

ANNALES  
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA  
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXIII, 2

SECTIO C

1968

Z Katedry Biochemii Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS  
Kierownik: doc. dr Jerzy Trojanowski

Jerzy ŁOBARZEWSKI, Maria BENESZ

**Kolorymetryczna metoda oznaczania aktywności esterazowej  
w materiale owadzin**

A Colorimetric Method of Estimating Esterase Activity in Insect Material

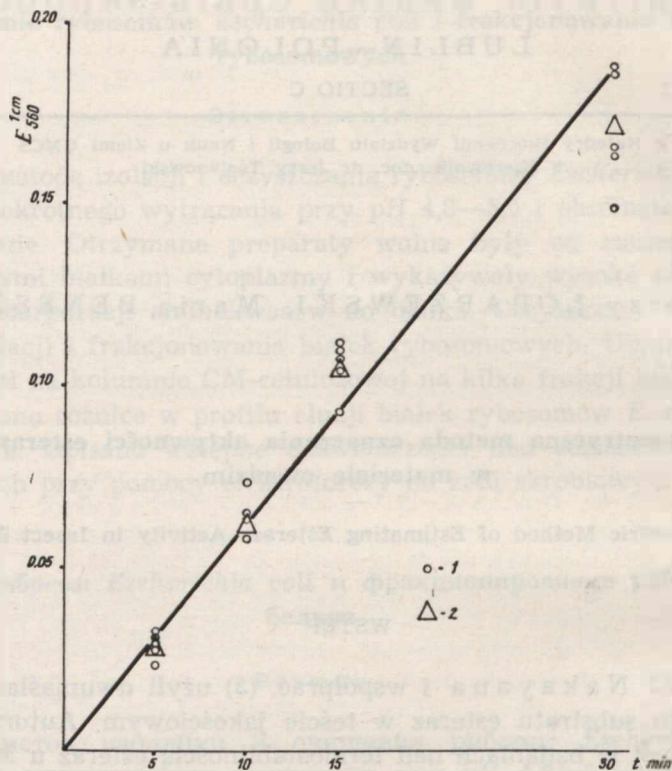
WSTĘP

W r. 1963 Nakayana i współprac. (3) użyli dwumaślanu fenoloftaleiny jako substratu esteraz w teście jakościowym. Autorzy ci stosowali ten test w badaniach nad termostabilnością esteraz u *Mycobacterium tuberculosis*. W oparciu o te badania przeprowadzono próby użycia dwumaślanu fenoloftaleiny do oznaczeń ilościowych aktywności esterazowej zawartej w homogenacie larw *Galleria mellonella*.

MATERIAŁ I METODY

10 g larw *Galleria mellonella* homogenizowano w temp. ok. 0°C w 100 ml buforu fosforanowego 0,025 M, pH = 7. Homogenat wirowano w temp. -5°C przez 20 min. przy 10 000 x g. Warstwa tłuszczu zbierała się w tych warunkach na powierzchni homogenatu. Tłuszcz zbierano, a supernatant nasycano siarczanem amonu do 40%. Strącone białko wirowano w temp. -5°C przy 6 000 x g. Osad rozpuszczano w 0,025 M buforze fosforanowym o pH = 7 i poddawano dializie w temp. ok. 0°C wobec tego samego buforu przez 24 godz. Tak przygotowany preparat enzymatyczny był przechowywany w temp. -10°C przez kilka tygodni, nie wykazując strat aktywności esterazowej.

Dwumaślan fenoloftaleiny (c. cz. 370,0) syntetyzowano w Katedrze Chemii Organicznej Politechniki Warszawskiej. Związek ten jest białą drobnokrystaliczną substancją, trudno rozpuszczalną w wodzie. Dwumaślan fenoloftaleiny do reakcji przygotowuje się przez rozpuszczenie 5 mg tego związku w 1,5 ml acetonu i uzupełnia wodą do 10 ml. W tych warunkach powstaje jednolita zawiesina mikrokryształów dwumaślanu fenoloftaleiny. Odczynnik pozostaje bezbarwny, nawet po



Ryc. 1. Wpływ czasu inkubacji preparatu esteraz z dwumaślanem fenoloftaleiny na rozrzut wyników reakcji enzymatycznej; 1 — jednorazowy pomiar, 2 — średnia arytmetyczna

The influence of incubation time of esterase preparation with phenolphthalein dibutyrate on the dispersion of results of the enzymatic reaction; 1 — single measurement, 2 — arithmetic mean

Tab. 1. Rozrzut wyników (ryc. 1)  
Deviation of results (Fig. 1)

Czas (min.) inkubacji enzym-substrat Incubation time of the enzyme-substrate mixture	Średnia arytmetyczna Arithmetic mean $E_{560}^{1cm}$	Odchylenie od prostej w procentach Deviation from the straight line in per cent
5	0,0287	4,33
10	0,0608	0
15	0,105	11,5
30	0,171	9,95

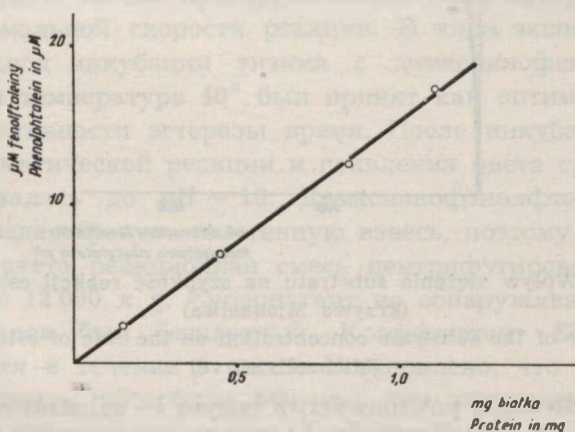
alkalizacji do  $pH = 10$ . Właściwości te nie zmieniają się w ciągu 6 godz. Po tym czasie mikrokryształy dwumaślanu fenoloftaleiny zaczynają sedimentować, co uniemożliwia dalsze użycie tego odczynnika.

Mieszanina reakcyjna w naszych doświadczeniach zawierała 1 ml roztworu substratu, 1 ml buforu fosforanowego 0,025 M,  $pH = 7$  i 1 ml preparatu enzymu. Do próby kontrolnej wprowadzano 1 ml preparatu enzymu ogrzanego uprzednio w temp.  $100^{\circ}C$  przez 10 min. Próbę i kontrolę wstawiano do łaźni wodnej o temp.  $37^{\circ}C$ . Czas reakcji enzymatycznej — 10 min. Wybrano na drodze doświadczałnej (ryc. 1, tab. 1). Po inkubacji do próby i kontroli dodawano po 1 ml 1 M roztworu  $Na_2CO_3$ .  $Na_2CO_3$  alkalinizuje środowisko do  $pH = 10$  i hamuje reakcję enzymatyczną. W badanej próbce powstaje zabarwienie charakterystyczne dla soli sodowej fenoloftaleiny. Próba kontrolna pozostaje bezbarwna. Zawiesinę dwumaślanu fenoloftaleiny usuwa się przez wirowanie przy  $12\ 000 \times g$  przez 10 min. Supernatant nie wykazuje zjawiska Tyndalla, a osad dwumaślanu fenoloftaleiny jest bezbarwny.

Współczynnik ekstynkcji supernatantu oznaczano w fotokolorymetrycznej spektrometrii „Spekol” firmy Zeiss przy długości fali świetlnej  $560\ m\mu$ , co odpowiada maksimum absorpcji soli sodowej fenoloftaleiny. W celu oznaczenia ilości fenoloftaleiny uwalnianej w reakcji enzymatycznej wykreślono krzywą kalibracyjną przy użyciu roztworu fenoloftaleiny w  $pH = 10$  przy długości fali świetlnej  $560\ m\mu$ . Natężenie barwy fenoloftaleiny w tych warunkach w koncentracji do  $20\ \mu M$  odpowiada prawu Lamberta-Beera.

## WYNIKI

Pracując w warunkach maksymalnej szybkości reakcji enzymatycznej stwierdzono, że ilości fenoloftaleiny uwalniane z estru w reakcji enzymatycznej są wprost proporcjonalne do ilości białka zawartego w preparacie enzymatycznym (ryc. 2). Wyniki te uzasadniają użycie dwumaślanu fenoloftaleiny do oznaczania aktywności esterazowej w ba-



Ryc. 2. Zależność pomiędzy ilością białka w preparacie enzymatycznym a stężeniem fenoloftaleiny powstającej na skutek rozkładu substratu w reakcji enzymatycznej  
The correlation between the amount of protein in enzymatic preparation and the concentration of protein after hydrolysis of the substrate

danym materiale. Aktywność specyficzną badanego preparatu esteraż przyjęto określać zgodnie z zaleceniami Międzynarodowej Unii Biochemicznej jako ilość mikromoli fenoloftaleiny (produktu reakcji) na 1 mg białka w czasie 10 min. inkubacji w temp. 40°C.

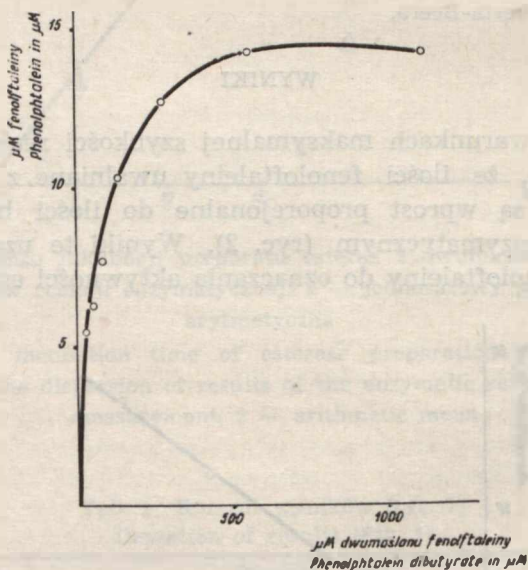
Jednostki aktywności specyficzej =  $\frac{\mu\text{M fenoloftaleiny}}{\text{obj. enzymu w ml} * \text{x mg białka **/ml}}$

\* W przypadku rozcieńczenia preparatu enzymatycznego podstawić iloraz  $\frac{1}{\text{rozcieńczenie}}$

\*\* Białko oznaczano metodą Lowry i współprac. (2).

W naszych doświadczeniach aktywność esterażowa wynosiła około 1 000 jednostek specyficznych.

Dla wykazania wpływu ilości substratu na szybkość reakcji enzymatycznej wykreślono krzywą Michaelisa (ryc. 3). Przebieg krzywej nie wykazuje efektu hamowania szybkości reakcji enzymatycznej w badanym zakresie stężeń substratu.



Ryc. 3. Wpływ stężenia substratu na szybkość reakcji esterażowej (krzywa Michaelisa)

The influence of the substrate concentration on the rate of esterase activity (Michaelis curve)

W celu porównania powinowactwa enzym — substrat oznaczono stałe Michaelisa wobec dwumaślanu fenoloftaleiny  $K_m = 3,84 \times 10^{-5} \text{ M}$  i maślanu etylu (1)  $K_m = 1,43 \times 10^{-4} \text{ M}$ . Dwumaślan fenoloftaleiny wykazuje większe powinowactwo do badanego preparatu enzymatycznego niż maślan etylu.



\*  
\*   \*  
\*

Autorzy serdecznie dziękują Panu Prof. Drowi Adamowi Paszewskiemu za udostępnienie materiału biologicznego oraz preparatu dwumaślanu fenoloftaleiny.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Methods in Enzymology. Red. Colowick S. P., Kaplan O. N., Academic Press, 1, New York 1955.
2. Methods in Enzymology. Red. Colowick S. P., Kaplan O. N., Academic Press, 3, New York 1957.
3. Nakayana Y., Takeya K.: A Simple Heat-stable Esterase Test for Classification of *Mycobacteria*. Nature, 198, 1963.

#### Колориметрический метод определения активности эстеразы на материале насекомых

##### Резюме

Для количественных определений был применен качественный тест на активность эстеразы с димаслянофенолфталеиновым эфиром (по Nakayana и сопр.). Источником энзима была активная фракция гомогената из личинок *Galleria mellonella*. Установлено, что количество фенолфталеина, освобожденного из эстеразы в энзиматической реакции, прямо пропорционально количеству белка в условиях максимальной скорости реакции. В ходе эксперимента 10-минутный период инкубации энзима с димаслянофенолфталеиновым эфиром при температуре 40° был принят как оптимальное для обозначения активности эстеразы время. После инкубации для торможения энзиматической реакции и появления цвета среда 1 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> алкализовалась до pH = 10. Димаслянофенолфталеиновый эфир в водной среде образует гомогенную взвесь, поэтому сразу же после появления цвета реакционная смесь центрифугировалась в течение 20 мин. при 12 000 x g. Супернатант не обнаруживал явления Тиндаля и осадок был бесцветный. Коэффициент E<sup>560</sup> супернатанта не изменялся в течение 5 часов. Установлено, что цвет фенолфталеина (максимум абсорбции 560 мμ) при концентрации до 20 μM и pH = 10 соответствует закону Ламберта-Бееера. K<sub>m</sub> эстеразы исследованного энзиматического препарата для масляноэтилового эфира составляет 1,43 × 10<sup>-4</sup>, а для димаслянофенолфталеинового эфира — 3,84 × 10<sup>-5</sup> M.

## A Colorimetric Method of Estimating Esterase Activity in Insect Material

### Summary

The qualitative test for esterase activity with phenolphthalein dibutyrate (according to Nakayana et al.) was adapted to quantitative determinations. Active fraction of a homogenate from larvae of *Galleria melonella* was the source of the enzyme. It was found that the amount of phenolphthalein liberated from the ester in enzymatic reaction was proportional to the amount of the protein obtained under the conditions of maximum rate of reaction. A ten-minute period was chosen for incubation of the enzyme with phenolphthalein dibutyrate, at 40°C, for determination of the esterase activity. After incubation the medium was alkalinized with 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution and adjusted to pH 10.0 in order to inhibit the enzymatic reaction and induce colour. As phenolphthalein dibutyrate forms a homogenous suspension in the water medium, the mixture was centrifuged at 12.000 x g for 20 minutes, immediately after the appearance of the colour caused by phenolphthalein sodium. The Tyndall effect was not observed in the supernatant. Microcrystals of phenolphthalein dibutyrate were colourless. The value of coefficient E<sup>560</sup> of the supernatant remained unchanged for 5 hrs. It was found that the colour of phenolphthalein (absorption at 560 mμ) up to the concentration of 20 μM solution, at pH 10.0, corresponded to the Lambert-Beer law. Michaelis constants of the examined enzymatic preparation of esterases in the presence of ethyl butyrate and phenolphthalein dibutyrate were 1.43 × 10<sup>-4</sup> M and 3.84 × 10<sup>-5</sup> M, respectively.