

Ispitivanje sadržaja proteaza kod divlje salate *Lactuca virosa*, mlečike *Euphorbia cyparissias*, maslačka *Taraxacum officinale* i ruse *Chelidonium majus*

U uzorcima biljaka divlje salate *Lactuca virosa*, mlečike *Euphorbia cyparissias*, maslačka *Taraxacum officinale* i ruse *Chelidonium majus* ispitivano je prisustvo i aktivnost proteolitičkih enzima. Najveća aktivnost pokazana je kod maslačka i ruse, dok je nešto manja kod mlečike i divlje salate. Ovi rezultati potvrđeni su i ispitivanjem sa specifičnim supstratima, benzoil-arginin-p-nitro-anilidom i alanin-p-nitro-anilidom. Kao ranije neispitivane vrste, ove biljke su novi uzorci u kojima je pokazana aktivnost proteaza.

Uvod

Proteaze, poznate i kao proteinaze ili proteolitički enzimi, pripadaju hidrolazama, klasi enzima koji katalizuju reakciju hidrolize različitih veza uz prisustvo molekula vode. Ovi enzimi katalizuju hidrolizu peptidne veze i tako razgrađuju i modifikuju proteine i peptide.

U interakcije sa grupama u aktivnom centru proteolitičkih enzima mogu stupiti samo određeni delovi molekula, tj. određeni aminokiselinski ostaci, pa prema tome samo odgovarajuća peptidna veza dolazi u položaj pogodan za hidrolizu. Proteinski lanci cepaju se postepeno, počevši od veza između aminokiselinskih ostataka na površini molekula koje su dostupne delovanju proteolitičkog enzima, pa je u početku brzina proteolize mala. Nakon cepanja određenog broja veza enzimu je dostupno sve više peptidnih veza i brzina proteolize se povećava.

Podela proteaza prema položaju veza u peptidnom lancu koje cepaju je na:

- egzopeptidaze (otkidaju aminokiseline sa krajeva lanca: aminopeptidaze sa aminoterminalnog, a karboksipeptidaze sa karboksiterminalnog kraja)
- endopeptidaze (cepaju peptidne veze u unutrašnjosti peptidnog lanca: tripsin, himotripsin, pepsin, papain, elastaza i dr.)

Proteaze se prirodno nalaze u svim organizmima, a često se neke vrste voća koriste za njihovu izolaciju. Tako se iz ananasa dobija bromelin, iz smokve ficin, a iz papaje papain. U ljudskom organizmu oni se proizvode u pankreasu, dok enzimi u vidu suplemenata mogu biti biljnog i životinjskog porekla, iz gljivica i bakterija ili se mogu dobiti ekstrakcijom iz pankreasa životinja (pankreatin). Primarna funkcija proteolitičkih enzima u dodacima ishrani je digestivna, antiinflamatorna i analgetička.

Cilj ovog rada je ispitivanje i upoređivanje sadržaja proteolitičkih enzima iz divlje salate (*Lactuca virosa*), mlečike (*Euphorbia cyparissias*), maslačka (*Taraxacum officinale*) i ruse (*Chelidonium majus*).

Materijal i metode

Eksperiment je rađen u *in vitro* uslovima. Proteolitički enzimi ekstrahovani su iz divlje salate *Lactuca virosa*, mlečike *Euphorbia cyparissias*, maslačka *Taraxacum officinale* i ruse *Chelidonium majus*. Sakupljeni su uzorci navedenih biljaka, kao i mlečni sokovi iz nadzemnog dela biljke koji su rastvoreni u 1 mL 0.1 M Na-fosfatnog pufera pH 6.

Ekstrakcija

Odmereno je 20 g herbe svake od biljaka i homogenizovano sa 100 mL hladnog 0.1 M Na-fosfatnog pufera pH 6 koji je sadržao 5 mM EDTA i 5 mM

Milica Đokić (1991), Leskovac. Jovana Cvijića 37, učenica 4. razreda Medicinske škole u Leskovcu

MENTOR: Miloš Rokić, Institut za biološka istraživanja „Šiniša Stanković“ Beograd

cistein kako bi se izbegla fenoloksidazna aktivnost i oksidacija, respektivno. Dobijeni homogenati su profiltrirani i nakon toga centrifugirani 30 min na 13400 rpm.

Dobijeni supernatanti su čuvani na -20°C da dalje ispitivanja.

Prečišćavanje sirovog ekstrakta

U 2 mL sirovog ekstrakta je dodato 4 mL acetona ohlađenog na -20°C i centrifugirano 10 minuta na 3000 rpm. Dobijeni supernatant je odliven, a talog ponovo rastvoren dodavanjem 2 mL 0.1 M Na-fosfatnog pufera pH 6 sa 2% glicerolom. Nakon prečišćavanja rastvori su ponovo zamrznuti.

Određivanje aktivnosti enzima:

Rastvori mlečnih sokova su neposredno pre određivanja aktivnosti promešani 15 min na vortex-u i centrifugirani 10 min na 13400 rpm.

Smeša za određivanje aktivnosti sadržala je:

- 0.1 mL uzorka
- 1.1 mL 0.5% albumina u 0.1 M Na-fosfatnom puferu pH 6
- 0.8 mL 5% TCA (trihlorsirćetna kiselina) kojom se zaustavlja reakcija.

Smeša uzorka i albumina je inkubirana tokom 25 min na 30°C nakon čega je dodato 0.8 mL 5% TCA. Slepe probe sadržale su sve sem odgovarajuće zapremine uzorka umesto koga je dodata ista zapremina 0.1 M Na-fosfatnog pufera pH 6. Nakon toga dobijena smeša je centrifugirana 30 min na 3000 rpm i supernatanti su odvojeni i izmerena im je apsorbancija na talasnoj dužini od 350 nm. Apsorbance su merene na spektrofotometru Cintra 10, GBC Spectral UV/Vis spectrophotometer, Melbourne. Izmerene apsorbance korišćene su za izračunavanje aktivnosti enzima (AE) preko formule:

$$AE = \frac{V_0 \cdot \Delta A}{d \cdot V \cdot \Delta t}$$

gde je V_0 – celokupna zapremina reakcione smeše u mL, $\Delta A/\Delta t$ – iznos promene apsorbance u toku minuta (na 590 nm za fenol-crveno), d – dužina putanje svetlosti u cm (1.0), V – zapremina enzima u uzorku u mL (Petronijević 2007).

Određivana je i aktivnost proteaza u reakcionoj smeši koja je sadržala 0.2 i 0.4 mL uzorka.

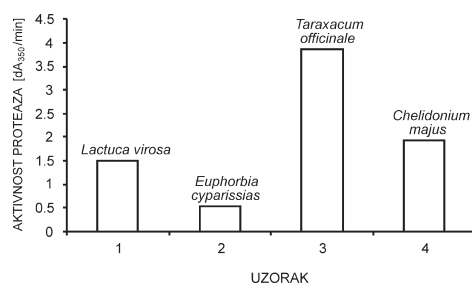
Rađeno je ispitivanje uzoraka sa specifičnim supstratima, i to benzoil-arginin-*p*-nitro-anilidom koji je

supstrat za tripsin, i alanin-*p*-nitro-anilidom koji je opšti supstrat za aminopeptidaze. U 1 mL uzorka je dodavan svaki od supstrata i praćena je promena boje, od bezbojnog do jarko žutog. Intenzitet boje je srazmeran sa aktivnošću enzima, tako da su uzorci kod kojih je boja jarko žuta sadržavali enzime sa najvećom aktivnošću.

Rezultati i diskusija

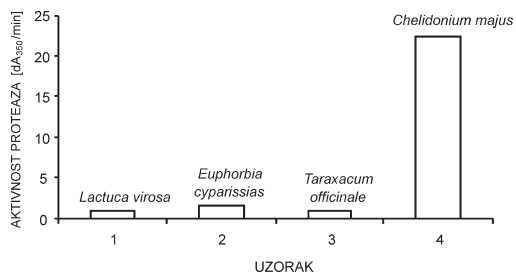
Aktivnosti proteaza u reakcionim smešama date su na grafikonima (slike 1-5), a promena boje reakcione smeše u tabeli 1.

Na osnovu rezultata može se videti da najveću aktivnost proteaza pokazuju kako sirovi ekstrakt, tako i mlečni sok dobijeni iz maslačka *Taraxacum officinale* i ruse *Chelidonium majus*. U zelenoj salati *Lactuca virosa* i mlečiki *Euphorbia cyparissias* aktivnost enzima je uočena, ali je manja u odnosu



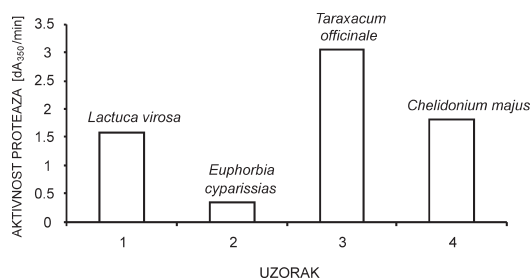
Slika 1. Aktivnost proteaza u 0.1 mL sirovog ekstrakta

Figure 1. Protease activity in 0.1 mL of crude extract



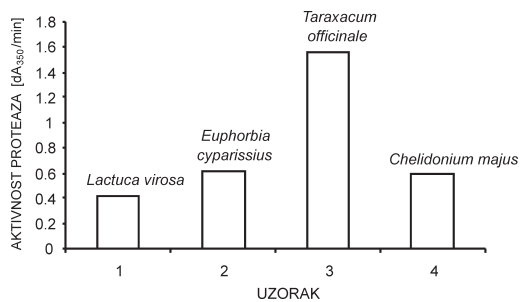
Slika 2. Aktivnost proteaza u 0.1 mL mlečnog soka

Figure 2. Protease activity in 0.1 mL of milky sap



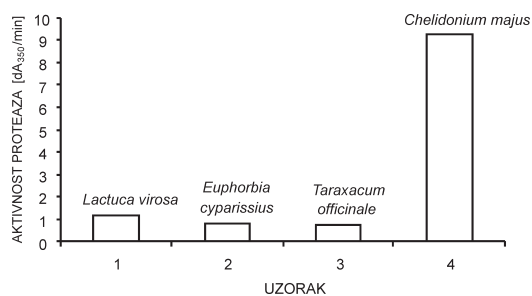
Slika 3. Aktivnost proteaza u 0.2 mL sirovog ekstrakta

Figure 3. Protease activity in 0.2 mL of crude extract



Slika 5. Aktivnost proteaza u 0.4 mL sirovog ekstrakta

Figure 5. Protease activity in 0.4 mL of crude extract



Slika 4. Aktivnost proteaza u 0.2 mL mlečnog soka

Figure 4. Protease activity in 0.2 mL of milky sap

na prve dve navedene biljke. Upoređivanjem aktivnosti enzima pokazane pri dodavanju 0.1, 0.2 i 0.4 mL sirovih ekstrakata, kao i 0.1 i 0.2 mL mlečnog soka, može se primetiti da su one približno iste. To potencijalno govori o prezasićenosti enzimom, tj. o nedostatku supstrata za koji se ovaj vezuje. Dodavanjem supstrata benzoil-arginin-*p*-nitro-anilida i alanin-*p*-nitro-anilida, uz promenu boje, dobijaju se slični rezultati koji potvrđuju da proteaze iz maslačka imaju najveću aktivnost, a mnogo manju one iz mlečike. Dalja istraživanja bi se mogla nastaviti u pravcu ispitivanja uticaja količine dodatog enzima, a takođe i detaljnijeg ispitivanja sa navedenim specifičnim supstratima.

Tabela 1. Promena boje reakcione smeše dodavanjem benzoil-arginin-*p*-nitro-anilida i alanin-*p*-nitro-anilida

Uzorak	Supstrat	
	benzoil-arginin- <i>p</i> -nitro-anilid	alanin- <i>p</i> -nitro-anilid
<i>Lactuca virosa</i> (sirovi ekstrakt)	++	++
<i>Euphorbia cyparissias</i> (sirovi ekstrakt)	+	+
<i>Taraxacum officinale</i> (sirovi ekstrakt)	++	++
<i>Chelidonium majus</i> (sirovi ekstrakt)	+	++
<i>Lactuca virosa</i> (mlečni sok)	+	++
<i>Euphorbia cyparissias</i> (mlečni sok)	–	–
<i>Taraxacum officinale</i> (mlečni sok)	++	++
<i>Chelidonium majus</i> (mlečni sok)	–	–

+ svetlo žuta boja rastvora, ++ žuta boja rastvora, – nepromenjena boja rastvora

Zaključak

Dobijeni rezultati pokazuju da u ispitivanim biljkama – divljoj salati *Lactuca virosa*, mlečiki *Euphorbia cyparissias*, maslačku *Taraxacum officinale* i rusi *Chelidonium majus* postoje proteolitički enzimi. Ispitivanjem kako sirovih ekstrakata, tako i mlečnih sokova, veća aktivnost se uočava kod maslačka i ruse, dok su proteaze nešto manje zastupljene u mlečiki i zelenoj salati. Ovi rezultati potvrđeni su i ispitivanjem sa specifičnim supstratima, benzoil-arginin-*p*-nitro-anilidom i alanin-*p*-nitro-anilidom. Kako nije ispitivana aktivnost enzima uz dodavanje manjih zapremine uzoraka, kao i podrobnije ispitivanje sa navedenim specifičnim supstratima, to ostavlja prostor za dalja istraživanja.

Zahvalnost. Veliku zahvalnost dugujem prof. Živomiru Petronijeviću sa Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, na korisnim sugestijama prilikom izrade ovog rada, svom mentoru dipl. bioh. Milošu Rokiću, kao i dipl. bioh. Nikoli Lončaru sa Hemijskog fakulteta u Beogradu, na sugestijama i praćenju same realizacije rada.

Literatura

Azarkan M., Moussaoui A. E., Wuytswinkel D., Dehon G., Looze Y. 2003. Fractination and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*. *Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **790**: 229.

Devakate R. V., Patil V. V., Waje S. S., Thorat B. N. 2009. Purification and drying of bromelain. *Separation and Purification Technology*, **64**: 259.

Devaraj K. B., Kumar P. R., Prakash V. 2008. Purification, characterization, and solvent-induced thermal stabilization of ficin from *Ficus carica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**: 11417.

Huang L., Qu H., Zhang L., Du S. S., Yang S., Hao D. Y., Wang X. P. 2008. Purification and Characterization of a Proteolytic Enzyme from Fig Latex. *Chemical Research in Chinese Universities*, **24**: 348.

Metrione R., Johnston R. B., Seng R. 1967. Purification, partial characterization, and sequence around a reactive sulfhydryl of ficin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **122**: 137.

Perelló M., Arribére M. C., Caffini N. O., Priolo N. S. 2000. Proteolytic Enzymes from the Latex of *Ficus pumila* L. (Moraceae). *Acta Farmaceutica Bonaerense*, **19**: 257.

Petronijević Ž. 2007. *Praktikum za vežbe iz enzimologije*. Leskovac: Tehnološki fakultet

Skaletón G. 1969. Electrophoresis of enzymes of tropical papaw *Carica papaya*. *Publ. Univ. Off Congo Lubunbashi*, **7**: 249.

Vallés D., Furtado S., Cantera A. M. B. 2007. Characterization of news proteolytic enzymes from ripe fruits of *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). *Enzyme and Microbial Technology*, **40**: 409.

Yamada F., Takahashi N., Murachi T. 1976. Purification and Characterization of a Proteinase from Pineapple Fruit, Fruit Bromelain FA21. *Journal of Biochemistry*, **79**: 1223.

Milica Đokić

Comparing the Content of Proteolytic Enzymes in Wild Lettuce *Lactuca virosa*, Spurge *Euphorbia cyparissias*, Dandelion *Taraxacum officinale* and Celandine *Chelidonium majus*

Proteases, or proteolytic enzymes, belong to the hydrolase group, a class of enzymes that catalyze the reaction of hydrolysis of various bonds in the presence of water molecules. Proteases catalyze the hydrolysis of peptide bonds and, by doing so, they degrade and modify proteins and peptides.

Proteases are naturally found in all organisms, and some of their most abundant sources are fruits from which they are often isolated for commercial purposes. In the human body they are produced in the pancreas, while enzymes in the form of supplements can be of plant or animal origin, from bacteria or fungi, and can be obtained by extraction from animal pancreas (pancreatin). The primary function of proteolytic enzymes in food supplements is digestive, anti-inflammatory and analgesic.

The aim of this paper is to examine and compare the content of proteolytic enzymes from wild lettuce *Lactuca virosa*, spurge *Euphorbia cypa-*

rissias, dandelion *Taraxacum officinale* and celandine *Chelidonium majus*.

Proteolytic enzymes were extracted from wild lettuce, spurge, dandelion and celandine in the following way: 20 g of each plant was measured and homogenized with 100 mL of cold 0.1 M Na-phosphate buffer pH 6 containing 5 mM EDTA and 5 mM cysteine; the homogenates were filtered and then centrifuged for 30 min at 13,400 rpm; cooled acetone was added in 2 mL of the obtained crude extracts and then centrifuged for 10 min at 3000 rpm; the supernatants were removed, and the residue re-dissolved by adding 2 mL of 0.1 M Na-phosphate buffer pH 6 with 2% glycerol.

Composition of the enzyme assays:

- 0.1 mL crude extract sample
- 1.1 mL 0.5% albumin in 0.1 M Na-phosphate buffer pH 6
- 0.8 mL of 5% TCA (trichloroacetic acid), which stops the reaction.

Absorbance was measured at a wavelength of 350 nm on a Cintra 10, GBC Spectral UV / Vis spectrophotometer, Melbourne. The measured absorbance was used to calculate enzyme activity. We measured the activity of proteases in reaction mix-

tures containing 0.2 mL and 0.4 mL sample. Testing of samples was done with specific substrates: benzoyl-arginine-*p*-nitro-anilido, which is a substrate for trypsin, and alanine-*p*-nitro-anilido, which is a general substrate for aminopeptidases.

Our results show that the highest protease activity is present in the crude extract and milky sap obtained from dandelion *Taraxacum officinale* and celandine *Chelidonium majus*. Enzyme activity from lettuce *Lactuca virosa* and spurge *Euphorbia cyparissias* was lower than in the first two listed plants. By comparing the enzyme activity shown when adding 0.1, 0.2 and 0.4 mL of crude extracts, as well as 0.1 and 0.2 mL of milky sap, it is obvious that they are approximately the same. This could indicate an inadequate substrate concentration in the assay. Assays in which benzoyl-arginine-*p*-nitro-anilide and alanine-*p*-nitro-anilide were used as substrates showed similar results as the albumin assay – the highest protease activity was obtained for the dandelion extract. Further research may continue in the direction of studying enzyme kinetics as a function of the concentration of substrate and further testing with the two specific substrates.

