



Doctoral Thesis

## The NTA-monoxygenase from *Pseudomonas* sp. ATCC 29600

**Author(s):**

Schneider, René Peter

**Publication Date:**

1989

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000507921> →

**Rights / License:**

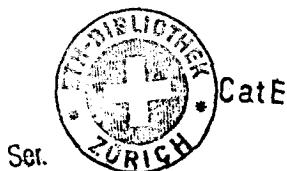
[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 8824

# THE NTA-MONOOXYGENASE FROM *PSEUDOMONAS* sp. ATCC 29600

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH  
for the degree of  
Doctor of Natural Sciences



presented by  
**RENÉ PETER SCHNEIDER**  
dipl. Natw. ETH  
Born on 20 May 1960 in São Paulo, Brazil

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. G. Hamer, examiner  
Prof. Dr. W. Harder, co-examiner

ADAG Administration & Druck AG  
Zurich 1989

## 6.0 SUMMARY

Nitilotriacetate (NTA) is widely used as a detergent builder in place of polyphosphates and has been shown to be biodegradable. It is postulated that in aerobic bacteria the first biochemical transformation is catalysed by a NTA-Monooxygenase (NTA-Mo). In this work, NTA-Monooxygenase from *Pseudomonas* sp. ATCC 29600 was studied. Methods for the analysis in cell-free extract of the substrate, NTA, and of one product, iminodiacetate (IDA), were developed. Whereas NTA was analysed for using ion exclusion chromatography, IDA was determined by ion chromatography. In both cases, detection was achieved by measuring eluant conductivity after chemical suppression with a membrane suppressor.

Oxygen, NADH and either  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  or  $Mn^{2+}$  were needed for NTA-cleavage and the products formed were glyoxylate, IDA,  $NAD^+$  and  $H_2O$ . Assays for NTA-Mo activity can be based on determination of either the substrates,  $O_2$ , NADH or NTA or of products, glyoxylate or IDA. However, care must be taken when determination of either  $O_2$  or NADH consumption is used to measure NTA-Mo activity, because NTA-dependent NADH oxidation occurred in the absence of NTA-cleavage. This indicated that NTA could act as an effector for NTA-Mo, with  $H_2O_2$  produced in the uncoupled oxidation of NADH. The possible chemical reaction of glyoxylate and  $H_2O_2$ , where formate was formed, precluded the use of assays based on the determination of these compounds. Therefore, an assay based on the determination of NTA was developed. Similar activity patterns resulted for NTA-cleavage with all three divalent metal ions. The temperature and pH optima were  $25^\circ C$  and 7.5, respectively. Addition of either FMN or FAD resulted in stimulation of NTA-cleavage activity. Assays conducted with either  $Mg^{2+}$  or  $Co^{2+}$  were linear with respect to time, whereas nonlinearity was observed with  $Mn^{2+}$ . There was considerable evidence that this nonlinearity was caused by destruction of NTA-cleavage capability due to significant  $H_2O_2$  production. Results suggested that the metal-NTA complex is the substrate of NTA-Mo and that  $Mg^{2+}$ -NTA was a better substrate than were NTA complexes of either  $Co^{2+}$  or  $Mn^{2+}$ . IDA was not a substrate for NTA-Mo, thus indicating that a second, hitherto unidentified enzyme must be involved in NTA-degradation by aerobic bacteria.

Partial purification of NTA-Mo provided evidence that it comprized at least three protein subunits (ABC). On gel filtration, a fraction containing NTA-cleavage activity (subunits ABC, apparent MW 54000) eluted separately from a fraction displaying only spectrophotometric activity (BC, apparent MW 42000). B (apparent MW 20000), which showed a flavin-like spectrum, could be separated from BC by ion chromatography. Different spectrophotometric properties were found for B and BC.

## 7.0 ZUSAMMENFASSUNG

Der Einsatz des biologisch abbaubaren Phosphatersatzstoffes Nitrilotriacetat (NTA) in Waschmitteln ist weit verbreitet. Es wird angenommen, dass in Mikroorganismen der erste biochemische Abbauschritt durch das Enzym NTA-Monooxygenase (NTA-Mo) katalysiert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde die NTA-Mo von *Pseudomonas* sp. ATCC 29600 untersucht. Dafür wurden analytische Methoden zur Bestimmung von NTA und dessen Abbauprodukt Iminodiacetat (IDA) in Zellextrakten entwickelt. NTA wurde mittels Ionenausschlusschromatografie und IDA mit Ionenchromatografie gemessen. In beiden Fällen wurde ein Leitfähigkeitsdetektor verwendet und die Eluentenleitfähigkeit chemisch durch Einsatz eines Suppressors unterdrückt.

O<sub>2</sub>, NADH und ein divalentes Metallion (Mg<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> oder Mn<sup>2+</sup>) waren für den Umsatz von NTA notwendig, wobei die Produkte IDA, Glyoxylat, NAD<sup>+</sup> und H<sub>2</sub>O entstanden. Assays für die Bestimmung der Aktivität von NTA-Mo müssen auf Messung der Verbrauchsraten von Substraten oder der Bildungsraten von Produkten beruhen. Es zeigte sich, dass die normalerweise in Monooxygenasenassays gemessenen O<sub>2</sub> und/oder NADH Verbrauchsraten nur bedingt zur Bestimmung der NTA-Mo Aktivität verwendet werden können, da unter bestimmten Bedingungen der NTA-Umsatz von der NADH Oxidation entkoppelt werden kann. Dabei entsteht H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, was auf eine mögliche Effektorfunktion von NTA in diesem Fall hinweist. Auch die Messung der beiden Reaktionsprodukte Glyoxylat und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kann nicht zur Bestimmung der NTA-Mo Aktivität verwendet werden, da die beiden Verbindungen chemisch miteinander reagieren können, wobei Formiat gebildet wird. Deswegen wurde eine Methode entwickelt, welche auf der Messung der NTA-Umsatzrate beruht. Ähnliches Umsatzverhalten wurde für alle drei Metallionen gefunden und die Temperatur- (25°C) bzw. pH-Optima (7.5) wurden bestimmt. Der NTA-Umsatz wurde durch FMN oder FAD stimuliert. Die Reaktionsraten waren bei Verwendung von Mg<sup>2+</sup> oder Co<sup>2+</sup> linear. Hinweise deuten darauf hin, dass die nichtlinearen Umsatzraten mit Mn<sup>2+</sup> durch eine Schädigung der NTA-Mo infolge starker H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produktion verursacht wurden. Die Resultate weisen darauf hin, dass ein Metall-NTA Komplex eigentliches Substrat der NTA-Mo ist, wobei der Mg<sup>2+</sup> Komplex als bestes Substrat erscheint. IDA wurde von der NTA-Mo nicht umgesetzt, was auf die Existenz eines weiteren, bis anhin unbekanntes Enzyms im Stoffwechselweg von NTA in aeroben Bakterien hinweist.

Hinweise, dass NTA-Mo aus drei Proteinuntereinheiten (ABC, scheinbares MG 54000) besteht, wurden bei der partiellen Reinigung des Enzyms erhalten. In der Gelfiltration waren die Maxima für NTA-Umsatz (ABC, scheinbares MG 54000) und NTA-abhängiger NADH-oxidation (BC, scheinbares MG 42000) in verschiedenen Fraktionen. Die Untereinheit B (scheinbares MG 20000), die ein flavinähnliches Spektrum aufwies, wurde nach Ionenchromatografie erhalten. Die beiden Untereinheiten B und BC unterschieden sich in ihren spektrophotometrischen Aktivitäten voneinander.

## 8.0 RESUMO

O ácido nitrilotriacético (NTA) é utilizado em detergentes como substituto biodegradável para polifosfatos. A primeira reação bioquímica na cadeia metabólica da degradação do NTA em bactérias aeróbicas é mediada por uma monooxigenase, a NTA-Mo. Neste trabalho foi estudada a NTA-Mo obtida de *Pseudomonas* sp. ATCC 29600. Foram desenvolvidos métodos para medir a concentração do substrato NTA e do produto ácido iminodiacético (IDA) em extratos celulares. O NTA foi analisado por cromatografia de exclusão de íons e cromatografia de ânions foi aplicada na determinação do IDA. Em ambos os casos, a condutividade do eluente foi reduzida em um supressor e um condutômetro foi utilizado na detecção das substâncias.

A transformação do NTA pela NTA-Mo necessitava de NADH,  $O_2$  e de um dos cátions  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ . Os produtos da reação foram IDA, glioxilato,  $NAD^+$  e  $H_2O$ . A atividade da NTA-Mo pode ser medida pela determinação da taxa de consumo de um dos substratos ou da taxa de formação de um dos produtos. Taxas de consumo de  $O_2$  ou NADH devem ser interpretadas com extrema cautela, devido à possibilidade de estímulo da oxidação do NADH pelo NTA sem que ocorra produção do IDA. Isto indica que o NTA, à parte de servir como substrato para a enzima, também poderia agir como efetor, o que resultaria na formação de  $H_2O_2$  devido à total absorção dos elétrons provenientes do NADH por oxigênio. A atividade da NTA-Mo também não pode ser determinada pela taxa de produção de  $H_2O_2$  e/ou glioxilato porque estas substâncias podem reagir quimicamente entre si, o que resulta na formação de ácido fórmico. Diante disso, elaborou-se um ensaio para determinar a atividade da NTA-Mo baseado na medição do consumo de NTA durante a reação. Resultados similares foram obtidos com os três cátions divalentes, sendo que a atividade máxima ocorreu à temperatura de  $25^\circ C$  e pH 7.5. Tanto FMN quanto FAD estimularam a taxa de consumo do NTA pela enzima. Ensaio conduzido na presença de  $Mg^{2+}$  ou  $Co^{2+}$  foram lineares em função do tempo. A inibição progressiva da taxa de consumo do NTA observada em ensaios com  $Mn^{2+}$  foi provavelmente devida à destruição da capacidade de transformação do NTA da enzima pelo  $H_2O_2$  ou um derivado deste. Os resultados sugerem que o substrato real da enzima é o complexo do NTA com o cátion, sendo que o complexo  $Mg^{2+}$ -NTA parece ser o substrato preferido. A NTA-Mo não reage com o produto IDA. Isto significa que uma enzima ainda desconhecida é responsável pela biodegradação do IDA.

Evidência de que a NTA-Mo é composta por três subunidades protéicas foi obtida após purificação parcial da enzima. Em filtração por gel, a fração que continha atividade máxima de transformação do NTA (ABC, peso molecular (PM) aparente 54000) eluiu antes da fração que continha o máximo da atividade espectrofotométrica (BC, PM aparente 42000). A subunidade B (PM aparente 20000), que exibiu um espectro típico de uma flavoproteína, pôde ser separada do complexo BC por cromatografia em DEAE. As subunidades B e BC distinguiam-se pelas propriedades da atividade espectrofotométrica.