



Doctoral Thesis

Biochemistry of nitrilotriacetate degradation in the facultatively denitrifying bacterium TE11

Author(s):

Kemmler, Judith

Publication Date:

1992

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000694090> →

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](#).

5. März 1993

Thesis ETH No. 9983

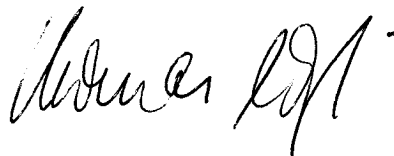
**Biochemistry of Nitrilotriacetate Degradation in
the Facultatively Denitrifying Bacterium TE11**

A Dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Judith Kemmler
Dipl. Zool. Universität Zürich
born on April 1, 1961
citizen of Zürich

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. G. Hamer, examiner
Prof. Dr. J. Bailey, co-examiner
PD Dr. T. Egli, co-examiner

Zürich, 1992

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Hamer G.' with a flourish at the end.

Summary

The aerobic degradative pathway of nitrilotriacetate (NTA) has been elucidated in the facultatively denitrifying strain TE11. The first step, i.e., NTA oxidation, was found to be catalyzed by a NTA dehydrogenase (NTA DH) which differs from the NTA Monooxygenase (NTA Mo) found in *Chelatobacter heintzii* ATCC 29600 and, with regard to kinetic properties, from the anaerobic protein complex consisting of NTA dehydrogenase and nitrate reductase (NtrR) recently found in strain TE11. NTA DH from aerobically grown cells has been purified, characterized and the reaction catalyzed was compared to NTA oxidation mediated by the anaerobic protein complex. NTA DH is a non-heme iron containing flavoprotein, which catalyzes the oxygen independent cleavage of a C-N bond in NTA to form iminodiacetate (IDA) and glyoxylate. *In vitro* the electrons were first transferred to the electron carrier phenazine methosulfate (PMS), which was reoxidized by either molecular oxygen or, in the absence of oxygen, by the electron acceptor iodo-nitrotetrazolium chloride (INT).

NTA was the only substrate oxidized by NTA DH out of some 30 compounds tested. Preliminary results from an immunocytochemical study based on the gold-labelling method indicated that NTA DH in strain TE11 was located in the cytoplasm of the cell. The presence of a soluble electron carrier able to transfer the electrons derived from NTA oxidation by the cytosolic NTA DH to the respiration chain in membranes could not be shown yet. Hence, the question remains unanswered, whether the NTA degrading enzyme evolved as a result of adaptation to NTA or whether it fulfils also another presently unknown function.

NTA DH isolated from aerobically grown cells was shown to be identical with the NTA DH protein isolated from the NTA DH/NtrR enzyme complex from anaerobically grown cells, on the basis of catalytic activity, kinetic data, molecular weight, flavin as the cofactor, N-terminal amino acid sequence and immunological cross reaction. Activity of NTA DH/NtrR, assayed anaerobically with nitrate as terminal electron acceptor, was reconstituted with NTA DH from aerobically grown cells and either with purified NtrR enzyme unit from the NTA DH/NtrR enzyme complex in anaerobically grown cells or with dissimilative NtrR activity in cells grown under denitrifying conditions on glucose and ammonia as the

carbon and nitrogen sources. This finding strongly supported that NTA degradation in strain TE11 proceeded via NTA DH under both aerobic and anaerobic conditions and that in denitrifying cells the NTA DH was tightly associated with a NtrR.

The oxidation of IDA to glycine and glyoxylate was mediated by a membrane associated dehydrogenase. The enzyme required either molecular oxygen as its final electron acceptor or an artificial electron acceptor such as INT, when the membranes were inhibited with KCN.

NTA DH and IDA DH were expressed only during growth on NTA as the sole source of nitrogen, none of the some 20 other compounds led to the induction of these enzymes.

From ten NTA degrading isolates tested, NTA DH was only present in the facultatively denitrifying strain TE11, whereas all the obligately aerobic strains degraded NTA via NTA Mo. IDA DH activity, in contrast, was present in all the ten aerobic strains and in strain TE11 grown under both aerobic and denitrifying conditions.

Zusammenfassung

Untersuchungen über den aeroben Abbauweg von Nitrilotriacetat (NTA) im Stamm TE11 ergaben, dass NTA von einer Dehydrogenase (NTA DH) in Iminodiacetat (IDA) und Glyoxylat gespalten wird. Diese NTA DH unterscheidet sich von der NTA Monooxygenase (NTA Mo) in *Chelatobacter heintzii* und vom Enzymkomplex in denitrifizierend gewachsenen Zellen des Stammes TE11, der aus einer NTA DH und einer Nitrat Reduktase (NtrR) besteht.

Die NTA DH von aerob gewachsenen Zellen wurde gereinigt, charakterisiert und mit dem Enzymkomplex aus anaerob gewachsenen Zellen verglichen. Das Enzym, ein Nichthäm-Eisen Protein mit Flavin als Kofaktor, katalysiert die sauerstoff-unabhängige Spaltung einer C-N Bindung im NTA Molekül. IDA, ein sekundäres Amin, und Glyoxylat sind die Reaktionsprodukte. *In vitro* werden die Elektronen aus der NTA-Oxidation auf den primären Elektronenüberträger Phenazinmethosulfat (PMS) übertragen, welcher entweder durch Sauerstoff oder durch weitere Elektronenakzeptoren wie z.B. Iodonitrotetrazoliumchlorid (INT) reoxidiert wird.

NTA war das einzige Substrat von über 30 getesteten Substanzen, welches durch NTA DH umgesetzt wurde. Erste Resultate aus immunocytochemischen Studien mit ProteinA-Gold-markierung deuten darauf hin, dass die NTA DH im Cytoplasma lokalisiert ist. Noch konnte kein physiologischer Elektronenüberträger zwischen dem löslichen Enzym und der Elektronentransportkette in den Zellmembranen gefunden werden. Die Frage nach der natürlichen Funktion oder der Adaptation dieses spezifischen Enzyms bleibt somit noch ungeklärt.

Die NTA DH aus aerob gewachsenen Zellen ist identisch mit dem entsprechenden Enzym aus anaeroben Zellen in bezug auf die katalytische Aktivität, kinetische Daten, Molekulargewicht, Flavin als Kofaktor, N-Terminus und immunologische cross-Reaktion. Aktivität eines NTA DH/NtrR Enzymkomplexes wurde rekonstituiert aus der NTA DH von aerob gewachsenen Zellen zusammen mit entweder der gereinigten NtrR aus dem Enzymkomplex von anaerob gewachsenen Zellen oder mit der dissimilativen NtrR-Aktivität in Zellen, die denitrifizierend auf Glucose und Ammonium gewachsen waren. Die Resultate zeigen, dass der NTA-Abbauweg im Stamm TE11 sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Wachstumsbedingungen über die NTA DH verläuft und

dass diese NTA DH in anaerob gewachsenen Zellen eng assoziiert ist mit einer NtrR.

Die Oxidation von IDA zu Glycin und Glyoxylat wurde durch eine membrangebundene Dehydrogenase katalysiert, welche entweder molekularen Sauerstoff oder den künstlichen Elektronenakzeptor INT als terminalen Elektronenüberträger benötigte.

NTA DH und IDA DH wurden ausschliesslich während des Wachstums auf NTA als einziger Stickstoffquelle gefunden, keine der 20 anderen getesteten Komponenten induzierte diese Enzyme im Stamm TE11.

NTA DH wurde nur im fakultativ denitrifizierenden Stamm TE11 gefunden, die obligat aeroben NTA-Abbauer oxidierten NTA mittels einer NTA Mo. Hingegen wurde Aktivität einer IDA DH sowohl in allen aeroben Stämmen als auch in Stamm TE11, gewachsen unter aeroben und anaeroben Bedingungen, nachgewiesen.