0 y en presencia de cisteína 12 mM. Las fracciones I y III poseen pI superiores a 9,3 y la fracción II tiene un pI de 8,9. Las proteasas son irreversiblemente inhibidas por iodoacetato de sodio y E-64, lo que demostraría que grupos sulfhidrilos forman parte de sus sitios activos. La actividad caseinolítica a distintas temperaturas muestra que las proteasas son estables, en presencia de caseína, entre 50-70°C. La medición de la actividad esterásica se realizó sobre sustratos sintéticos del tipo N-CBZ-p-nitrofenil ésteres de aminoácidos. Las tres proteasas revelaron una mayor preferencia por el derivado de glutamina y con él se determinaron los parámetros

cinéticos, que arrojaron los siguientes valores de K_m : y k_{cat} , respectivamente: *araujaína h I*, $2,37 \times 10^{-2}$ mM y $152,79 \text{ s}^{-1}$; *araujaína h II* $23,8 \times 10^{-2}$ mM y $223,08 \text{ s}^{-1}$; *araujaína h III* $9,9 \times 10^{-2}$ mM y $1132,08 \text{ s}^{-1}$. Se determinó la secuencia N-terminal de *araujaína h II* (VPDSIDWREKDAVLPIRNQGGQXGSIWAFXIASVE) y de *araujaína h III* (LPESVDWRKKNLVFPVRNQGQXGSXXAFSAVAXYG). *Araujaína h I* tiene el N-terminal bloqueado y por lo tanto se secuenció un péptido interno obtenido por hidrólisis con proteasa V8, cuya secuencia de 42 aminoácidos se consigna ahora: AFTYVAKNGITSRDKYPYRGQQGQCYQLQKVVRISGYQSVP. Las secuencias obtenidas fueron comparadas utilizando el BLAST network service, encontrándose una alta homología con otras proteasas vegetales. Por otra parte se ensayó la estabilidad del extracto crudo de *Arauja hortorum* en medios miscibles y bifásicos con diferentes proporciones de agua, así también como medios hidrofóbicos con baja actividad de agua. Los resultados obtenidos del comportamiento de las enzimas en distintos medios de reacción y frente a diferentes sustratos fueron modelados matemáticamente con el objeto de predecir cómo actuarán los biocatalizadores frente a otros sistemas de reacción.

Por otra parte, se estudió la funcionalidad de una de las enzimas ya purificada y liofilizada: *morrenaina b II*, en medios con baja actividad de agua, utilizando diferentes inductores (cisteína, 2-mercaptoetanol y sulfito de sodio), para su aplicación a la síntesis de péptidos. Los ensayos de estabilidad de la enzima en sistemas monofásicos muestran que la proteasa es estable. Debido a la alta estabilidad de la enzima en NN-DMF (50 % (v/v) H₂O) y en acetonitrilo (50 % (v/v) H₂O), dichos medios fueron seleccionados para ensayar la síntesis de péptidos a partir de Phe-OCH₃, Asp y Cys, como activador. La enzima fue incapaz de expresar su actividad de síntesis en medios con alto grado de hidrofiliidad, a pesar de su alta estabilidad en los mismos. Este hecho puede ser debido al desplazamiento termodinámico que ejerce el agua sobre la reacción de síntesis peptídica. En cuanto a los sistemas bifásicos, del estudio del efecto de diferentes solventes sobre la estabilidad de la enzima y sobre las solubilidades de los sustratos se determinó que, a pesar de que la enzima sólo retiene el 10 % de su actividad hidrolítica al cabo de 1 h de permanecer en cloroformo-agua (50:50), éste fue el medio de reacción bifásico más conveniente para la síntesis. En un experimento representativo, 0,5 ml de fenilalanina oximetilada (66 mM) y 0,5 ml de ácido aspártico (12mM) se adicionaron a 2,5 ml del solvente orgánico. Luego, 0,1 ml de cisteína 0,325M se agregaron a 1,4 ml de la solución acuosa de la enzima a pH 8 (0,0783 g/l). La suspensión se agitó a 200 rpm a 40 °C, durante 2 horas, después de las cuales se separó y liofilizó la fase acuosa. *Morrenaina b II* demostró ser capaz de catalizar la síntesis de, al menos, un compuesto peptídico cuya identificación y dilucidación estructural fue realizada por TLC, HPLC con detectores de IR y UV (λ : 254 nm), RMN y HPLC-EM. De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir que la enzima cataliza la síntesis peptídica de Phe-OCH₃-Cistina, aunque no es esteroespecífica, ya que reacciona indistintamente con isómeros D y L de los sustratos involucrados.

A partir del látex de *Morrenia odorata* (Hook .et Arn.) Lindley se han purificado y caracterizado dos proteasas cisteínicas de pI superior a 9,3 y de masas moleculares 24,2 y 25,8 kDa. De una de las proteasas (*morrenaina o II*) se determinaron los valores de K_m utilizando N-CBZ-p-nitrofenil ésteres de alanina, glicina y ácido aspártico, obteniéndose los siguientes valores: 2,8, 1,3 y $3,0 \times 10^{-1}$, respectivamente. De la misma proteasa se determinó la secuencia N-terminal: LPDSVDWRKKNLVFPVRNQGKXGSXWTFSAVASIXT.

De los frutos inmaduros de *Bromelia balansae* Mez (*Bromeliaceae*) se obtuvo una nueva proteasa (balansaína I). Los extractos crudos fueron purificados parcialmente por fraccionamiento etanólico. Esta preparación mostró máxima actividad a pH 8,5-9,0, resultó muy estable a valores moderados de fuerza iónica y exhibió una alta estabilidad térmica. La cromatografía de intercambio aniónico permitió el aislamiento de una fracción homogénea por SDS-PAGE, IEF y espectrometría de masas, de pI = 5,45 y masa molecular = 23.192 (MS). La enzima

exhibió un perfil de pH similar pero más estrecho que el de la preparación parcialmente purificada y fue inhibida por E-64 y otros inhibidores de peptidasas cisteínicas, pero no por los inhibidores de los otros tipos catalíticos. La enzima mostró mayor afinidad por el derivado de alanina de los N-CBZ-p-nitrofenil ésteres de aminoácidos. El extremo N-terminal (AVPESIDWRDYGAVTSVKNQG) mostró una elevada homología (85-90%) con otras endopeptidasas de *Bromeliaceae*. Por otra parte se ha realizado la hidrólisis parcial de caseína y de concentrado de soja con la preparación parcialmente purificada, analizándose los resultados por SDS-PAGE y SDS-Tricina-PAGE, con la confección de los respectivos densitogramas y análisis de los perfiles hidrolíticos.

A partir de los frutos de "ihvirá" [*Pseudananas macrodentes* (Morr.) Harms] se obtuvieron nuevos extractos crudos y por cromatografía de alta resolución (FPLC) empleando geles de intercambio iónico (Q-Sepharose Fast Flow) se obtuvieron macrodontaína I y II puras que se conservaron liofilizadas. Macrodontaína I es el componente proteolítico mayoritario, fue inhibida por ácido iodoacético y E-64 de manera irreversible, mientras que el HgCl₂ produjo una inactivación reversible. El agregado de distintos iones metálicos (ZnSO₄, KCl, MgSO₄, CaCl₂ y CuSO₄) a una concentración final 0,5 mM en la mezcla de reacción no produjo modificaciones en la actividad proteolítica. La enzima es homogénea por isoelectroenfoque, electroforesis bidimensional y espectrometría de masas. Su pI determinado por IEF es 6,1 y su PM determinado por espectroscopía de masas es de 23.459. Los derivados N-CBZ-p-nitrofenil ésteres de alanina, glutamina y tirosina fueron fuertemente preferidos por la enzima. Su N-terminal presenta una muy elevada homología con los correspondientes a las proteasas de otras *Bromeliaceae*. De macrodontaína II se determinó el perfil de pH, comprobando que el 80% de la actividad máxima se manifiesta entre pH 6,5 y 8,5. La enzima mostró muy baja actividad frente a sustratos sintéticos del tipo N-carbobenzoxi-p-nitrofenilésteres derivados de L-aminoácidos, aún luego de ser tratada durante diferentes tiempos y temperaturas con cisteína 20 mM como activador. Se ha logrado la determinación del valor de K_m (8,4) empleando Bz-Phe-Val-Arg-AMC como sustrato.

Del látex de *Asclepias fruticosa* L. (*Asclepiadaceae*) se aisló una preparación con actividad proteolítica. El extracto crudo contuvo 0,2 mg de proteínas/ml y una actividad de 4 Ucas/ml (caseína). El perfil de pH mostró que el 80% de la actividad máxima se manifiesta entre pH 7,5 y 10,5. La preparación es altamente estable luego de 2 h a 37 °C y 45°C, pero se inactiva luego de 5 min a 80°C. Empleando extractos crudos se hidrolizaron parcialmente proteínas de concentrados de soja, determinándose el grado de hidrólisis alcanzado y analizando los péptidos obtenidos por SDS-PAGE y posterior densitograma (Scion Image). Mediante IEF-zimograma del extracto crudo se detectó una peptidasa de pI cercano a 9,0 que fue purificada por cromatografía de alta resolución (FPLC) utilizando geles de intercambio catiónico (SP-Sepharose Fast Flow). La enzima resultó homogénea por SDS-PAGE e isoelectroenfoque-zimograma. Mediante el empleo de inhibidores específicos de grupo se determinó que se trata de una proteasa cisteínica, la que fue liofilizada y acondicionada para su análisis por espectrometría de masas y la posterior determinación de su secuencia N-terminal.

Como resultado de una búsqueda de plantas de la flora patagónica que puedan resultar buenas productoras de proteasas se han seleccionado seis especies con actividad proteolítica promisorias: *Coliguaja integerrima*, *Euphorbia collina*, *Euphorbia peplus*, *Grindelia chiloensis*, *Philibertia gilliesii* y *Stilingia patagonica*, sobre las que se está aplicando la estrategia de purificación diseñada en este laboratorio para el estudio de proteasas vegetales.

6.3 Inconvenientes encontrados para el desarrollo del plan

Merced a un subsidio otorgado por la ANPCyT (PICT 97-00932) se adquirió un equipo de cromatografía de media presión (FPLC) que debió haberse recibido a

comienzos de 1999. Este equipamiento recién arribó en diciembre de 1999 pero incompleto, por lo que recién pudo ser utilizado a partir de junio de 2000.

En el mes de septiembre de 1999 quedó fuera de servicio el espectrofotómetro UV-Visible Beckman M-26, cuya reparación no fue satisfactoria, por lo que debió recurrirse a equipos de otros institutos. Recién en el mes de diciembre de 2000 y a través del mencionado subsidio se recibió un nuevo espectrofotómetro (Hewlett Packard) con equipamiento adicional para cinética enzimática. La demora en la recepción del nuevo equipamiento y la salida de servicio del antiguo espectrofotómetro impidieron un mayor rendimiento en la ejecución del proyecto.

Las actividades planificadas para *Onopordon acanthium* L. se han visto demoradas como consecuencia de la imposibilidad de obtener en su momento material vegetal en estado de floración, lo que ha sido logrado a fines del 2000.

En relación a los estudios de proteasas sobre agua de cola, este aspecto se postergó como consecuencia de la necesidad de contar con un mayor número de especies que sean buenas productoras de proteasas.

7. TRABAJOS DE INVESTIGACION Y DESARROLLO 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

- 7.1.1. Priolo, N., M.C. Arribére, N. Caffini, S. Barberis, R. Nieto Vázquez and J. Luco (2001). "Isolation and purification of three cysteine peptidases from the latex of *Araujia hortorum* fruits. Study of their esterase activities using partial least-squares (PLS) modeling". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **635**: 1-13
- 7.1.2. Perelló, M., M.C. Arribére, N.O. Caffini & N.S. Priolo (2000) "Proteolytic enzymes from the latex of *Ficus pumila* L. (Moraceae)", *Acta Farm. Bonaerense* **19**: 257-62
- 7.1.3. Pardo, M.F., L.M.I. López, F. Canals, F.X. Avilés, C.L. Natalucci, & N.O. Caffini (2000). "Purification of Balansain I, an Endopeptidase from Unripe Fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae)". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 3795-800.
- 7.1.4. Priolo, N., S. Morcelle del Valle, M.C. Arribére, L.M.I. López & N.O. Caffini (2000). "Isolation and Characterization of a cysteine protease from the latex of *Araujia hortorum* fruits". *Journal of Protein Chemistry* **19**: 39-49
- 7.1.5. López, Laura M.I., C. Sequeiros, C.L. Natalucci, N.O. Caffini, A. Brullo, B. Maras & D. Barra (2000) "Purification and Characterization of Macrodontain I, a Cysteine Peptidase from Unripe Fruits of *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae)", *Protein Expression and Purification* **18**: 133-40.
- 7.1.6. Cortadi, A., A. Scandizzi, S. Gattuso, N. Priolo, N. Caffini y M. Gattuso (1999) "Estudio morfoanatómico de especies de los géneros *Araujia* y *Morrenia* (Asclepiadaceae) utilizadas en medicina popular". *Rojasiana* **5**(1): 15-36.
- 7.1.7. Ramírez, S., A.A. Porta y N.O. Caffini (1999) "Fitoquelatinas y péptidos relacionados. Estructura, rol metabólico y aplicaciones ambientales". *Acta Farm. Bonaerense* **18**: 53-63
- 7.1.8. Ramírez, S.S., M. Bilen, A.A. Porta and N.O. Caffini (1999) "Incorporation of Cu(II) by *Schoenoplectus californicus* (C.A. Meyer) Soják (Cyperaceae), *Acta Horticulturae* **500**: 105-10

- 7.1.9. Arribére, M.C., S.E. Vairo Cavalli, N.S. Priolo, N.O. Caffini, M. Gattuso and A.A. Cortadi (1999) "Proteolytic enzymes from the latex of *Morrenia odorata* (Hook et Arn.) Lindley (Asclepiadaceae)", *Acta Horticulturae* **501**: 259-68
- 7.1.10. Llorente, B., C. Brutti, C. Cimino, S.Vairo Cavalli, C. Natalucci and N. Caffini (1999) "Presence of milk clotting proteinases in *Cynara scolymus* L. cv. Green Globe (Asteraceae)", *Acta Horticulturae* **501**: 249-57
- 7.2 TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION.
Acompañar copia de cada uno de los trabajos y comprobante de aceptación.
Ver punto 7.1.
- 7.2.1. López, L.M.I., C. Sequeiros, S.A. Trejo, M.F. Pardo, N. O. Caffini and C.L. Natalucci "Comparison of Two Cysteine Endopeptidases from *Pseudananas macrodentes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae)", *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **382** (en prensa).
- 7.2.2. Pardo, M.F., L.M.I. López, N.O. Caffini and C.L. Natalucci. "Properties of a milk clotting protease isolated from Fruits of *Bromelia balansae* Mez". *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **382** (en prensa).
- 7.2.3. Vairo Cavalli, S.E., A. Cortadi, M.C. Arribére, P. Conforti, N.O. Caffini and N.S. Priolo "Comparison of two cysteine endopeptidases from latices of *Morrenia brachystephana* Griseb. and *Morrenia odorata* (Hook et Arn.) Lindley (Asclepiadaceae)". *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **382** (en prensa).
- 7.3 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION.
Acompañar copia de cada uno de los trabajos indicando el lugar al que han sido enviados.
- 7.3.1. Obregón, W.D., M.C. Arribére, S. Morcelle del Valle, C. Liggieri, N.O. Caffini and N.S. Priolo "Isolation, Purification and Characterization of three Cysteine Endopeptidases from the Latex of *Araujia hortorum* Fourn. (Asclepiadaceae)". Enviado a *Journal of Protein Chemistry*
- 7.3.2. Priolo, N., Arribére, Ma.C., Cortadi, A., Gattuso, M., Vairo Cavalli, S. and Caffini, N. "Morrenain b I- a cysteine proteinase from the latex of *Morrenia brachystephana* Griseb. (Asclepiadaceae)". Enviado a *Planta*.
- 7.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION.
(Adjuntar resúmenes de no más de 200 palabras)
- 7.4.1. Trejo, S.A., L.M. I. López, C.V. Cimino, N.O. Caffini and C.L. Natalucci "Purification and Characterization of a new plant endopeptidase isolated from the latex of *Asclepias fruticosa* L. (Asclepiadaceae). A ser enviado a *Journal of Protein Chemistry*
- 7.5 COMUNICACIONES. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores) Ver punto 7.1.
- 7.5.1. Cortadi, A., Gattuso, M., Obregón, D.; Curciarello, R.; Lufrano, D.; Priolo, N. y Caffini, N. "Localización Citoquímica, Aislamiento y Caracterización de proteasas del látex de *Araujia angustifolia* (Hook. et Arn.) Decaisne". X Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica, Comodoro Rivadavia, abril de 2001
- 7.5.2. Vairo Cavalli, S., P. Conforti, W. Obregón, S. Morcelle del Valle, C. Liggieri, M. Arribére, N. Priolo y N. Caffini "Proteasas obtenidas de látex de *Asclepiadaceae*". Reunión Iberoamericana de Bioquímica, Biología Molecular y Biología Celular. XXIII Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. XXXVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología

- Molecular en asociación con la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Viña del Mar, Chile, octubre de 2000.
- 7.5.3. Sequeiros, C., López, L.M.I., Mattio, N., Caffini, N.O. y Natalucci, C.L. “Búsqueda de nuevas fitoproteasas en especies patagónicas”. Reunión Iberoamericana de Bioquímica, Biología Molecular y Biología Celular, Viña del mar, Chile. Octubre de 2000.
- 7.5.4. Pardo, M. F., Mercerat, J.R., Fernández Tayeldin, M., Fingerman, M., Natalucci, C.L. y Caffini, N.O. “Actividad proteolítica y coagulante de proteasas de *Bromelia balansae* Mez sobre proteínas lácteas”. Reunión Iberoamericana de Bioquímica, Biología Molecular y Biología Celular, Viña del mar, Chile. Octubre de 2000
- 7.5.5. Trejo, S., L.M.I. López, C. Cimino, C.L. Natalucci y N.O. Caffini “Purification and characterization of a new plant endopeptidase from the latex of *Asclepias fruticosa* L. (Asclepiadaceae)”. IX Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina, Urbino-Roma, Septiembre de 2000.
- 7.5.6. Morcelle del Valle, S., N. Priolo and N. Caffini “Properties of entrapped cysteine proteases from the latex of *Funistrum clausum* (Jacq.) Schlecht.” IX Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina, Urbino-Roma, Septiembre de 2000.
- 7.5.7. López, L.M.I., C. Sequeiros, A. Brullo, S. Trejo, B. Maras, D. Barra, C.L. Natalucci y N.O. Caffini. “Comparison of two cysteine endopeptidases from *Pseudananas macrodentes* (Morr.) Harms. (Bromeliaceae)”. International Conference on Cysteine Proteinases and their Inhibitors, Portoroz, Eslovenia. Septiembre de 2000.
- 7.5.8. Pardo, M.F. , L.M.I. López, F. Canals, X.F. Avilés, C.L. Natalucci, and N.O. Caffini “Balansain I, a plant protease closely related to bromelain isolated from *Bromelia balansae* Mez fruits”. International Conference on Cysteine Proteinases and their Inhibitors, Portoroz, Eslovenia. Septiembre de 2000.
- 7.5.9. Cortadi, A., M.C. Arribére, S. Vairo Cavalli, P. Conforti, N. Priolo, and N. Caffini “Cysteine endopeptidases from species belonging to the genus *Morrenia* (Asclepiadaceae): *M. brachystephana* Griseb. y *M. odorata* (Hook. et Arn.) Lindley. International Conference on Cysteine Proteinases and their Inhibitors, Portoroz, Eslovenia. Septiembre de 2000.
- 7.5.10. Obregón, W.D., M.C. Arribére, S. Morcelle del Valle, N. Priolo and N. Caffini “Cysteine endopeptidases from the latex of *Araujia hortorum* Fourn.: isolation, purification and characterization of the three proteolytic fractions” International Conference on Cysteine Proteinases and their Inhibitors, Portoroz, Eslovenia. Septiembre de 2000.
- 7.5.11. Pardo, M.; Trejo, S.*; Llerena Suster, C; López, L; Natalucci, C. y N. Caffini. “Obtención de hidrolizados de proteínas de soja por acción de fitoproteasas de *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae) y de *Asclepias fruticosa* (Asclepiadaceae)”. IV Feria-Congreso Latinoamericano de Biotecnología y II Congreso Argentino de Biotecnología. Buenos Aires, junio de 2000.
- 7.5.12. Cortadi, A., S. Gattuso, S. Morcelle del Valle, N. Priolo y N. Caffini. “Origen y desarrollo de laticíferos y localización citoquímica de proteasas del látex de *Funistrum clausum* (Jacq.) Schlecht. (Asclepiadaceae)”. XIX Reunión anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, Santa Fe, diciembre de 1999.
- 7.5.13. Morcelle del Valle, S., Priolo, N., Cortadi, A. y Caffini, N. “Proteases in plants: cytochemical localization and isolation from latex” XVII Reunión Científica anual de la Sociedad de Biología de Cuyo. Merlo, San Luis, diciembre de 1999.

- 7.5.14. Obregón, W., Mongiardini, E., Conforti, P., Liggieri, C., Arribére, M., Priolo, N. y Caffini, N. "Análisis comparativo de las proteasas extraídas de látex de *Araujia hortorum* Fourn. (*Asclepiadaceae*)". XXXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, Mendoza, noviembre de 1999.
 - 7.5.15. Morcelle del Valle, S., Priolo, N., Cortadi, A. y Caffini, N. "Perfil proteolítico del látex de *Funastrum claussum* (Jacq.) Schlecht. (*Asclepiadaceae*)". XXXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, Mendoza, noviembre de 1999.
 - 7.5.16. M.F. Pardo, J.R. Mercerat, C.L. Natalucci y N.O. Caffini "Hidrólisis controlada de sustratos proteicos por acción de proteasas de frutos de "caraguatá" (*Bromelia balansae* Mez, *Bromeliaceae*)". XXXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, Mendoza, noviembre de 1999.
 - 7.5.17. S. Trejo, L.M.I. López, C. Cimino, C.L. Natalucci y N.O. Caffini "Aislamiento y purificación de una fitoproteasa cisteínica a partir del látex de *Asclepias fruticosa* L. (*Asclepiadaceae*)". XXXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, Mendoza, noviembre de 1999.
 - 7.5.18. Cortadi, A., S. Gattuso, S. Morcelle del Valle, N. Priolo and N. Caffini "Origin and development of laticifer and cytochemical localization of protease from latex of *Funastrum clausum* (Jacq.) Schlecht. (*Asclepiadaceae*)" IX Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica y III Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica. Brasil, septiembre de 1999.
 - 7.5.19. L.M.I. López, C. Sequeiros, C.L. Natalucci, F. Canals, F.X. Avilés y N.O. Caffini "Purificación y caracterización de macrodontaína II, una cisteín proteasa de frutos verdes de *Pseudananas macrodonta* (Morr.) Harms (*Bromeliaceae*)", XXII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, Pamplona, setiembre de 1999.
- 7.6 TRABAJOS EN REALIZACION. (Indicar en forma breve el estado en que se encuentran)
 - 7.7 INFORMES Y MEMORIAS TECNICAS. (Acompañar copia de cada uno o referencia de la labor y del lugar de consulta cuando corresponda)
 - 7.8 PATENTES, DESARROLLOS Y CERTIFICADOS DE APTITUD TECNICA. (Acompañar referencias documentales)
8. OTROS TRABAJOS REALIZADOS. (Publicaciones de divulgación, textos, etc.)
 - 8.1. DOCENCIA.
 - 8.2. DIVULGACION.
 - 8.2.1. Caffini, N.O. (1999) "SIDA: estado actual del conocimiento", *Bifase* 12 (1): 59-67
 - 8.3 OTROS: EDITOR DE PROCEEDINGS
 - 8.3.1. "Biological Resources, Sustainable Use, Conservation and Ethnobotany". Proceedings of the Second World Congress on Medicinal and Aromatic Plants WOCMAO-2. **Editor-in-Chief** (N. Caffini, J. Bernáth, D. Craker, A. Jatisatienr and G. Giberti, eds.) *Acta Horticulturae*, Vol. 500, pp.213, 1999.
 - 8.3.2. "Pharmacognosy, Pharmacology, Phytomedicines and Toxicology". Proceedings of the Second World Congress on Medicinal and Aromatic Plants WOCMAO-2. (V. Martino, **N. Caffini**, A. Lappa, G. Ferraro, H. Chilcher, J.D. Phillipson, A. Tchernitchin, S. Debenedetti and C. Acevedo, eds.), *Acta Horticulturae*, Vol. 501, pp.336, 1999.

9. DIRECCION DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES. (Indicar nombres de los dirigidos, Instituciones de dependencia, temas de investigación y períodos)
- 9.1. **Bioqca. Marcelo Fabián Pardo.** Beca de Estudio de la CICPBA. Tema: "Aislamiento, purificación y caracterización de proteasas vegetales destinadas a la obtención de proteínas modificadas para uso alimentario". Desde el 1° de mayo de 1997. Beca de Perfeccionamiento de la CICPBA desde el 1° de mayo de 1999. Beca de Perfeccionamiento de la UNLP desde el 1° de Mayo de 2001
 - 9.2. **Bioqca. Cynthia Sequeiros.** Beca de Entrenamiento de la CICPBA. Tema: "Nuevas fitoproteasas de aplicación en la industria alimentaria: proteasas de *Bromeliaceae*". Desde el 1° de mayo de 1997. Renovación 1° de mayo de 1998. Beca de Iniciación de la CICPBA desde el 1° de mayo de 1999
 - 9.3. **Bioqca. Susana Raquel Morcelle del Valle.** Beca de iniciación a la investigación de la Universidad Nacional de La Plata. "Síntesis de péptidos en medio orgánico mediante el uso de nuevas fitoproteasas". Desde el 1° de abril de 1999 al 31 de marzo del 2000.
 - 9.4. **Qca. Paula Andrea Conforti.** Beca de entrenamiento de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires. "Obtención de nuevas fitoproteasas para ser ensayadas en la síntesis de péptidos en medios orgánicos". Desde el 1° de septiembre de 1999.
10. 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)
- 10.1. **Dra. Berta Elizabet Llorente.** Tesis para optar al Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. Tema: "Producción, aislamiento, purificación y caracterización de proteinasas de alcaucil (*Cynara scolymus* L.) por cultivo *in vitro*". Febrero de 2001. Calificación sobresaliente (10).
 - 10.2. **Bioqca. Adriana Brullo.** Tesis para optar al Doctorado en Bioquímica, Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. Tema: "Aislamiento y purificación de proteasas vegetales destinadas a la obtención de proteínas modificadas para uso alimentario". En etapa de redacción. Será defendida el año 2001.
 - 10.3. **Bioqca. Mariela Anahí Bruno.** Tesis para optar al Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas. Tema: "Aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas de frutos *Bromelia hieronymi* Mez. (*Bromeliaceae*)". Año 2000. En ejecución.
11. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS. (Indicar la denominación, lugar y fecha de realización, títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas y autores de los mismos)
- Fue incluido en el ítem 7.5.
12. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. (Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc.)
13. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO. (Indicar institución otorgante, fines de los mismos y montos recibidos.)
- 13.1. Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia. de Bs. Aires. Subsidio Personal. Año 1999. Expediente N° 2756-1430/99, Resolución N° 1903/99. Monto \$ 1.875.
 - 13.2. Secretaría de Ciencia y Técnica de la UNLP. Proyecto "Fitoproteasas de aplicación industrial". Monto \$ 1.650.

14. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO

Invitado a participar como conferencista en el III Taller Internacional “Química de Los Productos Naturales”, IV Congreso Internacional de Química, 18 de abril de 2001. La Habana, Cuba. Tema desarrollado: “Proteasas Vegetales: Estructura Y Aplicaciones”.

15. ACTUACION EN ORGANISMOS DE PLANEAMIENTO, PROMOCION O EJECUCION CIENTIFICA Y TECNICA. (Indicar las principales gestiones realizadas durante el período)

15.1. EVALUACIÓN DE SOLICITUDES DE SUBSIDIOS

15.1.1. Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires. Proyectos de Investigación. Noviembre de 2000.

15.1.2. Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Rosario. Diciembre de 1997. Enero de 2001

15.1.3. Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. Noviembre de 1999. Area Tecnología de Alimentos. <http://www.agencia.secyt.gov.ar/fct/evaluadores8.html>.

15.2. EVALUACIÓN DE INFORME DE INVESTIGADORES Y SOLICITUDES DE PROMOCION

15.2.1. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Comisión Asesora de Ciencias Agrarias, de la Ingeniería y de Materiales (Comisión ad hoc de Ingeniería Química). Junio de 1999.

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

15.3.1. Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Octubre de 1999, enero de 2001.

15.3.2. Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de San Luis. Noviembre de 1999. Febrero de 2001.

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

15.4.1. Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Luján. Febrero de 2000

15.4.2. Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de San Luis. Diciembre de 1999. Idem febrero de 2001.

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

15.4.4. Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Enero de 2000, octubre de 2000.

15.4.5. Centro de Investigación y Tecnología (CIDET), Fac. de Cs. Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones. Febrero de 2000.

15.5. CATEGORIZACION DE INVESTIGADORES (PROGRAMA DE INCENTIVOS)

15.5.1. Comisión Metropolitana. Integrante Extradisciplinario del Comité de Categorización III y IV de Historia y Geografía del Programa de incentivos a Docentes Investigadores. Mayo de 1999. No aceptado por coincidencia de fechas de funcionamiento con la Comisión Regional Bonaerense.

15.5.2. Comisión Regional Bonaerense de Categorización de Docentes Investigadores. Integrante de la Comisión de Química, Bioquímica y Farmacia. Mayo de 1999.

16. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO

16.1. De grado.

Cargo desempeñado: Profesor Titular con dedicación exclusiva del Área Biología Básica. A cargo del curso de Biología General (primer año de las carreras de Farmacia y de Bioquímica).

16.2. De postgrado.

“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. Será dictado en el mes de agosto de 2001.

17. 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)

17.1. JURADO DE TESIS DOCTORALES

17.1.1. Dra. de la Facultad de Ciencias Exactas Silvia del Carmen Rodríguez, Abril de 2000. Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.

17.1.2. Dra. en Bioquímica Diana Mary González de Cid, Noviembre de 2000. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis.

17.1.3. Dr. en Ciencias Naturales Mario Carlos Nazareno Saparrat, Diciembre de 2000. Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata.

17.1.4. Dra. en Ciencias Bioquímicas Berta Elizabet Llorente, Febrero de 2001. Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.

17.2. JURADO DE TESIS DE MAESTRIAS

17.2.1. Magister en Ciencias Químico-Farmacéuticas Claudia Alcia Ortega. Octubre de 2000. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis.

17.2.2. Magister en Ciencias Químico-Farmacéuticas María Eugenia Alvarez. Octubre de 2000. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis.

17.3. EVALUACIÓN DE PLANES DE TESIS DOCTORALES

17.3.1. Lic. Mario Saparrat. Tema y plan de tesis para optar al Doctorado en Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata, agosto de 1998. Revisión: julio de 1999.

17.4. JURADO DE CONCURSOS DE PROFESORES

17.4.1. Año 2000. Jurando titular de concurso de Profesor Adjunto de Farmacotecnia, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis.

18. TITULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO. (Deberá indicarse las acciones a desarrollar)

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

18.2. 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.

18.3. 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.

Los aspectos de aplicación incluidos en el proyecto contemplan el empleo de nuevas fitoproteasas o de las ya estudiadas en nuestro laboratorio sobre proteínas alimentarias, en el tratamiento de efluentes industriales y para la síntesis en medio orgánico de péptidos de interés industrial.

El empleo de fitoproteasas sobre proteínas alimentarias persigue por una parte el propósito de mejorar las características fisicoquímicas y funcionales de las mismas, de modo de obtener productos con mejores propiedades funcionales y por ende con un mayor valor agregado; por otra parte se estudiará el efecto de nuevas proteasas aspárticas sobre leche de diferentes mamíferos, con el fin de intentar su utilización en la industria de quesos.

El tratamiento de efluentes industriales consistirá inicialmente en ensayar los extractos de proteasas parcialmente purificadas sobre las proteínas presentes en el "agua de cola" y analizar los péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática. Los resultados de esta investigación constituirían la base de una aplicación biotecnológica que mitigue los impactos nocivos sobre el medio ambiente de proteínas animales provenientes de la industria pesquera, obteniendo además un producto de valor nutricional aplicable a la alimentación humana o animal.

La utilización de las nuevas fitoproteasas para la síntesis de péptidos en medio orgánico consiste, en un principio, en estudiar distintas estrategias de proceso para evaluar y seleccionar el sistema de reacción y el estado físico más adecuado de las fitoproteasas en estudio para que manifiesten su actividad en fase orgánica, utilizando sistemas homogéneos y heterogéneos, con el propósito de obtener péptidos de posible aplicación industrial.

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.

18.4. METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO

18.4.1. Material vegetal

Es producto de compromisos de cooperación científica establecidos con grupos de investigación pertenecientes a las Universidades Nacionales de Rosario, Luján y Misiones y al CENPAT e incluye las siguientes especies: *Araujia hortorum* Fourn., *Araujia angustifolia* (Hook. et Arn.) Decne, *Asclepias fruticosa* L. y *Funastrum clausum* (Jacq.) Schlechter (*Asclepiadaceae*), *Cynara scolymus* L. y otras especies de *Asteraceae* de la región bonaerense, *Bromelia balansae* Mez, *Bromelia hieronymi* Mez y *Pseudananas macrodentes* (Morr.) Harms (*Bromeliaceae*) y especies de *Euphorbiaceae* que crecen en la meseta patagónica.

Con algunas especies de *Asteraceae* que resultaran de mayor interés para su uso en la elaboración de quesos se realizarán cultivos de tejidos. Para optimizar la expresión de proteasas se ensayarán modificaciones en la concentración de algunos iones y el efecto de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo de Murashige-Skoog y de ser necesario se utilizarán elicitores; adicionalmente se variarán el explanto utilizado y el fotoperíodo

18.4.2. Obtención de preparaciones parcialmente purificadas

Cuando las proteasas forman 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 mediante una primera centrifugación en frío de la suspensión a 10.000 × g y una posterior ultracentrifugación del sobrenadante a 100.000 × g permitirá eliminar gomas y otros materiales insolubles, rindiendo de este modo el "extracto crudo". 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 fosfatos 0,1 M conteniendo protectores adecuados y los restos vegetales serán eliminados por centrifugación a 10.000 × g. 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.

18.4.3. 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.

El contenido de proteínas totales se determinará por el método de Bradford, que es adecuado en el caso de extractivos vegetales. El contenido de hidratos de carbono se determinará por el método de Dubois *et al.* La actividad proteolítica se expresará en unidades arbitrarias, sobre la base de la medida de la absorbancia de los productos de hidrólisis de los sustratos utilizados.

18.4.4. 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 isoelectrónicos (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 isoelectrónicos 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.

18.4.5. 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 isoelectrónico 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.

18.4.6. Obtención y secuenciamiento de cDNAs de proteasas

Se extraerá el RNA total del material seleccionado; si es necesario el mRNA será aislado por cromatografía de afinidad (oligo dT celulosa). Conociendo la secuencia correspondiente al extremo N-terminal de la proteasa, se intentará la amplificación del cDNA específico por RT-PCR. La síntesis de la primera cadena de cDNA se realizará empleando el mRNA como molde, oligo-dT como cebador y transcriptasa reversa AMV. La mezcla de cDNAs (primera hebra) se precipitará por adición de acetato de sodio hasta alcanzar una concentración final 0,3 M y posterior agregado de tres volúmenes de etanol al 96%. Diferentes cantidades del cDNA obtenido serán empleadas como molde en ensayos de PCR utilizando como cebadores el mismo oligo-dT empleado en la transcripción reversa

(*antisense*) y el oligonucleótico cuya secuencia ha sido deducida a partir del extremo N-terminal de la proteasa. La existencia del producto de amplificación deseado (aproximadamente 1,6-1,7 kb) se analizará en geles de agarosa al 0,8 % en presencia de bromuro de etidio.

En caso de obtener un producto de amplificación correspondiente al tamaño esperado para el mRNA de la proteasa, el mismo será clonado empleando un vector adecuado y posteriormente secuenciado. Se utilizarán los *primers* universales cuyos sitios de *annealing* están presentes en el vector de clonado y *primers* específicos que serán diseñados con tal fin.

La secuencia obtenida será analizada empleando los algoritmos BLAST para establecer el grado de homología con otras fitoproteasas.

Como estrategia alternativa se extraerá el DNA total de la especie seleccionada, el que será sometido a una digestión parcial con enzimas de restricción. Los fragmentos resultantes serán resueltos en gel de agarosa al 0,6% y transferidos a una membrana de nitrocelulosa por el método de Southern. Como sonda para identificar el fragmento que contenga al gen de la proteasa en estudio se utilizará un oligonucleótido sintetizado a partir de la secuencia N-terminal conocida marcado con ^{32}P . El fragmento identificado se purificará a partir de un gel de agarosa preparativo y se ligará a un vector de clonado adecuado, digerido previamente con la misma enzima. Con la mezcla de ligación se transformarán bacterias de *Escherichia coli*. La presencia del inserto de interés se determinará por hibridación de las colonias obtenidas (colony-blot). Los clones seleccionados se crecerán en cultivo líquido, se extraerá el material plasmídico y se secuenciará.

18.4.7. 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 poli(acrilamida) 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.

18.4.8. Utilización de nuevas fitoproteasas en la elaboración de quesos

Este proyecto se piensa desarrollar conjuntamente con el Departamento de Ciencias Básicas y la Planta Piloto de la Universidad Nacional de Luján. 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 (concentración de enzima y de cloruro de sodio, pH, temperatura) y con diferentes tipos de leche (bovina, caprina, ovina). Se realizarán ensayos a escala laboratorio (10 litros de leche) y en Planta Piloto (200 litros). 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.

Los caracteres organolépticos de los quesos serán evaluados por el Panel de degustadores de la Cátedra de Análisis Sensorial de la Carrera de Ingeniería en Alimentos de la Universidad Nacional de Luján. Se realizarán ensayos discriminativos con jueces y pruebas de aceptabilidad con consumidores. Se realizarán mediciones objetivas de textura para caracterizar los distintos tipos de productos. En los quesos seleccionados se realizarán estudios físicos y bioquímicos durante la maduración (curvas de evolución del pH, humedad, concentración de cloruro de sodio, contenido de grasas y proteínas, nitrógeno total y soluble y proteólisis de caseínas).

Este aspecto del proyecto está fuertemente condicionado a la obtención de un subsidio de la ANPCyT.

18.4.9. Tratamiento de efluentes industriales ("agua de cola") con fitoproteasas

Este aspecto del proyecto contará con el apoyo del CENPAT, donde desarrolla parcialmente su trabajo la Bioqca. Cynthia Sequeiros, actualmente becaria de CONICET.

Las preparaciones parcialmente purificadas de las fitoproteasas serán ensayadas en diferentes condiciones (concentración de enzima, pH, temperatura y tiempo de reacción) sobre las proteínas del agua de cola para la obtención de hidrolizados de diferente grado de complejidad. Se evaluará en cada caso el grado de hidrólisis alcanzado mediante el empleo de un "pH-stat". Los péptidos resultantes se analizarán por electroforesis en gel de poliacrilamida o por HPLC.

Se determinarán los cambios que la hidrólisis enzimática provoca sobre la viscosidad del producto obtenido a diferentes concentraciones. Los diferentes hidrolizados se someterán al proceso de concentración con el objeto de determinar el menor grado de hidrólisis compatible con la producción de concentrados con buena estabilidad y caracteres organolépticos adecuados para ser empleado en la elaboración de alimentos balanceados.

18.4.10. Ensayo de nuevas fitoproteasas para la síntesis de péptidos en medio orgánico

La formación de uniones peptídicas catalizada por proteasas ofrece varias ventajas sobre los métodos químicos: ausencia de racemización, mínimos requerimientos de activación y de protección de cadenas laterales, así como una alta quimio- regio- y enantioespecificidad. Existen dos mecanismos diferentes de síntesis peptídica catalizada por proteasas: la inversión de la reacción de hidrólisis -controlada termodinámicamente- y la transamidación de ésteres de aminoácidos, controlada cinéticamente. Uno de los ejemplos más conocidos es la síntesis del dipéptido aspartame catalizado por termolisina inmovilizada, que en la actualidad se transformó en el líder de los edulcorantes no calóricos a nivel mundial. Asimismo las proteasas pueden ser utilizadas en la síntesis de ésteres. El caso más exitoso de condensación de segmentos peptídicos catalizados por proteasas es la hemisíntesis de insulina humana a partir de insulina porcina. Más recientemente se utilizó papaína y bromelina adsorbidas en celite, en medios no convencionales para la síntesis preparativa de derivados aminoacídicos de encefalinas. Otros péptidos bioactivos como eledoisina y

LH-RH han sido sintetizados mediante el uso de alfa quimotripsina como catalizador en distintos sistemas de reacción.

Este aspecto del proyecto será desarrollado conjuntamente con la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis, en virtud de un compromiso de cooperación científica y contempla los siguientes aspectos: a) sintetizar enzimáticamente péptidos, b) estudiar la variación de los distintos parámetros que intervienen en los procesos enzimáticos con el objeto de conocer las condiciones óptimas de reacción, c) estudiar el grado de regio-, quimio- y estereoselectividad manifestado por la enzima en presencia de diferentes sustratos, d) evaluar la estabilidad del biocatalizador en distintas condiciones (temperatura, solvente, etc.) y su capacidad de reciclaje.