

Stability of *Araujain*, a Novel Plant Protease, in Different Organic Systems.

Evelina QUIROGA ¹, Nora PRIOLO ², José MARCHESE ³ and Sonia BARBERIS ^{1*}

¹ Laboratorio de Bromatología. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia.
Universidad Nacional de San Luis. Chacabuco y Pedernera. (5700) San Luis. Argentina.

² Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE).
Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. 47 y 115.
(1900) La Plata. Argentina.

³ Laboratorio de Ciencias de Superficies y Medios Porosos.
Universidad Nacional de San Luis. Chacabuco y Pedernera. (5700) San Luis. Argentina.

SUMMARY. The effect of different organic solvents on the stability of *araujain* (the crude enzyme preparation obtained from the latex of fruits of *Araujia hortorum* Fourn., Asclepiadaceae) in mixtures of buffer and different water-miscible or immiscible organic solvents, and in continuous systems (organic solvents with low water activity) after 4 h at 40 °C was studied in this paper in order to select the most adequate media for peptide enzymatic synthesis. *Araujain* showed the highest stability in 50% hexane, 50% propanone, and N,N-dimethylformamide (a_w : 0.5 in the enzyme), and those values were remarkably greater than in buffer. In addition, the presence of those organic solvents reduced the autolysis degree. In general, *araujain* was not inactivated in aqueous-miscible organic systems and the enzyme showed higher activities in those media than in buffer. In biphasic systems, the partition of the organic solvents into the aqueous phase activated the enzyme in several cases. These results did not agree with those obtained in continuous systems, because many of them inactivated the enzyme. Nevertheless, in N,N-dimethylformamide (a_w : 0.5 in the enzyme) *araujain* showed a remarkable stability after 4 h, and it displayed a higher activity in this organic solvent than in aqueous medium. From these results, it is evident that *araujain* in the presence of most of the studied organic systems did not suffer unfolding and it was able to retain its native or native-like configuration, though with altered characteristics or properties. This fact was demonstrated by means of comparative FTIR spectroscopy studies for *araujain* in buffer and non-aqueous systems.

RESUMEN. “Estabilidad de *Araujiaína*, una Nueva Fitoproteasa, en Diferentes Sistemas Orgánicos”. Con el objeto de seleccionar los medios más adecuados para la síntesis enzimática de péptidos, estudiamos el efecto de diferentes solventes orgánicos sobre la estabilidad de *araujiaína* (la preparación enzimática no purificada obtenida del látex de frutos de *Araujia hortorum* Fourn., Asclepiadaceae) en mezclas de buffer y diferentes solventes orgánicos miscibles o inmiscibles con el agua y en sistemas continuos (solventes orgánicos con baja actividad de agua), luego de 4 h a 40 °C. *Araujiaína* mostró la mayor estabilidad en hexano (50%), propanona (50%) y en N,N-dimetilformamida (a_w : 0,5 en la enzima), siendo aquellos valores marcadamente más elevados que en buffer. Además, la presencia de aquellos solventes orgánicos redujo el grado de autólisis. En general, en sistemas miscibles *araujiaína* no fue inactivada, mostrando actividades más altas que en buffer. En sistemas bifásicos, la partición de los solventes orgánicos en la fase acuosa produjo en numerosos casos una considerable activación de la enzima. Por el contrario, la mayoría de los sistemas continuos inactivaron la enzima. Sin embargo, en N,N-dimetilformamida (a_w : 0,5 en la enzima) *araujiaína* fue estable luego de 4 h y más activa que en medio acuoso. De los resultados aquí presentados hay evidencias de que *araujiaína* no sufrió desdoblamiento en presencia de la mayoría de los sistemas orgánicos estudiados y fue capaz de retener su conformación nativa o semejante a la nativa pero con características o propiedades alteradas. Este hecho fue demostrado por medio de estudios comparativos de espectroscopía FTIR para *araujiaína* en buffer y en sistemas no acuosos.

KEY WORDS: *Araujain*, Cysteine plant protease, Organic media, Stability.

PALABRAS CLAVE: *Araujiaína*, Estabilidad, Fitoproteasas cisteínicas, Medio orgánico.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: sbarberi@unsl.edu.ar