

Hydrolytische Enzyme: Amylasen, Proteasen, Lipasen

VerfasserInnen: Thomas Huber its4tom@gmx.ch, Philippe Saner P.Saner@access.unizh.ch, Pascale Sandmann pascale@sandmann.ch, Isabelle Zumsteg izumsteg@hotmail.com
Betreuerin: Christine Lehmann chleh@botinst.unizh.ch

I. Einleitung

Anders als eukaryotische Zellen, können Bakterien keine Makromoleküle ins Zellinnere aufnehmen, da die Plasmamembran eine Barriere für solche Moleküle darstellt. Diese Moleküle müssen im extrazellulären Raum gespalten werden, und erst ihre Mono-, Di- oder kleinmolekulare Oligomere können die Membran passieren. Der Spaltvorgang (meist Hydrolyse) wird durch Enzyme bewerkstelligt, welche vom Mikroorganismus ausgeschieden werden. Bei der Hydrolyse werden Makromoleküle gespalten, indem, vereinfacht ausgedrückt, ein dissoziiertes Wassermolekül eingebaut wird. H^+ bindet an ein neues freies Ende der Kette während OH^- an das andere freie Ende bindet. (siehe auch Fig. 1a-c der Experimentieranleitung). Es gibt verschiedene Klassen solcher Exoenzyme, je nach Spezifität mit der sie die Makromoleküle angreifen. In diesem Experiment betrachteten wir

- Stärkespezifische **Amylasen** (Spaltung von glykosidischen Bindungen zwischen Glukosemolekülen)
- Protein- bzw. peptidspezifische **Proteasen bzw. Peptidasen** (Spaltung von Peptidbindungen zwischen Aminosäuren)
- Fettspezifische **Lipasen** (Spaltung von Esterbindungen zwischen Glycerin und Fettsäure)

Das Ziel des Experimentes ist es, mittels spezifischer Tests bakterielle Exoenzymaktivität auf Medien, welche diese Makromoleküle enthalten, nachzuweisen.

II. Vorgehen und Ergebnisse

Nähragarplatten, angereichert mit den entsprechenden Makromolekülen wurden mit Mikroorganismen beimpft und inokuliert: Je eine Petrischale mit Kartoffelstärke-Agar, Magermilch-Agar und Spirit Blue Lipid-Agar wurde auf der Rückseite der Petrischale mit einem wasserfesten Stift in 4 Quadranten geteilt und jeweils ein Quadrant mit einer Bakterienkultur, *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas syringae* und *Staphylococcus aureus*, inokuliert und während 48 Stunden bei 30°C inkubiert.

Für die Auswertung wurden die von den Gruppen der Vortage angesetzten Agarplatten getestet.

1. Amylase-Nachweis: Beim Übergiessen der Agarplatten mit **Lugol** (Iod interkaliert mit den Stärkemolekülen) färben sich stärkehaltige Bereiche dunkelblau.

Dort, wo die Stärke durch die Bakterien abgebaut wurde, ist der Agar farblos bis hellbraun gefärbt (Eigenfarbe der Lugolschen Lösung). Kein einziges Areal der 4 Kulturen blieb jedoch ungefärbt. Dies kann mehrere Ursachen haben, z.B.:

- Keiner der getesteten Mikroorganismen ist in der Lage Amylase zu produzieren.
- Die Inkubationszeit war zu kurz (die Mikroorganismen benötigen mehr Zeit, um Amylase zu synthetisieren). Diese Interpretation ist gemäss Assistentin wahrscheinlicher.



Abb. 1 Mit Lugo übergossene Stärkeagarplatte. Dort, wo Stärke vorhanden ist, wird diese durch Iod blau angefärbt. Dort, wo Bakterien die Stärke abgebaut haben, erscheint der Agar aufgehellt.

Quelle: http://www2.austin.cc.tx.us/microbugz/images/starch_after.jpg

2. Caseinase-Nachweis

Im **Magermilchagar**, welcher das Protein Casein enthält, waren rund um Kolonien von *Bacillus megaterium* **transparente Bereiche** zu beobachten (Abb. 2). Ca-Caseinat, ursprünglich gelb-weiss und undurchsichtig war abgebaut worden. *Bacillus megaterium* ist also imstande ein Casein-spezifisches Exoenzym (Caseinase) in den extrazellulären Raum abzugeben. Bei den anderen 3 Mikroorganismen war der Nachweis negativ. Diese 3 Arten sind nicht in der Lage, Caseinase zu synthetisieren oder bräuchten dazu mehr Zeit als 48 Stunden.

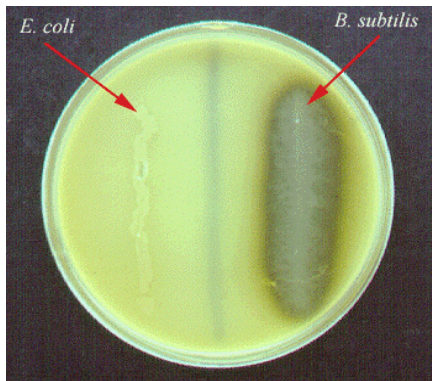


Abb. 2 Abbau von Casein durch *B. subtilis* (rechts), welcher Caseinase produzieren kann. Keine Caseinhydrolyse durch *E. coli* (links)

Quelle:

<http://www.cat.cc.md.us/courses/bio141/labmanua/lab8/images/skim.gif>

3. Lipase-Nachweis

Ein agarhaltiges Medium, angereichert mit Tween 80 (Polyoxyethylene sorbitan monooleate) und versetzt mit Spirit Blue (Solvent Blue 38, ein basischer Phthalocyaninfarbstoff) wurde inokuliert und während 48 Stunden bei 30°C inkubiert. Wie beim Caseinase-Nachweis, lag nur in Arealen um Kolonien von *Bacillus megaterium* ein positives Ergebnis vor (in diesem Fall intensive Blaufärbung unterhalb der Kolonien). *Bacillus megaterium* ist somit, im Gegensatz zu den anderen 3 untersuchten Mikroorganismen, in der Lage, Lipase in den extrazellulären Raum abzugeben. Wiederum gilt die Einschränkung, dass die anderen 3 Mikroorganismen u.U. nur einen längeren Zeitraum benötigt hätten, um Lipase zu synthetisieren. Desweiteren könnten die anderen 3 Mikroorganismen zwar eine Lipase ausscheiden; jedoch eine Form, welche nicht in der Lage ist, Tween 80 zu spalten.

III. Schlussfolgerungen

Nicht jede Spezies kann alle erwähnten Exoenzyme produzieren. Die Enzymtest-Nähragarplatten, angereichert mit je einem Makromolekül und inokuliert mit einem Mikroorganismus, veranschaulichen die Produktion und Wirkung von Exoenzymen, werden aber nicht gebraucht, um Bakterien oder andere Mikroorganismen zu kultivieren.

IV. Anhang: Links:

Visual lab study guide: <http://styx.pitt.cc.nc.us/sci/faculty/ta/metab.htm>

Practical uses of lipases: <http://www.mahidol.ac.th/abstracts/annual2000/0692.htm>