

Ein neues Verfahren zum direkten Nachweis mikrobieller Aminoacylaseaktivität auf Agarplatten mit *o*-Phthalaldehyd

A New Detection Procedure for Aminoacylase Activity of Microorganisms Directly on Plate Culture with *o*-Phthalaldehyde

Y. Yamazaki, W. Hummel 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**, 1082–1088 (1987); received April 8, 1987

Amino Acid, Aminoacylase, Detection, Microbial, Phthalaldehyde

Not less than 1 nmol of methionine and phenylalanine were detected as fluorescent spots on agar plates with *o*-phthalaldehyde reagent under UV light. Microorganisms were grown on thin-agar-layer coated filter papers placed on nutrient agar plates, and then transferred onto new plates lacking nutrients by moving the papers. After the background amino compounds were removed by the diffusion to the bottom plates, the paper cultures were moved and incubated on assay plates containing N-acetylmethionine or N-acetylphenylalanine. The amino acids formed around the colonies were visualized by the *o*-phthalaldehyde procedure to indicate aminoacylase activity of microorganisms. The substrate- and stereospecificity of the enzyme was shown for some strains on the agar plates by this procedure.

Einführung

Im Verlauf unserer Untersuchungen über die mikrobiologische Darstellung von Aminosäuren aus ihren N-geschützten Vorstufen war es notwendig geworden, für ein schnelles Screening die freigesetzten Aminogruppen sofort auf der Agarplatte nachzuweisen. Zur Sichtbarmachung von Aminogruppen, besonders in chromatographischen Verfahren, sind viele nützliche Reagenzien entwickelt worden [1], jedoch sind in der Literatur keine Anwendungen dieser Reagenzien direkt auf Agarplatten mit Mikroorganismen-Kolonien zu finden. Ein besonderes Problem beim direkten Nachweis bieten die im Kulturmedium vorhandenen Verbindungen. Wir haben das Problem durch eine neue Technik gelöst, indem wir auf eine Agar-Unterschicht ein steriles Filterpapier legen und dieses Filterpapier dann mit einer dünnen Agar-Deckschicht versehen. Mit Hilfe des Filterpapiers können die Kolonien von der Agar-Unterschicht abgelöst und transportiert werden. Die Nährstoffe können in der Wachstumsphase durch das Filterpapier diffundieren. Durch Auflegen der Filterpapierschicht auf nährstofffreie Platten werden störende Verbindungen aus den Kolonien ausgewaschen; danach kann die Filterpapierschicht zum Nachweis von Enzymaktivitäten (Aminosäure-Acylasen) auf

substrathaltige Agarplatten (N-Acyl-Aminosäure) übertragen werden.

Die enzymatisch freigesetzten Aminosäuren können dann durch Besprühen mit *o*-Phthalaldehyd (OPA)-Reagenz [2] direkt nachgewiesen werden. Mit dieser Methode konnte Aminoacylaseaktivität (EC 3.5.1.14) in Bakterien-, Actinomyceten- und Pilz-Stämmen auf der Platte nachgewiesen werden. Die mit dieser Methode erreichten halbquantitativen Ergebnisse entsprechen weitgehend den mit der herkömmlichen Methode bestimmten Enzymaktivitäten. In dieser Arbeit werden die Einzelheiten des neuen Verfahrens und seine Anwendung bei Untersuchungen der Enzym-Stereospezifität berichtet.

Material und Methoden

Chemikalien und Mikroorganismen

OPA und 2-Mercaptoethanol wurden von Fluka AG (Buchs), N-Acetyl-DL-methionin, N-Acetyl-DL-phenylalanin und *Aspergillus* Aminoacylase von Sigma Chemical Co. (USA), N-Acetyl-L- und -D-phenylalanin von Serva Feinbiochemica (Heidelberg) und Reagenzien für die Kultivierung von Mikroorganismen von E. Merck (Darmstadt) bezogen. Alle weiteren Reagenzien kamen von Fluka oder Merck. Die eingesetzten Mikroorganismen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (Göttingen) bezogen.

Sonderdruckanforderungen an Dr. W. Hummel.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341–0382/87/0900–1082 \$ 01.30/0

Kultivierung auf Agar bedecktem Filterpapier

Medien

Fünf Agarmedien (A–E) mit der folgenden Zusammensetzung wurden hergestellt und 20 min bei 120 °C im Autoklaven sterilisiert: A – 0,2% Hefeextrakt, 0,2% Malzextrakt, 0,2% Fleischextrakt, 0,2% Pepton, 0,5% Glucose, 0,5% Glycerin, 0,2% K_2HPO_4 , 0,03% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,1% NaCl, 0,3 ppm H_3BO_3 , 0,2 ppm $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,75 ppm $ZnCl_2$, 0,2 ppm $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 2,5 ppm $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0,1 ppm $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 0,15 ppm $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ und 1,2% Agar (pH 7,4 für Bakterien, pH 5,6 für Pilze); B – wie A, aber mit 2,7% Agar; C – 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5), 0,2 mM $CoCl_2$ und 0,5% Agar; D – 15 mM N-Acetylaminosäure (nach der Sterilisation als konzentrierte Lösung zufügen), 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5), 0,5 mM $CoCl_2$ und 0,8% Agar; E – Kontrollansatz für D (ohne N-Acetylaminosäure). Das Filterpapier (Schleicher & Schuell, Nr. 300110, 8 cm Ø) wurde wie oben angegeben sterilisiert.

Herstellung der Platten

Es wurden Agarplatten mit Medium C (je 50 ml), D oder E (je 10 ml) in Petrischalen (9 × 1 cm) hergestellt. Die Zweischichtplatten bestanden aus je 20 ml Medium A (Unterschicht) und Medium B, das für die Deckschicht bei etwa 90 °C gehalten wurde. Auf die Oberfläche jeder Platte mit Medium A wurde luftblasenfrei ein steriles Filterpapier gelegt. Nachdem das Papier gut durchfeuchtet war, wurden 5 ml heißes Medium B auf jedes Filter gegossen und überschüssiges Medium B möglichst schnell, aber sorgfältig durch Dekantieren entfernt. Zur vollständigen Erstarrung des Agargels wurden die Petrischalen auf einem horizontalen Tisch liegengelassen. So konnte eine dünne Agar-Deckschicht mit einer Stärke von 0,1–0,2 mm auf jedem Filterpapier reproduzierbar hergestellt werden.

Inkubation

Die Mikroorganismen wurden mit einer Impföse auf die Agar-Deckschicht (Medium B) geimpft und 12–44 Std. bei 30 °C inkubiert. Nach guter Vermehrung wurde das Filterpapier mit der bewachsenen Deckschicht auf Platten mit Medium C überführt. Nach 2 Std. Inkubation bei 30 °C (ohne Deckel) wurde das Filterpapier mit der Deckschicht erneut auf frische Platten mit Medium C überführt und wieder

für 2 Std. inkubiert. Zum Test auf Aminoacylase-Aktivität wurden die Filterpapierkulturen jeweils auf Platten mit Medium D (Substratplatten) und E (Kontrollplatten) übertragen und 4–19 Std. bei 30 °C inkubiert. Bei mycel-bildenden Pilzen wurde abgekühltes, aber noch flüssiges Medium D bzw. E auf die entsprechende Filterpapierkultur aufgegossen, so daß die Kolonie in das Gel eingebettet waren. Nach der Inkubation wurden die Platten mit OPA behandelt.

Sichtbarmachung mit OPA

Die Platten wurden mit einer Lösung von OPA (0,1%, w/v) und 2-Mercaptoethanol (0,1%, v/v) in Aceton besprüht und nach kurzem Trocknen (5 Min. bei Raumtemperatur) mit einprozentiger Lösung von Triethylamin in Aceton nachgesprüht. Die besprühten Platten wurden 30–60 Min. bei Raumtemperatur liegengelassen und dann unter einer UV-Lampe (366 nm, Desaga UVIS) betrachtet.

Bestimmung von Aminoacylaseaktivität in flüssigen Proben

Die Bestimmung erfolgte im wesentlichen nach der von Chibata *et al.* veröffentlichten Methode [3]. Jeder Mikroorganismus wurde in 100-ml Erlenmeyer-Kolben mit 30 ml Nährlösung (Medium A ohne Agar) bei 30 °C und 150 Upm für 13–15 Std. (Bakterien und Hefe) oder 37–39 Std. (Actinomyceten und Pilze) inkubiert. Durch Zentrifugation oder Filtration wurden die Zellen geerntet und mit 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5) gewaschen. 0,05 g bzw. 0,10 g feuchte Zellen wurden in 1,5 bzw. 3 ml Test- oder Kontroll-Lösung suspendiert. Die Testlösung enthielt 67 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5), 0,67 mM $CoCl_2$ und 33 mM N-Acetyl-DL-methionin oder N-Acetyl-DL-phenylalanin, die Kontrolle enthielt keine N-Acetylaminosäure. Die Mischungen wurden 30 Min. bei 37 °C geschüttelt und dann 2,5 Min. in einem siedenden Wasserbad erhitzt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation entfernt und die freigesetzten Aminosäuren im Überstand mit Hilfe eines Aminosäureanalysators (Biotronik, LC 5001) oder der manuellen Ninhydrin-Methode [4] bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion

Als allgemeines Nachweisreagenz für Aminosäuren bei chromatographischen Verfahren kennt man Ninhydrin, Fluorescamin und OPA [1]. Für die An-

wendung auf Agarplatten ist das Ninhydrin-Reagenz nicht geeignet, da die Probe für die Farbentwicklung erhitzt werden muß. Zum Nachweis von Aminosäuren und Agarplatten versuchten wir daher, Fluorescamin [5] und OPA [2] anzuwenden. Als Testsubstanz wurde Methionin eingesetzt, üblicherweise in einer Konzentrationsreihe von 0,06–200 nmol. Fluorescamin erwies sich als zu wenig empfindlich, selbst 300 nmol Methionin wurden nicht deutlich nachgewiesen; OPA dagegen ergab stark fluoreszierende Flecken in einem Bereich von 0,6–200 nmol Methionin (Abb. 1a). Die Reaktion erfolgt gemäß folgender Gleichung, wobei das Kondensationsprodukt der Fluorophor ist.

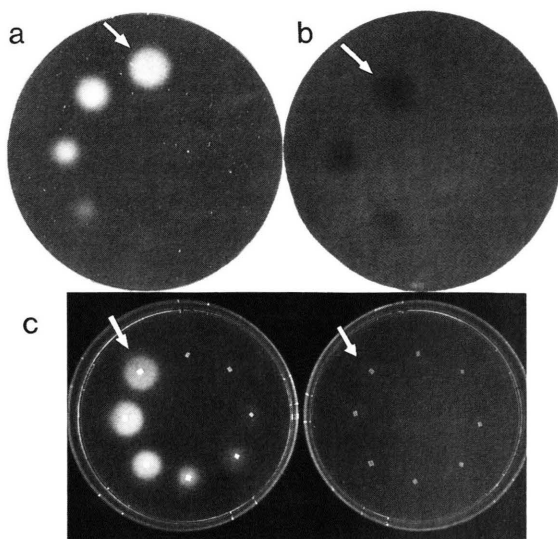
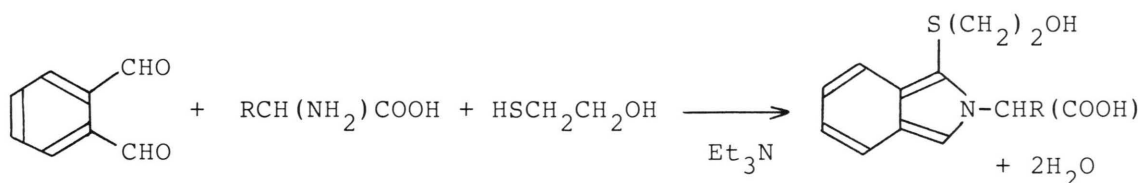


Abb. 1. Sichtbarmachung von Methionin (a), Cystein (b) und Aminoacylaseaktivität (c) auf Agarplatten mit OPA. (a) 2 µl wäßrige Lösung von 100, 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1 oder 0,03 mM Methionin wurde auf eine Agarplatte (0,8% Agar in 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5) aufgetragen. Sprüh- und Beobachtungsvorgang siehe Text. (b) Der gleiche Test mit Cystein (100, 30, 10, 3, 1, oder 0,3 mM), aber auf einer 0,015% Glycin enthaltenden Agarplatte. (c) Kleine Filterpapierstücke (1 × 1 mm) wurden mit je 2 µl einer Lösung von Aminoacylase (1, 0,7, 0,3, 0,1, 0,07, 0,03, 0,01 oder 0 U/ml) getränkt und auf zwei Agarplatten (0,8%) gelegt. Eine Platte enthielt 0,5 mM CoCl₂ + 15 mM N-Acetyl-DL-methionin in Phosphatpuffer, die andere nur 0,5 mM CoCl₂. Vor dem OPA-Besprühen wurden die Platten 2 Std. bei 30 °C inkubiert. In allen Fällen wurde die Probelösung mit dem gleichen Abstand und in abnehmender Konzentration links herum aufgetragen. Der Pfeil zeigt jeweils den Ausgangspunkt.

rescamin erwies sich als zu wenig empfindlich, selbst 300 nmol Methionin wurden nicht deutlich nachgewiesen; OPA dagegen ergab stark fluoreszierende Flecken in einem Bereich von 0,6–200 nmol Methionin (Abb. 1a). Die Reaktion erfolgt gemäß folgender Gleichung, wobei das Kondensationsprodukt der Fluorophor ist.

Anschließend wurden die Sprühbedingungen (d.h. Lösungsmittel, Konzentration von OPA, 2-Mercaptoethanol und Triethylamin, andere Basen statt Triethylamin, Reaktionsdauer und -temperatur) für einen Nachweis auf der Agarplatte systematisch untersucht. Es zeigte sich, daß die Standardmethode von Lindberg [2], die zum Nachweis auf Kieselgelplatten entwickelt wurde, auch für Agarplatten gut geeignet ist, lediglich die Farbentwicklung benötigte eine längere Zeit. Das Maximum der Fluoreszenzintensität ist nach ca. 1 h erreicht, während auf Kieselgelplatten 10 Min. ausreichend sind. Das von Roth *et al.* [6] beschriebene wäßrige Reagenz kann ebenfalls verwendet werden, die Flecke sind aber oft vergrößert und weniger scharf umgrenzt. Mit der Standardmethode wurden auch Phenylalanin, Tyrosin, Valin, Lysin, Arginin, Histidin und Glutaminsäure bis zu 1 nmol nachgewiesen.

Prolin konnte in ähnlicher Weise mit OPA sichtbar gemacht werden, wenn die Platten mit 0,12prozentiger wäßriger Natriumhypochloritlösung [7] besprüht und dann 3 Min. bei 50 °C erwärmt wurden. Die Nachweisgrenze liegt hier bei 5 nmol. Cystin und Cystein ergaben keine fluoreszierenden Flecken, da die schwefelhaltigen Gruppen Fluoreszenzlöschung bewirken. Ein Nachweis dieser Verbindungen mit OPA ist allerdings möglich, indem man den Agarplatten Glycin zufügt. Cystein kann dann durch die Fluoreszenzlöschung als dunkler Fleck sichtbar gemacht werden (6–200 nmol, Abb. 1b). Die Färbung mit OPA auf der Agarplatte kann auch als halbquantitativer Aktivitätstest für Aminoacylase verwendet werden (Abb. 1c). Das Foto zeigt, daß

mit steigender Enzymaktivität die Leuchtstärke und der Durchmesser der Flecken zunehmen. Eine solche halbquantitative Beurteilung ist z.B. beim Screening auf Acylase-aktive Mikroorganismen sehr wertvoll.

Wenn die Gesamtmenge der Hintergrund-Aminoverbindungen nicht groß war, z.B. wenn das Agarmedium nur weniger als 0,01% Hefeextrakt enthielt, störte der mit OPA nachweisbare Hintergrund nicht den Nachweis von 10 nmol Methionin. Gewöhnliche Kulturmedien enthalten jedoch sehr viel mehr Aminoverbindungen, die aus Hefe-, Malz- und Fleischextrakt sowie Pepton stammen; die Konzentrationen dieser Nährstoffe überschreiten oft 0,1%. Der Nachweis zusätzlich gebildeter Aminoverbindungen ist in diesem Fall nur möglich, wenn die Hintergrund-Aminoverbindungen wirksam entfernt werden können. Wir haben eine Technik entwickelt (s. Material und Methoden), Mikroorganismen auf einer Agar-Deckschicht über einem Filterpapier zu kultivieren. Durch Ablösen des Filterpapiers von der Unterschicht kann diese Deckschicht transportiert werden, zuerst auf Platten mit Medium C zum Entfernen der Hintergrund-Aminoverbindungen („Waschen“), dann zum Test der Acylaseaktivität auf Platten mit Medium D (Substratplatten) und E (Kontrolle). Eine einmalige Wiederholung des Waschvorganges reicht völlig aus, wenn der Agarnährboden 0,2% Hefe-, Malz- und Fleischextrakt sowie 0,2% Pepton enthält. Das Filterpapier dient hier als Stütze für die dünne Agarschicht. Mikroorganismen können sich auch ohne Agar-Deckschicht unmittelbar auf der Oberfläche des Filterpapiers auf dem Nähragar vermehren, jedoch ist das Wachstum auf der Agarschicht häufig besser als auf dem Filterpapier allein. Überdies ist die Oberfläche der Agarschicht glatter, so daß man die Kolonien leichter betrachten kann als bei einer Kultivierung auf Filterpapier. Mit der Filterpapiertechnik können auch Kopien einer Mutterplatte hergestellt werden.

Zur Prüfung der Methode wurden 3 Filterplatten mit jeweils 3 Mikroorganismen beimpft. Nach dem Wachstum wurden die 3 Deckschichten auf drei verschiedene Agarplatten übertragen: Die erste Platte enthielt N-Acetyl-DL-phenylalanin, die zweite N-Acetyl-DL-methionin und die dritte war eine Kontrolle. Nach 4 Std. Inkubation wurden alle Platten mit OPA besprüht (Abb. 2a–i). Alle Kolonien zeigten sich als blau fluoreszierende Flecke, da die Proteine der Zelloberfläche mit OPA angefärbt waren. Zu-

sätzlich erschienen hell fluoreszierende Höfe um die Kolonien von *A. eutrophus* auf beiden Substratplatten (Abb. 2d, e) und um die von *A. faecalis* auf der

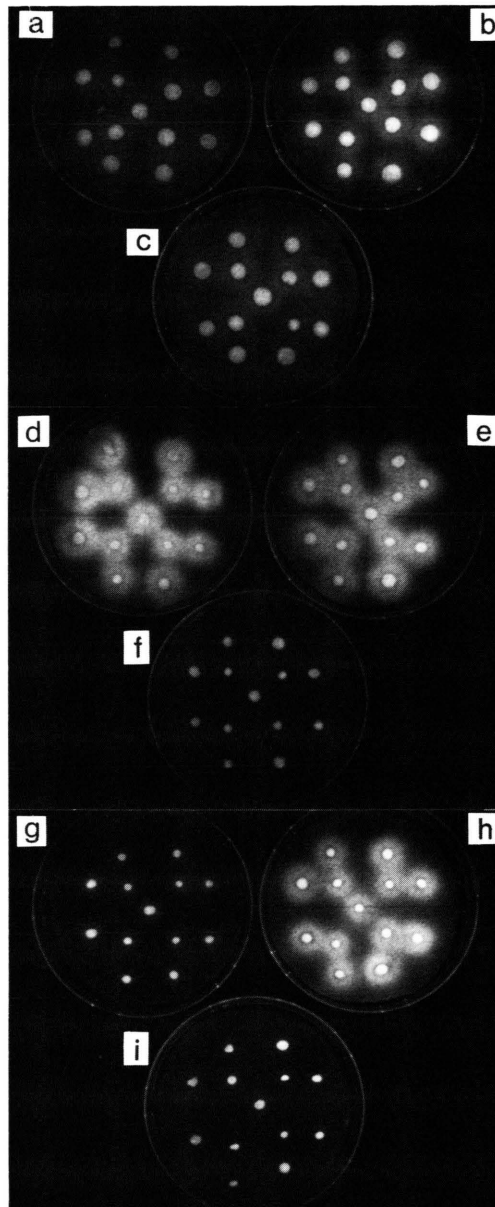


Abb. 2. Nachweis der mikrobiellen Aminoacylaseaktivität direkt auf Agarplatten.

Stämme: *S. cerevisiae* (a–c), *A. eutrophus* (d–f) und *A. faecalis* (g–i).

Substrate: 15 mM N-Acetyl-DL-methionin (a, d, g), 15 mM N-Acetyl-DL-phenylalanin (b, e, h) oder Kontrolle ohne Substrat (c, f, i).

Wachstumszeit: 17 Std.

Dauer der Enzymreaktion: 4 Std., Vorgang siehe Text.

Acetylphenylalanin-Platte (Abb. 2h). Schwach fluoreszierende Höfe zeigten die Kolonien von *S. cerevisiae* auf der Acetylphenylalanin-Platte (Abb. 2b) und die von *A. faecalis* auf der Acetylmethionin-Platte (Abb. 2g). Kein fluoreszierender Hof wurde um die Kolonien auf den Kontrollplatten beobachtet (Abb. 2c, f, i). Die Hefe (*S. cerevisiae*) zeigt also eine Aminoacylaseaktivität gegen N-Acetylphenylalanin; die beiden *Alcaligenes* Stämme besitzen hohe Enzymaktivität, wobei aber die Substratspezifität der beiden *Alcaligenes*-Acylasen verschieden ist. Für das Enzym aus *A. eutrophus* sind N-Acetylphenylal-

anin und N-Acetylmethionin vergleichbar gute Substrate, während das Enzym aus *A. faecalis* von den beiden angebotenen Substraten nur das Phenylalanin-Derivat umsetzt. Dieser auf Agarplatten erhaltene Befund stimmt gut überein mit Werten, wie sie mit der herkömmlichen quantitativen Methode ermittelt wurden (Tab. I).

Für eine Reihe von Mikroorganismen wurde die halbquantitative Aktivitätsbestimmung auf der Agarplatte mit der herkömmlichen Acylasemessung verglichen. Aufgrund von Literaturdaten wurden Acylase-aktive Stämme ausgewählt: *Alcaligenes sp.*

Tab. I. Vergleich der Aminoacylaseaktivität mit der Filterplatten-OPA-Methode und mit der konventionellen Flüssigprobe-Ninhydrin-Methode.

Stämme	DSM Nr.	Fluoreszenzintensität mit der Filterplatten-Methode ^a		Aktivität mit der konventionellen Methode (U/g feuchte Zellen ^b)	
		Substrat N-Ac-DL-Met ^c	N-Ac-DL-Phe ^d	Substrat N-Ac-DL-Met	N-Ac-DL-Phe
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	428	+++	++	4,43 ± 0,43	4,87 ± 0,79
<i>Alcaligenes faecalis</i>	30032	±	++	0,15 ± 0,02	1,88 ± 0,21
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	70449	±	+	0,07 ± 0,01	0,12 ± 0,01
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	84	+	– (+)	0,53 ± 0,16	0,08 ± 0,02
<i>Pseudomonas putida</i>	291	±	– (–)	0,29 ± 0,09	0,10 ± 0,03
<i>Escherichia coli</i>	1116	++	– (–)	0,14 ± 0,03	0,02 ± 0,01
<i>Bacillus subtilis</i>	1970	++	+	3,48 ± 0,37	0,51 ± 0,07
<i>Alcaligenes paradoxus</i>	30162	+++	+++	2,93 ± 0,17	3,21 ± 0,34
<i>Streptomyces sparsogenes</i>	40356	+++	++	0,64 ± 0,20	0,53 ± 0,09
<i>Streptomyces polychromogenes</i>	40316	–	– (–)	1,04 ± 0,35	0,16 ± 0,07
<i>Streptomyces albus</i>	40492	+	±	2,01 ± 0,35	0,51 ± 0,06
<i>Streptomyces griseobrunneus</i>	40066	– (–)	– (–)	1,46 ± 0,13	0,37 ± 0,06
<i>Streptomyces lavendulae</i>	2014	++	+	1,07 ± 0,53	0,29 ± 0,18
<i>Streptomyces sp.</i>	40529	+++	– (–)	3,07 ± 1,76	0,38 ± 0,18
<i>Streptoverticillium parvisporogenes</i>	40473	+++	+	0,82 ± 0,12	0,34 ± 0,07
<i>Chainia rosea</i>	40303	++	+	0,50 ± 0,24	0,23 ± 0,10
<i>Aspergillus ochraceus</i>	824	+++	+++	1,93 ± 0,50	1,53 ± 0,51
<i>Beuveria bassiana</i>	875	– (–)	– (–)	1,22 ± 0,12	0,20 ± 0,06
<i>Byssosclamyces fulva</i>	1808	– (±)	– (±)	0,17 ± 0,02	0,12 ± 0,02
<i>Penicillium chrysogenum</i>	1075	– (–)	– (+)	0,16 ± 0,04	0,26 ± 0,08
<i>Penicillium funiculosum</i>	1960	– (+)	– (+)	0,17 ± 0,10	0,17 ± 0,06

^a Die Testkulturen von Bakterien, Actinomyceten und Hefe (12–13 Kolonien pro Platte) wurden auf die Oberfläche der Testplatten übertragen, während die von Pilzen (5–9 Kolonien pro Platte) in Agargel eingeschlossen wurden. Inkubationszeit: 12–17 Std. für Bakterien und Hefe, 19–44 Std. für Actinomyceten und 37–44 Std. für Pilze.

Für die halbquantitative Abschätzung der Fluoreszenzintensität der Höfe dienten Flecken eines Methionin-Standard:

- +++ heller als 200-nmol-Fleck;
- ++ vergleichbar mit 60- bzw. 20-nmol-Fleck;
- + vergleichbar mit 6- bzw. 2-nmol-Fleck;
- ± ein wenig heller als auf der Kontrollplatte;
- kein Unterschied zur Kontrollplatte.

Die Werte in Parenthese bedeuten, daß die Dauer der Enzymreaktion 17–19 Std. betrug.

^b Mittelwert ± Standardabweichung ($n=4-6$). Die Züchtung wurde für jeden Mikroorganismus zumindest dreimal wiederholt.

^c N-Acetyl-DL-methionin.

^d N-Acetyl-DL-phenylalanin.

[8], *S. sparsogenes* und *C. rosea* [9], *S. lavendulae* [10], *S. parvisporogenes* [11] und *A. ochraceus* [12] (Tab. I).

Tab. I zeigt die Korrelation der Ergebnisse beider Methoden: Ein Mikroorganismus mit hoher Aminoacylaseaktivität ergibt auch höhere Fluoreszenzintensität um die Kolonie auf der OPA-behandelten Agarplatte. Zwar bestehen einige Abweichungen (z. B. falsch negative Fluoreszenzfärbung für *S. polychromogenes*, *S. griseobrunneus* und *B. bassiana* gegen beide Substrate und für *Streptomyces sp.* DSM 40529 gegen N-Acetylphenylalanin sowie eine übermäßig starke Fluoreszenzfärbung für *E. coli* und die schwache Färbung für *B. subtilis* gegen N-Acetyl-methionin), aber es zeigt sich, daß mit der vorliegenden Methode die Aminoacylaseaktivität von Mikroorganismen zuverlässig nachgewiesen werden kann, wenn die Aktivität über 0,3 U/g Zellen (Feuchtgewicht) liegt.

Um die Kolonien von *S. polychromogenes* und *S. griseobrunneus* wurde die Ausscheidung gelber Farbstoffe beobachtet. Die falsch negative Reaktion dieser Actinomyceten könnte durch Fluoreszenzlöschung dieser Farbstoffe verursacht worden sein. Die intensive Fluoreszenz von *E. coli* könnte auf die unterschiedliche Dauer der Enzymreaktion bei den Methoden zurückzuführen sein (4 Std. im Plattentest, 30 Min. im Suspensionstest). Die lange Inkubationszeit könnte eine Induktion der Acylase oder auch eine teilweise Autolyse der *E. coli*-Zellen mit Freisetzung größerer Enzymmengen bewirken. Berücksichtigt man die unterschiedlichen Bedingungen der Kultivierung und der Enzymaktivitätsmessung bei beiden Methoden, so ist die erzielte Übereinstimmung sehr gut: Von 42 herkömmlich getesteten Acylaseaktivitäten konnten 35 im halbquantitativen Plattentest bestätigt werden. Von den 26 positiven Stämmen konnten 22 auch im Plattentest gefunden werden; problematisch sind hier nur die Farbstoff-ausscheidenden Streptomyceten.

Schließlich wurde mit der vorliegenden Methode die Stereospezifität der mikrobiellen Aminoacylase untersucht. 9 Stämme (*B. subtilis*, *A. eutrophus*, *A. faecalis*, *A. paradoxus*, *S. sparsogenes*, *S. lavendulae*, *S. parvisporogenes*, *C. rosea* und *A. ochraceus*) wurden auf Filterplatten angezogen und auf Testplatten mit D-, L- oder DL-N-Acetylphenylalanin überführt, die Kontrollplatte enthielt kein Aminosäure-Derivat. Alle Stämme außer *C. rosea* zeigten deutlich positive Fluoreszenzfärbung nur auf den L-

und DL-Substrat-Platten. Dieses Ergebnis stimmt überein mit der L-Stereospezifität der normalen Aminoacylase [3, 8, 11]. In Abb. 3 sind die L- und D-Substrat- und die Kontrollplatten für *A. ochraceus* und zwei Actinomyceten dargestellt. *C. rosea* war auf allen drei Substratplatten positiv (Abb. 3). Dies deutet darauf hin, daß der Stamm D-Aminoacylase enthält. Dieser Stamm (DSM 40303) ist synonym mit *Streptomyces roseiscleroticus* IFO 13363 [13], für den Sugie und Suzuki [9] ein Auftreten von D-Aminoacylase berichten. Auch mit der konventionellen Methode ist in *C. rosea* die Anwesenheit von D-Aminoacylase ($0,53 \pm 0,05$ U/g feuchte Zellen) gleichzeitig mit der von L-Aminoacylase ($0,27 \pm 0,04$ U/g feuchte Zellen) bestätigt.

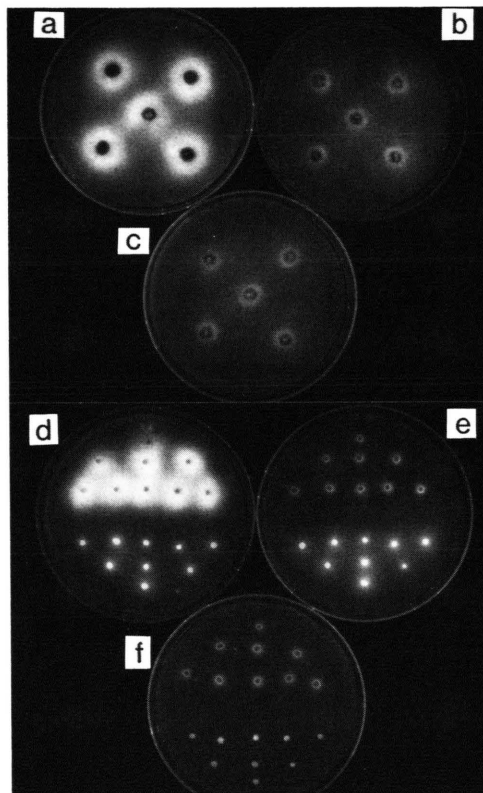


Abb. 3. Untersuchung der Stereospezifität mikrobieller Aminoacylase auf Agarplatten.

Stämme: *A. ochraceus* (a–c), *S. parvisporogenes* (obere Hälfte von d–f) und *C. rosea* (untere von d–f).

Substrate: 15 mM N-Acetyl-L-phenylalanin (a, d), 15 mM N-Acetyl-D-phenylalanin (b, e) oder Kontrolle ohne Substrat (c, f).

Wachstumszeit: 41,5 Std. (a–c) oder 18,5 Std. (d–f).

Dauer der Enzymreaktion: 4,5 Std. (a–c) oder 5,5 Std. (d–f).

Diese Beispiele machen deutlich, daß man die entwickelte Methode nicht nur zum Nachweis mikrobieller Aminoacylasen, sondern auch zur Untersuchung ihrer Substrat- und Stereospezifität verwenden kann.

Außer der herkömmlichen Ninhydrin- [3] und OPA-Methode [14] sind drei neuere kolorimetrische sowie fluorimetrische Methoden zur Bestimmung oder zum Nachweis von Aminoacylase veröffentlicht worden. Für die Methode von Szewczuk und Wellman-Bednawska [15] und die von Wolfbeis und Koller [16] werden spezielle chromogene und fluorogene Verbindungen als Enzymsubstrat benötigt. Die Methode von Qavi und Kit [17] wurde zur aktiven Färbung des Enzyms in Elektropherogrammen eingesetzt; der Nachweis geschieht mit Hilfe von Aminosäure-Oxidase, so daß die Substratspezifität der Oxidase die Anwendung dieser Methode begrenzt. Will man die eigentlich umzusetzende Verbindung auch als Testsubstrat einsetzen, so sind die oben zitierten

Methoden zum Nachweis des gewünschten Enzyms unbrauchbar. Mit OPA können dagegen nicht nur natürliche Aminosäuren, sondern auch andere primäre Amine und die an der Umsetzung beteiligten Enzyme nachgewiesen werden. Die vorliegende Filterplatten-Technik ist sehr einfach und preiswert und besitzt den wesentlichen Vorteil, daß viele Kolonien gleichzeitig und schnell auf verschiedene enzymatische Reaktionen untersucht werden können. Die Kombination dieser Technik mit der OPA-Methode öffnet der Forschung über Aminoacylase und andere ähnliche Enzyme auf dem Gebiet von Mikrobiologie und Biotechnologie neue Möglichkeiten.

Dank

Wir danken dem Deutschen Akademischen Austauschdienst für das Forschungsstipendium für Y. Y. Dankbar sind wir Frau S. Löslein für ihre hervorragende technische Hilfe mit dem Aminosäurenanalysator.

- [1] G. A. Rosenthal, Colorimetric and Fluorimetric Detection of Amino Acids, 573–590, in: G. C. Barrett, Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids, Chapman and Hall, London 1985.
- [2] E. G. G. Lindberg, J. Chromatogr. **117**, 439–441 (1976).
- [3] I. Chibata, T. Tosa, T. Sato und T. Mori, Production of L-Amino Acids by Aminoacylase Adsorbed on DEAE-Sephadex, in: K. Mosbach, Methods in Enzymology, Vol. XLIV, Academic Press, New York 1976.
- [4] H. Rosen, Arch. Biochem. Biophys. **67**, 10–15 (1957).
- [5] J. Vandekerckhove und M. Van Montagu, Eur. J. Biochem. **44**, 279–288 (1974).
- [6] M. Roth und A. Hampai, J. Chromatogr. **83**, 353–356 (1973).
- [7] P. Böhlen und M. Mellet, Anal. Biochem. **94**, 313–321 (1979).
- [8] M. Kikuchi, I. Koshiyama und D. Fukushima, Japan Kokai Tokyo Koho **8007**, **015** (1980); Chem. Abstract **92**, 179083d (1980).
- [9] M. Sugie und H. Suzuki, Agric. Biol. Chem. **44**, 1089–1095 (1980).
- [10] M. G. Oreshina, G. A. Penzikova, M. M. Levitov und Y. E. Bartoshevich, Antibiotiki (Moskow) **27**, 728–732 (1982).
- [11] Y. Yamazaki, H. Suzuki, A. Kamibayashi, N. Watanabe und N. Takahashi, Agric. Biol. Chem. **43**, 1945–1950 (1979).
- [12] K. Hirano, I. Karube, T. Matsunaga und S. Suzuki, J. Ferment. Technol. **55**, 401–404 (1977).
- [13] DSM Catalogue of Strains, BACTERIA **38**, GBF, Braunschweig 1983.
- [14] I. Gilles, H.-G. Löffler und F. Schneider, Z. Naturforsch. **39c**, 1017–1020 (1984).
- [15] A. Szewczuk und M. Wellman-Bednawska, Clin. Chim. Acta **84**, 27–31 (1978).
- [16] O. S. Wolfbeis und E. Koller, Anal. Biochem. **129**, 365–370 (1983).
- [17] H. Qavi und S. Kit, Biochem. Genet. **18**, 669–679 (1980).