

Isolation, Purification and Partial Characterization of a New Protease from the Latex of Fruits of *Morrenia brachystephana* Griseb. (*Asclepiadaceae*)

María Cecilia ARRIBÉRE *¹, Adriana A. CORTADI²,
Marisa P. BETTIOL¹, Nora S. PRIOLO¹ y Néstor CAFFINI¹

¹ LIPROVE, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas,
Universidad Nacional de La Plata, C.C. 711, 1900 La Plata, Argentina.

² Cátedra de Botánica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas,
Universidad Nacional de Rosario, Suipacha 531, 2000 Rosario, Argentina

SUMMARY. Latex obtained from fruits of *Morrenia brachystephana* Griseb. (*Asclepiadaceae*), received on 0.1 M phosphate buffer (pH 6.9) containing 5 mM EDTA and 5 mM cysteine and centrifuged at 16,000 x g for 30 min gives a crude extract that shows high proteolytic activity when assayed on casein in the presence of 12 mM cysteine. The enzyme preparation was strongly and irreversibly inhibited by very low concentrations of sodium iodoacetate (0.01 mM) and mercuric chloride (1 mM), but not fully and reversibly inhibited by 10 mM PMSF, suggesting that the protease belongs to the cysteine type. Maximum activity was reached at alkaline pH (8.0-10.0). The crude extract shows a remarkable thermal stability (80% of residual activity after 2 h at 60 °C). Fractioned acetone precipitation followed by cation exchange chromatography (CM-Sepharose CL-6B Fast Flow) allows the separation of two proteolytically active fractions, the principal of which has a relative molecular mass of 22.1 kDa (SDS-PAGE) and an isoelectric point higher than 9.3 (IEF).

RESUMEN. "Aislamiento, Purificación y Caracterización Preliminar de una Proteasa de Látex de frutos de *Morrenia brachystephana* Griseb. (*Asclepiadaceae*)". El látex proveniente de frutos de *Morrenia brachystephana* Griseb. (*Asclepiadaceae*) recogido sobre buffer fosfatos 0,1 M (pH 6,9) conteniendo EDTA y cisteína 5 mM y centrifugado a 16.000 x g durante 30 minutos constituye un extracto crudo con actividad proteolítica destacada frente a caseína como sustrato, en presencia de cisteína 12 mM. La preparación enzimática fue fuerte e irreversiblemente inhibida por muy bajas concentraciones de iodoacetato de sodio (0,01 mM) y de cloruro mercuríco (1 mM) e inhibida en forma parcial y reversible por PMSF 10 mM, sugiriendo que la proteasa pertenece al tipo cisteínico. La actividad caseinolítica resulta máxima a pH alcalino (pH 8,0-10,0). El extracto crudo muestra una notable estabilidad térmica (80% de actividad residual luego de 2 h a 60 °C). Mediante precipitación acetónica fraccionada, seguida de cromatografía de intercambio catiónico (CM Sepharose CL-6B Fast Flow), se obtienen dos fracciones proteolíticamente activas. La fracción principal (II) tiene una masa molecular relativa de 22,1 kDa (SDS-PAGE) y un punto isoeléctrico superior a 9,3 (IEF).

KEY WORDS: *Asclepiadaceae*. Enzymes, Latex, *Morrenia brachistephana*, Plant proteases.

PALABRAS CLAVE: *Asclepiadaceae*, Enzimas, Fitoproteasas, Látex, *Morrenia brachystephana*.

Author to whom correspondence should be addressed