



INFORME CIENTÍFICO-TECNOLÓGICO¹

PERIODO: mayo 2003 - abril 2005

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" (tema de ingreso)

"Aplicación Industrial de Enzimas Proteolíticas de Vegetales Superiores".(tema actual)

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: 04 de junio de 2005

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.

Desde su creación por el Consejo Superior de la Universidad Nacional de La Plata en 1982, el Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE) ha desarrollado una creciente tarea relacionada con el aislamiento, purificación y caracterización de proteasas vegetales, con el propósito de ampliar el conocimiento que se tiene acerca de este tipo de productos naturales, que representan casi las dos terceras partes de las enzimas que se comercializan en el mundo, así como de establecer su posible aplicación en ciertos procesos industriales tales como el tratamiento de cueros, el reemplazo del cuajo vacuno en la producción de quesos y la síntesis enzimática de péptidos bioactivos, entre otros.

Durante el período que abarca el presente informe (mayo de 2003 a abril de 2005) se han 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, dos becarios posdoctorales y cinco becarios doctorales de CONICET, un becario posdoctoral y otro doctoral de la UNLP y uno de la ANPCyT y nueve estudiantes avanzados de Bioquímica, lo que hace un total de veintisiete (26) personas afectadas en distinto grado a tareas de investigación. Se han finalizado tres tesis doctorales y se encuentran en distintas etapas de desarrollo otras ocho, al menos 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 o para ser enviados siete (7) trabajos en revistas internacionales con referato y se han presentado veintitrés (23) comunicaciones o conferencias en distintos congresos nacionales e internacionales.

En relación a la cooperación internacional, se han suscripto dos convenios internacionales con grupos de investigación extranjeros: el Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana y el Centro de Bioplasmas de la Universidad de Ciego de Avila. El suscripto ha sido designado además Coordinador del Proyecto CYTED IV.22 ("Aplicación industrial de enzimas proteolíticas de vegetales superiores"), que involucra además a otros dos grupos del país, dos de España, dos de Cuba y uno de cada uno de los siguientes países: Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, Méjico, Portugal y Uruguay, que ya ha desarrollado dos reuniones de coordinación, en los meses de marzo de 2004 (Buenos Aires) y mayo de 2005 (Mar del Plata).

La formación de recursos humanos estuvo representada por la dirección de dos becarios de CONICET, uno de la ANPCyT y dos de la UNLP, además de la defensa de una tesis doctoral y la continuación de la dirección de otra. Durante el año 2004 y a través del CYTED se atendieron un pasante de la Universidad de La Habana, uno de la Universidad de la República de Uruguay y una pasante de la Universidad Nacional de San Luis. El año 2005 está desarrollando una nueva pasantía un investigador cubano y se ha previsto para el resto del año otra pasantía de una tesista cubana y de un pasante ecuatoriano.

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 proteínas de cereales y otros materiales.

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. Llorente, E.B., M.C. Brutti y N.O. Caffini (2004) "Purification and Characterization of a Milk-Clotting Aspartic Proteinase from Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.)" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 8182-8189

The study of proteinases expression in crude extracts from different organs of the globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) disclosed that enzymes with proteolytic and milk-clotting activity are mainly located in mature flowers. Maximum proteolytic activity was recorded at pH 5.0, and inhibition studies showed that only pepstatin, specific for aspartic proteinases, presented significant inhibitory effect. Such properties, in addition to easy enzyme inactivation by moderate heating, make this crude protease extract potentially useful for cheese production. Adsorption with activated carbon, together with anion exchange and affinity chromatography led to the isolation of a heterodimeric milk-clotting proteinase consisting of 30 and 15-kDa subunits. MALDI-TOF mass spectrometry of the 15-kDa chain determined 10 a 15.358-Da mass and the terminal amino sequence presented 96% homology with the smaller cardosin A subunit. The amino terminal sequence of the 30-kDa chain proved identical to the larger cardosin A subunit. Electrophoresis evidenced proteinase self-processing that was confirmed by immunoblots presenting 62, 30 and 15-kDa bands.

7.1.2. Morcelle, S.R., N.,O. Caffini & N.S. Priolo (2004)"Proteolytic properties of *Funastrom clausum* latex", *Fitoterapia* **75**: 480-493.

As part of a screening of latex endopeptidases from plants growing in Argentina, the presence of proteolytic activity in the latex of *Funastrom clausum* stems is reported. The proteases present in the crude extract showed the main characteristics of the cysteine proteolytic class, i.e. optimum pH at alkaline range, isoelectric point (pI) higher than 9.0, and inhibition of proteolytic activity by thiol blocking reagents. A remarkable thermal stability was also evident in the crude extract. Endosterolytic preference tried on *p*-nitrophenyl esters of *N*-a-carbobenzoxy-L-amino acids was higher for the alanine, asparagine and tyrosine derivatives. Preliminary peptidase purification by two-step ionic exchange showed the presence of two proteolytic fractions with molecular masses of approximately 24.0 kDa according to SDS-PAGE.

- 7.1.3. Sequeiros, C., L.M.I. López, N.O. Caffini and C.L. Natalucci (2003) "Proteolytic Activity in some Patagonian Plants from Argentina". *Fitoterapia* **74**: 569-76.

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, 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.

- 7.2 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. Abreu Payrol, J., Obregón, W.D., Natalucci, C.L. & Caffini, N.O. "Reinvestigation of the proteolytically active components of *Bromelia pinguin* fruit ". *Fitoterapia* (en prensa)

Pinguinain is the name given to a proteolytic enzyme preparation obtained from *Bromelia pinguin* L. fruits that has been scarcely studied. The present paper deals on the reexamination of the proteases present in fruits of *B. pinguin* grown in Cienfuegos, Cuba. The extract was made by homogenizing the pulp of fruits in a domestic blender followed by an ethanolic fractionation of juice and further centrifugation of the redissolved precipitate at 15,000 rpm for 30 min. This preparation (partially purified pinguinain, PPP) showed the main characteristics of the cysteine proteases, i.e., optimum pH within alkaline range (pH 7.2-8.8), inhibition of proteolytic activity by thiol blocking reagents, which is usually reverted by addition of cysteine, a remarkable thermal stability and notable stability at high ionic strength values. Isoelectric focusing and zymogram of PPP revealed the presence of several proteolytic components between pI 4.6 and 8.1 Preliminary peptidase purification by cationic exchange chromatography showed the presence of two main proteolytic fractions with molecular masses of approximately 20.0 kDa, according to SDS-PAGE.

- 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.

- 7.3.1 Obregón, W.D., Curciarello, R., Caffini, N.O. and Priolo, N.S. "Hidrolitic profile of Latex from *Araujia angustifolia* Fruits", Enviado a *Fitoterapia*.

The presence of hydrolases in latex of *Araujia angustifolia* (Asclepiadaceae), a climbing plant that grows in Argentina, has been studied. The crude extract (CE) obtained by differential centrifugation at 8000 and 15000 rpm of latex from *A. angustifolia* fruits, collected on 0.05 M citric-citrate buffer (pH 4.5) with 5mM EDTA, exhibited several enzymatic activities. The CE showed amydasic activity on L-pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine-p-nitroanilide (pFLNA), proteolytic activity on 1% casein in Tris-HCl pH 8.5 as substrate, polygalacturonidase activity using 1 % polygalacturonic acid in acetic acetate buffer pH 4.5, methyl pectin esterase on 1% pectin in citric phosphate pH

6.8 in presence of 0.02M Cl₂Ca, and endosterolytic activity on *p*-nitrophenyl esters of N- α -carbobenzoxy-L-amino acids in 0.1M Tris-HCl buffer pH 8.0. As proteolytic activity was the main catalytic activity observed, the proteolytic properties of CE were established. The proteases present in CE showed the characteristics of the cysteine proteases: optimum pH at alkaline range, isoelectric point (pI) higher than 8.0, and inhibition of activity by thiol blocking reagents, such as E-64 and iodoacetate. A remarkable thermal stability was also evident in the CE. Three proteases have been detected by IEF and zymogram in the CE and purified by FPLC (SP-Sepharose, 55 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, NaCl linear gradient 0-0,5 M) affording three basic active fractions (*araujain al, all and allII*) with molecular masses close to 23 kDa (SDS-PAGE).

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. Claudia L. Natalucci, Laura M.I. López, Adriana Brullo, Bruno Maras, Sebastián A. Trejo, Boris Turk and Néstor O. Caffini "Complete amino acid sequence and kinetic and structural properties of macrodonta I, a papain-like protease isolated from *Pseudananas macrodonta* fruits". A enviarse a Biological Chemistry.

Properties of two cysteine peptidases (macrodonta I and II) isolated from fruits of *Pseudananas macrodonta* 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 macrodonta 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. The full sequence of macrodonta I has been achieved, which show a great identity degree with other endopeptidases of the Bromeliaceae family.

7.4.2. Mariela A. Bruno, Néstor O. Caffini and Laura M.I. López. "Isolation and characterization of Hieronymain II, another peptidase isolated from fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae)". A enviarse a The Protein Journal

From unripe fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae), a partially purified protease preparation was obtained by acetone fractionation of the crude extract. Purification was achieved by anionic exchange chromatography (FPLC) on Q-Sepharose HP followed by cationic exchange chromatography (SP-Sepharose HP). Homogeneity of the new enzyme, named, was confirmed by SDS-PAGE and mass spectroscopy (MALDI-TOF-TOF). The molecular mass of hieronymain II was 23,411 Da, and maximum proteolytic activity and (more than 90% of maximum activity) was achieved at pH 7.5-9.0 on casein and at pH 7.3-8.3 on Z-Phe-Arg-*p*-nitroanilide. The enzyme was completely inhibited by E-64 and iodoacetic acid and activated by the addition of cysteine. The N-terminal sequence of hieronymain II (AVPQSIDWRVYGAV) was compared with those of twelve plant cysteine proteases which showed more than 70 % of identity. Kinetic enzymatic assays on some synthetic substrates demonstrated a similar preference that another proteases from the Bromeliaceae family

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 S.A. Trejo, F. Canals, L.M.I. López, N.O. Caffini, C.L. Natalucci and F.X. Avilés "Isolation and characterization of Af-CP, a cDNA clone encoding a cysteine protease of *Asclepias fruticosa* L.".VIth European Symposium of the Protein Society. Barcelona. Mayo de 2005

7.5.2 D. Obregón, R. Curciarello, C. Liggieri, S. Trejo, C. Cimino, N. Priolo and N. Caffini. "Enzymatic profile of proteases obtained from latices of *Araujia angustifolia* (Hook. et Arn.) Decaisne and *A. hortorum* Fourn. fruits (*Asclepiadaceae*). Protein Society 2005. Barcelona. Mayo de 2005

- 7.5.3 Diego Vallés, Mariela A. Bruno, Marisa González, Laura M.I. López, Ana María B. Cantera y Néstor O. Caffini. "Purificación de biocatalizadores proteolíticos de frutos maduros de *Solanum granuloso-leprosum* Dunal (Solanaceae)". Primer Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones. 13 y 15 de diciembre de 2004, Montevideo, Uruguay
- 7.5.4 Susana R. Morcelle, Sonia Barberis, Nora Priolo, Néstor Caffini & Pere Clapés. "Síntesis del derivado peptídico Z-Ala-Phe-OMe catalizada por proteasas del tipo de la papaína". Primer Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones. 13 y 15 de diciembre de 2004, Montevideo, Uruguay.
- 7.5.5 Curciarello, Renata; Obregón, David; Trejo, Sebastián; Durante, Natalia; Colombo, Laura; Priolo, Nora and Caffini, Néstor. "Kinetic characterization of plant endopeptidases isolated from the latex of *Araujia angustifolia* (Hook et Arn.) Decaisne (Asclepiadaceae)". XL Reunion de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), 5 al 8 de Diciembre de 2004, Iguazú/Misiones.
- 7.5.6 Vallés, Diego; Bruno Mariela A.; González, Marisa; López, Laura M.I.; Cantera, Ana María B. and Caffini, Néstor O. "A New Cysteine Peptidase from Ripe Fruits of *Solanum granuloso-leprosum* (Solanaceae)". XL Reunion de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), 5 al 8 de Diciembre de 2004, Iguazú/Misiones.
- 7.5.7 S. Morcelle, N. Priolo, N.O. Caffini, D. Obregón, C. Liggieri, C.E. Salas, M.T. Lopes, M.T. Gomes, M.C. Morán, J. Castillo, M.R. Infante y P. Clapés. "Screening of higher plants proteases as catalyst for the synthesis of arginine- based cationic surfactants", 6th Green Chemistry Conference. IUCT. The Green Chemistry Institute of Spain. Barcelona, 8-9 de noviembre de 2004.
- 7.5.8 S.A. Trejo, F. Canals, F.X. Avilés, L.M.I. López, N.O. Caffini, C.L. Natalucci "Structural characterization of asclepain f, cysteine plant endopeptidase from *Asclepias fruticosa* L." 5th International Congress on Chemistry and Chemical Engineering. II International Symposium on Biochemistry and Molecular Biology, Havana, Cuba, 18-22 de octubre de 2004.
- 7.5.9 S. R. Morcelle del Valle, S. Barberis, N. S. Priolo, N. O. Caffini. "Aplicación de las proteasas del látex de *Funastrum clausum* en la síntesis del derivado peptídico Z-Ala-PheOMe". 5th International Congress on Chemistry and Chemical Engineering. V International Workshop on Natural Products Chemistry, Havana, Cuba, 18-22 de octubre de 2004.
- 7.5.10 M.A. Bruno, M. de las M. Stabile, S. Trejo, L.M.I. López, F.X. Avilés and N.O. Caffini. "Purification and characterization of a new cystein plant endopeptidase from *Bromelia hieronymi* Mez". 5th International Congress on Chemistry and Chemical Engineering. V International Workshop on Natural Products Chemistry, Havana, Cuba, 18-22 de octubre de 2004.
- 7.5.11 Boeris, Mónica A.; Skliar, Mario L.; Bruno, Mariela A.; López, Laura M. I. y Caffini, Néstor O. "Actividad Antiinflamatoria de Extractos de *Bromelia hieronymi* Mez". VIII Simposio Argentino y XI Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica, Buenos Aires, Argentina. 2 - 6 de Agosto de 2004.
- 7.5.12 Bruno, Mariela A.; López, Laura M.I. y Caffini, Néstor O. "Endopeptidasas de frutos de *Bromelia hieronymi* Mez". VIII Simposio Argentino y XI Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica, Buenos Aires, Argentina. 2 - 6 de Agosto de 2004.
- 7.5.13 J. Abreu Payrol, W.D. Obregón, C.L. Natalucci & N.O. Caffini. "Caracterización de la preparación enzimática parcialmente purificada obtenida a partir del fruto de *Bromelia pinguin* L. (maya o piña de ratón)". VII Iberoamerican Meeting on Pharmacy and Foods Sciences. La Habana, Cuba, 21 al 23 de junio de 2004.
- 7.5.14 C. Brutti, M. F. Pardo, J. Abreu Payrol, C. L. Natalucci y N. O. Caffini. "Actividad Coagulante en Extractos de Flores de *Onopordon acanthium* L. (Asteraceae)". VII Iberoamerican Meeting on Pharmacy and Foods Sciences. La Habana, Cuba, 21 al 23 de junio de 2004.
- 7.5.15 Obregón, W. David; Curciarello Renata; Caffini, Néstor O. and Priolo Nora S. "Isolation, purification and partial characterization of cysteine proteases from the latex of *Araujia angustifolia*" XXXVIX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas y Biología Molecular. Bariloche, Argentina. Noviembre de 2003.

- 7.5.16 Bruno, Mariela A.; Stabile, M^a de las Mercedes; Mercerat, Julio R.; Caffini, Néstor O. and López, Laura M.I. "Hieronymain II, a new peptidase from fruits of Bromelia hieronymi Mez (Bromeliaceae)", XXXIX Reunión Anual de SAIB. Bariloche, 17 al 21 de noviembre de 2003..
- 7.5.17 Trejo, Sebastián .A.; Avilés, F. Xavier; Canals, Francesc; Natalucci, Claudia L.; Caffini, Néstor O. and López, Laura M.I. "Cloning and sequencing of a cysteine protease from latex of Asclepias Fruticosa L.", XXXIX Reunión Anual de SAIB. Bariloche, 17 al 21 de noviembre de 2003.
- 7.5.18 Pardo, Marcelo F.; Brutti, Cristina, Fernández Gener Martín B.; La Blunda, Julia; Natalucci, Claudia L. and Caffini, Néstor O. Milk Clotting And Proteolytic Activities Of Plant Proteases - A Comparison To Chymosin. XXXIX Reunión Anual de SAIB. Bariloche, 17 al 21 de noviembre de 2003.
- 7.5.19 Pardo, M.F., Natalucci, C.L. y Caffini, N.O. "Actividad coagulante de balansaína". Primer Congreso Bonaerense de Ciencia y Tecnología. La Plata, 30 y 31 de Octubre de 2003. Mariela Bruno, M^a Mercedes Stábile, Néstor Caffin y Laura M.I. López . "Proteasas de *Bromelia hieronymi* Mez". Primer Congreso Bonaerense de Ciencia y Tecnología. La Plata, 30 y 31 de Octubre de 2003.
- 7.5.21 Claudia Natalucci y Néstor Caffini. "LIPROVE: las Proteasas y sus Aplicaciones". Primer Congreso Bonaerense de Ciencia y Tecnología. La Plata, 30 y 31 de Octubre de 2003.
- 7.5.22 Trejo, S.A.; López, L.M.I.; Natalucci, C.L.; Caffini, N.O.; Avilés, F.X. y Canals, F. "Asclepaína f, Estudio Estructural y Funcional". Primer Congreso Bonaerense de Ciencia y Tecnología. La Plata, 30 y 31 de Octubre de 2003.
- 7.5.23 Trejo, S.A., L.M.I. López, C.L. Natalucci, N.O. Caffini, F.X., Avilés and F. Canals. "Estudios de caracterización de una nueva cisteín peptidasa purificada a partir del látex de *Asclepias fruticosa* L. (Asclepiadaceae)". XXVI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, La Coruña, septiembre de 2003, España.
- 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 2004 y 2005 (disponible en internet, <http://www.biol.unlp.edu.ar/biologia>).

10.2 DIVULGACIÓN

10.2.1 Caffini, N.O. (2004) ¿Cuáles son las verdaderas causas del cáncer? *Bifase*. 17(1): 34-39.

10.2.2 Caffini, N.O. (2003) "Biotecnología y salud: los blancos de las proteasas y de sus inhibidores" (Conferencia de incorporación a la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica). *Rev. Farm.* (Buenos Aires) **145**: 60-66.

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

11.1 Bioqca. Mariela Anahí Bruno. Becaria de Perfeccionamiento de la 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.

11.2 Lic. Constanza Silvina Liggieri. Ayudante Diplomado con Semidedicación, UNLP. Tema: "Fitoproteasas de látex de *Asclepias curassavica* L. (*Asclepiadaceae*)". Propuesta como Profesional de Apoyo de CIC. Solicitado en septiembre de 2003.

11.3 Dr. Marcelo Fabián Pardo. Becario de Formación Superior 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.

11.4 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 1º de abril de 2002.

11.5 Bioqco. Walter David Obregón. Beca de Nivel Inicial para trabajar en el Proyecto "Aplicación Industrial de Enzimas Proteolíticas de Vegetales Superiores". Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. Programa FONCYT. Código 09-09916. A partir del 1º de Mayo de 2003.

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. Dra. Adriana Brullo. Tesis para optar al Doctorado en Bioquímica, Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. Tema: "Aislamiento, purificación y caracterización de las endopeptidasas cisteínicas presentes en frutos de *Pseudananas macrodonta* (Morr.) Harms (*Bromeliaceae*)". Diciembre de 2003. Calificación sobresaliente (10).

- 12.2. Bioqca. Mariela Anahí Bruno. Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas. "Aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas de frutos de *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. Conferencia. "Fitoproteasas e inhibidores. Aplicaciones biotecnológicas y terapéuticas". Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI). La Plata, mayo de 2004".
- 13.2. Conferencia Plenaria. "Biotecnología y Salud: los blancos de las proteasas y de sus inhibidores". V Taller Internacional "Química de los Productos Naturales", V Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química, La Habana, Cuba, 18-22 de octubre de 2004.
- 13.3. Conferencia. "Aislamiento de nuevas proteasas de plantas de Argentina". Centro de Bioplantas de la Universidad de Ciego de Avila, Cuba. Octubre de 2004.
- 13.4. Secretario del Comité Científico del X Congreso Argentino del Medicamento. Moderador de la Mesa Redonda sobre Biotecnología Farmacéutica. Mar del Plata, 30 de septiembre al 2 de octubre de 2004.
- 14. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.** Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc.
- 14.1 Visita al Centro de Bioplantas de la Universidad de Ciego de Avila, Cuba. Se ofreció una charla sobre las actividades desarrolladas por el LIPROVE y se establecieron planes de trabajo conjuntos con el Laboratorio de Ingeniería Metabólica, a cargo de la Dra. Martha Hernández. Se convino la incorporación del grupo de la Dra. Hernández al Proyecto IV.22 CYTED que coordina el suscripto y se fijaron las bases para la cooperación comprometida en el Anexo del Convenio Marco que suscribieron la Universidad de Ciego de Avila y la Universidad Nacional de La Plata. Octubre de 2004.
- 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..
- 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 segundo año.
- 15.3. Proyecto: "Aplicación Industrial de Enzimas Proteolíticas de Vegetales Superiores". Proyecto IV.22, Programa CYTED, Subprograma IV "Biomasa como Fuente de Productos Químicos y Energía". Coordinador del Proyecto. Junio de 2003.
- 15.4. Subsidio para equipamiento Científico Tecnológico en el marco de asociaciones de proyectos de Investigación y Desarrollo. Adquisición de un equipo HPLC-MS. Coordinadora Dra. Alicia Ronco. Año 2004.
- 16. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.**
- 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
- 17.1.1 Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. Area Tecnología Agraria, Pecuaria, Forestal y Pesquera. Junio de 2003.
 - 17.1.2 Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. Area Química. Julio de 2003.
 - 17.1.3 Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de San Luis. Agosto de 2003.
 - 17.1.4 Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de La Pampa. Noviembre de 2003. Abril de 2005.
 - 17.1.5 IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). IUPAC Project Proposal #2004-026-1."Practical studies for Medicinal Chemistry. An integrating approach for developing countries" to be coordinated by Dr. Antonio Monge, Universidad de Navarra, España. Agosto de 2004.
 - 17.1.6 Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Entre Ríos. Mayo de 2005.
- 17.2 EVALUACIÓN DE SOLICITUDES DE INGRESO Y DE PROMOCION A LA CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO
- 17.2.1 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Comisión Asesora de Biología. Septiembre de 2003.
 - 17.2.2 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Comisión Asesora de Biología. Noviembre de 2004
- 17.3 EVALUACIÓN DE INFORME DE INVESTIGADORES Y SOLICITUDES DE PROMOCION
- 17.3.1 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Comisión Asesora de Biología. Septiembre de 2003.
 - 17.3.2 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Comisión Asesora de Biología. Noviembre de 2004
- 17.4 EVALUACIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN (PROGRAMA DE INCENTIVOS)
- 17.4.1. Secretaría General de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Misiones. Marzo de 2004.
- 17.5 EVALUACIÓN DE INFORMES DE INVESTIGACIÓN (PROGRAMA DE INCENTIVOS)
- 17.5.1 Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico (CIDET), Fac. de Cs. Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones. Febrero de 2000. Marzo 2004.
 - 17.5.2 Secretaría de Ciencia y Técnica de la la Universidad Nacional de Entre Ríos. Octubre de 2003, mayo de 2004. mayo de 2005
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 2003 y 2004. Porcentaje de tiempo demandado: 17%

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 al 30 de abril de 2004.

Coordinador de la Comisión de Autoevaluación de las Carreras de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. Desde agosto de 2004.

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 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 del país y del exterior 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. En los casos más promisorios se ensayará el clonado y expresión de las proteasas en eucariotes poco evolucionados.

20.4.6. 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.

20.4.7. 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 epítopes para IgE, dando lugar a un producto de alto valor nutricional e hipoalérgico.

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 .