

Entwicklung neuer Plattentests zum Nachweis mikrobieller Hydrolysen von Estern und Oxidationen von 2-Hydroxycarbonsäuren

Development of New Plate Tests for the Detection of Microbial Hydrolysis of Esters and Oxidations of 2-Hydroxycarboxylic Acids

Y. Yamazaki und M.-R. Kula

Institut für Enzymtechnologie der Universität Düsseldorf in der Kernforschungsanlage Jülich, Wilhelm-Johnen-Straße, D-5170 Jülich, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **42c**, 1187–1192 (1987); received July 30, 1987

Esterase, Microbial, Oxidation, Indicator, Salicylhydrazide

The application of the thin-agar-layer coated filter culture technique (Z. Naturforsch. **42c**, 1082 (1987)) has been extended to the detection of ester hydrolysis and 2-hydroxyacid oxidation by microbial colonies. The former was performed by spraying with bromocresol purple and the latter with a salicylhydrazide reagent. Under the optimized conditions, the hydrolysis activity of more than 20 $\mu\text{mol/h} \cdot \text{g-wet cells}$ and the oxidation activity of more than 40 $\mu\text{mol/h} \cdot \text{g-wet cells}$ were usually detected directly on the filter-plate cultures of bacteria, yeasts and molds.

Einführung

Die in [1] beschriebene Filter-Kultur-Technik ermöglicht es, aus dem Nährboden stammende Begleitstoffe in einem einfachen Arbeitsschritt von Agarplattenkulturen abzutrennen und so die Hintergrundfärbung zu unterdrücken. Hierdurch können spezifische Aktivitätstests mit allen Kolonien einer Plattenkultur gleichzeitig und direkt auf der Platte unter neu gesetzten Bedingungen vorgenommen werden.

Bei Anwendung dieser Technik werden Nährstoffe, Puffersalze und Metabolite, etwa Carbonsäuren oder Nukleotide, aus der Plattenkultur entfernt bzw. deren Konzentration wird zumindest so stark verringert, daß nach Zugabe eines geeigneten Substrates beispielsweise die Esteraseaktivitäten der einzelnen Kolonien leicht durch Detektion der gebildeten Carbonsäure mit einem pH-Indikator nachgewiesen werden können. Weiterhin werden Mono- und Oligosaccharide mit Hilfe dieser Technik aus der Plattenkultur entfernt. Dies ermöglicht es, nach Aufbringen eines entsprechenden Carbonylreagens die durch mikrobielle Oxidation gebildeten Ketone direkt auf der Plattenkultur nachzuweisen.

Screening auf Mikroorganismen, die spezifische Esterasen [2, 3] oder 2-Hydroxycarbonsäuren oxidierende Enzyme [4] enthalten, sind im Hinblick auf die

Entwicklung neuer Biokatalysatoren gegenwärtig von großem Interesse. Bisher berichtete jedoch noch keine der Arbeitsgruppen über ein geeignetes Test-Verfahren, das sich unmittelbar auf der Agarplatte ausführen ließe, obwohl hier ein direkter Plattentest zu erheblichen Zeitersparnissen und drastischer Verminderung des Aufwandes führen kann.

In dieser Arbeit wird daher eine allgemeine Methode des Plattentests für das Screening auf mikrobielle Hydrolyse und Oxidation mit Hilfe der Filter-Kultur-Technik vorgestellt.

Material und Methoden

Salicylhydrazid wurde von Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, USA), (\pm)-2-Hydroxyisocaproinsäure und 2-Ketoisocaproinsäure Natriumsalz wurden von Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) bezogen. Bei den übrigen Reagenzien handelte es sich um Produkte von Fluka AG (Buchs, Schweiz) oder E. Merck (Darmstadt). Die eingesetzten Mikroorganismen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (Göttingen) bezogen.

Die mit dünner Agarschicht bedeckten Filterpapiere wurden auf Agarnährböden nach der früher beschriebenen Methode [1] hergestellt. Die Kultivierung der Mikroorganismen auf der Oberfläche der Agarschichten und die Reinigung der Filter-Kulturen auf frischen Agarplatten erfolgten ebenfalls entsprechend der in [1] beschriebenen Methode. Die Agarplatten für die Reinigung wurden jedoch mit 0,7% Agar in 5 mm Tris/HCl-Puffer, pH 7,5 (weiter

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. M.-R. Kula.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341–0382/87/1100–1187 \$ 01.30/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition “no derivative works”). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

nur Trispuffer genannt), hergestellt. Im Falle des Esterasetests wurde der Puffer durch 3 mM CaCl_2 ergänzt.

Bei den Esterasetests wurden die gereinigten, auf dem mit Agar beschichteten Filterpapier befindlichen mikrobiellen Kolonien in ein zweites Agargel nach der Überlagerungs-Methode [1] eingebettet. Dieses Gel wurde mit 0,5% Agar enthaltender Substratlösung bzw. Substratemulsion hergestellt. Die Substratlösung bzw. Substratemulsion war aus 0,1 M Triacetin, Milchsäurebutylester oder Buttersäureäthylester, 3 mM CaCl_2 und 0,2 mg/ml Tween 80 in Trispuffer zusammengesetzt. Nach Inkubation bei 30 °C für 2 bis 7 h wurden die Platten mit einer Indikatorlösung (20 mg Bromocresol Purpur (BCP) und 3,7 ml 0,01 N-NaOH in 50 ml Methanol) besprüht. Um eine Verbreiterung der Flecke zu vermeiden, erwies sich Methanol im Vergleich zu Wasser als das geeignetere Lösungsmittel.

Für die Oxidationstests wurden die gereinigten Filter-Kulturen jeweils auf ein in einer Petrischale ausgelegtes und mit 2 ml Substratlösung getränktes Filterpapier luftblasenfrei gelegt. Die Substratlösung enthielt 0,1 M racemische 2-Hydroxyisocaproinsäure als Natriumsalz bzw. racemische Mandelsäure als Natriumsalz in Trispuffer. Die Platten wurden 5 bzw. 8 h bei 30 °C inkubiert und anschließend mit einer Lösung von Salicylhydrazid (1,52 g in 50 ml Methanol unter Zusatz von 0,68 g ZnCl_2 und 1 ml 0,2 N-HCl bzw. zum Nachweis von Benzoylformiat 2 ml 2 N-HCl) besprüht. Etwa 30 min später wurden die Platten unter einer UV-Lampe (366 nm) betrachtet.

In jedem Falle wurde eine Kontrollplatte ohne Substrat parallel mit der Substratplatte getestet. Die folgenden Zeichen wurden für die visuelle Auswertung der Färbung benutzt: +++, weit und tief; ++, weniger weit, aber tief bzw. weit, aber weniger tief; +, eng, aber tief; ±, eng und schwach; und –, kein Unterschied zur Kontrollplatte.

Durch chromatographische Bestimmung der Reaktionsprodukte wurden die Geschwindigkeiten der Hydrolyse bzw. Oxidation in flüssigen Proben mit Zellsuspensionen abgeschätzt. Die gewaschenen Zellen der Mikroorganismen wurden wie früher beschrieben [1] hergestellt und in Substratlösungen bzw. Substratemulsionen oder die Pufferlösung als Kontrolle im Verhältnis von 0,1 g-feuchte Zellen/ml suspendiert. Die Substratlösungen bzw. -emulsionen für den Esterasetest waren identisch wie oben für den Plattentest mitgeteilt. Die Konzentration der

2-Hydroxycarbonsäuren betrug 0,05 M. Die Suspensionen wurden 0,5 oder 1 h bei 30 °C geschüttelt. Unmittelbar danach wurden die Zellen durch Zentrifugation entfernt. Gebildete Essigsäure, Butanol bzw. Buttersäure wurden im Überstand gaschromatographisch mittels einer Porapak-Q-Glassäule (100 ~ 120 mesh, Waters, 3 mm × 2 m) bestimmt: Trägergas, He; Fluß, 40 ml/min; Säulentemperatur, 230 °C; Retentionszeiten: 4,8 min (Essigsäure), 8,8 min (Butanol) und 11,6 min (Buttersäure). 2-Ketocarbonsäuren wurden mittels Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) mit einer ORH-801-Säule (ICT Handelsgesellschaft m.b.H., Frankfurt) bestimmt: Mobile Phase, 0,01 N- H_2SO_4 ; Fluß, 0,8 ml/min; Detektion, UV (210 nm); Retentionszeiten: 8,0 min (2-Ketoisocaproinsäure) und 7,4 min (Benzoylameisensäure). In den Kontrollproben konnte keines der genannten Produkte nachgewiesen werden. Hydrolysegeschwindigkeiten wurden jeweils gegen nichtenzymatische Umsetzungen korrigiert. Die Werte in den Tabellen sind bezogen auf ein Gramm feuchte Zellen und als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 4 \sim 7$) angegeben.

Ergebnisse und Diskussion

Aufgrund von Voruntersuchungen wählten wir für die Esterasetests Trispuffer als Puffermedium und BCP als Indikator aus. Dies erlaubt noch 10 nmol Buttersäure auf einer pufferhaltigen Agarplatte gut sichtbar zu machen. Buttersäurehaltige Bereiche erscheinen hierbei als gelbe Flecke auf purpurrotem Untergrund.

125 Mikroorganismen wurden mit der vorliegenden Methode auf Esteraseaktivität untersucht. Bei den BCP-Farbttests zeigten mehrere Stämme um ihre Kolonien auf den purpurrot gefärbten Substratplatten gelbe Höfe, jedoch keine gelbe Färbung auf den Kontrollplatten. Aus den Fotos der Abb. 1 geht hervor, daß *A. eutrophus* eine schwache Esteraseaktivität gegen Milchsäurebutylester und eine starke gegen Triacetin besitzt. Dieser Befund stimmt gut mit dem durch die Zellsuspensionen ermittelten quantitativen Ergebnis (Tab. I) überein. Wie aus den in Tab. I zusammengefaßten Daten ersichtlich ist, ist die Korrelation zwischen der Färbung im Plattentest und der Hydrolysegeschwindigkeit der Zellsuspensionen für Bakterien und Hefen im allgemeinen gut. Im Falle von Pilzen, z. B. *C. blakesleeana* (siehe Tab. I), wurde jedoch manchmal eine übermäßig hohe Einschät-

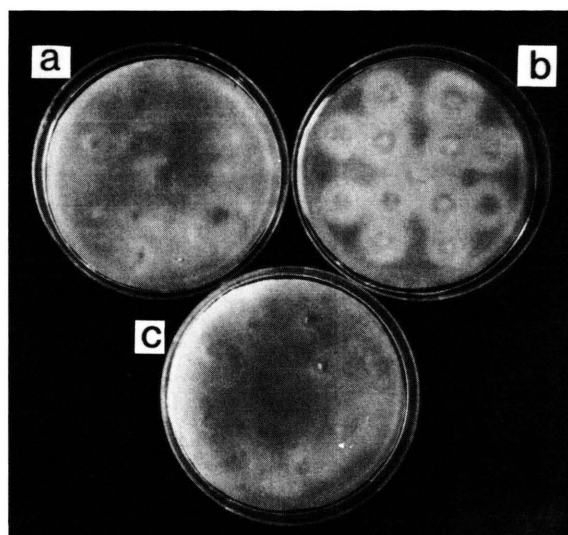


Abb. 1. Test der Esteraseaktivität von *A. eutrophus* DSM 531 auf Milchsäurebutylester (a), Triacetin (b) oder keinen Ester (c) enthaltenden Agarplatten durch die Filter-Kultur-Technik und anschließendem Besprühen mit BCP.

zung der Färbung in den Plattentests gegenüber denjenigen der Hydrolysegeschwindigkeiten der Zellsuspension vorgenommen. Diese Abweichungen könnten durch den morphologischen Unterschied dieser beiden Kulturen (flache Scheiben auf den Agarplatten und Kügelchen in den geschüttelten Kulturen) verursacht worden sein. In nur 2 Fällen von 42 Untersuchungen wurden falsche negative Reaktionen in den Plattentests angenommen. Eine falsche positive Reaktion wurde in keinem Fall beobachtet. Aus dem Ergebnis von Tab. I kann man schließen, daß eine mikrobielle Esteraseaktivität im Bereich oberhalb von 20 $\mu\text{mol/h} \cdot \text{g}$ -feuchte Zellen mit Hilfe dieses Plattentests gut nachgewiesen werden kann.

Die vorliegende Methode ist im Vergleich zu bisher veröffentlichten Nachweismethoden für Plattentests auf der Basis von chromogenen [5] bzw. fluorogenen [6] Estern oder mit einer substratspezifischen Färbungsreaktion [7] zwar weniger empfindlich, auf der anderen Seite benötigt sie jedoch keine speziellen Analysensubstrate, sondern die jeweils gewünschte Verbindung kann direkt als Substrat eingesetzt werden, worin der wesentliche Vorteil unserer Methode liegt.

Über die Verwendung eines pH-Indikators zum Nachweis mikrobieller Lipaseaktivität auf Agarplatten berichteten Alford und Steinle [8]. Dieses Verfahren beinhaltet jedoch keine Reinigung der Kolonien vor der Substratspaltung und dem Färbungsprozeß, wodurch falsche schwachpositive Zuordnungen nicht vermieden werden können.

Weiter untersuchten wir die Anwendbarkeit von 3 typischen Carbonyl-Reagentien, d. h. 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH, 0,4% in 2 N-HCl), Natriumnitroprussid-Natronlauge [9] und Salicylhydrazid-Zinkchlorid-Salzsäure [10], zur Detektion von 200 ~ 2 nmol 2-Ketoisocaproat bzw. Benzoylformiat auf mit dünner Agarschicht bedeckten Filterpapieren. Hierbei verwendeten wir zunächst ein Agargel in Trispuffer. Beide Ketosäuren wurden auf derartigen Medien mit dem DNPH- und Salicylhydrazid-Reagens sichtbar gemacht. Hierbei zeigte sich, daß der Kontrast zwischen Fleck- und Hintergrundfärbung wesentlich besser durch Besprühen der Proben mit Salicylhydrazid-Reagens als mit DNPH ausfiel (im 366-nm-UV-Licht rot fluoreszierende dunkle Flecken auf blau-weißlich fluoreszierendem Hintergrund (Abb. 2)). Die Färbung wurde mit der Zeit allmählich dunkler. Nach 24 h blieb sie jedoch stabil. Die Färbung durch DNPH war hinge-

Tab. I. Vergleich zwischen der Färbung im Plattentest und der Hydrolysegeschwindigkeit der Zellsuspension.

Stämme (DSM-Nr.)	Substrat ^a	Färbung ^b	Hydrolyse- geschwindigkeit [$\times 10 \mu\text{mol/h} \cdot \text{g}$]
<i>Alcaligenes eutrophus</i> (531)	A	+	8 ± 2
	B	+++	48 ± 7
	C	+	3 ± 1
<i>Escherichia coli</i> (1116)	A	\pm	< 1
	B	+	9 ± 4
	C	—	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (70449)	A	+	17 ± 5
	B	++	34 ± 6
	C	+	6 ± 1
<i>Aspergillus oryzae</i> (1861)	A	+	5 ± 3
	B	++	5 ± 2
	C	+	5 ± 1
<i>Cunninghamella blakesleeana</i> (1906)	A	++	8 ± 3
	B	+++	8 ± 2
	C	++	22 ± 5

^a A = Milchsäurebutylester, B = Triacetin, C = Buttersäureäthylester.

^b Zur Bedeutung der Zeichen siehe Material und Methoden.

gen sehr unbeständig. Salicylhydrazid wurde bisher vor allem histochemisch eingesetzt [11], jedoch über eine Färbung von Ketonen, z. B. 2-Ketocarbonsäuren, auf feuchten Proben wie Agarplatten mit diesem Reagens ist noch nicht berichtet worden.

Mit dem von uns für diese Art von Plattentest optimierten Reagens (Zusammensetzung siehe Material und Methoden) ließen sich noch 5 bis 10 nmol 2-Ketoisocaproat (Abb. 2) und 20 nmol Benzoylformiat als Nachweisgrenze sichtbar machen. Als ein 1% Glukose enthaltender Agarnährboden [1] als Träger von 2-Ketoisocaproat verwendet wurde, lag die Detektionsgrenze höher (40 ~ 30 nmol) als auf dem nährstofffreien Agar-Filterpapier. Hier wurden statt der dunklen Flecke nur schwache Schatten gegenüber dem dunklen, bläulich-grauen Hintergrund gefunden.

10 Stämme von unterschiedlichen Mikroorganismen wurden nach einem vorläufigen Screening mit gewaschenen Zellen und Detektion mit DNPH-Reagens ausgewählt und im Hinblick auf eine Oxidation von Natrium-2-hydroxyisocaproat und Natrium-

mandelat mittels der vorliegenden Methode getestet. Abb. 3 zeigt hierzu die besprühten und mit dem UV-Licht beleuchteten Testplatten für 4 Stämme. Die dunklen Flecke auf den Kolonien zeigen positive Reaktionen an. Bei *A. faecalis* und *M. lacticum* (Abb. 3a und 3c) treten zusätzlich dunkle Höfe um die Kolonien auf den Substratplatten auf. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß diese beiden Bakterien 2-Hydroxyisocaproat zu 2-Ketoisocaproat zu oxidieren vermögen. Im Gegensatz hierzu wiesen *A. eutrophus* und *P. fluorescens* im Plattentest keine erkennbare Oxidationsfähigkeit auf. Die deutlichen Oxidationsaktivitäten von *A. faecalis* und *M. lacticum* konnten durch kinetische Messungen mit den Zellsuspensionen bestätigt werden (vgl. Tab. II). *A. eutrophus* und *P. fluorescens* zeigten im Gegensatz zu den Ergebnissen aus dem Plattentest als Zellsuspensionen jedoch Oxidationsaktivität (siehe Tab. II). Für diesen Widerspruch gibt es zweierlei Erklärungsmöglichkeiten. Entweder sind die Aktivitäten dieser Bakterien unter den Bedingungen des Plattentests niedriger als die Detektionsgrenze des

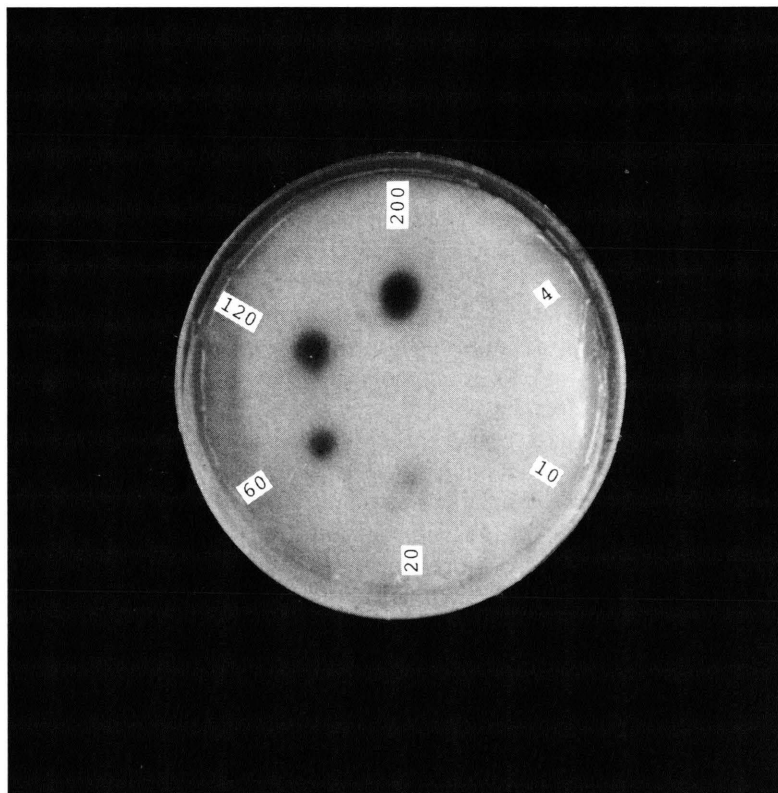


Abb. 2. Nachweis von Natrium-2-ketoisocaproat auf einem mit dünnem Agargel (2,7% Agar in Trispuffer) bedeckten Filterpapier mittels Salicylhydrazid-Reagens. Die Zahlen bezeichnen die aufgetragenen Mengen an 2-Ketoisocaproat in nmol.

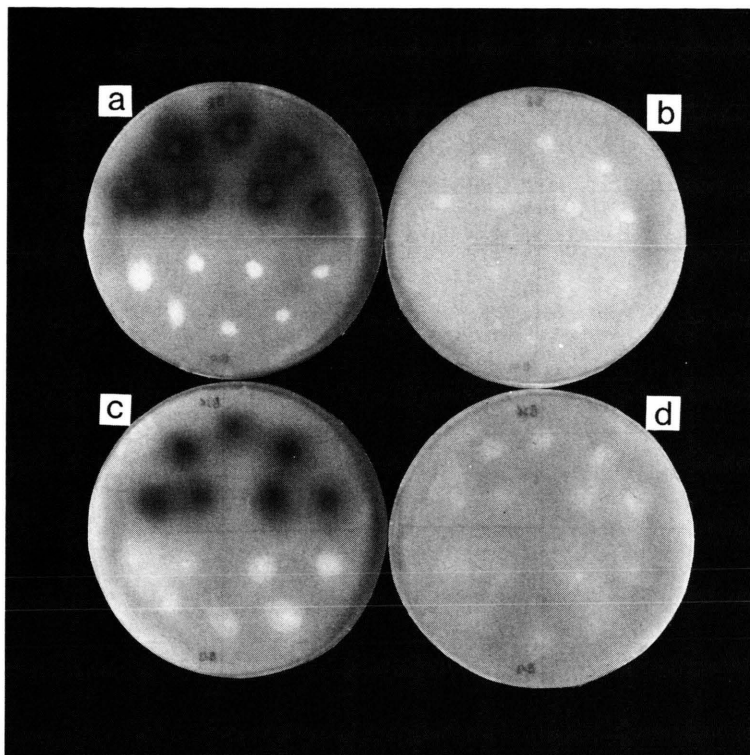


Abb. 3. Test zum Nachweis mikrobieller Oxidation von 2-Hydroxyisocaproat mit *A. faecalis* DSM 30032 (obere Hälfte von a und b), *A. eutrophus* DSM 428 (untere Hälfte von a und b), *M. lacticum* DSM 20427 (obere Hälfte von c und d) und *P. fluorescens* DSM 2005 (untere Hälfte von c und d) durch die Filter-Kultur-Technik und Besprühen mit Salicylhydrazid-Reagens: a und c, Substratplatten; b und d, Kontrollplatten ohne Substrat.

Tests, oder diese Bakterien zeigen in den Plattentests falsche negative Reaktionen. Ergebnisse für andere Mikroorganismen bzw. mit Mandelat als Substrat wurden in Tab. II zusammengefaßt.

Die Korrelation zwischen dem Färbungsgrad im Plattentest und der Oxidationsaktivität der entsprechenden Flüssigprobe mit Zellsuspensionen war nicht so deutlich wie im Esterasetest. Bei der Annahme einer Nachweisgrenze von $10 \mu\text{mol/h} \cdot \text{g}$ -feuchte Zellen wurden hier 10% aller Fälle als falsch negativ beurteilt (siehe Tab. II). Diese schlechtere Korrelation kann darauf zurückgeführt werden, daß die experimentellen Bedingungen der Kultivierung und der Aktivitätsmessung besonders im Hinblick auf die Sauerstoffversorgung deutliche Unterschiede zwischen den beiden Methoden aufweisen. Hervorzuheben ist, daß die besten Stämme in den Flüssigproben (*M. lacticum*, *A. faecalis*, *S. marinorubra* und *S. cerevisiae*) im Plattentest ohne Ausnahme deutlich positive Ergebnisse aufwiesen. Außerdem wurde auch in diesem Test keine falsche positive Reaktion gefunden. Aus Tab. II kann somit abgeleitet werden,

daß eine Oxidationsaktivität $\geq 40 \mu\text{mol/h} \cdot \text{g}$ -feuchte Zellen gut mit Hilfe dieses Plattentests nachgewiesen werden kann.

Über den direkten Nachweis ketonartiger mikrobieller Produkte auf Plattenkulturen liegen bisher wenige Berichte vor. Diese Arbeit gibt ein Beispiel dafür, wie unter Anwendung der Filter-Kultur-Technik ketonartige Produkte und somit Oxidationsaktivität von Kolonien unter Verwendung des Salicylhydrazid-Reagens direkt auf der Plattenkultur nachgewiesen werden kann.

Zusätzlich konnten SH-Verbindungen, z.B. Cystein, auf Agarmedien durch Besprühen mit Ellman's Reagens (1prozentige Lösung von 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) in Citrat-Phosphat-Puffer [12]) nachgewiesen werden. Die Detektionsgrenze war hierbei 10fach niedriger auf nährstofffreien Agar-Filterpapieren ($0,5 \sim 1 \text{ nmol}$ für Cystein) als auf den Agarnährböden [1] ($5 \sim 10 \text{ nmol}$). Dieses Experiment mit Cystein zeigt neben den anderen oben beschriebenen Untersuchungen, daß die Beseitigung von Hintergrund-Verbindungen vor der ei-

Tab. II. Vergleich zwischen der Färbung im Plattentest und der Oxidationsgeschwindigkeit der Zellsuspension.

Stämme	Substrat ^b	Färbung ^c	Oxidations- geschwindigkeit [μmol/h · g]
<i>Alcaligenes faecalis</i> ^{a1}	D	++	28 ± 2
	E	++	76 ± 7
<i>Alcaligenes eutrophus</i> ^{a2}	D	—	5 ± 3
	E	—	4 ± 2
<i>Microbacterium lacticum</i> ^{a3}	D	+++	52 ± 3
	E	—	3 ± 1
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ^{a4}	D	—	9 ± 3
	E	—	7 ± 2
<i>Serratia marinorubra</i> ^{a5}	D	++	45 ± 4
	E	+	24 ± 5
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ^{a6}	D	+++	37 ± 2
	E	—	3 ± 1
<i>Bacillus subtilis</i> ^{a7}	D	—	30 ± 7
	E	—	5 ± 2
<i>Brevibacterium sp.</i> ^{a8}	D	++	21 ± 2
	E	+	26 ± 2
<i>Escherichia coli</i> ^{a9}	D	+	36 ± 2
	E	+	21 ± 1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ^{a10}	D	++	63 ± 13
	E	++	71 ± 17

DSM-Nr.: ^{a1} 30032, ^{a2} 428, ^{a3} 20427, ^{a4} 2005, ^{a5} 30124, ^{a6} 20300, ^{a7} 1970, ^{a8} 20161, ^{a9} 1116, ^{a10} 70449.

^b D = 2-Hydroxyisocaproat, E = Mandelat.

^c Zur Bedeutung der Zeichen siehe Material und Methoden.

gentlichen Analyse wichtig ist, um eine naßchemische Reaktion für die Analytik im Plattentest effektiv verwenden zu können.

Danksagung

Wir danken dem Deutschen Akademischen Austauschdienst für das Forschungsstipendium für Y. Y. Weiterhin danken wir Herrn Dr. W. Hummel für seine hilfreichen Diskussionsbeiträge und Herrn Dipl.-Ing. R. Goldbaum für seine Unterstützung bei den HPLC-Messungen.

- [1] Y. Yamazaki, W. Hummel und M.-R. Kula, Z. Naturforsch. **42c**, 1082–1088 (1987).
- [2] H. Kotani, Y. Kuze, S. Uchida, T. Miyabe, T. Iimori, K. Okano, S. Kobayashi und M. Ohno, Agric. Biol. Chem. **47**, 1363–1365 (1983).
- [3] T. Kitazume, T. Sato, T. Kobayashi und J. T. Lin, J. Org. Chem. **51**, 1003–1006 (1986).
- [4] T. Sawada, M. Ogawa, R. Ninomiya, K. Yokose, M. Fujiu, K. Watanabe, Y. Suhara und H. B. Maruyama, Appl. Environ. Microbiol. **45**, 884–891 (1983).
- [5] M. Rodler, Á. Bélteki und A. Svidró, Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. **20**, 77–81 (1973).
- [6] S. K. Pancholy und J. Q. Lynd, Appl. Microbiol. **22**, 939–941 (1971).
- [7] G. Kouker und K.-E. Jaeger, Appl. Environ. Microbiol. **53**, 211–213 (1987).
- [8] J. A. Alford und E. E. Steinle, J. Appl. Bacteriol. **30**, 488–494 (1967).
- [9] K. G. Krebs, D. Heusser und H. Wimmer, in: Dünnschicht-Chromatographie, 2. Aufl. (E. Stahl, Hrsg.), S. 844, Springer Verlag, Berlin 1967.
- [10] B. Camber, Nature **174**, 1107 (1954).
- [11] D. Stiller, Acta Histochem. Suppl. **19**, 29–48 (1977).
- [12] D. Beales, R. Finch, A. E. M. Mclean, M. Smith und I. D. Wilson, J. Chromatogr. **226**, 498–503 (1981).