

Izolacija i karakterizacija proteaza iz ekstrakta aloje (*Aloe vera*)

U uzorcima aloje (Aloe vera) ispitivano je prisustvo i aktivnost proteolitičkih enzima. U ispitivanju su korišćeni sledeći uzorci: sirovi ekstrakt, talog nakon 60-procentnog zasićenja amonijum sulfatom (AS), talog nakon 100-procentnog zasićenja AS-om i supernatanti (nakon 60-procentnog i 100-procentnog zasićenja AS-om). Najmanja proteazna aktivnost detektovana je u uzorcima sirovog ekstrakta, tj. u uzorcima sa najvećom koncentracijom proteina, dok je najveća aktivnost skoncentrisana u talozima u kojima je najmanja koncentracija proteina. Ovi rezultati, dobijeni kvantitativnom metodom aktivnosti enzima, potvrđeni su i metodom zimografije.

Uvod

Proteaze, nazvane još i peptidaze ili proteinaze, su enzimi neophodni u velikom broju fizioloških reakcija, počevši od digestije pa sve do koagulacije krvi. One su enzimi koji spadaju u grupu hidrolaza i vrše proteolizu, tj. razlaganje proteina, na taj način što katalizuju hidrolizu peptidnih veza koje povezuju aminokiseline u polipeptidnim lancima. Na taj način one razlažu originalni protein na manje fragmente.

U zavisnosti od toga koji deo peptidnog lanca rastavljaju, dele se na endopeptidaze (raskidaju peptidne veze u unutrašnjosti peptidnog lanca) i egzopeptidaze (raskidaju peptidne veze na terminalnim delovima peptidnog lanca). Takođe, proteaze se mogu podeliti i na četiri velike grupe: serinske, cisteinske, aspartične i metaloproteaze (Jedinak *et al.* 2006).

U medicini i farmaciji proteaze se koriste zbog svoje sposobnosti da digestuju proteine, ali i zbog svojih antibiotskih i anti-inflamatornih dejstava.

Aloja (*Aloe vera*) je zeljasta biljka iz porodice Asphodelaceae. Bogata je vitaminima, mineralima, polisaharidima, aminokiselinama i enzimima. Sadrži 16 enzima iz grupa proteaza, amilaza, lipaza i celulaza. Čisti usnu duplju, želudac, pomaže kod zarastanja eventualnih oštećenja sluzokože želuca. Može se koristiti u kombinaciji sa drugim lekovima i prehranbenim materijama, kako bi održavala imuni sistem.

Cilj ovog rada je određivanje i ispitivanje ukupne proteazne aktivnosti iz ekstrakata aloje (*Aloe vera*) kao i koncentracije proteina u datim uzorcima.

Materijal i metode

Iz gela listova aloje napravljeni su ekstrakti, a potom izvršeno frakciono taloženje proteina čvrstim amonijum-sulfatom (AS). Ova metoda izdvajanja je rađena da bi se pri većim zapreminama iz kojih treba dobiti talog, postiglo zasićenje veće od 50-procentnog. Potom su određivane koncentracije proteina Lowryjevom metodom, a kao uzorci korišćeni su: sirovi ekstrakt, talog 1 (nakon 60% zasićenja AS-om), talog 2 (nakon 100% zasićenja AS-om) i supernatanti (nakon 60% i 100% zasićenja AS-om). Zatim su određeni ukupna aktivnost enzima i aktivnost enzima pomoću BAPNE (određivanje proteaza koje rade slično kao tripsin). Nakon ovih kvantitativnih metoda, urađena je i metoda zimografije.

Ekstrakcija

Odmereno je 40 g gela iz listova aloje i homogenizovano u blenderu sa 100 mL hladnog fosfatnog pufera (0.1 M, pH = 6), koji je sadržao 5 mM EDTA i 5 mM cistein kako bi se izbegla fenoloksidazna ak-

Anka Jevremović (1993), Trg Bratstva i jedinstva 1, učenica 3. razreda gimnazije SŠ „Sveti Ahilije“ u Arilju

Isidora Simanić (1993), Trebinje, Kralja Petra I Oslobođioca 29, učenica 3. razreda gimnazije „Jovan Dučić“ u Trebinju

MENTOR: Vladan Martinović, dipl. biohemičar

NAPOMENA: Rad je realizovan na seminaru biomedicine 2011. godine

ktivnost i oksidacija. Dobijeni homogenati su profiltrirani, a potom su centrifugirani 30 minuta na 3000 obrtaja. Potom su od supernatanta odvojeni alikvoti od po 1 mL, od kojih su dva zamrznuta.

Frakciono taloženje proteina amonijum-sulfatom

Frakciono taloženje proteina amonijum-sulfatom urađeno je kroz dve faze:

1. taloženje proteina postepenim dodavanjem čvrstog amonijum sulfata
2. dijaliza rastvora proteina

Prvo je rađeno do zasićenja od 60% AS-om. Odmerno je 72.2 g čvrstog AS (koji je zbog boljeg rastvaranja prethodno dobro usitnjen u avanu) i postepeno je dodavan u 200 mL sirovog ekstrakta aloje, koji je stavljen na magnetnu mešalicu. Preračunavanje je izvršeno na osnovu tabele za količinu čvrstog AS, potrebne da se promeni jedno zasićenje (60% zasićenje). Nakon što je dodata cela količina AS, zamućeni rastvor je ostavljen da stoji još sat vremena na magnetnoj mešalici i preko noći ostavljen u frižideru. Nakon toga uzorci su centrifugirani 20 minuta na 3000 obrtaja/min. Talozni su rastvoreni u 3 mL fosfatnog pufera (0.1 M, pH = 6), dok su supernatanti zasićeni 100% AS-om. Smeša je centrifugirana 20 min. na 3000 obrtaja/min. Talozni su zatim resuspendovani u 3 mL fosfatnog pufera (0.1 M, pH = 6), supernatanti odvojeni, a talozni ponovo rastvoreni u 1 mL pufera. Potom su stavljeni u creva za dijalizu. Creva su stavljena u posudu sa vodom sa česme (protočna frakcija), i tu su ostavljena da stoje 4 h, nakon čega su premeštena u destilovanu vodu i u frižider (stacionarna frakcija) na 3 h. Posle 100% taloženja AS-om, zamućeni rastvor je centrifugiran 20 minuta na 3000 obrtaja, a talog (drugi po redu) resuspendovan u 4 mL fosfatnog pufera (0.1 M, pH 6) i ponovo dijalizovan kao i prethodni. Potom je promešana smeša u crevima za dijalizu i sipana u erlenmajer. Iz sva tri ova rastvora (supernatanta nakon 100% zasićenja AS-om, taloga 1 i taloga 2) uzeti su alikvoti po 2 mL koji su zamrznuti.

Određivanje koncentracije proteina Lowry-jevom metodom

Napravljeni su rastvori: reagens 1 – 2% Na₂CO₃ i 0.1 M, reagens 2 – 1% CuSO₄ i reagens 3 – 2% kalijum-natrijum tartarat.

Potom je pripremljen reagens C, koji je sadržao 98 mL reagens 1, 1 mL reagens 2 i 1 mL reagens 3. Pripremljen je Folin-Ciocalteuov rastvor razblažen vodom u odnosu 1 : 1. Nakon toga odmereno je 0.2 mL uzorka i 3 mL reagens C i smeša je snažno promešana i inkubirana na 15 min. Potom je dodato 0.6 mL FCR reagens i potom je usledila inkubacija od 30 minuta na tamnom mestu. Na isti način su napravljeni uzorci za standardnu krivu sa albuminom koncentracije 1 mg/mL.

Kao uzorci su korišćeni sirovi ekstrakt, talog 1 (nakon 60% zasićenja AS-om) i talog 2 (nakon 100% zasićenja AS-om). Kao slepa proba korišćena je destilovana voda umesto odgovarajuće zapremine uzorka. Pre spektrofotometriiranja uzorci su promešani na vorteksu. Za svaku koncentraciju albumina za standardnu krivu i za svaki rastvor uzorka rađena su po tri ponavljanja. Apsorbanca je merena na 550 nm na spektrofotometru Cintra 10, GBC Spectral UV/Vis spectrophotometer, Melbourne (Vujičić 2002).

Određivanje ukupne proteazne aktivnosti

Rastvori aloje su neposredno pre određivanja aktivnosti promešani na vorteksu i centrifugirani 10 minuta na 13400 obrtaja/min.

Smeša za određivanje aktivnosti enzima je sadržavala: 0.2 mL uzorka, 1.1 mL 0.5% (BSA) albumina u fosfatnom puferu (0.1 M, pH = 6) i 0.7 mL 5% TCA (trihlorsirćetne kiseline), kojom se završava reakcija.

Kao uzorci su korišćeni sirovi ekstrakt, talog 1 (nakon 60% zasićenja AS-om), talog 2 (nakon 100% zasićenja AS-om) i supernatant nakon 100% zasićenja AS-om. Pored ovih uzoraka ispitana je aktivnost enzima uz dodatak EDTA (etilendiamin tetra-acetat) (5 mM), da bi se utvrdilo da li ima metaloproteaza. Uz dodatak EDTA uzimani su nezaleđeni uzorci, dok su se za drugu grupu koristili zaleđeni alikvoti. Smeša uzorka i albumina je inkubirana u vodenom kupatilu na 30°C u roku od 25 minuta, nakon čega je uzorcima dodato 0.7 mL 5% TCA. Slepe probe su sadržale sve komponente sem uzorka aloje, umesto koga je dodata ista zapremina fosfatnog pufera (0.1 M, pH = 6). Smeša je centrifugirana 30 min. na 3000 obrtaja. Potom su supernatanti odvojeni i apsorbanca im je izmerena na 350 nm. Kao pozitivna kontrola korišćen je tripsin (7 mg/mL) rastvoren u vodi. Za svaki od uzoraka je vršeno po 3 ponavljanja, kao i za tripsin. Apsorbance su merene na spektrofotometru

Cintra 10, GBC Spectral UV/Vis spectrophotometar, Melbourne. Izmerene apsorbance su korišćene za izračunavanje aktivnosti enzima preko formule:

$$A_1 = \frac{V_c \cdot \Delta A_{\min}}{d} \cdot V_u$$

gde je A_1 – ukupna aktivnost enzima, V_c – celokupna zapremina reakcione smeše u mL, ΔA_{\min} – promena apsorbance/vreme inkubacije (na 590 nm za fenol-crveno), d – dužina putanje svetlosti u cm (1.0), a V_u – zapremina ekstrakta u uzorku u mL (Petronijević 2007).

Određivanje proteazne aktivnosti – BAPNA

Ova metoda služi za određivanje aktivnosti proteaza koje rade slično kao tripsin.

Odmereno je 0.0271 g BAPNE i rastvoreno u 0.5 mL DMSO-a (dimetilsulfoksid ($\text{CH}_3)_2\text{SO}$)), a potom je ta smeša rastvorena u 25 mL zagrejanog tris-HCl pufera (0.05 M, pH = 8.2) na 60°. Rađeno je sa uzorcima sirovog ekstrakta, taloga 1, taloga 2 i supernatanta nakon 100% taloženja AS-om. Pipetirano je 200 μL uzorka, 0.9 mL BAPNE i nakon toga je usledila inkubacija u trajanju od 2 h. Posle toga reakcija je prekinuta dodavanjem 100 μL sirćetne kiseline. Za svaki od uzoraka rađeno je po tri ponavljanja. Kao slepa proba korišćen je fosfatni pufer (0.1 M, pH = 6). Kao pozitivna kontrola je korišćen tripsin (7 mg/mL). Apsorbance su merene na talasnoj dužini od 410 nm. Izmerene apsorbance su korišćene za izračunavanje aktivnosti enzima preko formule:

$$A_2 = \frac{1}{8800} \cdot \frac{V_c \cdot \Delta A_{\min}}{d} \cdot V_u$$

gde je A_2 – proteazna aktivnost, V_c – celokupna zapremina reakcione smeše u mL, ΔA_{\min} – promena apsorbance/vreme inkubacije (na 590 nm za fenol-crveno), d – dužina putanje svetlosti u cm (1.0), V_u – zapremina ekstrakta u uzorku u mL, a 8800 – ekstinkcioni koeficijent BAPNE (Petronijević 2007).

Zimografija

Napravljeni su sledeći rastvori: monomerni rastvor akrilamida i bisakrilamida (30%), pufer za razdvajajući gel tris-HCl (1.5 M, pH 8.8), pufer za koncentrujući gel tris-HCl (0.5 M, pH = 6.8), 10% rastvor SDS-a (natrijum-dodecilsulfat), rastvor

amonijum-persulfata (APS) 10% m/V i rastvor za nadslojavanje (1-butanol). Svi puferi su titrovani 4 M HCl do određene pH vrednosti.

Pufer za obradu uzoraka (PUZ) je sadržao: 0.05 M tris-HCl (pH = 6.8), 85% glicerol, 1.5 g čvrstog SDS-a, 0.1% bromfenol plavo, vodu i 5% β -ME (svež). Napravljeni su i pufer za elektroforezu (0.025 M tris-HCl, 0.192 M glicin, 0.1% SDS, pH = 8.3), rastvor za fiksiranje, bojenje i obezbojavanje (50% metanol, 10% sirćetna kiselina), rastvor boje (0.1% CBB, 50% metanol, 10% sirćetna kiselina), rastvor za obezbojavanje (5% metanol, 7% sirćetna kiselina).

Gel za razdvajanje (6%) je sadržao 4 mL rastvora akrilamida/bisakrilamida, 5 mL pufera za razdvajanje (1.5 M tris-HCl, pH 8.8), 2 mL želatinskog gela $10 \times$ (80 mg/10 mL), 4.3 mL rastvora saharoze (50%), 4.7 mL vode, 70 μL amonijum-persulfata i 7.5 μL TEMED-a.

Gel za koncentrovanje je sadržao: 0.710 mL rastvora akrilamida/bisakrilamida, 1.425 mL pufera za koncentrovanje (0.05 M, pH = 6.8), 1.425 mL rastvora saharoze (50%), 2.140 mL vode, 70 μL amonijum persulfata (10%) i 15 μL TEMED-a.

Korišćeni su uzorci sirovog ekstrakta (500 μL uzorka + 500 μL PUZ-a).

Nakon što je završena elektroforeza, gel je presečen na dva dela i oba dela su ispirana sat vremena (četiri puta po 15 minuta) u renaturišućem puferu, koji je napravljen dodatkom 6.025 mL Tritona X-100 u 250 mL razvijajućeg pufera (6.055 g, 50 mM tris; 11.69 g, 200 mM NaCl; 0.7 mg ZnCl_2 i 0.74 g, 5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ u 1 L vode, pH = 7.5). U drugih 250 mL razvijajućeg pufera je dodat 10 mM EDTA. Nakon sat vremena gelovi su se razdvojili, od kojih je jedan bio samo sa razvijajućim puferom, a drugi sa puferom sa dodatkom EDTA. Gelovi su ostavljeni u ovim rastvorima preko noći, a sutradan skenirani. Celokupan postupak sproveden je prema proceduri opisanoj kod Troeberga i Nagasea (2003).

Rezultati i diskusija

U tabeli 1 su predstavljene vrednosti aktivnosti enzima, specifične aktivnosti enzima i koncentracije proteina po Lowryju, izračunate na osnovu srednjih vrednosti apsorbanci.

Iz table 1 se vidi da je najveća ukupna protezna aktivnost skoncentrisana u talozima, a najmanja u sirovom ekstraktu i supernatantu, dok se iz table 2 vidi da je najmanja aktivnost u sirovom ekstraktu u

Tabela 1. Ukupna proteazna i specifična aktivnost uzoraka

Naziv uzorka	Zapremina uzorka (mL)	Aktivnost enzima (mM/Lmin)	Konc. proteina po Lowryju ($\mu\text{g/mL}$)	Specifična akt. enzima (mM/Lmin)
Sirovi ekstrakt	0.2	27.3	73.2	0.186
Sirovi ekstrakt + EDTA	0.2	22.4	73.2	0.153
Talog 1	0.2	145.2	7.83	9.27
Talog 1 + EDTA	0.2	2.2	7.83	0.14
Talog 2	0.2	197.0	–	–
Talog 2 + EDTA	0.2	1.0	–	–
Supernatant 60%	0.2	53.6	–	–
Supernatant + EDTA	0.2	13.6	–	–

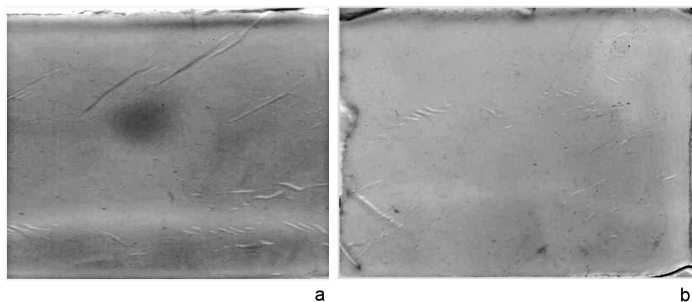
Tabela 2. Proteazna aktivnost – BAPNA

Naziv uzorka	Zapremina uzorka (mL)	Aktivnost enzima (mM/Lmin)	Konc. proteina po Lowryju ($\mu\text{g/mL}$)	Specifična akt. enzima (mM/Lmin)
Sirovi ekstrakt	0.2	0.10	73.2	0.138
Talog 1	0.2	2.47	7.83	0.315
Talog 2	0.2	2.32	–	–
Supernatant 60%	0.2	0.42	–	–
Supernatant 100%	0.2	3.58	–	–

kome je i najveća koncentracija proteina ($73.2 \mu\text{g/mL}$), dok je aktivnost najveća u talozima, gde je najmanja i koncentracija proteina ($7.83 \mu\text{g/mL}$). Vrednost koncentracija proteina u talogu 2 (nakon 100% zasićenja AS-om) i supernatantima je bila jako mala, gotovo da u tim uzorcima nije ni bilo proteina.

Na slici 1a je prikazan zimogram bez EDTA, a na slici 1b zimogram sa EDTA. Zimografija je ra-

đena zbog tačne detekcije proteazne aktivnosti. Na slici a se vidi da je detektovana proteazna aktivnost, dok se na b primećuje da je sa dodatkom EDTA ova aktivnost inhibirana. Ovim je potvrđena pretpostavka da u datim uzorcima nema metaloproteaza (poznato je da ih EDTA inaktivira), što je prvobitno utvrđeno kvantitativnom metodom određivanja aktivacije enzima (tabele 1 i 2).



Slika 1.
Zimogram bez EDTA (a) i sa EDTA (b)

Figure 1.
Zymogram without EDTA (a), and with EDTA (b)

Poredeći rezultate dobijene kvantitativnom metodom sa rezultatima dobijenim zimografijom, dolazi se do zaključka da se oni slažu. Najveća koncentracija proteina nalazi se u sirovom ekstraktu, u kome je dobijena najmanja proteazna aktivnost, dok je u talozima, u kojima je najmanja koncentracija proteina, dobijena najveća proteazna aktivnost.

Zaključak

Rezultati ispitivanja prisustva i aktivnosti enzima pokazuju da u aloji (*Aloe vera*) postoje proteolitički enzimi. Ispitivanjem sirovog ekstrakta (rađenog bez i sa dodatkom EDTA) i taloga (rađenih bez i sa dodatkom EDTA), uočava se manja aktivnost u sirovom ekstraktu, dok je proteazna aktivnost veća u talozima. Takođe je dobijeno da u datim uzorcima nema metaloproteaza, što je i očekivano, jer je poznato da ih EDTA inaktivira. Rezultati su saglasni sa činjenicom da je u sirovom ekstraktu veća koncentracija proteina (73.2 µg/mL), dok je u talozima manja (7.83 µg/mL).

Ovi rezultati, dobijeni kvantitativnom metodom, potkrepljeni su i zimogramima.

Zahvalnost. Zahvaljujemo se svom mentoru Vladanu Martinoviću, dipl. biohemičaru na podršci, strpljenju i pomoći tokom realizacije projekta, kao i Milošu Rokiću, dipl. biohemičaru, na pruženoj stručnoj pomoći.

Literatura

Das S., Mishra B., Gill K., Ashraf M. S., Singh A. K., Sinha M., Sharma S., Xess I., Dalal K., Singh T. P., Dey S. 2011. Isolation and characterization of novel protein with anti-fungal and anti-inflammatory properties from *Aloe vera* leaf gel. *International Journal of Biological Macromolecules*, **48**: 38.

Jedinak A., Maliar T., Grančai D., Nagy M. 2006. Inhibition activities of natural products on serine proteases. *Phytotherapy research*, **20**: 214.

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

Sokol A. P., Ohman E. D., Iglewski H. B. 1979. A more sensitive plate assay for detection of protease production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, **9** (4): 538-540.

Troeberg L., Nagase H. 2003. Zymography of metalloproteinases. *Current protocols in protein science*, Unit 21.15.

Vujičić Z. 2002. *Eksperimentalna biohemija – praktikum*. Beograd: Rantec, str. 38-42, 46-49, 80-89.

Anka Jevremović and Isidora Simanić

Isolation and Characterization of Proteases from Aloe (*Aloe vera*) Extract

Proteases (also termed peptidases or proteinases) are compounds essential in a number of physiological reactions, from digestion to coagulation. They are enzymes which are a subclass of hydrolases and are enabling proteolyses, that is, the decomposition of proteins, by catalyzing the hydrolysis of peptide bonds of amino acid in the polypeptide chains. Enabling this process, they breakdown the original protein to smaller fragments. Proteases can be divided into four big subclasses: serine, cysteine, aspartic and metalloproteases.

The aim of the project is the determination of the total protease activity, as well as the concentration of proteins in the samples of Aloe, a plant widely used in medicine and the pharmaceutical industry. Considering its effectiveness, we have assumed that its properties are connected to the existence of the proteases in it.

Materials and methods. After the extraction, the following was done: the determination of the total protease activity, proteases activity using BAPNA, the determination of protein concentration using Lowry protein assay, the fractional precipitation using ammonium-sulfate and zymography.

Extraction: 40 g of Aloe were measured and homogenized in a blender with 100 mL of phosphate buffer (0.1 M, pH = 6), containing 5 mM EDTA and 5 mM cysteine, so that the phenoloxidase activity and oxidation would be avoided. The homogenates were filtered and centrifuged for 30 min. at 3000 rpm.

The fractional precipitation of proteins using ammonium-sulfate: Firstly, it was done with the 60% saturation and then with 100% saturation with ammo-

nium-sulphate. The precipitates were resuspended in 4 mL phosphate buffer (0.1 M, pH = 6).

The determination of total protease activity: The activity measuring mixture contained: 0.2 mL of the sample, 1.1 mL 0.5% albumin (BSA) in the phosphate buffer (0.1 M, pH = 6), 0.7 mL 5% TCU (trichloroacetic acid) with which the reaction was stopped. The raw extract, precipitate 1, precipitate 2, and the supernatant made after the 100% saturation with AS. The activity of enzymes was measured using 5 mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) so that it could be determined whether there were any metalloproteases. The supernatants were isolated afterwards and their absorbance was measured at 350 nm. Apart from total protease activity, the activity of the proteases was measured using BAPNA, which works in the same way as the trypsin.

The determination of the concentration of proteins (Lowry protein assay): Reagents used for the process were: reagent 1 – 2% Na₂CO₃ (2 g) and 0.1 M, reagent 2 – 1% CuSO₄, reagent 3 – 2% KNaC₄H₄O₆. The absorbance was measured at 550 nm using spectrophotometer 10, GBC Spectral UV/Vis spectrophotometer, Melbourne.

Zymography: After making the separating and concentrating gels, the electrophoresis was run. The

gel was afterwards cut in two pieces, one of which was with, and the other without EDTA. The gel was then rinsed in the renaturing buffer, and in the developing buffer afterwards, where they were left overnight before being scanned.

Results. Acquired results show that Aloe (*Aloe vera*) contains proteolytic enzymes. Analyzing the raw extract (with and without EDTA) and precipitates (with and without EDTA), the smaller activity is seen in the raw extract than in the supernatants. It was also deduced that the metalloproteases were not present in the given samples, since it is known that they are inactivated using EDTA. These results correlate with the fact that the greater concentration of proteins is present in the raw extract (73.154 µg/mL), than in the precipitates (7.83 µg/mL). This fact was also supported by the results of the zymography, which was done with and without EDTA, and which confirmed the results acquired using the quantitative method of the measuring the enzyme activity. Considering the fact that the enzyme activity with the addition of smaller quantities of samples was not investigated, as well as the investigation of other types of proteases, the possibility for future research is present. 