

Bestimmung von hydrolytischen Enzymaktivitäten

Die enzymatische Hydrolyse ist der erste und die Umsatzgeschwindigkeit bestimmende Schritt für den Abbau organischen Materials. Deshalb werden die entsprechenden Enzymmengen gemessen und miteinander verglichen. Die wichtigsten Enzymgruppen sind Esterasen, Lipasen, Gycosidasen, Peptidasen und die (alkaline) Phosphatase. Fast alle dieser Enzyme werden als bakterienbürtig angesehen. Nur die Esterasen sind überwiegend gelöst, alle anderen Hydrolasen sind zellgebunden. Die Phosphatase ist das einzige Enzym, das überwiegend von Mikroalgen und Cyanobakterien produziert werden soll.

Die zu bestimmenden Enzyme spalten die Bindung zwischen einem Fluoreszenzfarbstoff und dem Substrat. Der gebräuchlichste Fluoreszenzmarker ist das Methylumbelliferon (MUF). Vor der Substratabspaltung fluoresziert der Methylumbelliferylrest am Substrat nicht. Im Gegensatz dazu zeigt Methylumbelliferon bei einer Anregung von 365 nm eine Fluoreszenz bei 451 nm. Die mit der Zeit ansteigende Fluoreszenz des abgespaltenen MUF ist proportional zur Aktivität bzw. Menge der Enzyme. Im Gegensatz zur klassischen Mikrobiologie, die enzymatische Aktivitäten in Proteinextrakten misst, bestimmt man in der aquatischen Mikrobiologie die apparenten (sind oft Gemische an Enzymen) extrazellulären Hydrolasen in Zellsuspensionen, i.e. direkt im Plankton. Da meistens pH und Temperatur konstant gehalten werden, ist das Ergebnis einer Enzymmenge proportional.

Große Mengen an kohlenhydrat- und proteinabbauenden Enzymen sollen das Vorhandensein des entsprechenden polymeren Substrats anzeigen. Es ist bisher unklar, wie die Mikroorganismen dieses Angebot wahrnehmen. Im Gegensatz dazu wird eine hohe Phosphataseaktivität als Anzeiger eines Phosphatmangels interpretiert. Die Hydrolaseaktivitäten können bisher nur relativ zueinander als **Charakteristika der Substratverfügbarkeit**, z. B. als Ratios, im Zeitverlauf oder über räumliche Gradienten, interpretiert werden.

Substratauswahl:

Enzym	Substrat	Marker
Chitinase	MUF-N-acetyl-glucosamine	MUF
Aminopeptidase	L-Leucine-4-methylcoumarinyl-7-amid	AMC
β -Cellobiosidase	MUF- β -Cellobioside	MUF
β -Galactosidase	MUF- β -D-galactopyranoside	MUF
α -Glucosidase	MUF- α -D-glucopyranoside	MUF
α -Glucosidase	MUF- β -D-glucopyranoside	MUF
Lipase	MUF-oleate, -stearate	MUF
Esterase	MUF-butyrate, -acetate	MUF
alkaline Phosphatase	MUF-phosphate	MUF

Sättigungskonzentration und Stammlösungen:

Kinetiken werden selten aufgenommen. Üblich ist die Messung der maximalen Hydrolyserate (v_{max}). Allgemein üblich wird als Sättigung eine 100 μ M Endkonzentration angenommen. In sehr eutrophen Gewässern mit hoher Plantonbiomasse reicht das jedoch nicht aus.

Substrat	Endkonzentration (µM)	Stammlösung (mM) ¹	Einwaage (mg) je ml Ethanol
L-Leucine-4-methylcoumarinyl-7-amid	400	20	6,50
MUF-β-D-glucoopyranoside	800	40	13,54
MUF-butyrat, -acetate	600	30	6,55
MUF-phosphate	100	5	1,28

- Etwas mehr als benötigte Substratmenge im Deckel eines Eppendorfgefäßes abwiegen. Masse notieren. Gefäß verschließen.
- Passende ml Ethanol ausrechnen und auffüllen.
- Haltbarkeit der Substrate ist sehr unterschiedlich. Gut sind Phosphat und alle Zuckersubstrate. Sehr stark chemisch werden die Bindungen mit Butyrat, Acetat und auch Leucin angegriffen. Deshalb nicht lange aufbewahren. Ggf. mehrere Stammlösungen vor Benutzung mischen. Der Anteil an bereits zersetztem Substrat wird zum Zeitpunkt 0 erfasst.

Probenvorbereitung:

- Als Kontrolle dient Reinstwasser ohne Enzymaktivität.
- Soll der Anteil freier gelöster Enzyme bestimmt werden, müssen pro zu messender Enzymaktivität 6 ml einer unfixierten, frischen Probe durch 0,2 µm Celluloseacetat-Filter (25 mm Spritzenvorsatz mit 0,2 µm-Celluloseacetatfilter und Einwegspritze verwenden) filtriert werden. Bei z. B. 3 verschiedenen Substraten müssen mindestens 18 ml filtriert werden.
- Reinstwasserblindwerte, Filtrate und Vollproben werden mit je 1 ml 50 mM TRIS/TRIS-HCl-Puffer zu 10 ml Probe (pH 8,2) gepuffert.
- Je gepufferter Unterprobe (Blindwerte, Filtrate und Vollproben) werden 3mal 2 ml in Küvetten pipettiert Reihenfolge notieren!

Enzym B	Voll 2	Voll 2	Voll 2				
	Filtrat 2	Filtrat 2	Filtrat 2				
	Voll 1	Voll 1	Voll 1				
	Filtrat 1	Filtrat 1	Filtrat 1				
	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle				
Enzym A	Voll 2	Voll 2	Voll 2	Enzym C			
	Filtrat 2	Filtrat 2	Filtrat 2				
	Voll 1	Voll 1	Voll 1				
	Filtrat 1	Filtrat 1	Filtrat 1				
	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle				
	Voll 2	Voll 2	Voll 2		Voll 2	Voll 2	Voll 2
	Filtrat 2	Filtrat 2	Filtrat 2		Filtrat 2	Filtrat 2	Filtrat 2
	Voll 1	Voll 1	Voll 1		Voll 1	Voll 1	Voll 1
	Filtrat 1	Filtrat 1	Filtrat 1		Filtrat 1	Filtrat 1	Filtrat 1
	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle		Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle

Messung:

- Fluorometer HITACHI 4010 starten, Menü "Quantitative" wählen, Geräteparameter laden oder eintragen: Ex/Em 1,5/1,5 nm Spaltbreite, Anregung 365 nm, Emission 451 nm, 2 s warten, 2 s integrieren).

¹ bei 40 µl je 2 ml Probe. vgl. "Messung"

- Datenübernahmeprogramm auf externem Computer mit !HITACHI starten. Mit Taste 5 den Empfang der Druckdaten aktivieren.
- Im Abstand von 15-30 s in die Küvetten einzeln bestimmte Mengen der MUF-Substratlösung (40 µl bei 5 mM Substrat in 100%igem Ethanol, eingefroren gelagert) pipettieren und danach sofort gemessen (= Startwert 0 min).
- Nach Inkubationsstart aller Proben im Abstand von einigen Minuten bis Stunden und je nach Probenumfang mindestens noch 2 Messungen aller Unterproben durchführen.
- Die laufenden Nummern der Messwerte, die Uhrzeit der Messung, die Probenreihenfolge und das entsprechende Enzymsubstrat notieren. Evtl. Verwechslungen und Verzögerungen protokollieren.
- Zum Speichern beliebige Taste und dann die 3 auf externem Computer drücken, Dateinamen protokollieren.

	Abstand zwischen den Messungen [min.]	Gesamtinkubation [h]
Enzyme mit hoher Umsatzleistung		
Esterase	10-30	max. 2
Peptidase	20-60	1-2
Enzyme mit mittlerer und variabler Umsatzleistung		
Lipase	mind. 100	mind. 3
Phosphatase	60-100	mind. 2
Enzyme mit sehr geringer Umsatzleistung		
Glucosidase	120-180	6-8

Auswertung:

- Datenliste in Tabellenkalkulationssystem importieren (Interpunktion von Komma auf Punkt als Dezimalstelle umstellen). Kontrolle, Filtrate und Vollproben mit den Inkubationszeiten in Tabellen umschreiben, die eine Regressionsanalyse jeder Unterprobe mit der Inkubationszeit zulassen.
- Jede Unterprobe mit der Inkubationszeit korrelieren! Der Anstieg (MUF-Menge je Zeiteinheit) ist proportional der Enzymaktivität bzw. -menge. Anstieg in MUF je Stunde umrechnen.
- Die Kontrollwerte (Anstiege) müssen von den anderen Unterproben subtrahiert werden.
- Die Differenz zwischen Vollprobe und Filtrat ist die zellgebundene Enzymaktivität (intrazelluläre und extrazelluläre Enzyme).

Literatur:

Hoppe H-G (1983) Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. Mar Ecol Progr Ser 11:299-308

Qualitätssicherung:

- Je Enzymgruppe 3 Blindwerte mit Reinstwasser mit messen (=chemische Hydrolyse).
- Täglich je Fluorophor (MUF und AMC) 8-stufige geometrische Verdünnungsreihe (25 µM – 12,5 µM – 6,25 µM – usw.) herstellen und messen.

Chemikalien:

- TRIS-TRIS-HCl-Puffer: 3,54 g TRIS-HCl und 3,34 g TRIS base je l, ggf. mit 1N HCl oder 1N NaOH auf 8,2-8,3 titrieren
- 50 µM Fluorophorstammlösungen: in 100 ml TRIS-Puffer pH 8,2 + 2 ml 96% Ethanol (dunkel und kühl mehrere Monate haltbar)

BACOSA 2014

1. Substrate ansetzen: für ca. 10 Proben 1,5 ml, nur für Zingster Strom 0,4 ml.
2. Küvetten strukturiert stecken
3. Geometrische Kalibriergeraden direkt in den Küvetten pipettieren

A) Zingster Strom

K	K	K	K	K	K	K	K	K		
K	K	K	K	K	K	K	K	K		
Peptidase										
V	V	V								
F	F	F								
BW	BW	BW								
Phosphatase										
V	V	V								
F	F	F								
BW	BW	BW								

BW: Blindwerte
 F: 0,2 µm Filtrate
 V: Vollproben
 K: Kalibriergeraden

B) Gradient

5	5	5								
4	4	4								
3	3	3							K	K
2	2	2							K	K
1	1	1							K	K
V	V	V		Phosphatase					K	K
F	F	F		9	9	9			K	K
V	V	V		8	8	8			K	K
F	F	F		7	7	7			K	K
BW	BW	BW		6	6	6			K	K

BW: Blindwerte
 F: 0,2 µm Filtrate **nur vom Zingster Strom, Tag 1 und 2**
 Nummern: Vollproben von West nach Ost
 V: Vollproben **Zingster Strom, Tag 1 und 2**
 K: Kalibriergeraden

1 Recknitzmündung, 2 R2, 3 R86/88=DB16, 4 R37/44, 5 R1/B65,
 6 B61/76, 7 B53, 8 B37/46, 9 B12/13

5	5	5								
4	4	4								
3	3	3								
2	2	2								
1	1	1								
V	V	V		Peptidase						
F	F	F		9	9	9				
V	V	V		8	8	8				
F	F	F		7	7	7				
BW	BW	BW		6	6	6				

C) Messkampagne

7	7	7								
6	6	6								
5	5	5							K	K
4	4	4							K	K
3	3	3							K	K
2	2	2							K	K
1	1	1		Phosphatase					K	K
V	V	V		10	10	10			K	K
F	F	F		9	9	9			K	K
BW	BW	BW		8	8	8			K	K

BW: Blindwerte
 F: 0,2 µm Filtrate **nur vom Zingster Strom**
 Nummern: Plot 1-10, 2x pro Woche 1x Dabitz und 1x
 Michaelsdorf
 V: Vollproben **Zingster Strom,**
 K: Kalibriergeraden

7	7	7							
6	6	6							
5	5	5							
4	4	4							
3	3	3							
2	2	2							
1	1	1		Peptidase					
V	V	V		10	10	10			
F	F	F		9	9	9			
BW	BW	BW		8	8	8			

D) Düngungsexperiment

Phosphatase									
RP3	RP3	RP3							
RP2	RP2	RP2							
RP1	RP1	RP1							
RN	RN	RN							
ZP3	ZP3	ZP3							
ZP2	ZP2	ZP2							
ZP1	ZP1	ZP1							
ZN	ZN	ZN							

ZN: Zingster Strom ohne P-Zugabe am Tag 7
 ZP1-3: Zingster Strom + 10 µM P am Tag 7
 RN: Ribnitzer See ohne P-Zugabe am Tag 7
 RP1-3: Ribnitzer See + 10 µM P am Tag 7

4. Messreihenfolge sorgfältig notieren.
5. 15 ml Reinstwasser + 1,5 ml Puffer mischen, in die 6 passenden BW Küvetten je 2 ml pipettieren.
6. Mit Rotrand-Spritzenvorfilter 15 ml Zingster Strom Filtrat(e) herstellen, puffern, in die Küvetten F pipettieren.
7. Von übrigen Proben je 15 ml abmessen und puffern, einpipettieren. Becherglas kann immer wieder verwendet werden, wenn es mit einem Schluck der nächsten Probe gespült wird.
8. 2 gelbe Pipettenspitzen und die Substrate griffbereit zustellen.
9. Gut lesbare Uhr mit Sekundenanzeige besorgen.
10. Fluorometer anschalten, Computer an, auf Empfang von Druckdaten stellen. Einstellungen: Ex 365 nm / Em 451 nm, Bandpass 1,5/1,5 nm, Response 2 s, Average 2 s.
10. Zur vollen Minute Substrat in die erste Küvette pipettieren, kurz anschütteln, messen.
11. im 20 s alle Folgenden.
12. Kalibranten messen.
13. Abspeichern: Pddmmyya.txt. Weitere Messungen dann b oder c hinten.
14. Mindestens 2x alle Proben wieder messen, üblicherweise jede Stunde (exakte Uhrzeit aufschreiben). Die letzten Werte der Vollproben sollten 10-50 rFU betragen.

neu MPR (BACOSA)

- Zuerst MUF Standards in geometrischer Verdünnung herstellen für Platte 2: 1. Well (A4) 3 ml, alle anderen Wells 1,5 ml **5 mM** Puffer. Dann 1,5 ml 50 μ M Standards aus erstem Well ins nächste, daraus wieder usw. Aus letztem Well (C6) 1,5 ml entfernen.
- Danach AMC Standards genauso in geometrischer Verdünnung herstellen für Platte 4
- Es kommen 10 Proben: mittwochs und freitags früh. Dabitz bzw. Michaelsdorf
- je Probe und 1x Reinstwasser: 10 ml in kleine Bechergläser o.ä.
- je 1 ml 50 mM TRIS-HCl-Puffer dazu
- gepufferte Proben und Blindwerte in 3 Replikaten in 24 Well Platten pipettieren: je 1,5 ml
- auch in die 3 anderen Platten einpipettieren

Platte1

	1	2	3	4	5	6
A	Da1	Da1	Da1	Da5	Da5	Da5
B	Da2	Da2	Da2	Da6	Da6	Da6
C	Da3	Da3	Da3	Da7	Da7	Da7
D	Da4	Da4	Da4	Da8	Da8	Da8

Platte2

	1	2	3	4	5	6
A	Da9	Da9	Da9	50 μ M MUF	25 μ M MUF	12,5 μ M MUF
B	Da10	Da10	Da10	6,2 μ M MUF	3,1 μ M MUF	1,5 μ M MUF
C	BW	BW	BW	0,7 μ M MUF	0,35 μ M MUF	0,17 μ M MUF
D						

- in Platte 1 und 2 zu den grau markierten Proben so schnell wie möglich je 30 μ l Phosphatasesubstrat pipettieren
- sofort zum ersten Mal messen: Uhrzeit minutengenau aufschreiben

Platte3

	1	2	3	4	5	6
A	Da1	Da1	Da1	Da5	Da5	Da5
B	Da2	Da2	Da2	Da6	Da6	Da6
C	Da3	Da3	Da3	Da7	Da7	Da7
D	Da4	Da4	Da4	Da8	Da8	Da8

Platte4

	1	2	3	4	5	6
A	Da9	Da9	Da9	50 μ M AMC	25 μ M AMC	12,5 μ M AMC
B	Da10	Da10	Da10	6,2 μ M AMC	3,1 μ M AMC	1,5 μ M AMC
C	BW	BW	BW	0,7 μ M AMC	0,35 μ M AMC	0,17 μ M AMC

D						
---	--	--	--	--	--	--

- Danach in Platte 3 und 4 zu den gelb markierten Proben so schnell wie möglich je 30 μ l Peptidasesubstrat (Leu) pipettieren
- sofort zum ersten Mal messen: Uhrzeit minutengenau aufschreiben
- Alle 4 Platten im Abstand von ungefähr einer Stunde wieder messen. Dazwischen lichtgeschützt lagern. Uhrzeiten notieren.

Geräteparameter

- Ex 365 nm und Em 451 nm, Autocutoff on
- Top Read ohne Deckel
- 12 Reads pro Well