

## Hidrolitic Profile and isolation of the Proteolytic Components of Latex from *Araujia angustifolia* Fruits

Walter D. OBREGÓN, Renata CURCIARELLO, Néstor O. CAFFINI and Nora S. PRIOLO\*

Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE),  
Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas,  
Universidad Nacional de La Plata, C.C. 711, 1900 La Plata, Argentina.

**SUMMARY.** The presence of hydrolases in the 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 5 mM EDTA, exhibited several enzymatic activities. CE showed amygdasic activity on L-pyrroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine-p-nitroanilide (PFLNA), proteolytic activity on 1% casein in Tris-HCl pH 8.5, polygalacturonidase activity using 1% polygalacturonic acid in acetic acetate buffer pH 4.5, pectin methyl esterase on 1% pectin in citric phosphate pH 6.8 in the presence of 0.02M Cl<sub>2</sub>Ca, and endosterolytic activity on *p*-nitrophenyl esters of N- $\alpha$ -carboboxy-L-amino acids in Tris-HCl buffer pH 8.0. As proteolytic activity was the main hydrolytic 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 affording three basic active fractions (*araujiain aI, aII and aIII*) with molecular masses about 23 kDa (SDS-PAGE).

**RESUMEN.** "Perfil Hidrolítico y Aislamiento de los Componentes Proteolíticos Presentes en el Látex de Frutos de *Araujia angustifolia*". Se estudiaron las hidrolasas presentes en el látex de *Araujia angustifolia* (*Asclepiadaceae*), enredadera que crece en Argentina. El extracto crudo (CE) obtenido por centrifugación diferencial a 8000 y 15000 rpm del látex de frutos de *A. angustifolia*, recogido en buffer cítrico-citrato 0,05 M (pH 4,5) con EDTA 5 mM, exhibió varias actividades enzimáticas: amidásica con L-pirrolglutamil-L-fenilalanil-L-leucina-p-nitroanilida (PFLNA) como sustrato; proteolítica sobre caseína al 1% en Tris-HCl pH 8,5; poligalacturonidasa usando ácido poligalacturónico al 1% en buffer acético-acetato pH 4,5; pectín metil esterasa ensayada sobre pectina al 1% en buffer cítrico-fosfato pH 6,8, en presencia de Cl<sub>2</sub>Ca 0,02M y endosterolítica empleando los ésteres *p*-nitrofenilados de N- $\alpha$ -carboboxy-L-aminoácidos en buffer Tris-HCl. pH 8,0. Dado que la actividad proteolítica fue la principal actividad hidrolítica observada, se determinaron las características proteolíticas del CE, que contiene proteasas de tipo cisteínico: pH óptimo alcalino, punto isoelectrónico (pI) superior a 8,0 y resultan inhibidas por reactivos bloqueantes de grupos tiólicos, tales como iodoacetato y E-64. El CE mostró notable estabilidad térmica. Se detectaron tres proteasas por IEF y zimograma y luego fueron purificadas por FPLC. Las masas moleculares de las mismas fueron del orden de 23 kDa (SDS-PAGE). Las mismas fueron denominadas *araujiaina aI, aII y aIII*.

**KEY WORDS:** *Araujia angustifolia*, *Asclepiadaceae*, Hydrolases, Milkweed family, Plant latex.

**PALABRAS CLAVE:** *Araujia angustifolia*, *Asclepiadaceae*, Hidrolasas, Látex.

\* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: priolo@biol.unlp.edu.ar