Mikrobieller Abbau von Iminodisuccinat

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von
Željko Cokesa
aus Sombor

Hauptberichter:	Prof. Dr. H.-J. Knackmuss
Mitberichter:	PD Dr. A. Stolz
Tag der mündlichen Prüfung:	20. April 2004

Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart
2004

Die Arbeiten für die vorliegende Abhandlung wurden am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart durchgeführt.

für Leonike und Jessica

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN 7

KURZFASSUNG 9

ABSTRACT 11

1 EINFÜHRUNG 13
1.1 Komplexbildner 13
1.2 Polyphosphate und deren Ersatzstoffe 15
1.3 Die klassischen Aminopolycarboxylate 17
1.4 EDDS als Ersatzstoff für die klassischen Komplexbildner? 24
1.5 Iminodisuccinat 25

2 DER MIKROBIELLE ABBAU VON IDS 28
2.1 Respirometertest 28
2.2 Wachstum von *A. tumefaciens* BY6 und *R.* sp. SLRS7 mit IDS und unterschiedlichen Metall-IDS Komplexen als Substrat 30
2.3 Umsatzversuche mit ganzen Zellen 32
2.4 Anreicherung, Identifizierung und Charakterisierung der in den IDS-Abbau involvierten Enzyme 33

3 CHARAKTERISIERUNG DER GENE DES INITALEN ABBAUWEGES 43
3.1 Klonierung der Gene für die C-N Lyase und die Epimerase aus *Agrobacterium tumefaciens* BY6 43
3.2 Das Lyase-Gen 44
3.3 Das Epimerase-Gen 51
3.4 Lokalisation der Gene 52

4 LITERATURVERZEICHNIS 53

Anhang 1 65

A stereoselective carbon-nitrogen lyase from *Ralstonia* sp. SLRS7 cleaves two of three isomers of iminodisuccinate

Anhang 2 89

Biodegradation of all Stereoisomers of the EDTA-substitute Iminodisuccinate by *Agrobacterium tumefaciens* BY6 requires an Epimerase and a Stereoselective C-N Lyase

Anhang 3 113

Characterization of the genes from *Agrobacterium tumefaciens* BY6 encoding a novel epimerase and a C-N lyase involved in IDS degradation

Anhang 4 133

Sequenz der 16S-rDNA aus den Stämmen *Agrobacterium tumefaciens* BY6 und *Ralstonia* sp. SLRS7

LEBENSLAUF 135

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
DOC	gelöster organischer Kohlenstoff
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTPA	Diethylentriaminpentaacetat
DTPMP	Diethylentriamin-penta(methylenphosphonsäure)
ED3A	Ethylendiamintriacetat
EDMA	Ethylendiaminmonoacetat
EDDA	Ethylendiamindiacetat
EDDS	Ethylendiamindisuccinat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDTMP	1,2 Diaminoethan-tetra(methylenphosphonsäure)
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FMN	Flavinadeninmononukleotid
h	Stunde
HEDP	1-Hydroxyethan(1,1-di-phosphonsäure)
HEDTA	N-(2-Hydroxyethyl)-ethylendiamintriacetat
IDA	Iminodiacetat
IDS	Iminodisuccinat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KPDA	Ketopiperazindiacetat
$NADH/H^+$	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
NTA	Nitrilotriacetat
NTMP	Nitrilotris(methylenphosphonsäure)
ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PLP	Pyridoxalphosphat
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
UV/Vis	Ultraviolett/Visible

Kurzfassung

Iminodisuccinat (IDS) ist ein neuer synthetisch hergestellter Komplexbildner mit dem Potenzial den meistbenutzten aber schwer abbaubaren Komplexbildner Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA) teilweise zu ersetzen. Von einem EDTA-Substitut wird neben guten Komplexierungseigenschaften insbesondere eine gute biologische Abbaubarkeit verlangt. In diesem Zusammenhang wurde die Abbaubarkeit von IDS bewertet, die initialen Abbauwege aufgeklärt und die in den Abbau involvierten Gene charakterisiert.

Standardisierte aerobe Abbautests nach OECD 301F (Respirometertest) zeigten je nach eingesetztem Belebtschlamm unterschiedliche Ergebnisse. Einerseits wurden mit dem Belebtschlamm aus der Kläranlage Leverkusen-Bürrig alle Isomere des IDS leicht abgebaut. Andererseits wurden nur zwei von drei IDS Isomeren, das R,S-IDS und S,S-IDS, mit dem Belebtschlamm aus der Kläranlage Stuttgart-Büsnau mineralisiert. Des Weiteren wurden die in der Natur hauptsächlich vorliegenden Metall-IDS Komplexe auf ihre biologische Abbaubarkeit untersucht. Dabei erwiesen sich Fe^{2+}- und Ca^{2+}-IDS als biologisch leicht abbaubar, während Mn^{2+}- und Cu^{2+}-IDS innerhalb der 28-tägigen Testperiode nur zu 55% bzw. 40% eliminiert wurden.

Aus den genannten Belebtschlämmen wurden die IDS-abbauenden Stämme *Agrobacterium tumefaciens* BY6 (Leverkusen-Bürrig) und *Ralstonia* sp. SLRS7 (Stuttgart-Büsnau) isoliert und für weitere Untersuchungen verwendet. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der standardisierten Abbautests mineralisierte der Stamm *A. tumefaciens* BY6 alle Isomere des IDS, der Stamm *R.* sp. SLRS7 nur die Isomere R,S-IDS und S,S-IDS.

In *R.* sp. SLRS7 werden R,S-IDS und S,S-IDS über eine homotetramere C-N Lyase reversibel zu Asparaginsäure und Fumarsäure gespalten. Aus R,S-IDS entsteht D-Asparaginsäure, aus S,S-IDS L-Asparaginsäure. Die Spaltung der C-N Bindung erfolgt dabei stereospezifisch am S-konfigurierten C-Atom.

In *A. tumefaciens* BY6 sind zwei Enzyme in den initialen Abbau der IDS Isomere involviert. Zum einen eine C-N Lyase mit vergleichbarer Funktion zur C-N Lyase aus *R.* sp. SLRS7. Sie katalysiert die stereoselektive Spaltung von R,S-IDS zu D-Asparaginsäure und Fumarsäure. Zum anderen wurde eine Epimerase gefunden. Diese ist das eigentliche Schlüsselenzym für die Metabolisierung von R,R-IDS. Sie epimerisiert R,R-IDS zu R,S-IDS sowie S,S-IDS zu R,S-IDS. Hierdurch werden die

Isomere R,R-IDS und S,S-IDS in den stereoselektiven Pfad eingeleitet, der durch die C-N Lyase katalysiert wird.

Die Gene für die Epimerase und die C-N Lyase aus *A. tumefaciens* BY6 wurden kloniert und sequenziert. Die von dem Lyase-Gen abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte die höchste Homologie mit Argininosuccinat-Lyasen, einer Unterfamilie der Fumarase II Superfamilie. Eine entsprechende Lyase-Aktivität gegenüber Arginiosuccinat wurde jedoch nicht beobachtet. Bei der C-N Lyase aus *A. tumefaciens* BY6 handelt es sich um ein nahe verwandtes Enzym der Argininosuccinat-Lyasen mit bisher unbekannter Hauptfunktion. Die von dem Epimerase-Gen abgeleitete Aminosäuresequenz besaß keine signifikante Ähnlichkeit zu Proteinen mit bekannter Funktion. Die Epimerase kann demnach als neuartig bezeichnet werden.

Die beiden in den IDS-Abbau involvierten Gene zeigten keine funktionelle Kopplung. Das Epimerase-Gen wurde auf einem zirkulären Plasmid, das Lyase-Gen auf der chromosomalen DNA lokalisiert.

Abstract

Iminodisuccinate (IDS) is a new synthetic chelating agent with the potential to substitute partially the most commonly used but persistent chelator ethylenediaminetetraacetate (EDTA). An EDTA-substitute requires besides good complexing attributes in particular ready biodegrability.

In this regard the biodegradability of IDS was estimated, the initial degradation pathway was elucidated, and the genes involved in the IDS-degradation were characterized.

The standardized aerobic biodegradation tests revealed different results depending on the activated sludge used. On the one hand, using the activated slugde from the sewage treatment plant of Leverkusen-Bürrig all isomers of IDS were readily biodegraded. On the other hand, only two of three IDS-isomers, namely R,S-IDS and S,S-IDS, were mineralized by the activated sludge from the sewage treatment plant of Stuttgart-Büsnau. Furthermore, in natural systems the mostly occuring metal-IDS complexes were tested on its biodegradability. Fe^{2+}- and Ca^{2+}-IDS were readily biodegradable whereas Mn^{2+}- und Cu^{2+}-IDS revealed only 55% and 40% biodegradation, respectively, within the 28 day period of the test.

From the activated sludges mentioned the IDS-degrading strains *Agrobacterium tumefaciens* BY6 (Leverkusen-Bürrig) and *Ralstonia* sp. SLRS7 (Stuttgart-Büsnau) were isolated and used for further investigations. In agreement with the results of the standardized biodegradation tests, the strain *A. tumefaciens* BY6 mineralized all isomers of IDS, the strain *R.* sp. SLRS7 only the isomers R,S-IDS and S,S-IDS.

The strain *R.* sp. SLRS7 cleaved R,S-IDS and S,S-IDS by a homotetrame C-N lyase with formation of aspartic acid and fumaric acid. Actually, R,S-IDS and S,S-IDS led to D-aspartic acid and L-aspartic acid, respectively. The cleavage of the C-N bond takes place stereospecifically on the asymmetric carbon atom exhibiting the S-configuration.

In contrast, two enzymes are involved in the initial transformation of all IDS isomers by *A. tumefaciens* BY6. There is a C-N lyase with comparable function to the C-N lyase from *R.* sp. SLRS7. It catalyzes the stereoselective cleavage of R,S-IDS generating D-aspartic acid and fumaric acid. However, the key enzyme for R,R-IDS metabolism is an epimerase. It epimerizes R,R-IDS to R,S-IDS as well as S,S-IDS to R,S-IDS.

Hereby, the isomers R,R-IDS and S,S-IDS were funneled into the stereoselective pathway initiated by the C-N lyase.

The genes encoding the epimerase and the C-N lyase were cloned and sequenced. The deduced amino acid sequence of the C-N lyase gene showed the highest degree of sequence similarity with argininosuccinate lyases, a subfamilie of the fumarase II superfamily. However, an appropriate lyase activity towards argininosuccinate could not be observed. The C-N lyase from *A. tumefaciens* BY6 is a closely related enzyme to the argininosuccinate lyase and so far with unknown natural function. The deduced amino acid sequence of the epimerase gene exhibited no significant similarity to proteins with known function. Therefore, the epimerase is described as a novel enzyme.

Both genes involved in IDS degradation showed no functional coupling. The epimerase gene was located on a circular plasmid, the lyase gene was part of the chromosomal DNA.

1 Einführung

1.1 Komplexbildner

Zeitgleich mit der zunehmenden Industrialisierung und wirtschaftlichen Entwicklung sind die Umweltbelastungen durch eine Vielzahl unterschiedlicher Umweltchemikalien anthropogenen Ursprungs stark angestiegen. Die seit Beginn der 50er Jahre verwendeten synthetisch hergestellten Komplexbildner verkörpern eine Gruppe von Umweltchemikalien, die das natürliche Ökosystem mehr oder weniger stark beeinflussen können.

Komplexbildner sind chemische Verbindungen, die befähigt sind mit mehrwertigen Metallionen Koordinationsverbindungen bzw. Komplexe einzugehen. Ein Komplex ist das Ergebnis einer Lewis Säure-Base Reaktion mit einem Zentralatom bzw. -ion als Lewis Säure und dem Liganden als Base. Man unterscheidet einzähnige und mehrzähnige Liganden von denen letztere mit dem Zentralatom ringförmige Strukturen, sogenannte Chelate, ausbilden (Abb. 1-1). Diese Chelatkomplexe sind erheblich stabiler gegenüber vergleichbaren Komplexen mit einzähnigen Liganden.

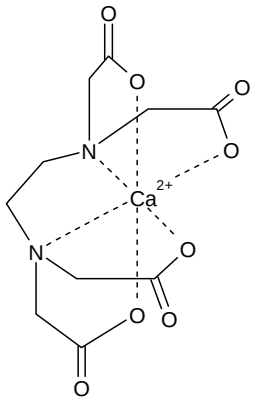


Abb. 1-1 Chelatkomplex Ca^{2+}-EDTA.

Durch die Chelatbildung wird das Metallion effektiv maskiert und infolgedessen bestimmte Reaktionsabläufe, z.B. die schwermetallabhängige katalytische Zersetzung von chemischen Substanzen oder das Ausfällen von Metallsalzen, unterbunden. Durch diese Eigenschaft erlangten die Chelatkomplexbildner einen hohen Stellenwert als Gebrauchschemikalie und fanden den Einsatz in vielen Produkten des täglichen Lebens. Sie finden z.B. Verwendung als Wasserenthärter in Wasch- und Reinigungsmitteln, Bleichmittelstabilisator in der Textil- und Papierindustrie, Abbindeverzögerer in der Bauindustrie, Korrosionsinhibitor in der Metallindustrie oder als Spurennährstoffdünger

in der Landwirtschaft. In kosmetischen und pharmazeutischen Mitteln dienen sie als Additive zur Verbesserung der Haltbarkeit. Beim fotografischen Fixieren wird nicht belichtetes Silberbromid durch die Komplexierung entfernt und dadurch das Nachdunkeln des Bildes vermieden. In der analytischen Chemie stellt die Komplexometrie ein Verfahren zur quantitativen Erfassung vieler Metalle dar. Selbst in der Medizin nutzt man die Bildung stabiler Komplexe zur Behandlung von Metallvergiftungen (Rubin & Martell, 1980). Für die Lebensmittelverarbeitung haben Komplexbildner als Zusatzstoffe eine steigende Bedeutung. Sie hemmen die katalytische Wirkung durch Schwermetallspuren bei der Fettoxidation und tragen somit wesentlich zur Stabilisierung von Aroma, Farbe, Textur und Haltbarkeit bei (Belitz & Grosch, 1992). Des Weiteren kann eine Sanierung von schwermetallbelasteten Böden durch eine Extraktion mit Komplexbildnern durchgeführt werden (Bossart & Müller, 2002).

Komplexbildner sind auch in der Natur zu finden. Die Huminstoffe bilden den größten Anteil an natürlichen Komplexbildnern. Bedeutungsvoll sind auch das im Blut befindliche Hämoglobin, der Pflanzenfarbstoff Chlorophyll sowie viele andere essenzielle Metalloproteine wie z.B. die Katalase, Alkohol-Dehydrogenase, Carboanhydrase, Cytochrome oder Vitamin B_{12}. Die Giftwirkung von vielen Schwermetallen beruht auf der Komplexbildung mit Proteinen. Ähnliches gilt für giftige Liganden wie Cyanid-Ionen, Schwefelwasserstoff oder Kohlenmonoxid, die sich an die Komplexe, wie z.B. Hämoglobin oder Cytochrome, anlagern und Sauerstoff verdrängen. Aerobe Mikroorganismen produzieren und sezernieren komplexierende Verbindungen, sogenannte Siderophore. Siderophore zeichnen sich vor allem durch ihre äußerst hohe Bindungsaffinität zu Fe^{3+}-Ionen aus. Sie haben die Aufgabe, das im Erdboden hauptsächlich in schwerlöslicher Form vorliegende Eisen, z.B. als Brauneisenstein $Fe_2O_3 \times H_2O$, Roteisenstein Fe_2O_3 oder Magnetit Fe_3O_4, zu lösen und in die Zelle zu transportieren. Die erneute Freisetzung des Fe^{3+} in der Zelle erfolgt durch enzymatische Hydrolyse des Siderophores (Enterobactin) oder im Falle von Ferrichrom durch Reduktion zum Fe^{2+}, welches durch Ferrichrom nicht mehr gebunden wird (Lengeler et al., 1999). Höhere Organismen besitzen wiederum Proteine, die das essenzielle Eisen so fest an sich binden und speichern (Hämoglobin, Ferritin, Lactoferritin, Transferrin), dass es für Mikroorganismen nicht verfügbar ist und ihr Wachstum unterdrückt. Die Auseinandersetzung um das Eisen zwischen den verschiedenen Organismen gewinnt der Organismus, der den Komplexbildner mit der höheren Affinität zum Eisen hervorbringt (Schlegel, 1992).

1.2 Polyphosphate und deren Ersatzstoffe

Die erste Stoffgruppe von kommerziell genutzten Komplexbildnern waren die Polyphosphate, die in erster Linie nur mit den Härtebildnern des Wassers, den Calcium- und Magnesiumionen, gute wasserlösliche Komplexe bilden. Deshalb fanden sie überwiegend Verwendung als Wasserenthärter in Waschmitteln. Das seit 1960 lange ausschließlich gebräuchliche Pentanatriumtriphosphat (Abb. 1-2) war bis 1981 in Waschmitteln mit bis zu 40% enthalten (Wasser-Wissen, 2000).

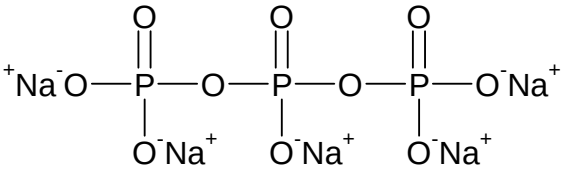


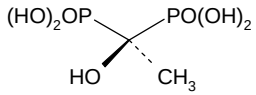
Abb. 1-2 Strukturformel des Pentanatriumtriphosphat.

Schließlich führte der übermäßige Gebrauch zu einem Umweltproblem, da sich der Phosphatgehalt in den Abwässern und Oberflächengewässern stark erhöhte. Phosphat ist in den Gewässern unerwünscht, weil es als Pflanzennährstoff dort übermäßiges Algenwachstum und hinterher schädliche Eutrophierungserscheinungen insbesondere in langsam fließenden und stehenden Gewässern hervorruft. Um den Gewässereintrag zu reduzieren wurde 1980 in Deutschland der Phosphateinsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln zur Verwendung im Haushalt und in Wäschereien durch die Phosphathöchstmengenverordnung reguliert. Daraufhin wurden verschiedene Phosphatersatzstoffe eingeführt: Zeolith A sowie verschiedene Phosphonate und Aminopolycarboxylate.

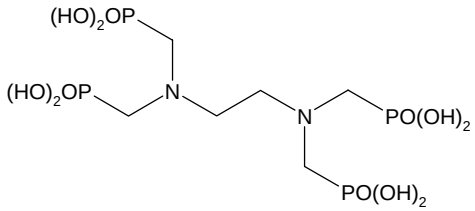
Zeolith A ist ein unlösliches, synthetisches Natriumaluminumsilicat mit Käfigstruktur, in denen bewegliche Natriumionen gegen die Härtebildner ausgetauscht werden können (Henning et al., 1977). Die Entfernung von Zeolith A aus dem Abwasser kann leicht durch Sedimentation erfolgen. Anschließend kann es zu Kieselsäure umgewandelt werden (Carrondo et al., 1981). Die Wirksamkeit als Enthärter ist jedoch vergleichsweise schwach, so dass Zeolithe nur in Kombination mit Aminopolycarboxylaten oder Phosphonaten effektiv eingesetzt werden (Wasser-Wissen, 2000).

Phosphonate sind synthetische phosphororganische Komplexbildner mit kovalenter Phosphor-Kohlenstoff Bindung. In standardisierten Abbauuntersuchungen wiesen die

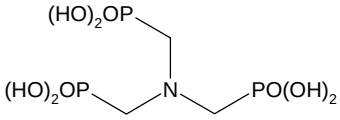
gängigsten Phosphonate HEDP, NTMP, EDTMP und DTPMP (Abb. 1-3) keine signifikante biologische Abbaubarkeit auf (Horstmann & Grohmann, 1988). Sie können allerdings in der Umwelt als Fe^{3+}- und Cu^{2+}-Komplex fotochemisch abgebaut werden, wobei unter anderem eutrophierendes Phosphat entsteht (Fischer, 1993; Matthijs et al., 1989). Ferner besteht die Gefahr der Remobilisierung von Schwermetallen aus Sedimenten sowie einer Beeinträchtigung der Phosphatfällung während der Abwasserbehandlung (Bordas & Bourg, 1998; Müller et al., 1984).



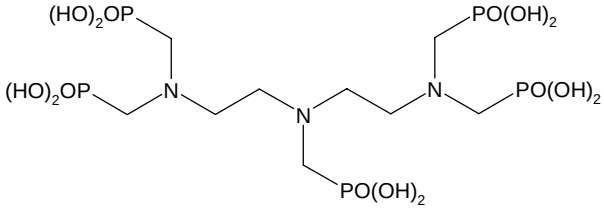
HEDP
1-Hydroxyethan(1,1-di-phosphonsäure)



EDTMP
1,2-Diaminoethan-tetra(methylenphosphonsäure)



NTMP
Nitrilotris(methylenphosphonsäure)

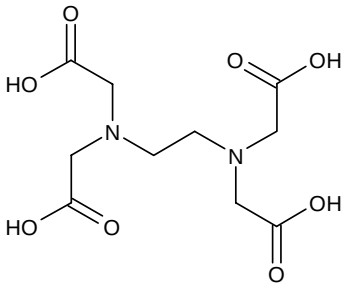


DTPMP
Diethylentriamin-penta(methylenphosphonsäure)

Abb. 1-3 Strukturformeln der bedeutsamsten synthetischen Phosphonate.

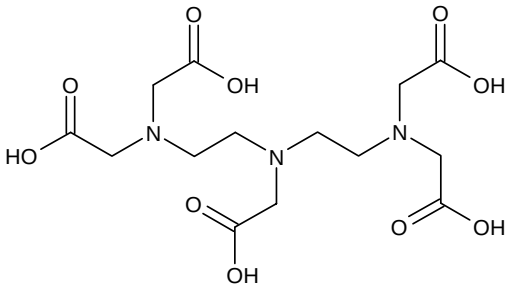
1.3 Die klassischen Aminopolycarboxylate

Im Zusammenhang mit dem Inkrafttreten der Phosphathöchstmengenverordnung haben die synthetischen Komplexbildner aus der Gruppe der Aminopolycarboxylate eine zunehmende Bedeutung als Phosphatersatzstoffe erlangt.



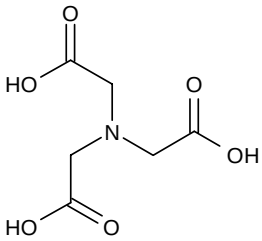
Ethylendiamintetraessigsäure

EDTA



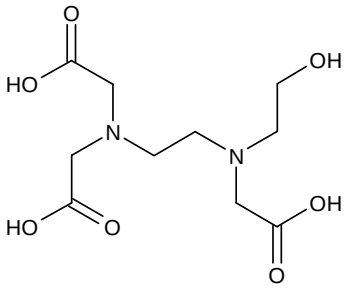
Diethylentriaminpentaessigsäure

DTPA



Nitrilotriessigsäure

NTA



N-(2-Hydroxyethyl)-ethylendiamintriessigsäure

HEDTA

Abb. 1-4 Strukturformeln der wichtigsten synthetischen Aminopolycarboxylate. Dargestellt sind die freien Säuren.

Die naturfremden Aminopolycarboxylate (s. Abb. 1-4) komplexieren neben den Erdalkalimetallen auch vorzugsweise die Schwermetalle, so dass sie technisch vielfältig eingesetzt werden können. Der Weltmarkt synthetischer Komplexbildner wird nahezu auf 300 kt geschätzt (Bayer, 2000), davon entfallen allein 100 kt auf die Wasch- und Reinigungsmittel (Bayer Research, 2001). Die wirtschaftliche Bedeutung der naturfremden Aminopolycarboxylate wird durch ihren Weltmarktanteil (vgl. Tab. 1-1) von 71% bestätigt.

Tab. 1-1 Weltmarktanteil Komplexbildner.

Komplexbildner	Weltmarktanteil[a] Komplexbildner in %
EDTA	39
NTA	24
Gluconate & Heptonate	15
Organophosphate	14
DTPA	7
HEDTPA	1

[a]Quelle: (Bayer, 2000)

Die ausgiebige Nutzung der wasserlöslichen Aminopolycarboxylate schließt verschiedene Umweltrisiken ein, die nachfolgend erörtert werden.

Der bedeutungsvollste Komplexbildner EDTA gilt in konventionellen Kläranlagen als biologisch schwer abbaubar und auch nicht am Klärschlamm adsorbierbar (Madsen & Alexander, 1985; Lahl & Burmann 1988; Siegrist et al., 1988; Alder et al., 1990; Kari & Giger, 1996). Mehrere Laboruntersuchungen mit Belebtschlämmen aus kommunalen oder industriellen Kläranlagen bestätigen die Persistenz von EDTA (Boatman et al., 1986; Hinck et al., 1997; Takahashi et al., 1997). Da in der Trinkwasseraufbereitung aus Fließgewässern in der Regel eine Bodenpassage, eine sogenannte Uferfiltration, integriert ist, kommt dem Abbauverhalten von EDTA im System Boden/Wasser besondere Bedeutung zu. In Feldstudien enthüllte Giger (1986), dass das EDTA bei der Infiltration von Flusswasser in das Grundwasser nicht eliminiert wird.

Konträr beschreiben einige Publikationen den Abbau von EDTA in einer mit EDTA-Abwasser belasteten Lagune (Belly et al., 1975), in Sedimenten und im Boden (Tiedje, 1975; Tiedje, 1977; Bolton et al., 1993). Einige Arbeiten (Ginkel et al., 1997; Kaluza et al., 1998; Henneken et al., 1998) beschreiben den Abbau von EDTA in der biologischen Abwasserbehandlung unter bestimmten verfahrenstechnischen Bedingungen. Ein langsamer Abbau von verschiedenen Metall-EDTA Komplexen konnte von Thomas et al. (1998) mit einer angereicherten Mischkultur beobachtet werden. Des Weiteren konnten drei Arbeitsgruppen unterschiedliche EDTA-abbauende Stämme isolieren, die den Abbau produktiv unter Laborbedingungen mit EDTA als einziger C-Quelle durchführen (Lauff et al., 1990; Nörtemann, 1992; Witschel et al., 1997). Der Mechanismus des Abbaus wurde in den isolierten Stämmen BNC1 (Nörtemann, 1992; Payne et al., 1998) und DSM 9103 (Witschel et al., 1997) genauer erforscht. Dabei konnte aus beiden Stämmen ein Enzymsystem, bestehend aus einer

Monooxygenase und einer NADH/H^+:FMN-Oxidoreduktase, isoliert werden, das die Umsetzung von EDTA zu Ethylendiamintriacetat (ED3A) und Glyoxylat katalysierte (Abb.1-5). Der weitere Abbau von ED3A zu N,N`-Ethylendiamindiacetat (EDDA) und Glyoxylat wurde im Stamm DSM 9103 durch dasselbe Enzymsystem initiiert. Die Entfernung der zweiten Acetatgruppe verläuft regiospezifisch, da N,N-EDDA als Abbauprodukt nicht detektiert werden konnte (Witschel et al., 1997). Vermutlich entsteht aus N,N`-EDDA durch Abspaltung weiterer Acetatgruppen Ethylendiamin über Ethylendiaminmonoacetat (EDMA), welches in einem weiteren Schritt zu Glycin umgwandelt werden kann (Bucheli-Witschel & Egli, 2001). Die Abbildung 1-5 gibt einen Überblick über die Ergebnisse des mikrobiellen Abbaus von EDTA.

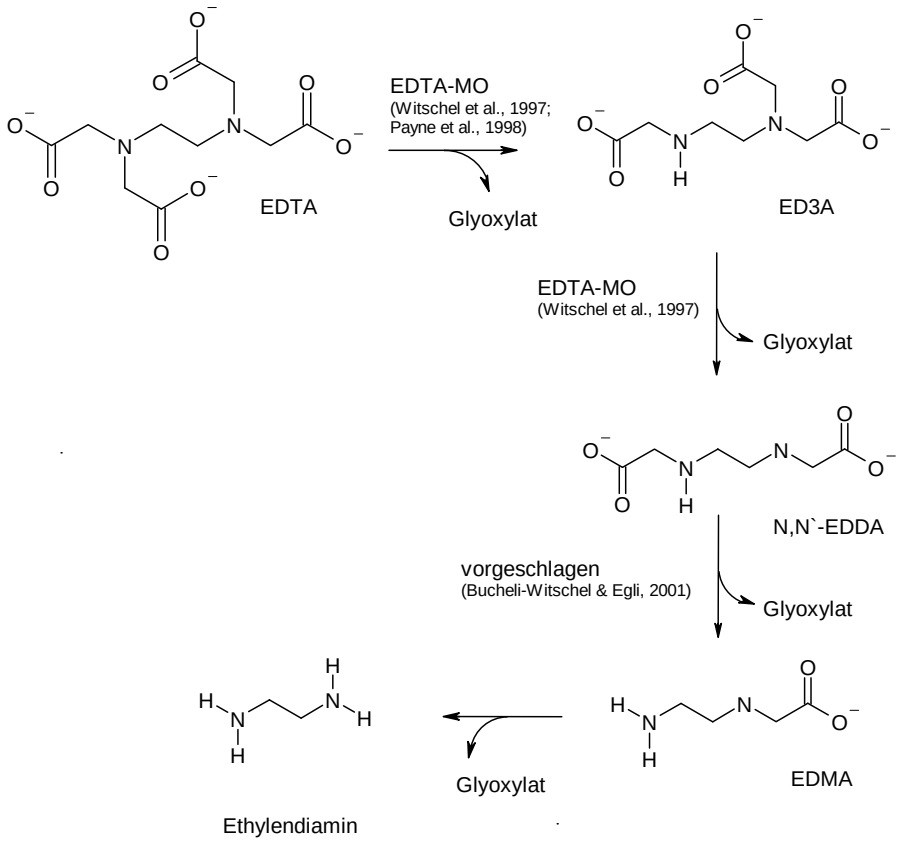


Abb. 1-5 Katabolismus von EDTA der Stämme DSM9103 (Witschel et al., 1997) und BNC1 (Payne et al., 1998). MO: Monooxygenase.

Trotz dieser ermutigenden Abbauuntersuchungen lässt sich de facto EDTA in nahezu allen anthropogen beeinflussten Fließgewässern sowie in aus Uferfiltrat gewonnenen Trinkwässern nachweisen. Anfang der 90er Jahre wurden in verschiedenen Flüssen innerhalb Deutschlands EDTA-Konzentrationen im Bereich von 2 bis 60 µg/l gemessen (Sillanpäa, 1997). EDTA-Konzentrationen von bis zu 100 µg/l wurden in der Ruhr (Trapp et al., 1992) und im Main (Nusch et al., 1991) bestimmt. Die toxikologisch

relevanten Konzentrationen für EDTA liegen deutlich höher, für Daphnien wurde ein EC_{50}-Wert von 610 mg/l bestimmt (Sorvari & Sillanpää, 1996). Die tatsächliche Gefahr, die von EDTA ausgeht, ist neben dessen Anreicherung in der Umwelt die Fähigkeit Schwermetalle und Radionuklide aus Sedimenten und Böden zu remobilisieren, was nicht zuletzt zu Problemen bei der Trinkwasseraufbereitung aus Uferfiltrat führt (Gardiner, 1976; Means et al., 1978 und 1981; Nowack et al., 1997).

Gestützt durch diese Ergebnisse wurde vom Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Bundesforschungsministerium, Bundesgesundheitsministerium und von der Industrie am 31.07.1991 eine gemeinsame Erklärung zur Reduzierung der Gewässerbelastung durch EDTA erarbeitet. Das Ziel war es, die EDTA-Frachten in den oberirdischen Gewässern um 50 % innerhalb von 10 Jahren zu reduzieren. In Baden-Württemberg wurde diese Vorgabe für den Neckar und die Donau erfüllt, für den Rhein wurde eine Reduktionsrate von 35% erreicht. Die EDTA-Reduktionsraten wurden jedoch teilweise durch die Verwendung von NTA und DTPA aufgebracht (LfU, 2001). Gesetzlich reguliert wurde die Anwendung von Komplexbildnern bei der Herstellung von Papier und Pappe. Laut Abwasserverordnung (AbwV, 2002) soll auf organische Komplexbildner, ausgenommen Phosphonate, verzichtet werden, die einen DOC-Abbaugrad nach 28 Tagen von 80% nicht erreichen. Außerdem verpflichtete sich der Fachverband der fotochemischen Industrie 1998 zur Reduzierung der Gewässerbelastung durch schwer abbaubare Komplexbildner im Abwasser fotografischer Prozesse.

In der Umwelt wird die Akkumulation von EDTA durch einen abiotischen Prozess reduziert. In Oberflächengewässern wird der Fe^{3+}-EDTA Komplex durch Fotolyse transformiert (Natarajan & Endicott, 1973; Lockhart & Blakeley, 1975a). Andere Metall-EDTA Komplexe werden indessen fotochemisch nicht oder nur äußerst langsam mineralisiert (Lockhart & Blakeley, 1975b). Kari und Giger (1995) ermittelten eine Halbwertszeit von 2 Stunden für Fe^{3+}-EDTA in einem Fluss bei direkter Sonneneinstrahlung. Der fotochemische Abbau von Fe^{3+}-EDTA erfolgt dabei über die Fe^{3+}-Komplexe des ED3A, des N,N`-EDDA bis zum EDMA, welches fotochemisch nicht weiter abgebaut werden kann (Lockhart & Blakeley, 1975a/b). Außerdem kann aus ED3A durch intramolekulare Zyklisierung Ketopiperazindiacetat (KPDA) entstehen (Abb.1-6). ED3A und KPDA sind in vielen Oberflächengewässern und im Trinkwasser im unteren µg/l-Bereich nachweisbar (Ternes et al., 1996). Über die toxikologischen

und ökotoxikologischen Effekte der Ketopiperazincarboxylatderivate ist bisher noch nichts bekannt (Nörtemann, 1999).

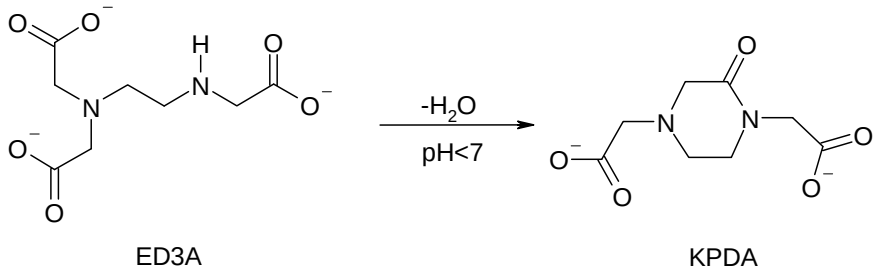


Abb. 1-6 Bildung von KPDA aus ED3A durch spontane intramolekulare Zyklisierung.

Im Gegensatz zum EDTA zeigte NTA (s. Abb. 1-4) in mehreren Studien eine gute biologische Abbaubarkeit mit Raten von 70 bis über 90% (Gundernatsch, 1974; Renn, 1974; Giger et al., 1987). Die Effektivität des NTA-Abbaus in biologischen Kläranlagen ist dabei abhängig von einigen Faktoren, wie z.B. der Konzentration von Schwermetallen, der Temperatur, der Wasserhärte und der NTA-Konzentration (Perry et. al., 1984). Zudem konnte eine NTA-Eliminierung unter anaeroben Bedingungen im Faulturm nachgewiesen werden (Moore & Barth, 1976; Kirk et al., 1982).

Ende der 90er Jahre betrug die NTA-Konzentration in deutschen Flüssen um 10 µg/l und darunter (UBA, 2003). Während der Infiltration von Flusswasser ins Grundwasser wird NTA schnell mineralisiert (Kuhn et al., 1987), so dass letztendlich nur Konzentrationen im unteren µg/l-Bereich im Grundwasser bzw. Trinkwasser gefunden wurden (Klopp & Pätsch, 1994). Eine Vielzahl von NTA-abbauenden Mikroorganismen wurden isoliert. Die Mehrzahl dieser Isolate sind gramnegativ und obligat aerobe Stäbchen (Focht & Joseph, 1971, Cripps & Noble, 1973; Tiedje et al., 1973; Egli et al., 1988). Für diese Stämme wurde von Auling et al. (1993) eine neue Gattung mit der Bezeichnung *Chelatobacter* vorgeschlagen. Genauere Untersuchungen zum Metabolismus von NTA wurden mit dem Stamm *Chelatobacter heintzii* ATCC 29600 durchgeführt. Der Abbau erfolgte über ein Enzymsystem aus einer Monooxygenase und einer $NADH/H^+$:FMN-Oxidoreduktase unter Bildung von Iminodiacetat (IDA) und Glyoxylat (Uetz et al., 1992; Xu et al., 1997). Anschließend wurde die Spaltung von IDA durch eine membrangebundene Dehydrogenase in Glyoxylat und Glycin katalysiert (Uetz & Egli, 1993).

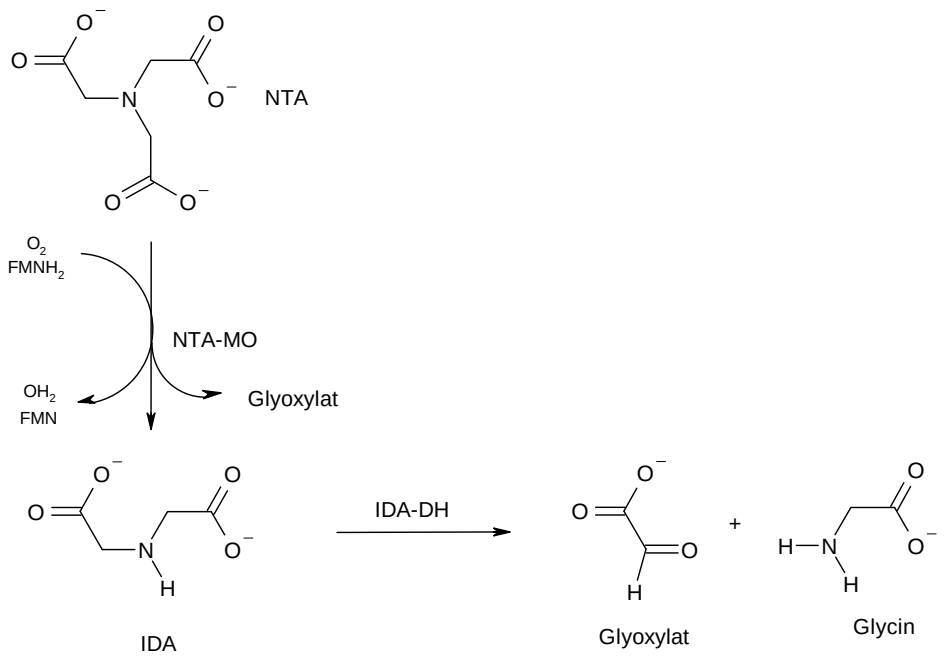


Abb. 1-7 Abbauweg des NTA aus *Chelatobacter heintzii* ATCC 29600. Monooxygenase (MO), Dehydrogenase (DH).

Trotz dieser guten Abbauergebnisse ist NTA ebenso in die Diskussion geraten, da NTA ein Potenzial zur Remobilisierung von Schwermetallen aus Sedimenten besitzt (Perry et al., 1984; Garnett et al., 1986) sowie bei Ratten in hohen Dosen und langer Exposition Krebs im Bereich des Harntraktes erzeugen kann (Goyer et al., 1981). Als Reaktion ergab sich 1984 eine Selbstverpflichtung des Industrieverbandes Körperpflege- und Waschmittel über die Begrenzung des Einsatzes von NTA in Waschmitteln.

Der Komplexbildner DTPA (s. Abb. 1-4), welcher vor allem in der Papierindustrie und als Ersatzstoff für EDTA in Waschmitteln eingesetzt wird, konnte in Fließgewässern in Konzentrationen von 2-15 µg/l nachgewiesen werden (Wanke & Eberle, 1992; Klopp & Pätsch, 1994). Aerobe Abbauversuche an DTPA ergaben Eliminierungsraten zwischen 50-70% (Nispel et al., 1990; Sillanpää, 1996), Werte bis zu 80% wurden von Richardson et al (1994) beobachtet. Im Gegensatz dazu ermittelten Hinck et al. (1997) keinen signifikanten Abbau mit adaptiertem Belebtschlamm. In Böden und Sedimenten wurde DTPA effektiv metabolisiert (Stumpf et al., 1996, Means et al., 1980, Bolton et al., 1993). Beim mikrobiellen Abbau des DTPA in Bodensuspensionen wurden die Metabolite EDTA und NTA nachgewiesen (Stumpf et al., 1996). Weitere Metabolite wurden von Ternes et al. (1996) als unvollständig substituierte Aminopolycarboxylate identifiziert, wie Diethylentriamintetraacetat, Diethylentriamintriacetat und ED3A, die wiederum teilweise spontan zu Ketopiperazincarboxylatderivate zyklisieren. Der foto-

chemische Abbau von DTPA und NTA erfolgte, wie beim EDTA, am Fe^{3+}-Komplex (Svenson et al. 1989). Bezüglich des Remobilisierungspotenzials von Schwermetallen aus Böden besitzt DTPA eine höhere Effektivität als EDTA, welches durch die stärkere Komplexbildung begründet ist (Norvell, 1984). Der Komplexbildner HEDTA (Abb.1-4), zu dem es nur wenige Studien zur biologischen Abbaubarkeit gibt, wird als biologisch schwer abbaubar angesehen (Graßhoff & Potthoff-Karl, 1996).

Zusammenfassend haften den bisher erwähnten Komplexbildnern Eigenschaften an, die in der heutigen Zeit als vermeidbar und nachteilig empfunden werden. Daher ist es eine wichtige Aufgabe Komplexbildner zu entwickeln und zu vermarkten, die unter vergleichbarer technischer Anwendbarkeit ein besseres ökologisches Gesamtprofil aufweisen. Zwei neue vielversprechende Kandidaten aus der Gruppe der Aminopolycarboxylate sind die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Ethylendiamindisuccinat und Iminodisuccinat.

1.4 EDDS als Ersatzstoff für die klassischen Komplexbildner?

Im Gegensatz zu den herkömmlichen Aminopolycarboxylaten besitzt Ethylendiamindisuccinat (EDDS) zwei asymmetrische C-Atome (Abb. 1-8) mit 3 verschiedenen Stereoisomeren, S,S-EDDS, R,R-EDDS, und die meso-Form R,S-EDDS.

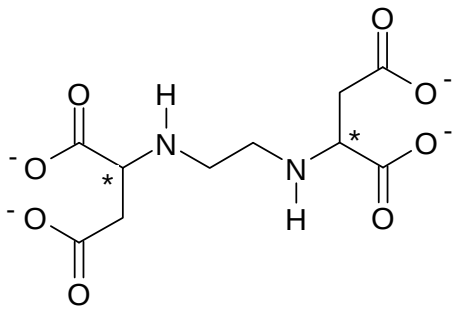


Abb. 1-8 Strukturformel des Ethylendiamindisuccinat (EDDS), die asymmetrischen C-Atome sind durch Sternchen gekennzeichnet.

Bei der chemischen Synthese von EDDS aus Maleinsäureanhydrid und Ethylendiamin (Kezerian & Ramsey, 1964; Hartmann & Perkins, 1987) entsteht eine Isomerenmischung mit folgender Zusammensetzung: 25% S,S-EDDS, 25% R,R-EDDS und 50% R,S-EDDS. Interessanterweise wird S,S-EDDS durch den Actinomycetenstamm *Amycolatopsis japonicum* synthetisiert (Nishikiori et al., 1984; Goodfellow et al., 1997). Ein natürliches Vorkommen der anderen Isomere wurde bisher nicht nachgewiesen. Erwartungsgemäß wird das S,S-EDDS Isomer biologisch mineralisiert. Der Abbau von R,S-EDDS führt zu einem dead-end Metaboliten, wahrscheinlich (D)-N`-Aminoethylaspartat, und R,R-EDDS ist persistent (Schowanek et al., 1997). Die initiale Transformation von S,S-EDDS wurde im Stamm DSM 9103 von Witschel & Egli (1998) untersucht. Dabei katalysierte eine kofaktorunabhängige C-N Lyase die Transformation von S,S-EDDS zu (L)-N`-Aminoethylaspartat und Fumarat. Die Befunde legen also nahe, dass nur das S,S-EDDS als umweltfreundliche Alternative zu den klassischen Komplexbildnern betrachtet werden kann. Eine Synthese von enantiomerenreinem S,S-EDDS kann relativ teuer aus L-Aspartat und 1,2-Dibromethan durchgeführt werden (Neal & Rose, 1968). Die Synthese ist nicht nur ökonomisch sondern auch ökologisch nachteilig, da bei der Reaktion Bromwasserstoff freigesetzt wird und entsorgt werden muss. Aus diesem Grund wird ein biotechnologisches Verfahren zur Produktion von isomerenreinem S,S-EDDS mit verschiedenen *Amycolatopsis* Gattungen angestrebt (Zwicker et al., 1997; Stegmann et al., 1999).

1.5 Iminodisuccinat

Eine weitere Alternative ist das synthetische D,L-Aspartat-N-(1,2-dicarboxyethyl), namentlich bekannt unter Iminodisuccinat (IDS). Das IDS besitzt analog dem EDDS zwei asymmetrische C-Atome und kommt daher in 3 verschiedenen Stereoisomeren, S,S-IDS, R,R-IDS und als meso-Form R,S-IDS, vor. Die gebräuchliche Bezeichnung Iminodisuccinat ist ein wenig verwirrend, da keine Iminogruppe, sondern in Wirklichkeit ein sekundäres Amin vorliegt (vgl. Abb. 1-9).

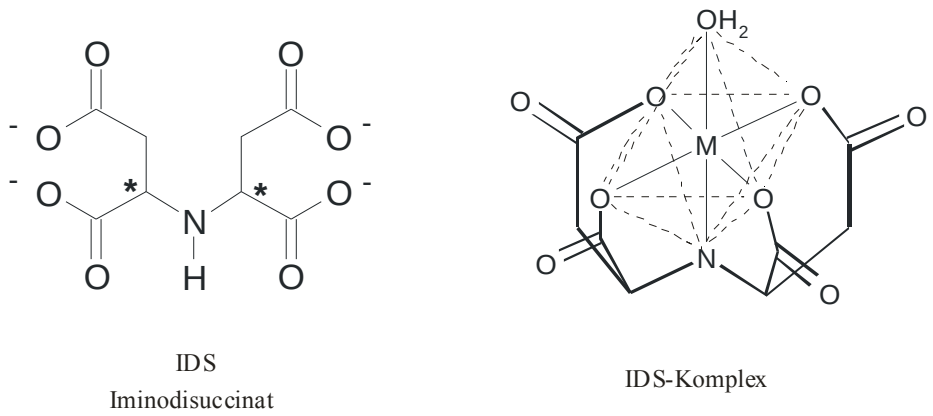


Abb. 1-9 Strukturformel des Iminodisuccinat und die oktaedrische Struktur eines Metall-IDS Komplexes. Die asymmetrischen C-Atome sind durch Sternchen gekennzeichnet.

Die chemische Synthese von IDS erfolgt aus den Rohstoffen Wasser, Maleinsäureanhydrid, Natronlauge und Ammoniak in einem von der Bayer AG patentierten umweltfreundlichen Prozess mit geschlossenen Stoffströmen (EPA, 2002). Es wird als entsprechendes Natriumsalz mit der Handelsbezeichnung Baypure CX™ vermarktet. Diese technische Isomerenmischung enthält 50% R,S-IDS, 25% S,S-IDS und 25% R,R-IDS.

Das IDS kann mit Metallionen einen fünffach koordinierten Komplex eingehen. Für die oktaedrische Form der vollständigen Komplexstruktur wird ein Wassermolekül zusätzlich in der sechsten Koordinationsstelle benötigt (Abb. 1-9). Die fünf Liganden des IDS, die als Elektronendonator wirken können, sind die vier Carboxylatgruppen und der Stickstoff. Das Metallion und die Liganden des IDS bilden 4 Chelatringe. Aus Tabelle 1-2 entnimmt man, dass EDTA unabhängig von den Metallionen der stärkste Komplexbildner ist, während IDS, EDDS und NTA geringere, aber untereinander vergleichbare Komplexierungseigenschaften besitzen. Das IDS kann demzufolge nur

dann als EDTA-Substitut eingesetzt werden, wenn die schwächeren Bindungseigenschaften gegenüber Metallionen in Kauf genommen werden können.

Tab. 1-2 Komplexbildungskonstanten der Amino-polycarboxylate IDS, EDDS, EDTA und NTA mit verschiedenen Metallionen.

	pK Komplexbildungskonstante			
Metallion	**IDS**	**EDDS**	**EDTA**	**NTA**
Mg^{2+}	6	5.8	8.7	5.5
Ca^{2+}	6.7	4.2	10.7	6.4
Mn^{2+}	7.3	9	13.8	7.5
Fe^{2+}	8.2		14.3	8.3
Fe^{3+}	16.1	22	25.1	15.9
Cu^{2+}	14.3	18.3	18.8	12.9
Zn^{2+}	13	13.5	16.5	10.7
Cd^{2+}	13.5	10.8	16.5	9.8

Die Werte gehen aus Jander & Blasius (1990), Martell & Smith (1974) und der Bayer Broschüre (1998) hervor.

Das Einsatzgebiet von IDS ist trotz dieser Einschränkung umfangreich. Es findet Anwendung in Produkten des täglichen Bedarfs wie Oberflächen- und Sanitärreiniger, Wasch- und Geschirrspülmittel, Shampoos, Duschgels und Cremes, außerdem in großtechnischen Prozessen wie beispielsweise der Textil- und Papierherstellung, der Fotoindustrie sowie zur Herstellung von Spurennährstoffdüngern für den landwirtschaftlichen Einsatz.

Das IDS zeigt eine geringe Remobilisierungsrate für Schwermetalle, keine mutagenen Effekte und ein gutes ökotoxikologisches Gesamtprofil (Bayer, 1998). Biologische Abbauuntersuchungen zu technischem IDS (Bayer Broschüre, 1998) zeigte im OECD 302B Test (Zahn-Wellens Test) nach 28 Tagen eine DOC-Abnahme von 89% und im OECD 301E Test (modifizierter OECD-Screening Test) nach 28 Tagen eine DOC-Abnahme von 79%.

Reinecke et al. (2000) beschrieben erstmals IDS-abbauende Bakterienstämme, die bezüglich der Stereoisomeren wahrscheinlich unterschiedliche Abbaugeschwindigkeiten besitzen. Es wurde vermutet, dass das R,R-IDS Isomer am langsamsten abgebaut wird. Zwei Abbauwege wurden von Reinecke et al. für das IDS postuliert: Eine Spaltung mit Hilfe einer Monooxygenase in die Produkte Fumarat und Oxalacetat, ähnlich dem

EDTA-Abbau (Witschel et al., 1997). Zum Zweiten eine lyaseabhängige Spaltung, ähnlich dem EDDS-Abbau (Witschel et al., 1998), die zu den Abbauprodukten Fumarat und Aspartat führt.

In Anbetracht dieser unvollständigen Ergebnisse stellte sich zunächst die Frage nach dem tatsächlichen Abbauweg sowie der biologischen Abbaubarkeit der einzelnen Stereoisomere von IDS. Besonders interessant ist hierbei das Abbauverhalten des R,R-IDS Isomers. Verhält es sich wie das vergleichbare aber persistente R,R-EDDS, oder kann doch ein mikrobieller Abbau nachgewiesen werden, wie man es aus den veröffentlichten Ergebnissen der OECD-Testverfahren erwarten würde (Bayer Broschüre, 1998) .

Eine wesentliche Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist eine detaillierte Beantwortung dieser Fragestellungen.

2 Der mikrobielle Abbau von IDS

2.1 Respirometertest

Die Abbauuntersuchungen nach dem Standardtestverfahren der OECD (Respirometertest 301F) ergaben, bedingt durch den jeweils eingesetzten Belebtschlamm als Inokulum, ein divergentes Bild.

Mit dem Belebtschlamm aus der gemischten kommunalen/industriellen Kläranlage Leverkusen-Bürrig wurde ein vollständiger Abbau der technischen IDS-Isomerenmischung sowie jedes einzelnen Isomeres innerhalb der 28-tägigen Testperiode ermittelt (Anhang 2). Demzufolge wurde das IDS als biologisch leicht abbaubar eingestuft. Für eine endgültige Beurteilung des Abbauverhaltens sind besonders die IDS-Komplexe zu berücksichtigen, da sie vorwiegen in der Natur vorliegen. Die biologische Abbaubarkeit wurde mit einer Auswahl von Metall-IDS Komplexen, im Einzelnen Ca^{2+}-, Fe^{2+}-, Mn^{2+}- und Cu^{2+}-IDS, nach dem Respirometertest 301F mit Belebtschlamm aus der Kläranlage Leverkusen-Bürrig durchgeführt. Die Anforderung für leichte biologische Abbaubarkeit liegt beim Respirometertest 301F bei 60% Sauerstoffzehrung innerhalb der 28-tägigen Testperiode. Fe^{2+}- und Ca^{2+}-IDS erfüllten das Kriterium der leichten biologischen Abbaubarkeit, während Mn^{2+}- und Cu^{2+}-IDS innerhalb von 28 Tagen eine theoretische Sauerstoffzehrung von 55 bzw. 40% aufwiesen (Anhang 2). Für Cu^{2+} ist eine stark wachstumshemmende Wirkung bekannt. Kupfer bindet in den Zellen an die freien Thiolgruppen von Enzymen (Schlegel, 1992). Es könnte daher die Mikroorganismenpopulation negativ beeinflusst haben. In der Praxis stellt der geringe Abbaugrad von Mn^{2+}- und Cu^{2+}-IDS vermutlich kein Problem dar, weil in Abwässern mit verschiedenen Metallionen auch die Umkomplexierung eine Rolle spielt.

Des Weiteren wurde beobachtet, dass im Verlaufe des Abbautests im Falle von Cu^{2+}-IDS, Mn^{2+}-IDS und Fe^{2+}-IDS die entsprechenden Metallhydoxide in der Testlösung ausgefallen waren. Diese Beobachtung deutet daraufhin, dass nur das im Gleichgewicht vorliegende “freie” IDS von der Zelle aufgenommen wird und das freie Metallion schließlich als Hydroxid präzipitiert. Vergleichbare Untersuchungen liegen zur Aufnahme des Komplexbildners EDTA vor (Witschel et al., 1999). Sie belegen, dass das “freie” EDTA und nur die Erdalkali-EDTA-Komplexe mit entsprechend geringen Komplexbildungskonstanten von den Zellen direkt aufgenommen werden,

während EDTA-Komplexe assoziiert mit Schwermetallionen nicht in die Zelle eindringen können.

Weitere Abbauuntersuchungen wurden mit dem Belebtschlamm aus der kommunalen Kläranlage Stuttgart-Büsnau durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass die technische Isomerenmischung ebenso das Kriterium der leichten biologischen Abbaubarkeit erfüllte, aber mit einer effektiven theoretischen Sauerstoffzehrung von nur 65% innerhalb der 28-tägigen Testperiode (Anhang 1). Dieser geringere Abbauwert resultierte aus der unterschiedlichen Abbaubarkeit der IDS-Isomere. Die differenzierte Betrachtung zeigte, dass das R,S- und S,S-IDS biologisch leicht abbaubar waren. Dagegen wurde das R,R-IDS mit dem Belebschlamm aus Stuttgart-Büsnau nicht abgebaut.

Zusammenfassend waren R,S- und S,S-IDS unabhängig vom verwendeten Inokulum biologisch leicht abbaubar, während die Abbauergebnisse mit R,R-IDS sich uneinheitlich präsentierten. Möglicherweise ist die unterschiedliche Belastung der beiden Kläranlagen mit IDS-haltigem Abwasser und einer dementsprechenden Präadaptation der Belebtschlammpopulation die Ursache für den unterschiedlichen Abbau von R,R-IDS.

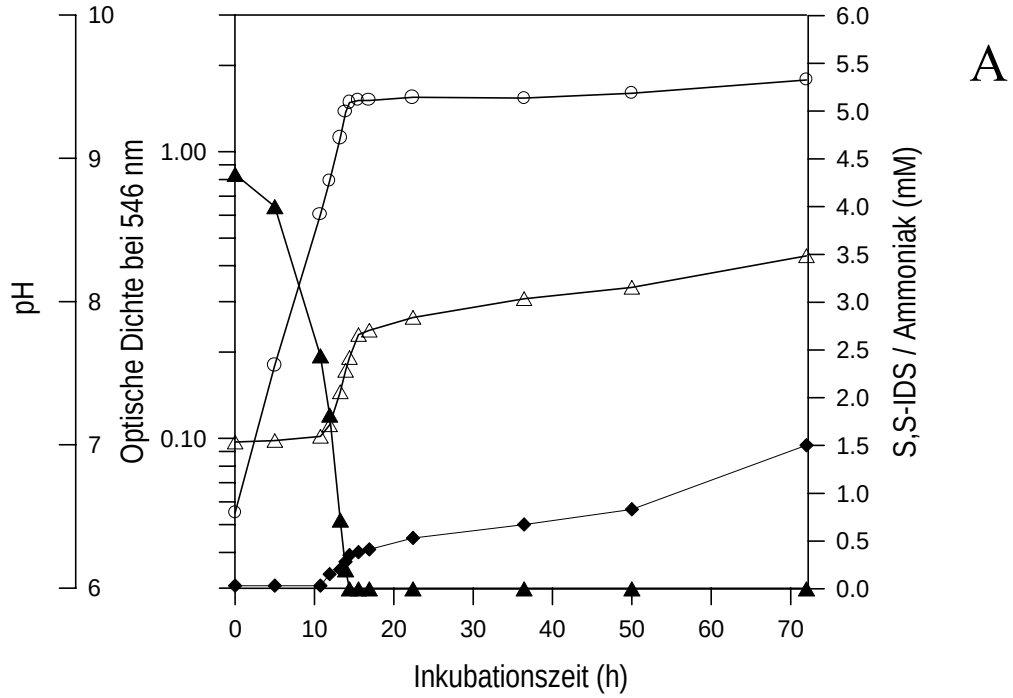
Um die initialen Abbauwege des IDS aufzudecken, wurden aus beiden Belebtschlamm-populationen Kulturen angereichert, die mit IDS bzw. nur mit R,R-IDS als einziger Stickstoff-, Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen konnten. Ein R,R-IDS verwertender Stamm, *Agrobacterium tumefaciens* BY6, wurde aus dem Belebtschlamm Leverkusen-Bürrig angereichert und isoliert. Erfreulicherweise hatte dieser Stamm auch die Fähigkeit alle Isomere des IDS zu metabolisieren. Aus dem Belebtschlamm Stuttgart-Bürrig wurden einige Stämme mit dem technischen IDS angereichert und isoliert. Der Stamm *Ralstonia* sp. SLRS7 wurde aufgrund seiner guten Wachstumsrate auf IDS repräsentativ für die Untersuchungen ausgewählt. Dieser konnte die beiden Isomere R,S-IDS und S,S-IDS mineralisieren. Die Deklaration der beiden Stämme erfolgte aufgrund der Sequenzähnlichkeit der 16S-rRNA (Anhang 4) mit Stämmen aus der Gattung *Agrobacterium* bzw. *Ralstonia*.

2.2 Wachstum von *A. tumefaciens* BY6 und *R.* sp. SLRS7 mit IDS und unterschiedlichen Metall-IDS Komplexen als Substrat

Um den Abbau genauer zu charakterisieren, wurden Wachstumskurven von *R.* sp. SLRS7 und *A. tumefaciens* BY6 mit den verschiedenen Isomeren als einziger Stickstoff-, Kohlenstoff- und Energiequelle ermittelt. Der Stamm *R.* sp. SLRS7 wächst in Mineralsalzmedium mit den Substraten R,S-IDS bzw. S,S-IDS mit einer Verdopplungszeit von 3,7 h bzw. 3,5 h bei einer Inkubationstemperatur von 23°C. Im Vergleich dazu betragen die Verdopplungszeiten für den Stamm *A. tumefaciens* BY6 mit dem Substrat R,S-IDS 3 h, S,S-IDS 3,3 h und R,R-IDS 3,8 h. In Verbindung mit der Stickstoffbilanzierung wurde festgestellt, dass beide Stämme ca. 30 ± 5% des eingesetzten IDS-Stickstoffs in Form von Ammoniak ins Medium abgeben und demzufolge ein Anstieg des pH-Wertes während des Wachstums zu beobachten war (vgl. Abb. 2-1). Ergänzend wurde das Wachstum mit erhöhten Substratkonzentrationen von bis zu 100 mM IDS untersucht. Dabei erfolgte eine Verwertung aus dem oben genannten Grund nur unter pH-kontrollierten Bedingungen (pH 7,0-8,5).

Ferner wurden Wachstumsversuche mit unterschiedlichen Metall-IDS Komplexen als einziger Stickstoff-, Kohlenstoff- und Energiequelle durchgeführt. Im Falle von *R.* sp. SLRS7 wurden die Metalle mit dem abbaubaren S,S-IDS komplexiert. Beide Stämme waren in der Lage, die Substrate Ca^{2+}-IDS, Mg^{2+}-IDS und Fe^{2+}-IDS innerhalb von 3 Tagen vollständig zu verwerten. Dagegen wurde mit Cu^{2+}-IDS bzw. Cu^{2+}-S,S-IDS nur 25 bis 30% Abbau innerhalb von 10 Tagen festgestellt. Hinsichtlich der Verwertung von Mn^{2+}-IDS unterschieden sich die beiden Stämme. *R.* sp. SLRS7 konnte Mn^{2+}-S,S-IDS innerhalb von 3 Tagen vollständig mineralisieren, *A. tumefaciens* BY6 benötigte dagegen für einen 75%igen Abbau schon 10 Tage (Anhang 1 & 2).

Bezüglich der Abbaubarkeit der verschiedenen Metall-IDS Komplexen korrelieren die Ergebnisse zwischen dem Stamm *A. tumefaciens* BY6 und den biologischen Abbauuntersuchungen mit dem Belebtschlamm aus Leverkusen-Bürrig.



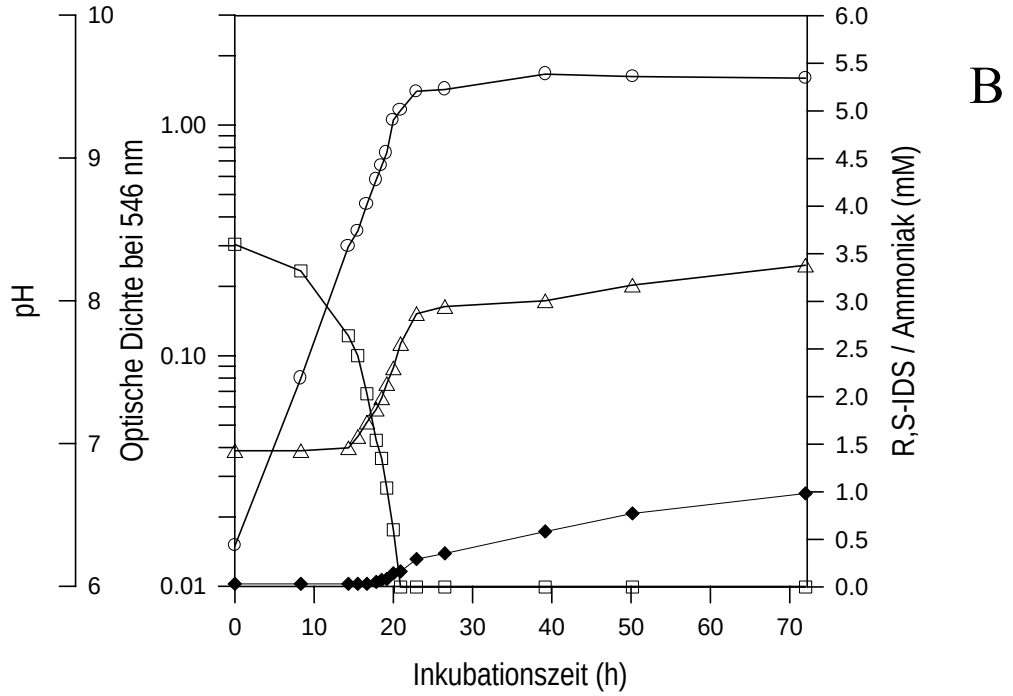


Abb. 2-1 Wachstum von *A. tumefaciens* BY6 bei 23°C mit S,S-IDS (A) oder R,S-IDS (B) als einziger Stickstoff-, Kohlenstoff-, und Energiequelle. A: 3,6 mM Anfangskonzentration von S,S-IDS (▲), B: 4,4 mM Anfangskonzentration von R,S-IDS (□), optische Dichte (○), pH (○) und Ammoniak (◆). Wachstum von *A. tumefaciens* BY6 mit R,R-IDS als Substrat vgl. Anhang 2. Wachstum von *R.* sp. SLRS7 mit R,S-IDS oder S,S-IDS als Substrat vgl. Anhang 1.

2.3 Umsatzversuche mit ganzen Zellen

Die Frage, die sich anschloss, war die nach der Umsetzung der verschiedenen IDS-Isomere im Gemisch. Ganze Zellen von *R.* sp. SLRS7 wurden mit einer anteiligen Mischung aus R,S-IDS und S,S-IDS inkubiert. Dabei wurde beobachtet, dass die beiden Isomere gleichzeitig aber mit unterschiedlichen Raten umgesetzt werden (Anhang 1). S,S-IDS wurde um einen Faktor von etwa 2 schneller als R,S-IDS umgesetzt. Geht man für die Isomere von einer ungehinderten, gleichschnellen Diffusion durch die Zellmembran aus, so könnten die unterschiedlichen Umsatzgeschwindigkeiten einen rein statistischen Hintergrund haben. Wenn das IDS-umsetzende Enzym im aktiven Zentrum nur das S-konfigurierte C-Atom des IDS bindet, ansonsten aber gegenüber dem Gesamtmolekül keine Unterscheidung macht, dann sollte S,S-IDS rein statistisch schneller umgesetzt werden als R,S-IDS (vgl. Kap. 2.4.1).

Im Unterschied dazu stellte sich mit ganzen Zellen von *A. tumefaciens* BY6, die mit R,S- und S,S-IDS gemeinsam inkubiert wurden, eine andere Selektivität des Umsatzes dar (Anhang 2). Hier wurde das R,S-IDS bevorzugt umgesetzt und erst nach dessen überwiegendem Verbrauch erfolgte eine signifikante Abnahme des S,S-IDS. Durch erneute Zugabe von R,S-IDS in der Phase des maximalen Umsatzes von S,S-IDS wurde dieser gehemmt und der Umsatz von R,S-IDS dominierte erneut. Eine entsprechende Beobachtung ergab sich für das Substratgemisch R,S- und R,R-IDS (Anhang 2).

Die in vivo durchgeführten Kompetitionsexperimente sollten in vitro mit reinen Enzymen genauer analysiert werden.

2.4 Anreicherung, Identifizierung und Charakterisierung der in den IDS-Abbau involvierten Enzyme

2.4.1 Eine C-N Lyase aus *R.* sp. SLRS7

Die ersten Aufreinigungsversuche eines IDS-abbauenden Enzyms erfolgten mit dem Stamm *R.* sp. SLRS7. Dabei wurden die auf IDS gewachsenen Zellen aufgeschlossen und mittels FPLC (fast-protein liquid chromatography) unter Verwendung eines Anionenaustauschers, einer Hydrophoben Interaktionschromatographie und einer Gelfiltration angereichert (Anhang 1). Das zur Homogenität gereinigte Enzym zeigte in einem SDS-Polyacrylamidgel eine Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von 57 kDa. Die analytische Gelfiltration ergab ein natives Molekulargewicht von 240 kDa, welches auf ein homotetrameres Enzym schließen lässt. Die C-N Lyase katalysiert kofaktorunabhängig die Transformation von IDS zu Fumarsäure und Asparaginsäure. Aus S,S-IDS entsteht L-Asparaginsäure, aus R,S-IDS nur D-Asparaginsäure. Demnach erfolgt, wie erwartet, die C-N Spaltung am S-konfigurierten C-Atom, die "R-Konfiguration" bleibt unberührt. Das Enzym kann gemäß dieser Reaktion in die Gruppe der Amin-Lyasen (EC 4.3.3) eingeordnet werden. Die katalytische Reaktion erwies sich als reversibel. Die Gleichgewichtskonstanten K_c betrugen 120×10^{-3} für S,S-IDS und 81×10^{-3} für R,S-IDS. Die Berechnung der Werte erfolgte nach der Gleichung K_c=c(Fumarsäure)^2/c(IDS). Das Gleichgewicht liegt somit weit auf der Seite der Produkte Fumarsäure und L- bzw. D-Asparaginsäure.

Der initiale Abbauweg ist in Abb. 2-2 schematisiert. Die Produkte L-Asparaginsäure und Fumarsäure werden in die üblichen Stoffwechselwege des Organismus eingeschleust. Die Freisetzung von Ammoniak während des Wachstums auf IDS beruht wahrscheinlich auf einer Desaminierungsreaktion mit einer Aspartase, die aus L-Asparaginsäure Fumarsäure und Ammoniak freisetzt.

Die D-Asparaginsäure wird vermutlich von den Zellen zum Aufbau der Zellwand benutzt. Überschüssige D-Asparaginsäure könnte durch eine Aminosäure-Racemase in den Stoffwechselweg der L-Asparaginsäure eingeschleust werden.

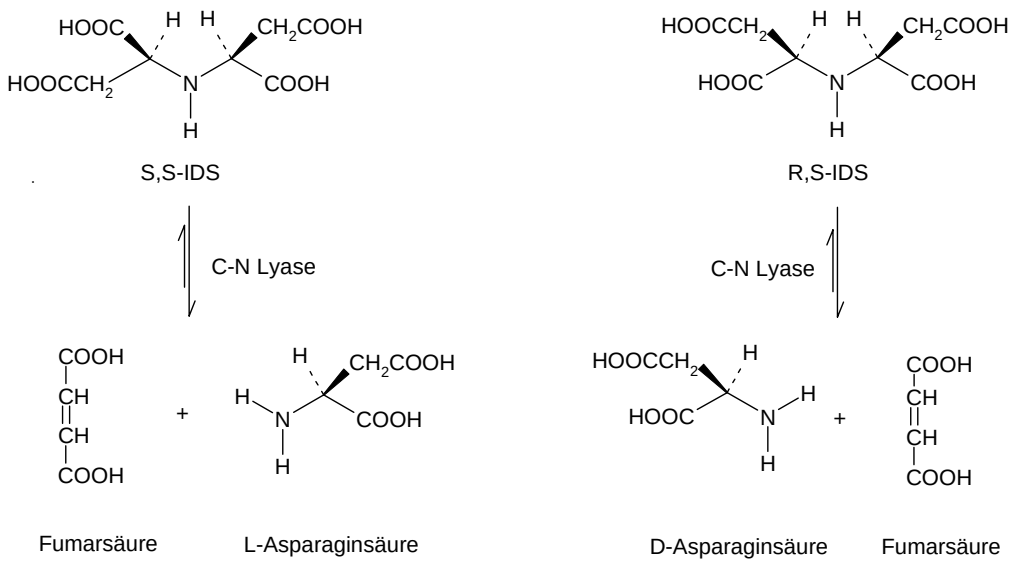


Abb. 2-2 Initialer Abbau von R,S-IDS und S,S-IDS in *Ralstonia* sp. SLRS7

Das für die C-N Lyase kodierende Gen wurde von Bäuerle (2003) partiell sequenziert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte hohe Ähnlichkeit zu verschiedenen als Argininosuccinat-Lyasen beschriebenen Proteinen. Die C-N Lyase transformierte mit geringer Aktivität Argininosuccinat unter Bildung von L-Arginin und Fumarat. Die relative Aktivität der Lyase zum Argininosuccinat entsprach 1% bezogen auf R,S-IDS (Bäuerle, 2003).

Die C-N Lyase ist im Bereich von pH 6.0 bis 11.5 aktiv, mit einem Aktivitätsoptimum bei pH 8,0 bis 8.5. Das Temperaturoptimum der Lyase-Aktivität betrug 35°C. Der K_m-Wert (Michaelis-Konstante) für die C-N Lyase mit S,S-IDS und R,S-IDS als Substrat wurde zu 2,5 ± 0,5 mM bzw. 1,0 ± 0,25 mM bestimmt. Die Wechselzahlen (k_{cat}) erreichten Werte von 79 s^{-1} (S,S-IDS) und 49 s^{-1} (R,S-IDS). Vermutlich begründet sich die höhere Wechselzahl des S,S-IDS mit der Tatsache, dass die räumliche Ausrichtung zur Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes für das Substrat S,S-IDS günstiger ist, da es von zwei Seiten an das Enzym binden kann. Die höhere Wechselzahl des S,S-IDS entspricht der in vivo erkannten höheren Umsatzgeschwindigkeit des S,S-IDS mit ganzen Zellen von *R.* sp. SLRS7 (vgl. Kap. 2.3).

Zur Bestimmung des katalytischen Potenzials der Lyase wurden verschiedene Aminopolycarboxylate und Metall-S,S-IDS Komplexe als Substrate verglichen. Die C-N Lyase zeigte mit den Erdalkalimetallkomplexen Ca^{2+}- und Mg^{2+}-S,S-IDS eine relative Aktivität zum S,S-IDS von 63,5 bzw. 37%. Für das Mn^{2+}-S,S-IDS wurde nur noch eine relative Aktivität von 1% gemessen. Nicht umgesetzt wurden die

Schwermetallkomplexe Fe^{3+}-, Fe^{2+}-, Zn^{2+}-, und Cu^{2+}-S,S-IDS. Die Ergebnisse kann man dahingehend interpretieren, dass nur Metall-IDS Komplexe mit pk-Werten unter 8 der Enzymkatalyse (vgl. Tab. 1-2) unterliegen. Inwiefern nur das im Gleichgewicht vorliegende "freie" IDS und nicht die komplexierte Form als Enzymsubstrat Verwendung findet, konnte nicht ermittelt werden. In der Annahme, dass nur "freies" IDS von der C-N Lyase konvertiert wird, sollten die Schwermetallkomplexe zumindest eine geringfügige Aktivität aufweisen. Dies ist aber nicht der Fall. Wahrscheinlich verändern die komplexierten Schwermetallionen die räumliche Anordnung der IDS-Liganden in der Weise, dass keine Enzymbindung mehr stattfinden kann. Zudem kann auch eine Enzymhemmung durch die im Gleichgewicht vorliegenden freien Schwermetallionen, vor allem Cu^{2+}-Ionen, diskutiert werden.

Die C-N Lyase katalysierte die Spaltung von S,S-EDDS mit einer relativen Aktivität zum S,S-IDS von 1,4% unter Bildung von Fumarat und (L)-N`-Aminoethylaspartat. R,S-EDDS und R,R-EDDS standen in isomerenreiner Form nicht zur Verfügung. Man kann aber davon ausgehen, dass auch R,S-EDDS am S-konfigurierten C-Atom gespalten werden kann.

Anzumerken ist, dass das Wachstum von *R.* sp. SLRS7 mit Fe^{2+}-S,S-IDS als einziger Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle ohne weiteres möglich ist, obwohl die C-N Lyase keine Aktivität gegenüber Fe^{2+}-S,S-IDS aufwies. Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme, dass die Zellen nur das "freie" IDS aufnehmen. Trotzdem kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass die Metall-IDS Komplexe aufgenommen werden und der Überschuss an Metallionen von den Zellen ausgeschleust wird.

2.4.2 Eine stereoselektive C-N Lyase aus *A. tumefaciens* BY6

Um den Abbauweg aller IDS-Isomere im Stamm *A. tumefaciens* BY6 zu klären, wurde der zellfreie Extrakt von mit IDS gewachsenen Zellen durch Anionenaustauscher-chromatographie fraktioniert. Eine dieser Einzelfraktionen (A) besaß Abbauaktivität gegenüber R,S-IDS. Dagegen konnte in keiner der Einzelfraktionen eine signifikante C-N spaltende Aktivität für S,S- und R,R-IDS gefunden werden. Erst als 2 bestimmte Einzelfraktionen A und B vereinigt wurden, konnte auch für die letztgenannten Enantiomere eine Umsetzung zu Fumarsäure und Asparaginsäure beobachtet werden. Die Fraktionen wurden wie folgt weiter untersucht.

Als Erstes wurde aus der R,S-IDS-abbauenden Fraktion (A) mittels FPLC wiederum eine C-N Lyase aufgereinigt (Anhang 2). Die SDS-PAGE ergab ein apparentes Molekulargewicht von ca. 57 kDa (Abb. 2-3). Die analytische Gelfiltration ergab ein natives Molekulargewicht von 260 kDa, welches auf eine homotetramere Quartärstruktur schließen lässt.

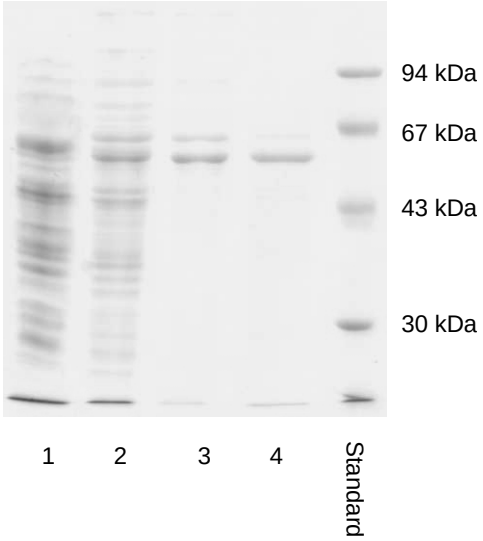


Abb. 2-3 SDS-PAGE. Anreicherung der C-N Lyase aus *A. tumefaciens* BY6. Bahnen: Rohextrakt (1); nach Ultrazentrifugation (2), Anionenaustauscherchromatographie (3), Hydrophobe-Interaktionschromatographie (4). Standard: Low Molecular Weight Calibration Kit (Amersham Pharmacia Biotech).

Die C-N Lyase wandelte das R,S-IDS Isomer reversibel zu Fumarsäure und D-Asparaginsäure um. L-Asparaginsäure als Abbaumetabolit wurde nicht identifiziert. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Spaltung ausschließlich zwischen dem S-konfigurierten Kohlenstoff und dem Stickstoff erfolgen muss. Folglich wird auch die Spaltung von R,R-IDS nicht katalysiert. Obwohl in der R,S-IDS-abbauenden

Einzelfraktion kein signifikanter Abbau des S,S-IDS beobachtet wurde, zeigte die angereicherte C-N Lyase trotzdem die Fähigkeit S,S-IDS enzymatisch umzusetzen. Jedoch betrug die relative Aktivität zum R,S-IDS nur 2,5%. Als Produkte wurden Fumarsäure und L-Asparaginsäure nachgewiesen.

Ein Vergleich der C-N Lyasen aus *A. tumefaciens* BY6 und *R.* sp. SLRS7 zeigte viele Ähnlichkeiten. Beide Enzyme können die C-N Bindung des IDS nur an einem S-konfigurierten C-Atom spalten. Sie weisen eine homotetramere Organisation der Enzymunterheiten auf. Dabei entsprechen sich das apparente Molekulargewicht, das pH- und das Temperaturoptimum. Daneben ähneln sich die Lyasen auch in der enzymatischen Umsetzung der Metall-IDS Komplexe.

Ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal der beiden C-N Lyasen ist die relative Aktivität zum R,S- und S,S-IDS. Die C-N Lyase aus *A. tumefaciens* BY6 ist stereoselektiv für das Substrat R,S-IDS, da sie nur mit einer geringfügigen Aktivität die Spaltung von S,S-IDS katalysiert. Im Vergleich dazu beschränkt sich die Stereospezifität der C-N Lyase aus *R.* sp. SLRS7 auf die S-Konfiguration eines C-Atoms des IDS, unabhängig von der Konfiguration am zweiten asymmetrischen C-Atom. Sie kann sogar S,S-EDDS umsetzen. Im Gegensatz dazu kann die C-N Lyase aus *A. tumefaciens* BY6 keine EDDS-Isomere transformieren.

Die untersuchten Eigenschaften der beiden IDS-spaltenden C-N Lyasen sowie einer bekannten EDDS-spaltenden C-N Lyase (Witschel & Egli, 1998) sind in Tabelle 2-1 zusammengefasst.

Tab. 2-1. Vergleich aller bekannten C-N Lyasen, die Komplexbildner aus der Gruppe der Aminopolycarboxylate umsetzen können.

	C-N Lyase aus *A. tumefaciens* BY6 (Anhang 2)	C-N Lyase aus *R.* sp. SLRS7 (Anhang 1)	C-N Lyase aus dem Stamm DSM 9103 (Witschel & Egli, 1998)
Klassifizierung	E.C. 4.3.3 (Amin-Lyase)	E.C. 4.3.3	E.C. 4.3.3
Hauptaktivität der C-N Lyase	R,S-IDS	S,S-IDS R,S-IDS	S,S-EDDS, R,S-EDDS
Nebenaktivität der C-N Lyase	S,S-IDS	S,S-EDDS	keine Angabe
Größe im SDS-Gel Größe nativ	57 kDa 260 kDa	57 kDa 240 kDa	58 kDa 130 kDa
Struktur	homotetramer	homotetramer	homodimer
pH-Optimum	8-8,5	8-8,5	7.5
Temperaturoptimum	35-40°C	35°C	45-50°C
Gleichgewichts-konstante K_c	90×10^{-3} (R,S-IDS)	120×10^{-3} (S,S-IDS) 81×10^{-3} (R,S-IDS)	keine Angabe
Isoelektrischer Punkt	5,95	5,4	keine Angabe
K_m-Wert	1,0±0,2 mM (R,S-IDS)	2,5±0,5 mM (S,S-IDS) 1,0±0,25 mM (R,S-IDS)	0,2±0,02 mM (S,S-EDDS)
Kofaktor	nein	nein	nein
Aktivität gegen die Metallkomplex	Ca^{2+}, Mg^{2+} gut Mn^{2+} mäßig	Ca^{2+}, Mg^{2+} gut Mn^{2+} mäßig	Erdalkali-Ionen gut Mn^{2+} mäßig
Nicht umsetzbare Metallkomplexe	Zn^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}	Zn^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}	Zn^{2+},Co^{2+},Ni^{2+},Cu^{2+}, Fe^{2+}
Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz	Argininosuccinat-Lyasen	Argininosuccinat-Lyasen	keine Angabe
Aktivität gegenüber Argininosuccinat	nein	ja	keine Angabe

2.4.3 Eine Epimerase aus *A. tumefaciens* BY6

Im Anschluss an die Untersuchung zur stereoselektiven C-N Lyase aus *A. tumefaciens* BY6, die wie oben beschrieben die Komponente A der initialen Aktivität des IDS Abbaus darstellte, wurde anschließend Komponente B untersucht. Nur im Zusammenspiel von Komponente A und B konnte ein Abbau von R,R-IDS beobachtet werden. Die Erklärung bestand überraschend darin, dass die Fraktion B keine Spaltung von R,R-IDS sondern eine Isomerisierung von R,R-IDS zum R,S-IDS katalysierte.

Das bis zur Homogenität aufgereinigte isomerisierende Enzym zeigte im SDS-Polyacrylamidgel ein apparentes Molekulargewicht von 48 kDa (Abb. 2-4). Die analytische Gelfiltration ergab für das native Enzym ein Molekulargewicht von 170 kDa. Somit deutet sich eine homotetramere Enzymstruktur an.

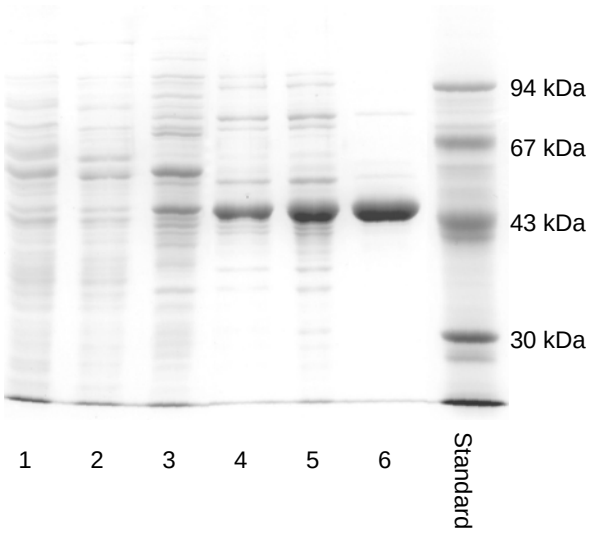


Abb. 2-4 SDS-PAGE. Anreicherung der Epimerase aus *A. tumefaciens* BY6. Bahnen: Rohextrakt (1); nach Ultrazentrifugation (2), Anionenaustauscherchromatographie (3), Hydrophobe-Interaktionschromatographie (4), Gelfiltration (5) aufgereinigtes Protein nach der Hydroxyapatit-Säule (6). Standard: Low Molecular Weight Calibration Kit (Amersham Pharmacia Biotech).

Das isomerisierende Enzym wird bedingt durch die zwei asymmetrischen C-Atome des IDS als Epimerase klassifiziert. Weitere Aktivitätsuntersuchungen zeigten, dass die Epimerase neben dem R,R-IDS auch das S,S-IDS in R,S-IDS umwandeln kann. Das ermittelte pH- und Temperaturoptimum betrug 8.5 und 35°C. Unter diesen Bedingungen stellte sich im Gleichgewicht, unabhängig vom eingesetzten IDS-Isomer, folgendes prozentuales Verhältnis ein: 55,5% R,S-IDS, 27,8% S,S-IDS und 16,7% R,R-IDS (Abb. 2-5). Die Messung der spezifischen Enzymaktivitäten ergab, dass

S,S-IDS am schnellsten epimerisiert wurde, nahezu doppelt so schnell wie R,R-IDS und sogar zehnmal so schnell wie R,S-IDS (Anhang 2).

Zweifellos ist die identifizierte Epimerase das Schlüsselenzym für den Abbau des R,R-IDS Isomers. Sie leitet die Isomere R,R-IDS und S,S-IDS in den stereoselektiven Abbau des R,S-IDS ein (Abb. 2-5). Vergleichbare Enzymsysteme, die auf diese Art alle Stereoisomere einer Substanz abbauen können, sind in der Literatur nicht zu finden.

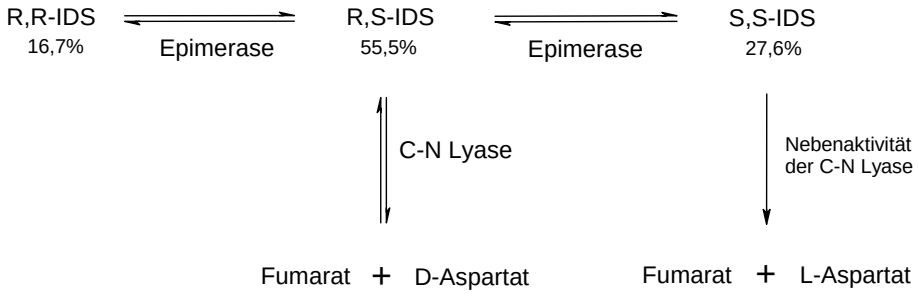


Abb. 2-5 Initialer Abbau der IDS Isomere in *A. tumefaciens* BY6 unter Einbeziehung einer Epimerase und einer stereoselektiven C-N Lyase.

Es stellte sich natürlich die Frage des katalytischen Potenzials der Epimerase gegenüber anderen Substraten, insbesondere bezüglich des Strukturanalogen S,S-EDDS. Eine enzymatische Epimerisierung des S,S-EDDS Isomers konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Bezüglich der Transformation verschiedener Metall-IDS Komplexe zeigte sich das gewohnte Bild. Die Epimerase zeigte mit den Erdalkalimetall-IDS Komplexen Ca^{2+}-, Ba^{2+}- und Mg^{2+}-R,R-IDS eine relative Aktivität von 98%, 83% und 44% bezogen auf R,R-IDS. Im Vergleich dazu erfolgte die Epimerisierung der Schwermetall-IDS Komplexe nur sehr langsam (Mn^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}) oder überhaupt nicht (Zn^{2+}, Cu^{2+}).

Um die Epimerisierungsreaktion hinsichtlich des zu Grunde liegenden Mechanismus zu charakterisieren, wurden basierend auf der Strukturähnlichkeit des IDS zu Aminosäuren (z.B. Asparaginsäure), verschiedene Aminosäure-Racemasen verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Racemasen in kofaktorabhängige und -unabhängige klassifiziert werden können. Als Kofaktor fungiert meistens Pyridoxalphosphat (PLP). Die Racemisierung erfolgt hierbei über eine Schiffsche Base, die aus der α-Aminogruppe der Aminosäure und PLP gebildet wird (Snell & Mari, 1970). Des Weiteren wurde für die Racemisierungsreaktion ein Ein-Basen und ein Zwei-Basen Mechanismus vorgeschlagen (Cardinale & Abeles, 1968). Der Ein-Basen Mechanismus ist typisch für PLP-abhängige Aminosäure-Racemasen (Snell & Mari, 1970). Das UV/Vis Spektrum

der aufgereinigten IDS-Epimerase lieferte jedoch keinen Hinweis auf das Vorhandensein eines Kofaktors. Kofaktorunabhängige Epimerasen und Racemasen unterliegen vorwiegend einem Zwei-Basen Reaktionsmechanismus (Rudnick&Abeles, 1975; Wisemann & Nichols, 1984; Choi et al., 1992; Yamauchi et al., 1992). Es ist daher anzunehmen, dass der enzymkatalytischen IDS-Epimerisierung ein Zwei-Basen Mechanismus zu Grunde liegt.

In einem Zwei-Basen Mechanismus wird ein Proton an einem asymmetrischen C-Atom des IDS von einem basischen Aminosäurerest abstrahiert. Im Übergangszustand liegt vermutlich ein pyramidal gebautes Carbanion (sp^3-hybridisiert) vor. Carbanionen unterliegen einem raschen "Umklappen" der Konfiguration (Sykes, 1988), so dass die konjugierte Säure eines weiteren basischen Aminosäurerestes ein Proton von der entgegengesetzten Richtung liefern kann (vgl Abb. 2-6).

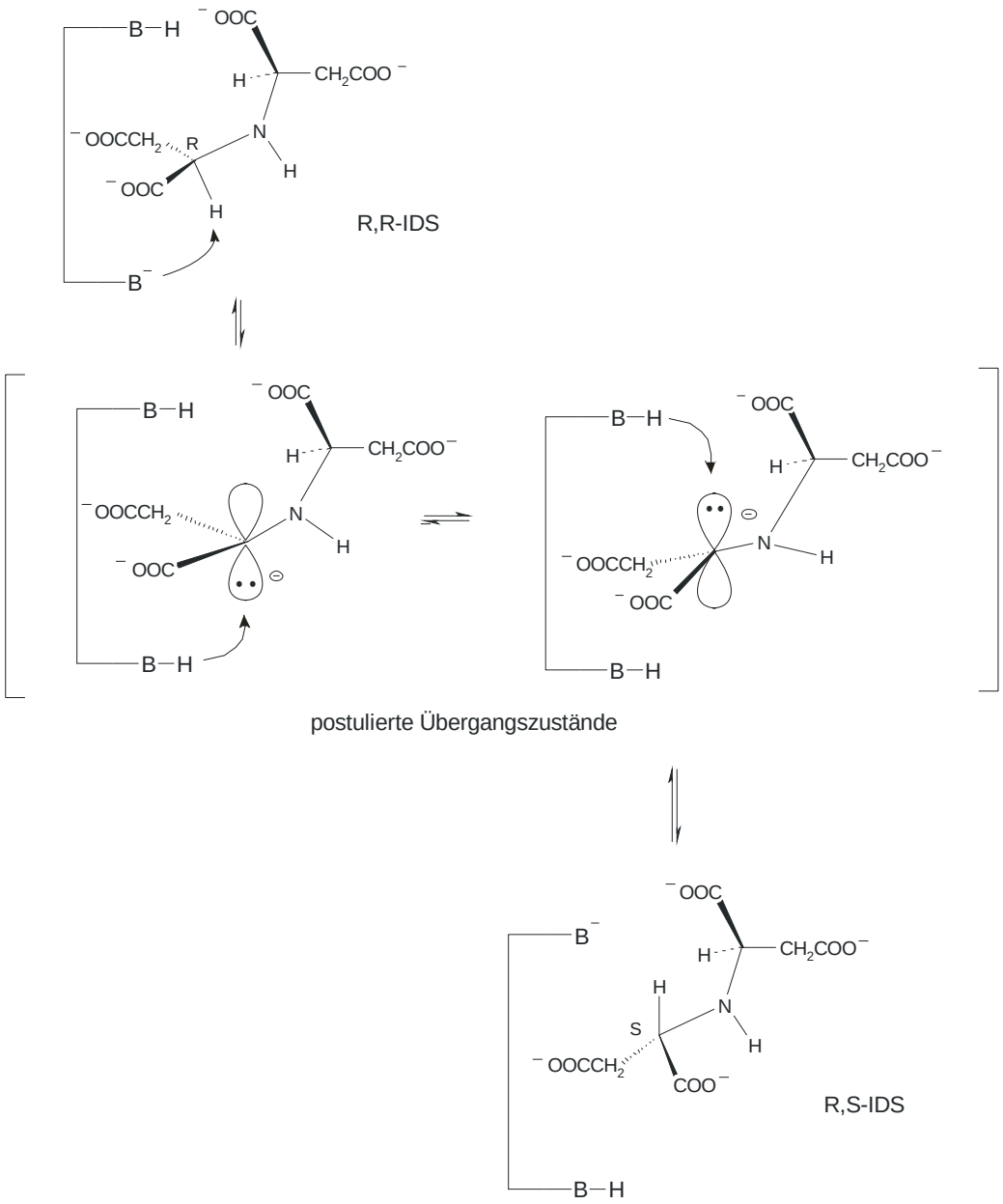


Abb. 2-6 Vermuteter Zwei-Basen Mechanismus: Epimerisierung von R,R-IDS zum R,S-IDS. Das Enzym besitzt zwei Säure-Base katalysierende Gruppen (B).

3 Charakterisierung der Gene des initalen Abbauweges

3.1 Klonierung der Gene für die C-N Lyase und die Epimerase aus *Agrobacterium tumefaciens* BY6

Um auf die natürliche Funktion der C-N Lyase und der Epimerase aus *A. tumefaciens* BY6 zu schließen, wurden die Gene kloniert, sequenziert und charakterisiert.

Der erste Schritt bestand in der N-terminalen Sequenzierung der beiden in den IDS--Abbau involvierten Enzyme. Anschließend wurden die Enzyme tryptisch verdaut, die internen Peptide fraktioniert und sequenziert. Ein Datenbankvergleich (Altschul et al., 1997) der ermittelten Peptidsequenzen zeigte in beiden Fällen keine signifikanten Ähnlichkeiten mit bekannten Proteinen.

Aus der N-terminalen Aminosäuresequenz und einer entsprechenden internen Sequenz wurden degenerierte Oligonukleotid-Primer abgeleitet. Mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) konnte damit ein 0,581 bp (Epimerase) und ein 1,037 bp (C-N Lyase) großes PCR-Produkt amplifiziert werden (Anhang 3). Um an das vollständige Gen zu gelangen, wurden die beiden PCR-Produkte Digoxigenin markiert und als spezifische Gensonden eingesetzt. Ein Southern Blot mit verdauter genomischer DNA wurde erstellt, der Blot mit einer Gensonde inkubiert und die mit der Sonde hybridisierenden DNA-Fragmente detektiert. Mit dieser Vorgehensweise konnte ein ca. 3,7 kb großes *Bam*HI-Fragment isoliert werden, welches das kodierende Gen der C-N Lyase enthielt. Die Hybridisierung mit der epimerasespezifischen Gensonde zeigte ein Detektions-signal für ein ca. 5 kb großes *Xho*I-Fragment. Die isolierten DNA-Fragmente wurden in einen *Bam*HI bzw. *Xho*I geschnittenen pBluescript II SK(+) Vektor ligiert und die Ligationsansätze in *Escherichia coli* Zellen transformiert. Mittels Kolonie-hybridisierung wurden die Klone mit den rekombinanten Plasmiden identifiziert. Die Plasmide wurden isoliert und die darin enthaltenen DNA-Fragmente aus *A. tumefaciens* BY6 sequenziert. Die Plasmide wurden wie folgt bezeichnet: pB37L (3,7 kb *Bam*HI-Fragment mit dem Lyase-Gen), pX50E (5,0 kb *Xho*I-Fragment mit dem Epimerase-Gen) und pB22E (2,2 kb *Bam*HI-Fragment mit dem unvollständigen Epimerase-Gen).

3.2 Das Lyase-Gen

Die Sequenzierung des klonierten DNA-Fragments aus *A. tumefaciens* BY6 in dem Plasmid pB37L ergab eine genaue Fragmentgröße von 3692 bp (Anhang 3). Das für die Lyase kodierende Gen *icl* wurde in dem in pB37L klonierten DNA-Fragment an der Position 1279 bis 2883 identifiziert. Das Gen *icl* kodierte eine Aminosäuresequenz, bestehend aus 534 Aminosäuren, mit einem entsprechenden Molekulargewicht von 58419 g/mol. Dieser Wert korrespondiert mit dem durch SDS-PAGE bestimmten apparenten Molekulargewicht des Enzyms.

Die Analyse der offenen Leserahmen (ORF) ergab drei ORFs, darunter das für die Lyase kodierende Gen *icl*. Mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Lyase-Gens *icl* wurde in der Datenbank BLAST (Altschul et al., 1997) die höchste Ähnlichkeit mit einer putativen Argininosuccinat-Lyase aus *Methanosarcina barkeri* (GenBank Accession Nr. ZP00078839; 39% Identität), einer putativen Argininosuccinat-Lyase aus *Methanococcus jannaschii* (Accession Nr. NP247778; 34% Identität) und einer Argininosuccinat-Lyase (*arg*H) aus *Methanococcus maripuladis* (Accession Nr. O74026; 34% Identität; Cohen-Kupiec et al., 1999) gefunden.

Der offene Leserahmen ORF1 transkribiert entgegengesetzt zum Gen *icl* und kodiert für einen potenziellen Transkriptionsregulator. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von ORF2 besaß die größte Ähnlichkeit mit einem periplasmatischen ABC-Transporterprotein.

Tab 3-1. Zusammenfassung der im Datenbankvergleich identifizierten Proteine, die die höchsten Sequenzähnlichkeiten mit den aus den offenen Leserahmen und dem *icl* Gen abgeleiteten Aminosäuresequenzen besaßen.

ORF	Position	Ähnliches Protein	Herkunft	Accession Nr.	Sequenz-Identität
1	166-1107	Transkriptionsregulator	*Ralstonia metallidurans*	S28671	33%
icl	1279-2883	Argininosuccinat-Lyase	*Methanosarcina barkeri*	ZP00078839	39%
2	2914-3690 (Fragment)	ABC-Transporterprotein	*Ralstonia solanacearum*	NP518165	42%

Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz aus dem Gen *icl* mit Sequenzen der NCBI Conserved Domain Database ergab die größte Homologie zu den konservierten Regionen der Argininosuccinat-Lyasen (Abb. 3-1). Überraschenderweise wurden weder Argininosuccinat noch Fumarat und Aspartat als Substrate von der C-N Lyase aus *A. tumefaciens* BY6 transformiert.

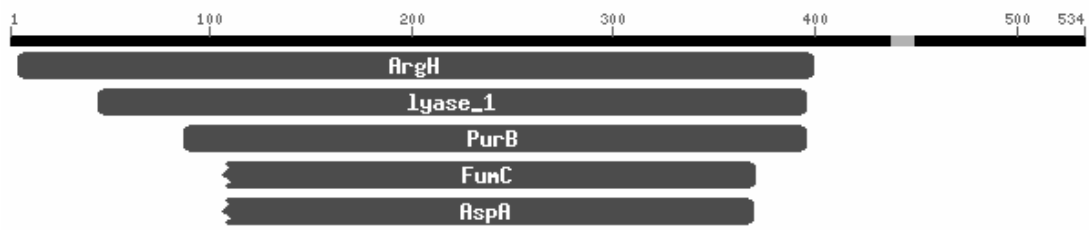


Abb. 3-1 Ergebnis der NCBI Conserved Domain Search mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Lyase-Gens. ArgH: Konsensussequenz der Argininosuccinat-Lyasen; lyase_1: Konsensussequenz mehrerer Lyasen; PurB: Konsensussequenz der Adenylosuccinat-Lyasen; FumC: Konsensussequenz der Fumarasen (Klasse II); AspA: Konsensussequenz der Aspartasen.

L-Argininosuccinat-Lyasen (EC 4.3.2.1; Woods et al., 1988), Fumarase der Klasse II (EC 4.2.1.2; Woods et al., 1986), L-Aspartasen (EC 4.3.1.1; Takagi et al., 1986; Woods et al., 1986), Adenylosuccinat-Lyasen (EC 4.3.2.2; Stone et al., 1993), 3-Carboxy-cis,cis-muconat lactonisierendes Enzym (EC 5.5.1.2; Williams et al., 1992) und δ--Crystallin (EC 4.3.2.1; Yeh et al., 1988; Matsubasa et al., 1989) bilden zusammen die Fumarase II Superfamilie.

Die verwandtschaftliche Beziehung der C-N Lyase innerhalb der Fumarase II Familie dokumentiert das Dendrogramm in Abbildung 3-2.

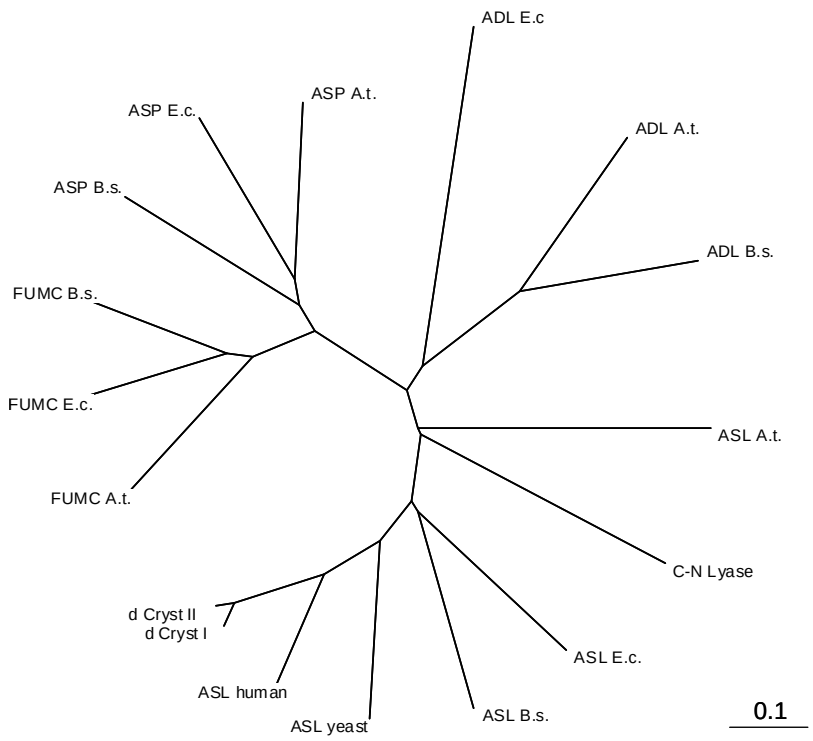


Abb. 3-2 Dendrogramm zur Darstellung der Verwandtschaft verschiedener Lyasen der Fumarase II Superfamilie auf Proteinebene. Erstellt mit Hilfe des Programms ClustalX v.1.83. Der Balken symbolisiert 10% Sequenzabweichung. ASL: Argininosuccinat-Lyase; ADL: Adenylosuccinat-Lyase; FumC: Fumarase; ASP: Aspartase; A.t.: *A. tumefaciens*; B.s. *Bacillus subtilis*; E.c.: *Escherichia coli*.
Referenzen für die Quellen: δ-Crystallin II (Accession Nr. P24058), δ-Crystallin I (P24057), ASL A.t. (D98284), ASL B.s. (CAB14904), ASL E.c.(NP418395), ASL human (NP000039), ASL yeast (NP011882), ADL A.t. (NP532521), ADL B.s. (P12047), ADL E.c. (NP415649), FumC A.t. (NP532302), FumC B.s. (UFBSC8), FumC E.c.(NP416128), ASP A.t. (D98261), ASP B.s. (Nr. NP290328), ASP E.c. (NP418562).

Die Enzyme der Fumarase II Superfamilie verfügen über eine typische homotetramere Struktur mit einem Molekulargewicht von ca. 200 kDa. Sie katalysieren ähnliche Reaktionen, bei denen eine C_α-N oder C_α-O Bindung gespalten und in der Regel Fumarat als ein Produkt gebildet wird (Sampaleanu et al., 2002). Die Primärsequenzen innerhalb der Superfamilie sind wenig übereinstimmend. Dennoch wurden drei hochkonservierte Bereiche (C1-C3; Sampaleanu et al., 2001) definiert (Abb. 3-3), die höchstwahrscheinlich an der Generierung des aktiven Zentrums und der Substratbindung beteiligt sind (Weaver et al., 1995). Jedes Enzym besitzt vier aktive Zentren, von denen jedes aus den drei hochkonservierten Bereichen von drei Untereinheiten zusammengesetzt wird. (δ-Crystallin: Simpson et. al., 1994, Fumarase: Weaver et al., 1995; δ-Crystallin: Abu-Abed et al., 1997; Adenylosuccinat-Lyase: Brosius & Colman, 2002; Aspartase: Shi et al., 1997).

```
                C1          C2            C3

             113    120   152      161   275                292
C-N Lyase     SRNDLYAT     GYTHGQPGQP     TSSIMPQKKNPSPIEHLK

             114    121   159      168   282                299
δ-Cryst. II   SRNDQVVT     GYTHLQKAQP     GSSLMPQKKNPDSLELIR
δ-Cryst I     SRNEQVVT     GYTHLQKAQP     GSSLMPQKKNPDSLELIR

ASL A.t.      SRNDIDHT     AYTHGQPAQP     ISSIMPQKRNPVPIEHLR
ASL E.c.      SRNDQVAT     GYTHLQRAQP     GSSLMPQKKNPDALELIR
ASL human     SRNDQVVT     GYTHLQRAQP     GSSLMPQKKNPDSLELIR
ASL yeast     SRNDQVVT     GYTHLQRAQP     GSSLMPQKKNADSLELIR

ADL A.t.      TSSDVLDT     GRSHGIHAEP     GSSAMPHKRNPVLTENLT
ADL E.c.      TSEDINNL     SRTHGQPATP     GSSTMPHKVNPIDFENSE

FumC A.t.     SSNDTYPT     GRTHTQDATP     GSSIMPGKVNPTQSEALT
FumC E.c.     SSNDVFPT     GRTHLQDATP     GSSIMPGKVNPTQCEALT

ASP A.t.      STNDAYPT     GRTQLQDAVP     GSSIMPGKINPVIPEVVN
ASP E.c.      STNDAYPT     GRTQLQDAVP     GSSIMPAKVNPVVPEVVN

Konsensus     S-ND---T     G-TH-Q-A-P     GSS-MP-K-NP---E
```

Abb. 3-3 Eingliederung der C-N Lyase aus *A. tumefaciens* BY6 in die drei hochkonservierten Bereiche C1, C2 und C3 (nach Sampaleanu et al., 2001) der Fumarase II Superfamilie. ASL: Argininosuccinat-Lyase; ADL: Adenylosuccinat-Lyase; FumC: Fumarase; ASP: Aspartase; A.t.: *Agrobacterium tumefaciens*; E.c.: *Escherichia coli*.
Referenzen für die Quellen: δ-Crystallin II (Accession Nr. P24058), δ-Crystallin I (P24057), ASL A.t. (D98284), ASL E.c.(NP418395), ASL human (NP000039), ASL yeast (NP011882), ADL A.t. (NP532521), ADL E.c. (NP415649) FumC A.t. (NP532302), FumC E.c.(NP416128), ASP A.t. (D98261), ASP E.c. (NP418562).

Die ergiebigsten Informationen über den Reaktionsmechanismus und die an der Enzymkatalyse beteiligten Aminosäuren liegen für δ-Crystallin vor, die sich höchstwahrscheinlich auf die C-N Lyase aus *A. tumefaciens* BY6 übertragen lassen.

Das δ-Crystallin ist das mengenmäßig wichtigste lösliche Protein in den Augenlinsen von Vögeln und Reptilien. Es entstand ursprünglich aus dem Argininosuccinat-Lyase Gen. Durch Duplikation der Gene entwickelten sich zwei Isoformen, das δ1- und δ2-Crystallin (Piatigorsky et al., 1988; Mori et al., 1990). Nur das δ2-Crystallin behielt während der Evolution die Argininosuccinat-Lyase Aktivität bei (Barbosa et. al., 1991; Lee et al., 1992). Das δ1-Crystallin spezialisierte sich mehr zu einem Strukturprotein der Augenlinsen und verlor in diesem Prozess die enzymatische Funktion (Kondoh et al.,1991; Chiou et al., 1992). Vergleiche der Aminosäuresequenz von δ1- und δ2-Crystallin aus Enten belegten eine Identität von 94% (Piatigorsky et al., 1988).

Ein Mechanismus zur enzymatischen Umsetzung von IDS kann, basierend auf den Ergebnissen zum chemischen Mechanismus der Argininosuccinat-Aktivität von δ2-Crystallin (Raushel 1984; Wu et al., 1998), formuliert werden (Abb. 3-4).

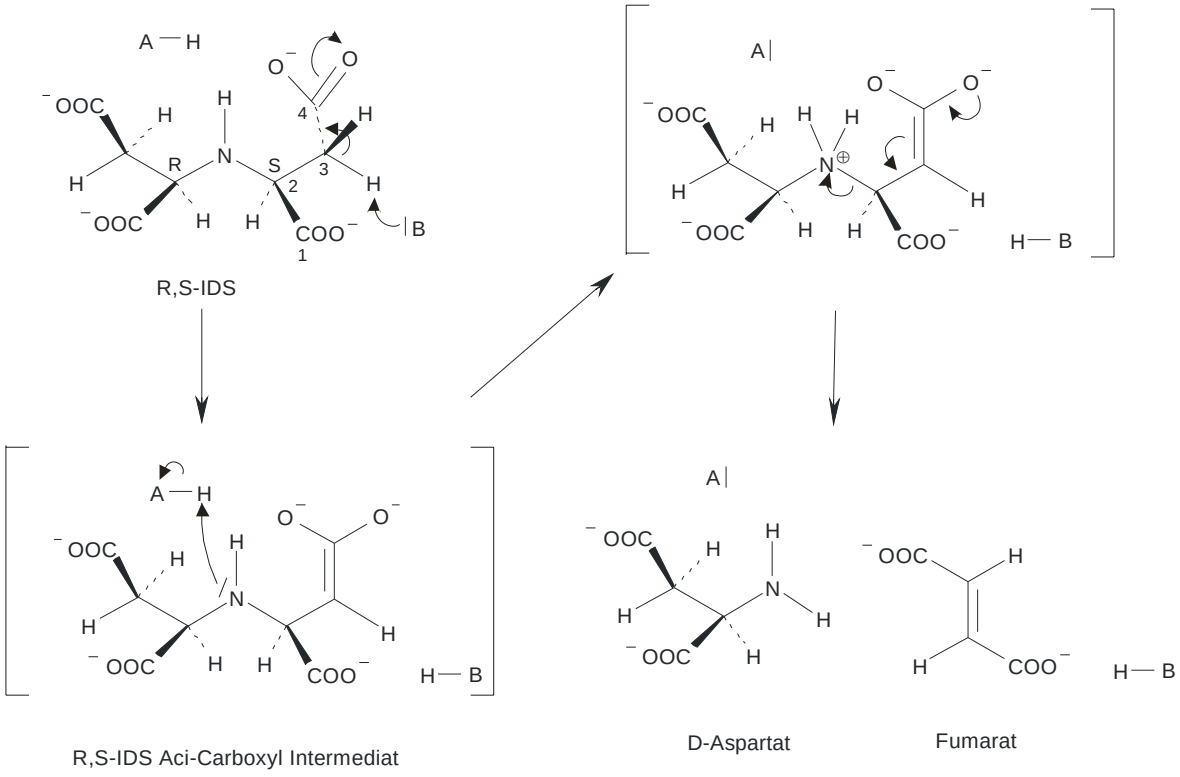


Abb. 3-4 Vermuteter E1cb Mechanismus zur enzymkatalysierten C-N Spaltung von R,S-IDS. B: basische Aminosäure; A-H: saure Aminosäure.

Eine basische Aminosäure (Protonenakzeptor) abstrahiert ein Proton am C-3 am S-konfigurierten C-Atom unter Bildung eines Carbanions. Durch Elektronen-verschiebung lässt sich eine Aci-Carboxylstruktur als Übergangszustand formulieren. Der Stickstoff wird durch eine saure Aminosäure (Protonendonor) protoniert und die Doppelbindung des Fumarats generiert. Der formulierte Mechanismus entspricht formell einer E1cb-Eliminierungsreaktion. Neben den Aminosäure-Resten, die als Protonenakzeptor und -donor wirken, wird ein weiterer Enzymbereich benötigt, der mit den Substrat-Carboxylaten interagiert (Weaver et al., 1995) bzw. das Aci-Carboxyl-Intermediat stabilisiert (Simpson et al., 1994).

Mutagenitätsstudien mit δ2-Crystallin implizierten, dass Histidin 160 zum aktiven Zentrum gehört. Es fungiert direkt oder indirekt über Aktivierung eines Wassermoleküls als Protonenakzeptor (Abu-Abed et al., 1997; Patejunas et al., 1995). In Argininosuccinat-Lyasen (Turner et al., 1997) und Adenylosuccinat-Lyasen (Lee et al., 1999) wird das Histidin aus dem konservierten Bereich C2 ebenfalls als Protonenakzeptor favorisiert. Weaver et al. (1995) vermuteten für die Fumarasen ein Protonen-Relais zwischen dem äquivalenten Histidin 188 und der Glutaminsäure 331. Das Histidin ist jedoch nicht strikt konserviert innerhalb der Fumarase II Superfamilien. In Aspartasen ist es durch Glutamin ersetzt (vgl. Abb. 3-3). Als potenzielle Säure gilt in δ2-Crystallin das hochkonservierte Ser-283 (Sampaleanu et. al., 2001;2002). Simpson (1994) nahm an, dass in δ2-Crystallin das hochkonservierte Lys-287 zur Stabilisierung des Carbanions beiträgt.

Durch Mutagenese und kristallografische Untersuchungen (Abu-Abed et al., 1997; Chakraborty et al. 1999; Vallée et al. 1999) konnten die Aminosäuren des δ2-Crystallin identifiziert werden, die entweder direkt oder über ein Wassermolekül an der Substratbindung von L-Argininosuccinat beteiligt sind. Der Succinatrest aus Argininosuccinat bindet an das aus drei Untereinheiten (a-c) bestehende aktive Zentrum direkt an die Aminosäuren Asn-116 (c), Thr-161 (a), His-162 (a) und indirekt an die Aminosäuren Lys-289 (b), Asn-291 (b), Glu-296 (b). Diese Aminosäuren sind hoch-konserviert innerhalb der Fumarase II Superfamilie (Abb. 3-2). Demzufolge sollten auch die äquivalenten Aminosäuren Asn-109, Thr-154, His-155, Lys-282, Asn-284, Glu-289 der C-N Lyase aus *A. tumefaciens* BY6 an der Bindung des Succinatrestes des IDS beteiligt sein. Zu erwähnen ist, dass gewöhnlich ein Succinatrest in den natürlichen Substraten der Fumarase II Familie vorhanden ist. Eine Bindung des Succinatrestes an

das aktive Zentrum erfolgt dabei nur, wenn das asymmetrische C-Atom des Succinatrestes in der S-Konfiguration vorliegt. Diese Feststellung begründet die stereospezifische Spaltung von IDS durch die C-N Lyasen aus *A. tumefaciens* BY6 und *R.* sp. SLRS7.

Der Argininrest aus Argininosuccinat interagiert im aktiven Zentrum mit den Aminosäuren Ser-29 (c), Arg-115 (c), Asn-116 (c), Tyr-323 (c), Q328 (c), Lys-331 (c) und über ein Wassermolekül mit den Aminosäuren Asn-27 (c), Asp-33(c), Asp-89 (c), His-91 (c), Arg-238 (c), Lys-325 (c) und Asp-330 (c) des δ2-Crystallin. Diese Aminosäuren, mit Ausnahme von Asn-116, sind innerhalb der Fumarase II Familie wenig konserviert. Nur drei (Arg-115, Asn116 und Arg-238) der dreizehn an der Argininbindung beteiligten Aminosäuren sind mit denen in der C-N Lyase aus *A. tumefaciens* BY6 identisch. Die für die Bindung von Argininosuccinat benötigten Aminosäuren sind in der C-N Lyase aus *R.* sp. SLRS7, soweit bekannt, besser konserviert und bewirken vermutlich, dass im Gegensatz zur C-N Lyase aus *A. tumefaciens* BY6 Argininosuccinat noch umgesetzt wird (Bäuerle, 2003).

Argininosuccinat-Lyasen sind ubiquitär in allen Organismen vorhanden (O´Brien & Barr, 1981). Sie sind in Prokaryonten an der Biosynthese von Arginin und in Eukaryonten am Harnstoffzyklus beteiligt. In diesem Zusammenhang wäre es von Interesse, ob Argininosuccinat-Lyasen oder auch andere Enzyme der Fumarase II Familie das Potenzial besitzen, IDS zu transformieren. Wenn dieses der Fall wäre, so sollte das biologische Abbaupotenzial für die Isomere R,S-IDS und S,S-IDS ubiquitär verbreitet sein.

Bisher wurde das natürliche Substrat bzw. die eigentliche Funktion der C-N Lyase aus *A. tumefaciens* BY6 noch nicht erkannt. Inwiefern die geringe Aktivität der C-N Lyase aus *R.* sp. SLRS7 tatsächlich die Funktion einer Argininosuccinat-Lyase erfüllt, sollte noch experimentell ermittelt werden.

In der Medizin ist das Krankheitsbild der Argininosuccinoazidurie bekannt. Bei dieser Stoffwechselkrankheit ist durch einen Defekt der Argininosuccinat-Lyase der Harnstoffzyklus nicht geschlossen. Dies führt zu einer erhöhten Ausscheidung von Argininosuccinat. Der Mechanismus dieser Störung ist auf enzymatische Ebene noch nicht aufgeklärt. Hier könnten die in dieser Arbeit beschriebenen Enzyme mit ihrer unterschiedlichen Spezifität für Argininosuccinat sehr wertvolle Beiträge zur Aufklärung leisten.

3.3 Das Epimerase-Gen

Von dem klonierten 5-kb großen *Xho*I-Fragment im Plasmid pX50E wurden 4269 bp bestimmt (Anhang 3). Das für die Epimerase kodierende Gen, bezeichnet als *ite*, befand sich an der Position 1197 bis 2537. Das Gen kodierte eine Aminosäuresequenz, bestehend aus 446 Aminosäuren, mit einem berechneten Molekulargewicht von 47581 g/mol. Dieser Wert entsprach dem durch SDS-PAGE bestimmten Wert von 48 kDa. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Epimeras-Gens *ite* zeigte überraschenderweise keine Ähnlichkeit mit Racemasen sowie keine signifikante Ähnlichkeit mit Proteinen bekannter Funktion. Die größte Ähnlichkeit wurde mit einem konservierten hypothetischen Protein in *Bordetella bronchiseptica* (Accession Nr. NP888892; 32% Identität), einem konservierten hypothetischen Protein in *Bordetella parapertussis* (Accession Nr. NP8883595; 32% Identität) und einem hypothetischen Protein in *Burkholderia fungorum* (Accession Nr. ZP00032190; 31% Identität) gefunden. Dieses lässt auf ein neuartiges Enzym schließen.

Erfolgreicher war die Suche nach konservierten Bereichen (NCBI Conserved Domain Database). Es zeigte sich, dass die Epimerase Ähnlichkeiten mit den konservierten Bereichen der Methylcitrathydratasen (*prp*D) besitzt, die am Propionatabbau beteiligt sind (Horswill & Escalanta-Semerena, 2001). Es ist denkbar, dass die Epimerase multifunktionelle Eigenschaft besitzt.

Das natürliche Substrat dieser neuartigen Epimerase ist bisher noch unbekannt.

3.4 Lokalisation der Gene

Aufgrund der Ergebnisse der Sequenzierung wurde vermutet, dass die beiden in den IDS-Abbau involvierten Gene funktionell nicht verbunden sind. Um dieses zu bestätigen, wurde die Lokalisation des Lyase-Gens und des Epimerase-Gens im Genom untersucht. Dabei wurde die isolierte genomische DNA einer Wechselfeld-gelelektrophorese mit anschließender Southern-Blot Analyse unterzogen. Der Stamm *A. tumefaciens* BY6 besaß ein zirkuläres Plasmid von 180 kb Größe (Anhang 3).

Mit der lyasespezifischen Gensonde wurde ein Hybridisierungssignal auf der genomischen DNA detektiert. Im Gegensatz dazu zeigte die Hybridisierung mit der epimerasespezifischen Gensonde ein Signal auf Höhe des 180 kb Plasmids. Demnach besitzen die Gene keine funktionelle Kopplung.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen auf molekularer Ebene erlauben eine Neubewertung der mit Standardmethoden erzielten Abbauergebnisse (Kap. 2.1). R,R-IDS wird mit dem Belebtschlamm aus der Kläranlage Leverkusen-Bürrig abgebaut, ohne dass dieser Umstand präzise definiert wurde. Die oben erwähnte Plasmidlokalisation des Epimerase-Gens indiziert, dass nur Spezialisten unter den Bakterien die Epimerisierung durchführen können. Der Vorteil eines plasmidkodierten Epimerase-Gens besteht wiederum in der Möglichkeit durch Konjugation das Plasmid und schließlich auch die Epimerisierungskompetenz auf andere Genera zu übertragen. In Anbetracht des Abbauergebnisses mit dem Belebtschlamm aus Stuttgart-Büsnau ist zu vermuten, dass diese Spezialisten noch nicht allgegenwärtig verbreitet sind. Einen Einblick über die Verbreitung dieser Spezialisten könnten Abbautests mit anderen Belebtschlammproben geben. Trotz der eingeschränkten Verbreitung ist abschließend festzuhalten, dass ein biologischer Abbau aller IDS-Isomere grundsätzlich möglich ist. Deshalb ist IDS als ökologisch erfreuliche Alternative für die klassischen Komplexbildner anzusehen.

4 Literaturverzeichnis

Abu-Abed, M., M. A. Turner, F. Vallée, A. Simpson, C. Slingby und P. L. Howell. 1997. Structural comparison of the enzymatically active and inactive forms of δ crystallin and the role of histidine 91. Biochemistry 36:14012-14022.

AbwV. Abwasserverordnung. Anhang 28. Herstellung von Papier und Pappe vom 2. Juli. 2002. BGBl. I. S.2479.

Alder, A. C., H. Siegrist, W. Gujer und W. Giger. 1990. Behaviour of NTA and EDTA in biological waste water treatment. Water Res. 24:733-742.

Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller und D. J. Lipman. 1997. Gapped Blast and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acid Res. 25:3389-3402.
[Online.] http://www.ncbi.nih.gov/cgi-bin/Blast/

Auling, G., H.-J. Busse, T. Egli, T. El-Banna und E. Stackebrandt. 1993. Description of the gram-negative, obligately aerobic, nitrilotriacetate (NTA)-utilizing bacteria as *Chelatobacter heintzii*, gen. nov., sp. nov., and *Chelatococcus asaccharovorans*, gen. nov., sp. nov. Syst. Appl. Microbiol. 16:104-122.

Barbosa, P., G. J. Wistow, M. Cialkowski, J. Piatigorsky und W. E. O`Brien. 1991. Expression of duck lens δ-crystallin cDNAs in yeast and bacterial hosts. J. Biol. Chem. 266:22319-22322.

Bäuerle, B. 2003. Isolierung, partielle Sequenzierung und biochemische Charakterisierung einer C-N Lyase aus *Ralstonia* sp. SLRS7. Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart. Diplomarbeit.

Bayer AG. 1998. IDS Na-Salz. Eine neue umweltfreundliche Alternative zu klassischen Komplexierungsmitteln. Bayer Broschüre zum IDS. Bayer AG.

Bayer AG. 2000. Entwicklung und Vermarktung umweltfreundlicher Funktions-polymere und Komplexbildner. Aus den Ausführungen von Dr. H.-J. Traencker am 6.September 2000.

Bayer AG. 2001. Safety Data Sheet 857037/10, Baypure CX 100 solid. Bayer AG.

Bayer Research. 2001. Von Muscheln lernen. Das Bayer-Forschungsmagazin 13:10-13.

Belitz, H. D. und W. Grosch. 1992. Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 4. überarb. Auflage. S. 411. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Belly, R. T., J. J. Lauff und C. T. Goodhue. 1975. Degradation of ethylene-diaminetetraacetic acid by microbial populations from an aerated laggon. Appl. Microbiol. 29:787-794.

Boatman, R. J., S. L. Cunningham und D. A. Ziegler. 1986. A method for measuring the biodegradation of organic chemicals. Environ. Toxicol. Chem. 5:233-243.

Bolton, H. jr., S. W. Li, D. J. Workman und D. C. Girvin. 1993. Biodegradation of synthetic chelates in subsurface sediments from the southeast coastal plain. J. Environ. Qual. 22:125-132.

Bordas, F. und A. C. M. Bourg. 1998. Effect of complexing agents (EDTA and ATMP) on the remobilization of heavy metals from a polluted river sediment. Aquat. Geochem. 4:201-204.

Bossart, K. und R. Müller. 2002. Schwermetallextraktion aus kontaminierten Böden mittels biologisch abbaubarer Chelatbildner. Diplomarbeit. Eidgenössische Technische Hochschule Zürich.

Brosius, J. L. und R. F. Colman. 2002. Three subunits contribute amino acids to the active site of tetrameric adenylosuccinate lyase: Lys^{268} and Glu^{275} are required. Biochemistry 41:2217-2226.

Bucheli-Witschel, M. und T. Egli. 2001. Environmental fate and microbial degradation of aminopolycarboxylic acids. FEMS Microbiol. Lett. Rev. 25:69-106.

Cardinale, G. J. und R. H. Abeles. 1968. Purification and mechanism of action of proline racemase. Biochemistry 7:3970-3978.

Carrondo, M. J. T., R. Perry und J. N. Lester. 1981. Sedimentation of zeolite type A in water and waste water. Can. J. Civ. Engng. 8:206-217.

Chakraborty, A. R., A. Davidson und P. L. Howell. 1999. Mutational analysis of amino acid residue involved in argininosuccinate lyase activity in duck δ II crystallin. Bichemistry. 38:2435-2443.

Chiou, S. H., C. C. Hung und C. W. Lin. 1992. Biochemical characterization of crystallins from pigeon lenses: structural and sequence analysis of δ-crystallin. Biochim. Biophys. Acta. 1160:317-324.

Choi S.-Y., N. Esaki, T. Yoshimura und K. Soda. 1992. Reaction mechanism of glutamate racemase, a pyridoxal phosphate-independent amino acid racemase. J. Biochem. 112:139-142.

Cohen-Kupiec, R., M. Kupiec, K. Sandbeck und J. A. Leigh. 1999. Functional conservation between the argininosuccinate lyase of the archaeon *Methanococcus*

maripuladis and the corresponding bacterial and eukaryal genes. FEMS Microbiol. Lett. 173:231-238.

Cripps, R. E., und A. S. Noble. 1973. The metabolism of nitrilotriacetate by a *pseudomonad*. Biochem. J. 136:1059-1068.

Egli, T., H.-U. Weilenmann, T. El-Banna und G. Auling. 1988. Gram-negative, aerobic, nitrilotriacetate-utilizing bacteria from wastewater and soil. Syst. Appl. Microbiol. 10:297-305.

EPA (United States Environmental Protection Agency). June 2002. EPA744-K-02-002. Presidential green chemistry challenge. Award recipients. Alternative synthetic pathway awards, p.16-17. [Online.] http://www.epa.gov/greenchemistry

Fischer, K. 1993. Distribution and elimination of HEDP in aquatic test systems. Water Res. 27:485-493.

Focht, D. D. und H. A. Joseph. 1971. Bacterial degradation of nitrilotriacetic acid. Can. J. Microbiol. 17:1553-1556.

Gardiner, J. 1976 Complexation of trace metals by ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in natural waters. Water Res. 10:507-514.

Garnett, K. P., W. W. Kirk, N. Lester und R. Perry. 1986. Assessment of the interaction of metals and nitrilotriacetic acid in soil/sludge mixture. Wat. Air Soil Pollut. 34:175-184.

Giger, W., P. H. Brunner, M. Ahel, J. McEvoy, A. Marcomini und C. Schaffner. 1987. Organische Waschmittelinhaltsstoffe und deren Abbauprodukte in Abwasser und Klärschlamm. Gas-Wasser-Abwasser 67:111-122.

Giger, W. 1986. Behavior of organic micropollutants during infiltration of river water into groundwater: field studies. Wat. Pollut. Res. Rep. 3:33-36.

Ginkel v., C. G., K. L. Vandenbroucke und C. A. Stroo. 1997. Biological removal of EDTA in conventional activated-sludge plants operated under alkaline conditions. Biores. Technol. 59:151-155.

Goodfellow, M., A. B. Brown, J. Cai, J. Chun und M. D. Collins. 1997. *Amycolatopsis japonicum* sp. nov., an *actinomcyete* producing (S,S)-N,N`-ethylenediaminedisuccinc acid. System. Appl. Microbiol. 20:78-84.

Goyer, R. A., H. L. Falk, H. Hogan, D. D. Feldman und W. Richter. 1981. Renal tumors in rats given trisodium nitrilotriacetate acid in drinking water for 2 years. J. Natl. Cancer Inst., 66, 869-880.

Graßhoff, A., und B. Potthoff-Karl. 1996. Komplexbildner in alkalischen Reinigern. Tens. Surfactant Deterg. 33:278-288.

Gundernatsch, H. 1974. Biologischer Abbau von Nitrilotriessigsäure. gwf Wasser Abwasser 115:418-421.

Hartman, F. A. und C. M. Perkins. 1987. Detergent compositions containing ethylenediamine-N,N`-disuccinic acid. U.S. patent 4.704.233.

Henneken, L., B. Nörtemann und D. C. Hempel. 1998. Biological degradation of EDTA. Reaction kinetics and technical approach. J. Chem. Technol. Biotechnol. 73:144-152.

Henning, K., J. Handler und H. D. Nielsen. 1977. Actuelle Fragen zur Substitution von Phosphaten in Waschmitteln. Seife-Öle-Fette-Wachse 103:571-578.

Hinck, M. L., J. Ferguson und J. Puhaakka. 1997. Resistance of EDTA and DTPA to aerobic biodegradation. Water Sci. Technol. 35:25-31.

Horstmann, B. und A. Grohmann. 1988. Investigations into the biodegradability of phosphonates. Vom Wasser 70:163-178.

Horswill, A. R. und J. C. Escalante-Semerena. 2001. In vitro conversion of propionate to pyruvate by *Salmonella enterica* enzymes: 2-methylcitrate dehydratase (PrpD) and aconitase enzymes catalyze the conversion of 2-methylcitrate to 2-methylisocitrate. Biochemistry 40:4703-4713.

Jander, Blasius. 1990. Einführung in das anorganisch-chemische Praktikum. 13. Aufl. von J. Strähle und E. Schweda. S. Hirzel Verlag, Stuttgart.

Kaluza, U., P. Klingelhöfer und K. Taeger. 1998. Microbial degradation of EDTA in an industrial wastewater treatment plant. Water Res. 32:2843-2845.

Kari, F. G. und W. Giger. 1995. Modeling the photochemical degradation of EDTA in the River Glatt. Environ. Sci. Technol. 29:2814-2827.

Kari, F. G. und W. Giger. 1996. Speciation and fate of ethylenediaminetetraacetate in municipal wastewater treatment. Water Res. 30:122-134.

Kezerian, C. und W. M. Ramsey. 1964. Bisadducts of diamines and unsaturated acids. U.S Patent 3.158.635.

Kirk, P. W. W., J. N. Lester und R. Perry. 1982. The behaviour of nitrilotriacetic acid during the anaerobic digestion of sewage sludge. Water Res. 16:973.

Klopp, R. und B. Pätsch. 1994. Organische Komplexbildner in Abwasser, Oberflächenwässer und Trinkwasser, dargestellt am Beispiel der Ruhr. Wasser Boden 8:32-37.

Kondoh, H., I. Araki. K. Yasuda, T. Matsubasa und M. Mori. 1991. Expression of the chicken 'δ2-crystallin' gene in mouse cells: evidence for encoding of argininosuccinate lyase. Gene 99:267-271.

Kuhn, E., M. van Loosdrecht, W. Giger und R. P. Schwarzenbach. 1987. Microbial degradation of nitrilotriacetate (NTA) during river/groundwater infiltration: laboratory column studies. Water Res. 10:1237-1248.

Lahl, U. und H. Burbaum. 1988. Einzelstoffanalysen im Zu- und Ablauf einer kommunalen Kläranlage. Korresp. Abwasser 35:360-364.

Lauff, J. J., D. B. Steele, L. A. Coogan und J. M. Breitfeller. 1990. Degradation of the ferric chelate of EDTA by a pure culture of an *Agrobacterium sp*. Appl. Environ. Microbiol. 56:3346-3353.

Lee, H.-J., S.-H. Chiou und G.-G. Gang. 1992. Biochemical characterization and kinetic analysis of duck δ-crystallin with endogenous argininosuccinate lyase activity. Biochem. J. 283:597-603.

Lee, T. T., C. Worby, Z.-Q. Bao, J. E. Dixon und R. F. Colman. 1999. His^{68} and His^{144} are critical contributors to the intersubunit catalytic site of adenylosuccinate lyase of *Bacillus subtilis*. Biochemistry. 38:22-32.

Lengeler, J. W., G. Drews und H. G. Schlegel. 1999. Biology of the prokaryotes. S.183-184. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

LfU. 2001. Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg. Gütebericht 2001. Entwicklung der Fließgewässerbeschaffenheit in Baden-Württemberg. 44-45. http://www.lfu.baden-württemberg.de

Lockhart, H. B. und R. V. Blakeley. 1975a. Aerobic photodegradation of Fe(III)-(ethylenedinitrilo)tetraacetate (ferric EDTA). Environ. Sci. Technol. 9:1035-1038.

Lockhart, H. B. und R. V. Blakeley. 1975b. Aerobic photodegradation of X(N) chelates of (ethylenedinitrilo)tetraacetic acid (EDTA): implications for natural waters. Environ. Lett. 9:19-31.

Madsen, E. L. und M. Alexander. 1985. Effects of chemical speciation on the mineralization of organic compounds by microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 50:342-349.

Matsubasa, T., M. Takiguchi, Y. Amaya, I. Matsuda und M. Mori. 1989. Structure of the rat argininosuccinate lyase gene: close similarity to chicken δ-crystallin genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:592-596.

Matthijs, E., N. T. De Oude, M. Bolte und J. Lemaire. 1989. Photodegradation of ferric ethylenediaminetetra(methylenephosphonic acid) (EDTMP) in aqueous solution. Water Res. 23:845-851.

Martell, A. E. und R. M. Smith. 1974. Critical Stability Constants, Vol. 1: Amino Acids. Plenum Press, New York.

Means, J. L., D. A. Crerar und J. O. Duguid. 1978. Migration of radioactive wastes: radionuclide mobilization by complexing agents. Science 200:1477-1481.

Means, J. L. T. Kucak und D. A. Crerar. 1980. Relative degradation rates of NTA, EDTA and DTPA and environmental implications. Environ. Pollut. B 1:45-60.

Means, J. L. und C. A. Alexander.1981. The environmental biogeochemistry of chelating agents and recommendations for the disposal of chelated radioactive wastes. Nucl. Chem. Waste Manag. 2:183-196.

Moore, L und E. F. Barth. 1976. Degradation of NTA during anaerobic digestion. J. Water Pollut. Control Fed. 48:2406-2414.

Mori, M., T. Matsubasa, Y. Amaya und M Takiguchi. 1990. Molecular evolution from argininosuccinate lyase to δ-crystallin. Prog. Clin. Biol. Res. 344:683-699.

Müller, G., J. Steber und H. Waldhoff. 1984. The effect of hydroxyethane diphosphonic acid on phosphate elimination with $FeCl_3$ and remobilization of heavy metals: results from laboratory experiments and field trials. Vom Wasser 63:63-78.

Natarajan, P. und J. F. Endicott. 1973. Photoredox behavior of transition metal-ethylenediaminetetraacetate complexes. A comparison of some group VIII metals. J. Phys. Chem. 77:2049-2054.

Nishikiori, T., A. Okuyama, T. Naganawa, T. Takita, M. Hamada, T. Takeuchi, T. Aoyagi und H. Umezawa. 1984. Production by *actinomycetes* of (S,S)-N,N`-ethylenediamine-disuccinic acid, an inhibitor of phospholipase C. J. Antibiot. 37:426-427.

Neal, J. A. und N. J. Rose. 1968. Stereospecific ligands and their complexes. I. A cobalt (III) complex of ethylenediaminedisuccinic acid. Inorg. Chem. 7:2405-2412.

Nispel, F., W. Baumann und G. Hardes. 1990. Abbauversuche an DTPA in Modellkläranlagen. Korresp. Abwasser 37:707-709.

Nörtemann, B. 1992. Total degradation of EDTA by mixed cultures and a bacterial isolate. Appl. Environ. Microbiol. 58:671-676.

Nörtemann, B. 1999. Biodegradation of EDTA. Appl. Microbial. Biotechnol. 51:751-759.

Norvell, W. A. 1984. Comparison of chelating agents as extractants for metals in diverse soil materials. Soil Sci. Soc. Am. J. 48:1285-1292.

Nowack, B. und U. Baumann. 1997. Biologischer Abbau der Photolyseprodukte von Fe^{III}EDTA. Acta Hydrochim. Hydrobiol. 26:104-108.

Nowack, B., H. Xue und L. Sigg. 1997. Influence of natural and anthropogenic ligands on metal transport during infiltration of river water to groundwater. Environ. Sci. Technol. 31:866-872.

Nusch, E. A., H. D. Eschke und K. H. Kornatzki. 1991. Die Entwicklung der NTA- und EDTA-Konzentrationen im Ruhrwasser und daraus gewonnenem Trinkwasser. Korresp. Abwasser 38:944-949.

O´Brien, W. E. und R. H. Barr. 1981. Argininosuccinate lyase: purification and characterization from human liver. Biochemistry. 20:2056-2060.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development)**.** 1993. Guidelines for testing of chemicals. The OECD expert group on degradation and accumulation. Ready biodegadability: 301F manometric respirometry Test. OECD, Paris, France.

Patejunas, G., P. Barbosa, M. Lacombe und W. E. O`Brien. 1995. Exploring the role of histidines in the catalytic activity of duck δ-crystallins using site-directed mutagenesis. Exp. Eye Res. 61:151-154.

Payne, J. W., H. jr. Bolton, J. A. Campbell und L. Xun. 1998. Purification and characterization of EDTA monooxygenase from the EDTA-degrading bacterium BNC1. J. Bact. 180:3823-3827.

Perry, R., P. W. W. Kirk, T. Stephenson und J. N. Lester. 1984. Environmental aspects of the use of NTA as a detergent builder. Water Res. 18:255-276.

Piatigorsky, J., W. E. O`Brien, B. L. Norman, K. Kalumuck, G. J. Wistow, T. Borras, J. M. Nickerson und E. F. Wawrousek. 1988. Gene sharing by δ-crystallin and argininosuccinate-lyase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:3479-3483.

Raushel, F. M. 1984. Nitro analogs of substrate of argininosuccinate synthetase and argininosuccinate lyase. Arch. Biochem. Biophys. 232. 520-525.

Reinecke, F, T. Groth, K. P. Heise, W. Joentgen, N. Müller und A. Steinbüchel. 2000. Isolation and characterization of an *Achromobacter xylosoxidans* strain B3 and other bacteria capable to degrade the synthetic chelating agent iminodisuccinate. FEMS Microbiol. Lett. 188:41-46.

Renn, E. 1974. Biodegradation of NTA detergents in wastewater treatment systems. J. Water Pollut. Control Fed. 46:2363-2371.

Richardson, D. E., G. H. Ash und P. E. Harden. 1994. Determination of diethylene-triaminepentaacetic acid in pulp mil effluent by ion-interaction reversed-phase liquid chromatography. J. Chromatogr. A 688:47-53.

Rubin, M. und A. E. Martell. 1980. The implication of trace metal-nitrilotriacetic acid speciation on its environmental impact and toxicity. Biol. Trace Elem. Res. 2:1-19.

Rudnick, G. und R. H. Abeles. 1975. Reaction mechanism and structure of the active site of proline racemase. Biochemistry 14:4515-4522.

Sampaleanu, L. M. F. Vallée, G. D. Thompson und P. L. Howell. 2001. Three-dimensional structure of the argininosuccinate lyase frequently complementing allele Q286R. Biochemistry. 40:15570-15580.

Sampaleanu, L. M., B. Yu und P. L. Howell. 2002. Mutational analysis of duck δ2 crystallin and the structure of an inactive mutant with bound substrate provide insight into the enzymatic mechanism of argininosuccinate lyase. J. Biol. Chem. 277:4166-4175.

Schlegel, H. G. 1992. Allgemeine Mikrobiologie. 7. überarbeitete Auflage. S.284. Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Schowanek, D., T. C. Feijtel , C. M. Perkins, F. A. Hartmann, T. W. Federle und R. J. Larson. 1997. Biodegradation of [S,S], [R,R] and mixed stereoisomers of ethylene diamine disuccinic acid (EDDS), a transition metal chelator. Chemosphere 34:2375-2391.

Shi, W., J. Dunbar, M. M. K. Jayasekera, R. E. Viola und G. K. Farber. 1997. The structure of L-aspartate ammonia-lyase from *Escherichia coli*. Biochemistry 36:9136-9144.

Siegrist, H., A. Alder, W. Gujer und W. Giger. 1988. Verhalten der organischen Komplexbildner NTA und EDTA in Belebungsanlagen. Wasser - Abwasser 68:101-109.

Sillanpää, M. 1996. Complexing agents in waste water effluents of six Finnish pulp and paper mills. Chemosphere 33:293-302.

Sillanpäa, M. 1997. Environmental fate of EDTA and DTPA. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 152:85-111.

Simpson, A., O. Bateman, H. Driessen, P. Lindley, D. Moss, S. Mylvaganam, E. Narebor und C. Slingsby. 1994. The structure of avian eye lens δ-crystallin reveals a new fold for a superfamily of oligomeric enzymes. Nature Struct. Biol. 1: 724-733.

Snell, E. E und S. J. Di Mari. 1970. Kinetics and mechanism, S.353-370. In P. D. Boyer, H. Lardy und K. Myrbäck (Ed.), The Enzymes Vol. 2., Academic Press, New York NY.

Sorvari, J. und M. Sillanpää. 1996. Influence of metal complex formation on heavy metal and free EDTA and DTPA acute toxicity determined by *Daphnia magna*. Chemosphere 33:1119-1127.

Stegmann, E., U. Theobald, N. Zwicker, K. Wilken, H.-P. Fiedler und W. Wohlleben. 1999. Ein mikrobiologisch hergestellter Komplexbildner - eine Alternative zu EDTA? GIT Labor-Fachzeitschrift 10/99:1044-1046.

Stone, R. L., H. Zalkin und J. E. Dixon. 1993. Expression, purification, and kinetic characterization of recombinant human adenylosuccinate lyase. J. Biol. Chem. 268:19710-19716.

Stumpf, M., Ternes T. A. B. Schuppert, K. Haberer, P. Hoffmann und H. M. Ortner. 1996. Sorption und Abbau von NTA, EDTA und DTPA während der Bodenpassage. Vom Wasser 86:157-171.

Svenson, A, L. Kay und H. Björndal. 1989. Aqueous photolysis of the iron (III) complexes of NTA, EDTA and DTPA. Chemosphere 18:1805-1808.

Sykes, P. 1988. Reaktionsmechanismen der Organischen Chemie. Eine Einführung. 9., überarbeitete Auflage. S.323-324. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.

Takagi, J. S., M. Tokushige, Y. Shimura und M. Kauchisa. 1986. L-aspartate ammonia-lyase and fumarate hydratase share extensive sequence homology. Biochem. Biophys. Res. Commun. 138:568-572.

Takahashi, R., N. Fujimoto, M. Suzuki und T. Endo. 1997. Biodegradabilities of Ethylenediamine-N,N`-disuccinic acid (EDDS) and other chelating agents. Biosc. Biotech. Biochem. 61: 1957-1959.

Trapp, S., R. Brüggemann, W. Kalbfus und S. Frey. 1992. Organische und anorganische Stoffe im Main. Wasser-Abwasser 133:495-504.

Ternes, T. A., M. Stumpf, T. Steinbrecher, G. Brenner-Weiß und K. Haberer. 1996. Identifizierung und Nachweis neuer Metabolite des DTPA in Fließgewässern und Trinkwasser. Vom Wasser 87:1319-1322.

Tiedje, J. M., B. B. Mason, C. B. Warren und E. J. Malek. 1973. Metabolism of nitrilotriacetate by cells of *Pseudomonas* species. Appl. Microbiol. 25:811-818.

Tiedje, J. M. 1975. Microbial degradation of ethylenediaminetetraacetate in soils and sediments. Appl. Microbiol. 30:327-329.

Tiedje, J. M. 1977. Influence of environmental parameters on EDTA biodegradation in soils and sediments. J. Environ. Qual. 6:21-26.

Thomas, R. A. P., K. Lawlor, M. Bailey und L. E. Macaskie. 1998. Biodegradation of metal-EDTA complexes by an enriched microbial population. Appl. Environ. Microbiol. 64: 1319-1322.

Turner, M. A., A. Simpson, R. R. McInnes und P. L. Howell. 1997. Human argininosuccinate lyase: a structural basis for intragenic complementation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:9063-9068.

UBA. Umweltbundesamt 2003. Wasser-Oberflächengewässer – Übersicht über Qualitätsanforderungen der EG, der internationalen Flussgebietsgemeinschaft und der LAWA für organische Umweltchemikalien, Schwermetalle und Pestizide. letzte Aktualisierung. http://www.umweltbundesamt.de/wasser/themen/ow_s4_5.htm

Uetz, T., R. Schneider, M. Snozzi und T. Egli. 1992. Purification and characterization of a two-component monooxygenase that hydroxylates nitrilotriacetate from *"Chelatobacter"* strain ATCC 29600. J. Bacteriol. 174:1179-1188.

Uetz, T. und T. Egli. 1993. Characterization of an inducible membrane-bound iminodiacetate dehydrogenase from *Chelatobacter heintzii* ATCC29600. Biodegradation 3:423-434.

Vallée, F., M. A. Turner, P. L. Lindley und L. P. Howell. 1999. Crystal structure of an inactive duck δ II crystalline mutant with bound argininosuccinate. Biochemistry 38:2425-2434.

Wanke, T. und S. H. Eberle. 1992. Die gaschromatografische Bestimmung von Diethylentriaminpentaessigsäure in Oberflächengewässern. Acta Hydrochim. Hydrobiol. 20:192-196.

Wasser-Wissen. 2000. Institut für Umweltverfahrenstechnik - Universität Bremen. Enthärter. [Online] http://www.wasser-wissen.de/abwasserlexikon/e/enthaerter.htm

Weaver, T. M., D. G. Levitt, M. I. Donnelly, P. P. Wilkens Stevens und L. J. Banaszak. 1995. The multisubunit active site of fumarase C from *Escherichia coli*. Nat. Struct. Biol. 8:654-662.

Williams, S. E., E. M. Woolridge, S. C. Ransom, J. A. Landro, P. C. Babbitt und J. W. Kozarich. 1992. 3-Carboxy-cis,cis muconate lactonizing enzyme from *Pseudomonas putida* is homologous to the class II fumarase family: A new reaction in the evolution of a mechanic motif. Biochemistry 31:9768-9776.

Wisemann, J. S. und J. S. Nichols. 1984. Purification and properties of diaminopimelic acid epimerase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 259:8907-9814.

Witschel, M., S. Nagel und T. Egli. 1997. Identification of the two-enzyme system catalyzing oxidation of EDTA in the EDTA-degrading bacterial strain DSM 9103. J. Bacteriol. 179 (22), 6937-6943.

Witschel, M. und T. Egli. 1998. Purification and characterization of a lyase from the EDTA-degrading bacterial strain DSM 9103 that catalyzes the splitting of [S,S]-ethylendiaminedisuccinate, a structural isomer of EDTA. Biodegradation 8:419-428.

Witschel, M., T. Egli, A. J. B. Zehnder, E. Wehrli und M. Spycher. 1999. Transport of EDTA into cells of the EDTA-degrading bacterial strain DSM 9103. Microbiology 145:973-98.

Woods, S. A., J. S Miller, R. E. Roberts und J. R. Guest. 1986. Structural and functional relationship between fumarase and aspartase. Nucleotide sequences of the fumarase (fumC) and aspartase (aspA) genes of *Escherichia coli* K12. Biochem. J. 237:547-557.

Woods, S. A., J. S. Miller und J. R. Guest. 1988. Sequence homologies between argininosuccinase, aspartase, and fumarase: A family of structurally-related enzymes. FEMS Microbiol. Lett. 51:181-186.

Wu, C., H. Lee, S. Wu, S. Chen, S. Chiou und G. Chang. 1998. Chemical mechanism of the endogenous argininosuccinate lyase activity of duck lens δ2-crystallin. Biochem J. 333:327-334.

Xu, Y., M. W. Mortimer, T. S. Fisher, M. L. Kahn, F. J. Brockman und L. Xun. 1997. Cloning, sequencing and analysis of a gene cluster from *Chelatobacter heintzii* ATCC29600 encoding nitrilotriacetate monooxygenase and NADH:Flavin mononucleotide oxidoreductase. J. Bacteriol. 179:1112-1116.

Yamauchi, T., S.-Y. Choi, H. Okada, M. Yohda, H. Kumagai, N. Esaki und K. Soda. 1992. Properties of aspartate racemase, a pyridoxal 5`-phosphate-independent amino acid racemase. J. Biol. Chem. 267:18361-18364.

Yeh, L.-S., A. Elzanowski, L. T. Hunt und W. C. Barker. 1988. Homology of δ crystrallin and argininosuccinate lyase. Comp. Biochem. Physiol. B. 89:433-437.

Zwicker, N., U. Theobald, H. Zähner und H. P. Fiedler. 1997. Optimization of fermentation conditions for the production of ethylene-diamine-disuccinic acid by *Amycolatopsis orientalis*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 19. 280-285.

Anhang 1

Submitted for publication in Biodegradation

A stereoselective carbon-nitrogen lyase from *Ralstonia* sp. SLRS7 cleaves two of three isomers of iminodisuccinate

Željko Cokesa, Silvia Lakner, Hans-Joachim Knackmuss & Paul-Gerhard Rieger*

*Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart, Allmandring 31, 70569 Stuttgart, Germany (*author for correspondence pg.rieger@po.uni-stuttgart.de)*

Key words: aminopolycarboxylates, C-N lyase, chelating agent, iminodisuccinate (IDS), IDS-lyase, IDS-degrading enzyme.

Abstract

Following biodegradation tests according to the OECD guidelines for testing of chemicals 301F different degradation rates were observed for the three stereoisomers of iminodisuccinate (IDS). A strain was isolated from activated sludge, which used two of three isomers, R,S-IDS and S,S-IDS, as sole source of carbon, nitrogen, and energy. The isolated strain was identified by 16S-rDNA and referred to as *Ralstonia* sp. SLRS7. An IDS-degrading lyase was isolated from the cell-free extract. The enzyme was purified by three chromatographic steps, which included anion-exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography and gel filtration. The lyase catalysed the non-hydrolytic cleavage of IDS without requirement of any cofactors. Cleavage of S,S-IDS led to the formation of fumaric acid and L-aspartic acid. Interestingly R,S-IDS yielded only D-aspartic acid besides fumaric acid. R,R-IDS was not transformed. Thus, the IDS-degrading enzyme is a carbon-nitrogen lyase attacking only the asymmetric carbon atom exhibiting the S-configuration. Besides S,S-IDS and R,S-IDS cleavage, the lyase catalysed also the transformation of certain S,S-IDS metal complexes, namely Ca^{2+}-, Mg^{2+}- and Mn^{2+}-IDS. The maximum enzyme activity was found at pH 8.0 to 8.5 and 35°C. SDS-PAGE analysis revealed a single 57-kDa protein band. The native enzyme was estimated to be around 240 kDa indicating a homotetramer enzyme.

Abbreviations: EDDS, ethylenediaminedisuccinate; EDTA, ethylenediaminetetraacetate; IDS, iminodisuccinate; NTA, nitrilotriacetate

Introduction

Metal chelators, also known as sequestrants or metal binding agents, form strong water-soluble complexes with most alkaline earth and heavy metal ions. These chelators are used for a wide variety of applications e.g., to stabilise the bleaching process in the textile and the pulp & paper industry, to control water hardness ions that interfere with cleaning products, to make micro nutrients bioavailable for agriculture, and in photographic film processing, to name only a few. The two most widely used synthetic chelating agents ethylenediaminetetraacetate (EDTA) and nitrilotriacetate (NTA) belong to the group of aminopolycarboxylates (Figure 1). NTA is readily biodegradable (Siegrist et al. 1988; Alder et al. 1990). A summary of NTA-degrading bacteria isolated from various habitats was given in a review by Kemmler and Egli (1990). The more effective chelator EDTA is poorly biodegradable in municipal sewage treatment plants (Siegrist et al. 1988; Alder et al. 1990; Kari & Giger 1996) despite some encouraging results with selected axenic cultures (Lauff et al. 1990; Witschel et al. 1997; Nörtemann 1999). Photochemical degradation of Fe^{3+}-EDTA in surface waters is presently the only known loss process of EDTA in the environment (Kari et al. 1995).

EDTA is the most commonly used metal chelator, because of its advantageous chemical properties. As a result, EDTA is released into the environment, particularly to surface waters. Ubiquitous distribution of EDTA may have some undesirable consequences such as the remobilisation of heavy metals and radionuclides from soils, sediments and infiltration areas (Gardiner 1976; Means et al. 1978 & 1981). The mobilised toxic heavy metals and radionuclides can be theoretically accumulated by plants and transferred to human beings through the food chain or can cause problems in the preparation of drinking water. Accordingly there is an increasing interest to replace the persistent EDTA by an equally effective but readily biodegradable chelating agent.

Promising aminopolycarboxylates as alternative chelating agents are ethylene diaminedisuccinate (EDDS) and iminodisuccinate (IDS). The chemical structures are shown in Figure 1. Importantly these structures harbour two asymmetric carbon atoms generating three different stereoisomers (R,R; R,S; S,S). In the case of EDDS, the S,S-EDDS isomer is readily biodegradable whereas the R,R-EDDS persists and R,S-EDDS leads to the formation of a recalcitrant end product (Schowanek et al. 1997). In the light of

these results it is notable that up to now only the S,S-EDDS isomer was found to be produced naturally by *actinomycetes* (Nishikiori et al. 1984).

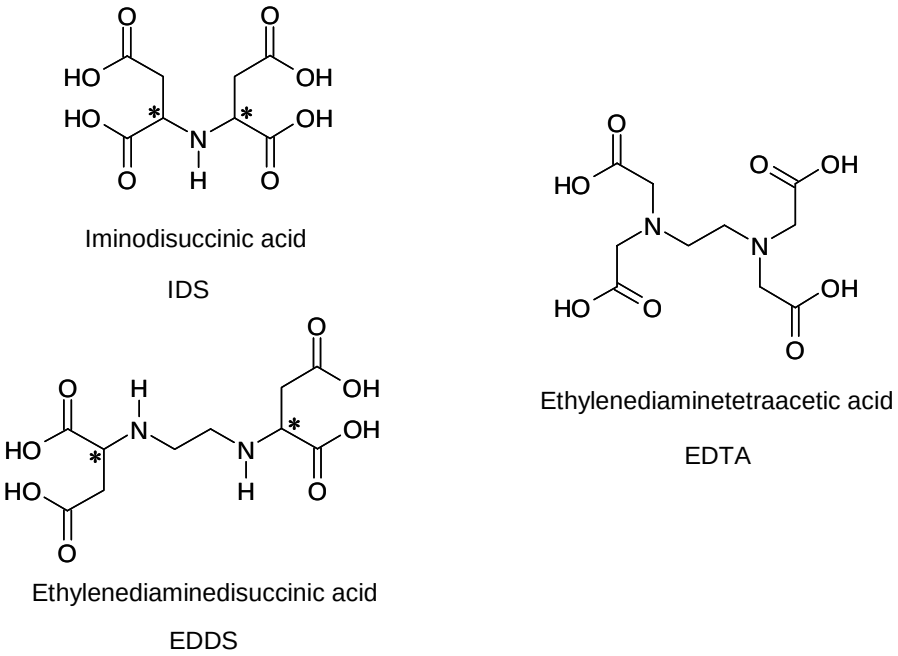


*Figure 1***.** Structural formulas of the chelating agents IDS, EDDS, and EDTA. Asymmetric carbon atoms are marked with asterisk.

IDS is to be classified as a synthetic, medium strength chelating agent and can be synthesize from maleic anhydride, ammonia and sodium hydroxide. This synthesis route produces a mixture of stereoisomers consisting of 25% R,S-IDS, 50% R,S-IDS, and 25% R,R-IDS. IDS is classified as readily biodegradable on the basis of two different standardised biodegradation tests. The OECD 302B test (Zahn-Wellens test) and the OECD 301E test (modified OECD-screening test) achieved a DOC-consumption of 89-99% and 79% respectively after 28 days (Bayer 1998, 2001 & 2002). Investigations on the metabolism of IDS by *Achromobacter xylosoxidans* B3 revealed liberation of aspartic acid but further details on the mechanism are missing (Reinecke et al. 2000). In this publication we report on the isolation of a stereoselective IDS-degrading strain and describe the stereoselective initial transformation of R,S-IDS and S,S-IDS.

Materials and methods

Characterization of the IDS samples

Na_4-IDS isomer mixture (Baypure CX 100 solid): The amount of iminodisuccinate sodium salt was minimum 65% and the solid content (sum of sodium salts) was minimum 85%. The sample contained 50% R,S-IDS, 25% S,S-IDS, and 25% R,R-IDS.

The isomeric purity of the S,S-IDS reference was 100%. The R,R-IDS isomer sample was 94.2% pure, by-products were 4.1% R,S-IDS and 1.7% fumaric acid. The R,S-IDS isomer sample was 94.9% pure, and contained 4% H_2O and 1,1% (R,R-IDS + S,S-IDS). R,S-IDS, S,S-IDS, R,R-IDS as well as the IDS isomer mixture were gifts from the Bayer AG (Leverkusen, Germany).

Chemicals

All other chemicals were of analytical grade and were purchased from Aldrich (Steinheim, Germany), Fluka (Neu-Ulm, Germany), Merck (Darmstadt, Germany), Roth (Karlsruhe, Germany), or Sigma (Deisenhofen, Germany).

Biodegradation test

The biodegradation tests with IDS were performed as described in the OECD guideline for the testing of chemicals (manometric respirometry test 301F). The test was performed with the OxiTop® Control system (WTW, Weilheim, Germany) and inoculation was done with freshly collected activated sludge from the municipal sewage treatment plant in Stuttgart-Büsnau (University Stuttgart, Germany). Relative oxygen consumption was calculated on the basis of the chemical oxygen demand (COD). The COD was measured with the Dr. Lange test system LCK 314 (Düsseldorf, Germany) according to ISO 6060.

Bacterial strain and growth conditions

Ralstonia sp. SLRS7 was isolated from activated sludge of the municipal sewage treatment plant (Stuttgart-Büsnau, Germany) and identified by 16S-rDNA sequencing.

For isolation and growth of *R.* sp. SLRS7 and batch experiments, the following mineral salts medium without nitrogen was used: 20 mg/l Fe(III)-citrate, 1 g/l $MgSO_4 \times 7H_2O$, 50 mg/l $CaCl_2 \times 2H_2O$ and 1 ml trace element solution (Pfennig & Lippert 1966). The mineral salts medium was buffered with Na^+/K^+-phosphate (50 mM, pH 7.4) and supplemented with IDS (5-20 mM) as the sole source of carbon, nitrogen, and energy. The

aqueous stock solution of the IDS isomer mixture (500 mM) was adjusted to pH 7 with hydrochloric acid. The free acids of the isomeric pure IDS samples were dissolved in water and adjusted to pH 7 with sodium hydroxide. The cells were grown in baffled Erlenmeyer flasks on a rotary shaker at 125 rpm and 23°C. Cultivation was done on solidified media containing 1.5% (w/v) agar.

For the production of high biomass amounts for protein purification, the strain was grown in batch cultures in a 10 l aerated fermenter (BIO-MAG, Fa. BCC, Göttingen, Germany) at 23°C, 400 rpm and 1.2 l air min^{-1}. The cells were harvested immediately after consumption of IDS at an optical density at 546 nm of 1.5 to 3 by centrifugation and washed once with 0.05 M Tris/HCl (pH 8.0). Cells were frozen in liquid nitrogen and stored at -30°C. Growth of *R.* sp. SLRS7 with different metal-IDS complexes was monitored by measuring concentrations of dissolved organic carbon (DOC) in cell-free culture fluids with a total organic carbon analyser (TOC-Analysator micro N/C, IDC, Langewiesen, Germany)

Preparation of cell extract

Fifteen grams (wet weight) of frozen cell paste was thawed at room temperature and resuspended in 40 ml of 0.05 M Tris/HCl (pH 8.0). The cells were broken by three passages through a French press (SLM Aminco, Urbane, Ill., U.S.A.) at 7 MPa. After the first passage 10 mg of DNase II (Serva, Heidelberg, Germany) was added. The suspension was kept on ice after each passage. The crude extract was centrifuged for 45 min at 100000×g to remove cells and cell debris. The resulting cell-free extract was used after filtration through 0.22 µm-pore-size filters for enzyme assays and protein purification.

Purification of the IDS-degrading enzyme

The cell-free extract was dialysed 18 h at 6°C (dialysis tubing size 3, molecular weight cut off 12-14 kDa; Medicell Int. Ltd., London) against 0.05 M Tris/HCl (pH 8.0) and then loaded on an anion exchange column (Q Sepharose HR, 1.6 by 10 cm; Pharmacia, Uppsala, Sweden) pre-equilibrated with 0.05 M Tris/HCl buffer (pH 8.0) at a flow rate of 2.0 ml min^{-1}. Fractions containing S,S-IDS-degrading activity were eluted from the column by a linear gradient (200 ml) of 0 to 1 M NaCl in 0.05 M Tris/HCl (pH 8.0) at an NaCl concentration of approximately 0.2 M. Ammonium sulphate was added to the combined fractions containing S,S-IDS-degrading activity to a final concentration of 1 M. Precipitated proteins were removed by centrifugation (5000×g, 15 min). The supernatant was applied on a Phenyl-Superose HR column (1.0 by 10 cm; Pharmacia) pre-equilibrated

with 1 M ammonium sulphate in 0.025 M Tris/HCl (pH 8.5) at a flow rate of 0.5 ml min^{-1}. The enzyme was eluted by a linear gradient (80 ml) of 1 to 0 M ammonium sulphate in 0.025 M Tris/HCl (pH 8.5) at a concentration of 0.4 M ammonium sulphate. Fractions containing S,S-IDS-degrading activity were pooled and then concentrated with Vivaspin concentrators (molecular weight cut off 10 kDa, Sartorius, Göttingen, Germany). The concentrated sample (0.5 ml) was applied on a gel filtration column (Superose 6 HR. 1.0 by 30 cm; Pharmacia) pre-equilibrated with 0.05 M Tris/HCl (pH 8.0) containing 0.1 M NaCl at a flow rate of 0.4 ml min^{-1}. All purification procedures were carried out at 6°C. The purification procedure was monitored by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The protein concentrations were determined as described by Bradford (1976) with bovine serum albumine (Fluka) as the standard. The molecular mass of the subunit and the subunit composition of the enzyme was determined using a 10% discontinuous SDS-polyacrylamide gel (Lämmli 1970) stained with Coomassie brilliant blue G-250 or silver (Shevchenko et al. 1996). The proteins of the low-molecular-weight marker kit (Pharmacia) were used as standards. The native weight of the enzyme was determined by analytical gel filtration as described above. The calibration curve was prepared with the Gel Filtration Calibration Kit (Pharmacia) for high- and low molecular weight protein with the following protein standards: ferritin (450 kDa), catalase (232 kDa), aldolase (158 kDa) and bovine serum albumine (68 kDa).

Enzyme assays

The IDS-degrading activity was measured by adding 5 µl of enzyme to 1.6 ml containing 5 mM S,S-IDS in 0.05 M Tris/HCl (pH 8.0). Aliquots of 100 µl (for ion pair chromatography) or 380 µl (for photometric assay) were withdrawn as a function of time. In order to stop the reaction the samples were diluted with acidic copper sulphate solutions as described in the analysis of IDS. Enzyme assays were performed at 23°C. For amino acid analysis the enzyme reaction was stopped by heating (3 min, 100°C).

Analysis of IDS

For photometric analysis of IDS in enzyme assays, sample aliquots were 1:1 (v/v) diluted with 64 mM $CuSO_4$ (Reinecke et al. 2000). In contrast to the method of Reinecke et al., the pH of the copper solution was adjusted to 1.3 with phosphoric acid to avoid $Cu(OH)_2$ precipitation. Precipitated proteins were removed by centrifugation at 16000×g for 5 min, and the absorption of the supernatant was measured at 710 nm.

Ion pair chromatography of IDS and fumarate was performed on a Purospher® RP18 endcapped column (250×4 mm, Merck, Darmstadt, Germany) by using an isocratic eluent of 12.5% (v/v) methanol in formate buffer (15 mM sodium formate, 5 mM formic acid, and 2 mM tetrabutylammonium hydrogen sulphate). IDS was measured as Cu^{2+}-complex by diluting the samples 10:1 (v/v) with 200 mM copper sulphate (pH adjusted to 1.3 with phosphoric acid). Precipitated proteins were removed by centrifugation at 16000×g for 5 min, and the supernatant was analysed. The detection wavelength of Cu^{2+}-IDS was 240 nm and the flow rate was 0.8 ml min^{-1}. Under these conditions R,S-IDS (t_R = 8.2 min) could be separated from R,R- and S,S-IDS (t_R = 10.5 min). The metabolite fumaric acid (t_R = 12.5 min) was identified by co-chromatography at 215 nm.

HPLC separation and analysis of D- and L-amino acids

D- and L-amino acids were separated and identified by precolumn derivatization with the FLEC/ADAM system ((+)-1-(9-fluorenyl)ethyl chloroformate/ 1-aminoadamantane) according to Einarsson & Josefsson (1987) on a Grom-Sil FLEC 1 250×4.0 mm column (Grom, Herrenberg, Germany). The amino acids were detected with a Waters 470 fluorescence detector (Millipore, Milford, Mass., USA). The excitation wavelength was set at 263 nm and the emission analysed at 313 nm.

Analysis of ammonia

Ammonia concentrations were determined spectrophotometrically by use of a rapid test system (Microquant® 14750, Merck, Darmstadt, Germany).

Conversion by whole cells

As described above, cells of *R.* sp. SLRS7 were grown in mineral salts medium with the IDS isomer mixture (5 mM). IDS-grown cells were obtained by harvesting during exponential growth. The cells were resuspended in Na^+/K^+-phosphate buffer (50 mM; pH 7.4) to an optical density of 5.1 at 546 nm and incubated at 23°C on a rotary shaker (125 rpm) with 6 mM R,S-IDS and 5.7 mM S,S-IDS. The consumption of the IDS isomers was followed by HPLC analysis.

Determination of kinetic parameters

The kinetic parameters were determined by using the Michaelis-Menten equation. The activity was measured as described above by adding 5 µl of enzyme from the Phenyl-

Superose purification step to 1 ml containing concentration from 0.25 to 12.4 mM IDS in 0.05 M Tris/HCl (pH 8.0).

Substrate specificity

The activities towards different metal-IDS complexes and substrates (EDTA, EDDS, N,N´-(1,3-Dicarboxypropyl)-L-arginin) were measured by ion pair chromatography as described in Enzyme Assays using 5 mM substrate. All metal-IDS complexes were converted into the Cu^{2+}-complexes by treating the samples with the acidic copper sulphate solution. In case of Fe-IDS complexes, the samples were diluted 10:4 (v/v) with the copper sulphate solution.

Results

Biodegradability of IDS

An OECD 301F manometric respirometry test was performed to estimate the biodegradability of IDS. The test was carried out with an unadapted activated sludge inoculum from the municipal sewage treatment plant in Stuttgart-Büsnau. As shown in Figure 2 both test substances, the IDS-isomer mixture and the R,S-IDS are readily biodegraded. Remarkably, biodegradation of the isomer mixture did not reach the rate of the R,S-isomer. Therefore, we assumed that not all of the possible IDS-isomers are equally biodegraded. Consequently a biodegradation test with each of the three different isomers was set up. As shown in Figure 3, the R,R-isomer degradation rate was very low.

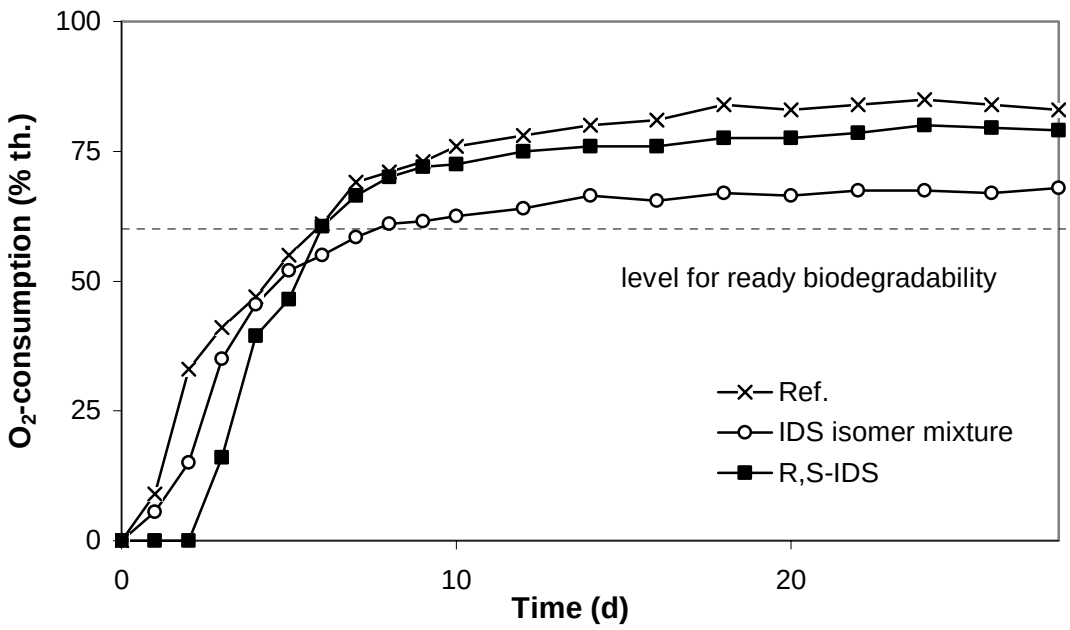


Figure 2. OECD 301F Manometric Respirometry Test. Biodegradation of the IDS-mixture and R,S-IDS by using activated sludge from the municipal sewage treatment plant (University Stuttgart, Büsnau, Germany) as inoculum. Sodium benzoate was used as reference (Ref.) compound. Data are expressed as % of theoretical O_2-consumption.

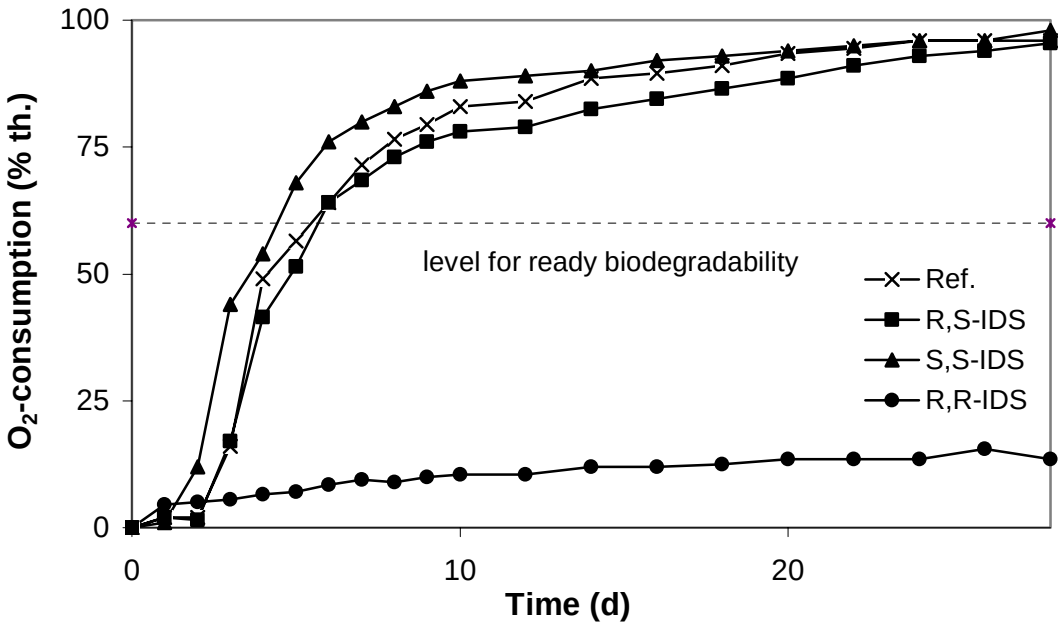


Figure 3. OECD 301F Manometric Respirometry Test. Biodegradation of the three IDS-stereoisomers by using activated sludge from the municipal sewage treatment plant (University Stuttgart, Büsnau, Germany) as inoculum. Sodium benzoate was used as reference (Ref.) compound. Data are expressed as % of the theoretical O_2-consumption.

Enrichment and isolation of S,S-IDS and R,S-IDS degrading bacteria

Enrichment of IDS-degrading bacteria was performed in batch culture at 23°C using mineral salts medium supplemented with 5 mM IDS isomer mixture as the sole source of carbon, nitrogen, and energy. Batch cultures were inoculated with sewage sludge from the municipal sewage treatment plant (Stuttgart-Büsnau, Germany). Enrichment cultures were plated and subcultivated on agar plates containing IDS isomer mixture. Colonies of different morphology were selected. Thus, seven different strains growing on IDS isomer mixture were isolated as pure cultures. Strain SLRS7 was selected for further investigations due to the fact that it exhibited very good growth on solid medium and could be handled in the lab without further safety restrictions. The BIOLOG test system (GN microtitre plates for gram negative cells; BIOLOG Inc., Calif.) identified the strain SLRS7 with high probability as *Comamonas acidovorans* (similarity 0.624).

The strain SLRS7 was finally identified by sequencing the 16S-rDNA gene isolate. A sequence alignment with BLAST databases (Altschul et al. 1997) resulted in highest homologies with *Ralstonia taiwanensis* LMG 19424 & 19425 (accession number AF300324, AF300325) and the formerly assigned *Alcaligenes eutrophus* strain (M32021) with similarity of 98%. In the following the strain is referred to as *R.* sp. SLRS7. Further

characterization revealed the cells as motile rods of 1 µm size, gram-negative, and oxidase-positive.

IDS as a growth substrate

R. sp. SLRS7 was grown in mineral salts medium with R,S-IDS and S,S-IDS as the sole source of carbon, nitrogen, and energy. The strain grew on S,S-IDS or R,S-IDS as substrate at 23°C with a doubling time of 3.5 h or 3.7 h, respectively. During growth on S,S-IDS and R,S-IDS, the pH increased as a result of ammonia excretion by the cells. The amount of ammonia released into the medium after 5 days corresponded to approximately 27% of the nitrogen originating from S,S-IDS and approximately 29% from R,S-IDS, respectively (Figure 4). Bacterial growth and a slight pH-increase was found when R,R-IDS was offered. But this was caused by R,S-IDS and fumaric acid which were both present as impurities in the R,R-IDS sample. For the growth curves, IDS-concentrations were measured by the rapid photometric test as described above. Growth at concentrations of more than 50 mM R,S-IDS and S,S-IDS was hindered, because the pH increased above 10.5. However growth was possible at concentrations even higher than 100 mM under pH-control within a range of 7.0 to 8.5.

Besides free IDS, it was tested if *R.* sp. SLRS7 could grow on different metal-IDS chelates. Therefore, growth test in the presence of 5 mM Mg^{2+}- , Ca^{2+}-, Fe^{2+}-, Cu^{2+}-, or Mn^{2+}-S,S-IDS complexes were conducted. To ensure metal complexation of most of the S,S-IDS, the metal ions were added as sulphate salts in slight excess (5.2 mM) over S,S-IDS (5 mM). The Mg^{2+}-, Ca^{2+}-, Mn^{2+}- and Fe^{2+}-IDS complexes were degraded largely within 3 days. In contrast only about 30% Cu^{2+}-S,S-IDS was degraded within 10 days (data not shown). Hence, one can assume that the Cu^{2+}-ions released during IDS-degradation inhibited the growth of the strain. During growth on Mn^{2+}-, Fe^{2+}-, and Cu^{2+}-IDS complexes the increasing turbidity was also due to precipitation of metal hydroxides, so that degradation was followed by measuring the dissolved organic carbon.

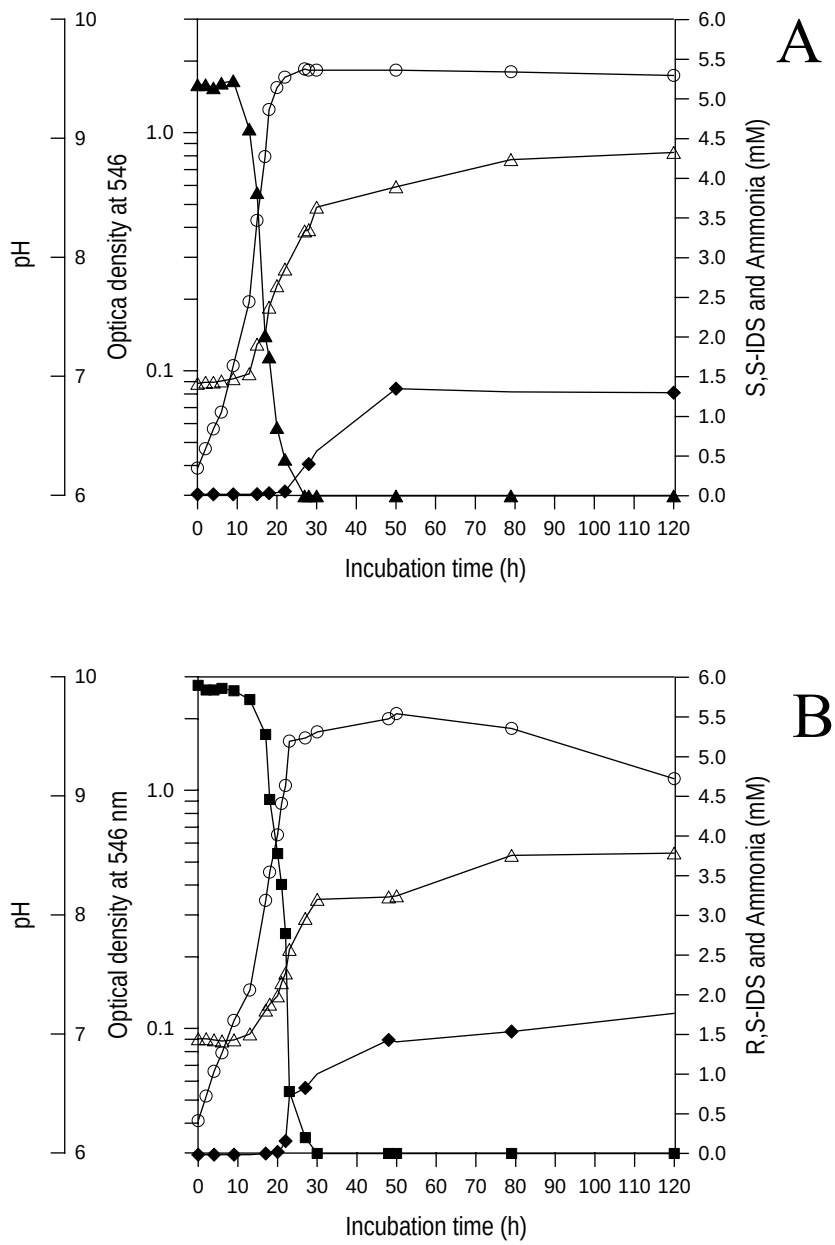


Figure 4. Growth of *R.* sp. SLRS7 in 500 ml Erlenmeyer flasks with 100 ml MSM containing S,S-IDS (A) or R,S-IDS (B) as the sole carbon, nitrogen, and energy source. The cultures were inoculated with a 10% (vol/vol) pre-culture grown with the same source. Incubation temperature was 23°C on a rotary shaker at 125 rpm. A: 5.2 mM starting concentration of S,S-IDS (▲); B: 5.9 mM R,S-IDS (■). Optical density (○), pH (◆), and ammonia (◆).

Experiments with whole cells of *R.* sp. SLRS7 incubated simultaneously with R,S-IDS and S,S-IDS showed that S,S-IDS decreased approximately twice as fast as R,S-IDS (Figure 5). Interestingly, the R,S-IDS consumption increased rapidly after consumption of S,S-IDS. From Figure 5 it cannot be deduced whether S,S- or R,S-IDS is the preferred substrate for uptake or initial transformation.

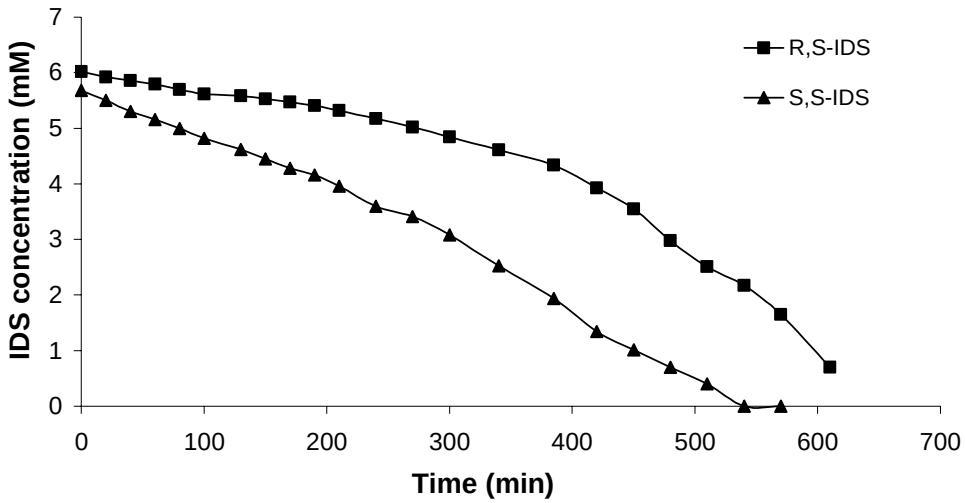


Figure 5. Simultaneous consumption of R,S-IDS and S,S-IDS by whole cells of *R.* sp. SLRS7. Cells were obtained by growth in mineral salts medium with IDS isomer mixture (5 mM). The cells were harvested, resuspended in phosphate buffer (OD_{546}=5.1), and incubated at 23°C with R,S-IDS plus 5.7 mM S,S-IDS. The concentration of IDS was determined by HPLC.

Enzyme purification

To identify the enzyme from *R.* sp. SLRS7 responsible for the initial transformation of IDS, the cell-extract was fractionated by using an anion exchange column, followed by hydrophobic interaction chromatography and gel filtration. The purification procedure is outlined in Table 1. The overall yield during purification was 7.2% and resulted in a 12.5 fold increase in specific activity. Cell free extract of *R.* sp. SLRS7 grown with Nutrient-Broth (NB) medium had no IDS-degrading activity at all. This indicates enzyme induction by the substrate IDS.

Table 1. Purification of an IDS transforming carbon-nitrogen lyase from the bacterial strain *Ralstonia* sp. SLRS7.

Purification step	Vol (mL)	Total amt of protein (mg)	Sp act[a] (µmol of S,S-IDS/min/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Cell-free extract	56	1260	0,85	100	1
Ultracentrifugation	43	753	1.06	74.5	1.2
Q-Sepharose	23	250	2.74	64.0	3.2
Phenyl-superose	17	46.8	7.18	31.4	8.4
Superose 6	1.2	7.3	10.6	7.2	12.5

[a]The specific activity was determined by measuring the disappearance of S,S-IDS.

Once purified, the enzyme was stable for at least 2 weeks at 6°C without significant loss of activity. After 2 month storage at 6°C however only 25% of the starting activity was measured. In this case, the starting activity could almost completely be restored by dithiotreitol treatment. To avoid loss of activity by freezing and thawing, the purified

enzyme was divided in 50 µl portions, then treated with 1 mM dithiothreitol and frozen at -20°C.

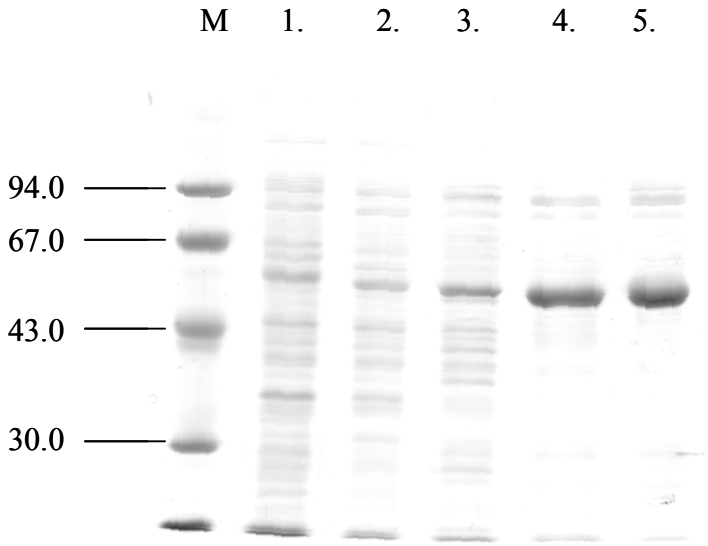


Figure 6. SDS-Page of the C-N lyase from *R.* sp. SLRS7 at different purification steps. Lanes: 1, crude extract; 2, crude extract after ultracentrifugation; 3, after Q-Sepharose; 4, active samples from Phenyl-Superose; 5, purified protein after gel filtration with Superose 6; M, molecular mass markers. Numbers on the left are molecular masses in kilodaltons. Lanes 1-5 were loaded with 5 µg protein.

Molecular weight and subunit structure

The molecular mass of the native enzyme calculated by gel filtration was 240 kDa. The SDS-PAGE analysis gave a single protein band of approximately 57-kDa (Figure 6), indicating that the IDS-degrading enzyme is most likely a homotetramer.

Transformation of IDS

The pure enzyme degraded S,S-IDS with formation of fumaric acid and L-aspartic acid without requirement of any cofactors. In addition, it catalysed also the degradation of R,S-IDS, however only D-aspartic acid was liberated besides fumaric acid (Figure 7). The R,R-IDS isomer was not transformed by the enzyme. These results demonstrate that the IDS-degrading enzyme is a carbon-nitrogen lyase that catalyses a cleavage reaction of the C-N bond between the succinic and the aspartic acid residue. Interestingly, this non-hydrolytic cleavage of R,S-IDS led only to the formation of D-aspartic acid, indicating that the S-configuration of IDS is mandatory for the cleavage reaction.

The carbon-nitrogen lyase catalyses also the reverse reaction. An equilibrium constant K_{eq} of 81×10^{-3} for R,S-IDS and 120×10^{-3} for S,S-IDS was calculated according to the following equation K_{eq}=c(fumaric acid)^2/c(IDS) (data not shown). Thus, the equilibrium

for both reactions is clearly in favour on the side of the cleavage products fumaric acid and aspartic acid.

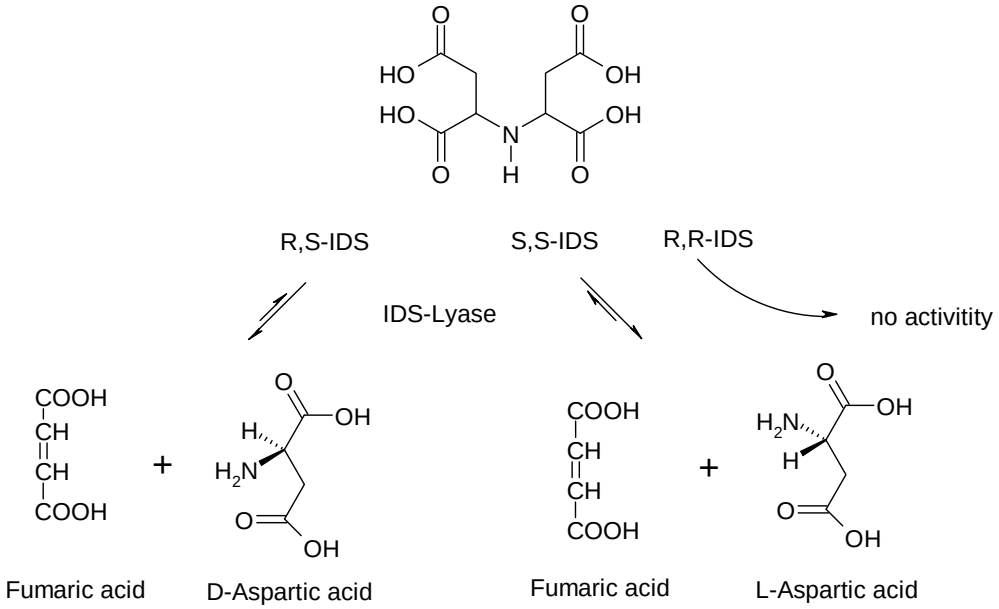


Figure 7. Initial transformation of IDS by *Ralstonia* sp. SLRS7.

Enzymatic characterization of the C-N lyase

The enzyme was active in a broad range from pH 6 to 11.5 with an optimum at pH 8 to 8.5. The maximum activity was found to be at 35°C whereas no activity was observed at 57.5°C. The determined kinetic parameters are shown in Table 2. The catalytic constant (k_{cat}) for S,S-IDS was approximately twice as high as for R,S-IDS and the catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) of the two isomers exhibited approximately the same value. The pure enzyme showed a typical protein absorption spectrum with a maximum at 280 nm.

Table 2. Steady-state kinetic parameters of the C-N lyase.

Substrate	K_m (mM)	V_{max} (µmol/min)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (s^{-1} M^{-1})
S,S-IDS	2.5 (0.5)	270 (20)	79	$3.2 * 10^4$
R,S-IDS	1.0 (0.25)	170 (9)	49	$4.9 * 10^4$

The values in parentheses are standard deviations.

Metal-IDS chelates as substrates for the C-N lyase

It can be expected that in natural systems IDS occur mostly as metal-complexes. Hence, it was tested whether metal-S,S-IDS chelates were transformed by the lyase. The metal-complexes were provided by combining equimolar concentrations of metal ions and S,S-IDS. To ensure complete complexation with IDS, metal-sulphate (5.2 mM) was added

in slight excess to S,S-IDS (5mM). Among the different metal-complexes tested, Ca^{2+}-IDS was consumed with the highest specific activity. Mg^{2+}-IDS and Mn^{2+}-IDS were also transformed but at lower rates. All other tested metal-IDS complexes (Zn^{2+}-, Cu^{2+}-, Fe^{2+}-, and Fe^{3+}-S,S-IDS) were not transformed at all (Table 3). This could be due to toxic effects of the metal ions or to the lack of activity towards these metal IDS complexes.

Further substrates for the C-N lyase

Activities with other chelating agents such as EDTA, EDDS isomer mixture and S,S-EDDS were tested. The activity with S,S-EDDS was measured, but showed only 1.4% of the S,S-IDS degrading activity (Table 3). In contrast N,N`-(1,3-Dicarboxypropyl)-L-arginin (Nopaline), which harbours structural similarity to IDS and might be a potential natural substrate, was not transformed.

Table 3. Activity of the C-N lyase from *Ralstonia* sp. SLRS7 with a variety of substrates.

Substrate	Activity[a] (µmol min^{-1} mg^{-1})	Activity (% of activity with S,S-IDS)
S,S-IDS	7.18	100
Ca^{2+}-S,S-IDS	4.56	63.5
Mg^{2+}-S,S-IDS	2.66	37
Mn^{2+}-S,S-IDS	0.07	1
Fe^{3+}-S,S-IDS	0	no transformation
Fe^{2+}-S,S-IDS	0	no transformation
Zn^{2+}-S,S-IDS	0	no transformation
Cu^{2+}-S,S-IDS	0	no transformation
S,S-EDDS	0.1	1.4
Nopaline	0	no transformation
EDTA	0	no transformation

[a]Assays were performed as described in Materials and Methods.

Liberation of ammonia

Ammonia, which was responsible for the pH increase during growth, must be a product from aspartate catabolism. The purified carbon-nitrogen lyase did not cleave L-/D-aspartic acid to form ammonia and fumaric acid, so that a second carbon-nitrogen lyase, probably an L-aspartate ammonia-lyase, must be induced during growth as it is well known for the aspartate metabolism.

Discussion

Initial biodegradation tests according to OECD guideline 301F with activated sludge inoculum from the municipal treatment plant in Stuttgart-Büsnau revealed 69% biodegradation after 28 days indicating ready biodegradability. An IDS-degrading strain was isolated from this sludge and identified. Reinecke et al. proposed two cleavage mechanism for IDS degradation. One involves a monooxygenase system as shown for EDTA (Witschel et al. 1997) and NTA (Uetz et al. 1991). The second proposed a cleavage mechanism similar to that described by Witschel & Egli. (1998) for EDDS. In the present work the IDS-degrading strain *R.* sp. SLRS7 confirmed an initial lyase-dependent degradation of IDS. The purified enzyme transformed S,S-IDS and R,S-IDS and in both cases led to the formation of fumaric acid. For S,S-IDS transformation the expected metabolite L-aspartic acid was detected, whereas R,S-IDS transformation led to D-aspartic acid. The metabolites were identified based on comparison with authentic standards. These results demonstrated that the enzyme cleaves only an S-configuration at the asymmetric carbon atom. Necessity of S-configuration was also observed for EDDS-degradation by strain DSM 9103 (Witschel & Egli 1998).

The IDS-degrading enzyme could be classified as a carbon-nitrogen lyase (EC 4.3.3.). Further metabolism of L-aspartic acid is supposedly based on an L-aspartate ammonia-lyase which generates fumaric acid and ammonia. Thus, the deamination of L-aspartic acid is responsible for the pH increase during growth on S,S-IDS. D-Aspartic acid metabolism probably starts with an aspartate racemase which funnels D-aspartic acid into the L-aspartic acid metabolism. In whole cell conversion assays S,S-IDS consumption was approximately twice as fast as R,S-IDS. Supposedly this is due to the fact that the lyase attacks S,S-IDS on both S-configuration carbons, whereas R,S-IDS could only be attacked from one side. Therefore, the probability for cleavage is twice as high for S,S-IDS compared to R,S-IDS. Thus, S,S-IDS exhibited approximately two times higher k_{cat} in comparison to R,S-IDS which approves stereoselectivity of the enzyme. The purified C-N lyase accepted free S,S-IDS as well as Ca^{2+}-, Mg^{2+}-, and Mn^{2+}-S,S-IDS complexes as substrate but no Fe^{2+}, Fe^{3+}-, and Cu^{2+}-S,S-IDS. In contrast, SLRS7 grew well on Ca^{2+}-, Mg^{2+}-, Mn^{2+}-, and also Fe^{2+}-IDS, whereas growth on Cu^{2+}-IDS was poor. It must be pointed out that Cu^{2+}-IDS exhibited a complex-formation constant ($pK_{Cu\text{-}IDS}$) of 14.3, whereas Fe^{2+}-, Mn^{2+}-, Ca^{2+}-, and Mg^{2+}-IDS exhibited pK-values of only 8.2, 7.3, 6.7, and 6.0 (Bayer, 1998). This strongly suggests that biodegradability of metal-IDS complexes

depends on the concentration of free IDS. Consequently metal complexes with lower $pk_{Me--IDS}$-values are more easily biodegraded. Such relationship between the complex-formation constant and the biodegradability of the different metal complexes was also observed for EDDS by Witschel & Egli (1998). An explanation for this interdependence could be that only free-IDS can enter the cell. This is indicated also by metal hydroxide precipitation during growth on metal-IDS. Remarkably Fe^{2+}-IDS and Cu^{2+}-IDS were not transformed by the purified lyase whereas Fe^{2+}-IDS is readily biodegraded by SLRS7. If complexed IDS is the form of cell uptake, the question arises how bacteria can handle the amounts of metal ions entering into the cell. An excretion of the metal ions could be considered. For EDTA transport into cells of strain DSM 9103 Witschel et al. (1999) reported that only free EDTA and complexes with low complex--formation constant were taken up. IDS uptake by strain SLRS7 should probably take place in a similar manner. It is important to mention that IDS occur in natural systems salts medium used.

The activity of the C-N lyase was tested with other chelating agents such as S,S-EDDS, EDTA and the opine nopaline. Only S,S-EDDS was transformed, but the measured activity differed from the EDDS-degrading lyase from strain DSM 9103 (Witschel et al. 1998) by three orders of magnitude. Consistently, both lyases only accept the S-configuration, they resemble in molecular mass and activity towards metal-complexes. A significant difference is the subunit organisation. The EDDS degrading-lyase from strain DSM 9103 is a homodimer in contrast to a homotetramer of the IDS-degrading system. Overall one can assume, that the two lyases belong to the same enzyme family (EC 4.3.3). The natural function of the C-N lyase remains unknown.

It will be of interest whether synthesis of new chemicals must be adapted to naturally occurring stereoselective cleaving enzymes in order to ensure biodegradability or if natural microbial communities provide alternative routes to circumvent stereoselective biodegradation. This is subject of further investigations.

Acknowledgements

We thank the Bayer AG, Leverkusen, Germany for funding this work and Dr. Torsten Groth (Bayer) for supplying us with IDS isomer mixture and the pure isomers.

References

Alder AC, Siegrist H, Gujer W & Giger W (1990) Behaviour of NTA and EDTA in biological waste water treatment. Water Res. 24:733-742.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI_BLAST; a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Bayer AG (1998) IDS Na-Salz. Eine neue umweltfreundliche Alternative zu klassischen Komplexierungsmitteln. Brochure of Bayer, Leverkusen, Germany.

Bayer AG (2001) Safety Data Sheet 857037/10 of Bayer, Leverkusen, Germany

Bayer AG (2002) Safety Data Sheet 699229/04 of Bayer, Leverkusen, Germany

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.

Einarsson S & Josefsson B (1987) Separation of amino acid enantiomers and chiral amines using precolumn derivatization with (+)-1-(9-Fluorenyl)ethylchloroformate and reversed-phase liquid chromatography. Anal. Chem. 59:1191-1195.

Gardiner J (1976) Complexation of trace metals by ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in natural waters. Water Res. 10:507-514.

Kari FG, Hilger SU & Cannonica S (1995) Determination of the reaction quantum yield for the photochemical degradation of Fe(III)-EDTA - implications for the environmental fate of EDTA in surface waters. Environ. Sci. Technol. 29:1008-1017.

Kari FG & Giger W (1996) Speciation and fate of ethylenediaminetetraacetate in municipal wastewater treatment. Water Res. 30:122-134.

Kemmler J & Egli T (1990) Nitrilotriacetat-abbauende Bakterien. gwf Wasser Abwasser 131:23-27.

Lämmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 227:680-685.

Lauff JJ, Steele DB, Coogan LA & Breitfeller JM (1990) Degradation of the ferric chelate of EDTA by a pure culture of an *Agrobacterium sp*. Appl. Environ. Microbiol. 56:3346-3353.

Means JL, Crerar DA & Duguid JO (1978) Migration of radioactive wastes: radionuclide mobilization by complexing agents. Science 200:1477-1481.

Means JL & Alexander CA (1981) The environmental biogeochemistry of chelating agents and recommendations for the disposal of chelated radioactive wastes. Nucl. Chem. Waste Manag. 2:183-196.

Nishikiori T, Okuyama A, Naganawa T, Takita T, Hamada M, Takeuchi T, Aoyagi T & Umezawa H (1984) Production by *actinomycetes* of (S,S)-N,N`-ethylenediamine-disuccinic acid, an inhibitor of phospholipase C. J. Antibiot. 37:426-427.

Nörtemann B (1992) Total degradation of EDTA by mixed cultures and a bacterial isolate. Appl. Environ. Microbiol. 58:671-676.

Nörtemann B (1999) Biodegradation of EDTA. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51:751-759.

Pfennig N & Lippert KD (1966) Über das Vitamin B_{12}-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. Arch. Mikrobiol. 55:245-256.

Reinecke F, Groth T, Heise KP, Joentgen W, Müller N, & Steinbüchel A (2000) Isolation and characterization of an *Achromobacter xylosoxidans* strain B3 and other bacteria capable to degrade the synthetic chelating agent iminodisuccinate. FEMS Microbiol. Lett. 188:41-46.

OECD (1993) Guidelines for Testing of Chemicals. The OECD Expert group on Degradation and Accumulation. Ready Biodegradability: 301F Manometric Respirometry Test. Organization for Economic Cooperation and Development. Paris, France.

Schowanek D, Feijtel TC, Perkins CM, Hartmann FA, Federle TW & Larson RJ (1997) Biodegradation of [S,S], [R,R] and mixed stereoisomers of ethylene diamine disuccinic acid (EDDS), a transition metal chelator. Chemosphere 34:2375-2391.

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O & Mann M (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. Anal. Chem. 68:850-858.

Siegrist H, Alder A, Gujer W & W. Giger (1988) Verhalten der organischen Komplexbildner NTA und EDTA in Belebungsanlagen. Wasser - Abwasser 68:101-109.

Uetz T, Schneider R, Snozzi M & Egli T (1991) Purification and characterization of a two-component monooxygenase that hydroxylates nitrilotriacetate from *Chelatobacter* strain ATCC 29600. J. Bacteriol. 174:1179-1188.

Witschel M, Nagel S & Egli T (1997) Identification of the two-enzyme system catalyzing oxidation of EDTA in the EDTA-degrading bacterial strain DSM 9103. J. Bacteriol. 179:6937-6943.

Witschel M & Egli T (1998) Purification and characterization of a lyase from the EDTA-degrading bacterial strain DSM 9103 that catalyses the splitting of [S,S]-ethylenediaminedisuccinate, a structural isomer of EDTA. Biodegradation 8:419-428.

Witschel M, Egli T, Zehnder AJB, Wehrli E & Spycher M (1999) Transport of EDTA into cells of the EDTA-degrading bacterial strain DSM 9103. Microbiology 145:973-983.

Anhang 2

Submitted for publication in Applied and Environmental Microbiology

Biodegradation of all Stereoisomers of the EDTA-substitute Iminodisuccinate by *Agrobacterium tumefaciens* BY6 requires an Epimerase and a Stereoselective C-N Lyase

Željko Cokesa, Hans-Joachim Knackmuss, and Paul-Gerhard Rieger*

Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart, 70569 Stuttgart, Germany

*Corresponding author. Mailing address: Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart, 70569 Stuttgart, Germany.

Phone:49-711-6855480. Fax:49-711-6855725. E-mail:pg.rieger@po.uni-stuttgart.de.

ABSTRACT

Biodegradation tests according to OECD 301F (manometric respirometry test) with technical iminodisuccinate revealed ready biodegradability for all stereoisomers of iminodisuccinate (IDS). The IDS-degrading strain *Agrobacterium tumefaciens* BY6 was isolated from activated sludge. The strain was able to grow on each IDS isomer as well as on Fe^{2+}-, Mg^{2+}-, and Ca^{2+}-IDS complexes as the sole source of carbon, nitrogen, and energy. In contrast, biodegradation of and growth on Mn^{2+}-IDS was rather scant and very slow on Cu^{2+}-IDS. Growth and turnover experiments with *A. tumefaciens* BY6 indicated that the isomer R,S-IDS is the preferred substrate.

The IDS degrading enzyme system isolated from this organism consists of an IDS-epimerase and a C-N lyase. The C-N lyase is stereospecific for the cleavage of R,S-IDS generating D-aspartic acid and fumaric acid. The decisive enzyme for S,S-IDS and R,R-IDS degradation is the epimerase. It transforms S,S-IDS and R,R-IDS into R,S-IDS. Both enzymes do not require any cofactors. The two enzymes were purified, characterized, and the N-termini sequenced. The purified lyase and also the epimerase catalyzed the transformation of alkaline earth metal-IDS complexes, while heavy metal-IDS complexes were transformed rather slowly or not at all.

The observed mechanism for the complete mineralization of all IDS isomers involving an epimerase offers an interesting possibility of funneling all stereoisomers into a catabolic pathway initiated by a stereoselective lyase.

INTRODUCTION

Synthetic D,L-aspartic-N-(1,2-dicarboxyethyl) tetrasodium salt, also known as sodium iminodisuccinate (IDS), belongs to the group of aminopolycarboxylate chelating agents. IDS is a medium-strong chelator that is able to substitute EDTA in cases where rather moderate chelating agents are sufficient for masking alkaline earth or heavy metal ions. The most commonly used chelator EDTA is of major concern because of its persistence in conventional waste water treatment system. Because of its versatile use large amounts of EDTA are readily released into the aquatic environment (4). Accumulated EDTA in water has the potential to remobilize toxic heavy metals in aqueous sediments or infiltration areas (15, 16). Thus, remobilization could cause heavy metal contamination in drinking water. Successful biodegradation of EDTA was observed only under laboratory conditions by special strains (12, 14, 24). A natural reduce for Fe^{3+}-EDTA is photodegradation as reported by Kari et al. (10).

IDS as a substitute of EDTA is used in a variety of applications including detergent formulations, corrosion inhibitors, production of pulp and paper, textiles, ceramics, in photochemical processes, and as trace nutrient fertilizers in agriculture. It is effective as a bleaching agent stabilizer (H_2O_2), water softener, and deposit remover with a superior ecological profile (2).

Sodium iminodisuccinate is produced from maleic anhydride, water, sodium hydroxide, and ammonia. This route yields a mixture of stereoisomers consisting of 25% S,S-IDS, 25% R,R-IDS, and 50% of the meso forms R,S-IDS (20). It is a so-called pentadentate chelating ligand. The chelation involves the four carboxylate groups and the nitrogen atom. It forms an octahedral complex conditional upon an occupation of the sixth coordination position by a water molecule (3).

In the present work we describe a two enzyme-system from the strain *Agrobacterium tumefaciens* BY6 that catalyzes the key reaction in the degradation of all IDS isomers.

MATERIALS AND METHODS

IDS test samples and chemicals. The tetrasodium iminodisuccinate isomer mixture or technical IDS (Baypure CX™ 100, solid) contained 50% R,S-IDS, 25% S,S-IDS, and 25% R,R-IDS. The amount of iminodisuccinate sodium salt was minimum 65% and the solid content (sum of sodium salts) was minimum 85%.

The isomeric purity of the S,S-IDS test sample was 100% whereas the R,R-IDS sample was 94.2% pure (with 4.1% R,S-IDS, 1.7% fumaric acid). The R,S-IDS sample was 94.9% pure (containing 4% H_2O and 1.1% R,R-IDS + S,S-IDS). The aqueous IDS stock solutions were neutralized to pH 7.0 either with hydrochloric acid or sodium hydroxide.

R,S-IDS, S,S-IDS, R,R-IDS as well as the technical IDS (Baypure CX™ 100) were gifts from the Bayer AG (Leverkusen, Germany). All other chemicals were of analytical grade and were obtained from Aldrich (Steinheim, Germany), Fluka (Neu-Ulm, Germany), Merck (Darmstadt, Germany), Roth (Karlsruhe, Germany), or Sigma (Deisenhofen, Germany).

Biodegradation test. The biodegradation tests were performed as described in the OECD guideline for testing chemicals by using the manometric respirometry test 301F (17). The test was carried out with the OxiTop® Control system (WTW, Weilheim, Germany). The activated sludge inoculum was obtained from the Bürrig waste water treatment plant (Leverkusen, Germany), which is a combined industrial/municipal plant. The chemical oxygen demand COD was determined with the Dr. Lange test system LCK 314 (Düsseldorf, Germany).

Bacterial strain and growth conditions. *Agrobacterium tumefaciens* BY6 was isolated from activated sludge of the Bürrig waste water treatment plant and identified by 16S-rDNA sequencing.

For isolation, growth and batch experiments, a mineral salts medium without nitrogen was used, containing the following: 20 mg/l Fe(III)-citrate; 1 g/l $MgSO_4 \times 7H_2O$; 50 mg/l $CaCl_2 \times 2H_2O$; 0.1 % (v/v) trace element solution (18). The mineral salts medium was buffered with 50 mM Na^+/K^+-phosphate buffer (pH 7.4) and contained 5 to 20 mM IDS as the sole source of carbon, nitrogen, and energy. Solid media were prepared by the addition of 1.5% (w/v) agar.

The cells were grown in baffled 3 l Erlenmeyer flasks on a rotary shaker at 125 rpm and room temperature (approximately 23°C) containing medium in volumes up to 30% of the flask volume. The cells were harvested by centrifugation immediately after complete consumption of IDS reaching an optical density of 1.5 to 2.5 at 546 nm. The pellet was washed twice with 0.05 M Tris/HCl (pH 8.0). Cells were frozen in liquid nitrogen and stored at -30°C until use.

Preparation of cell extract. Frozen cell paste (15 to 30 grams wet weight) was thawed at room temperature and resuspended in 40 ml of 0.05 M Tris/HCl (pH 8.0). The cell suspension was treated with 30 mg lysozyme (Fluka, Neu-Ulm, Germany) for 1 h at 23°C and thereafter overnight at 6°C. Then, the cells were disrupted by four passages through a French press at 7 MPa (SLM Aminco, Urbane, Ill.). After the first passage 10 mg of DNase I (ICN Biomedicals, Ohio, U.S.A.) was added. The suspension was kept on ice after each passage. Cell debris were removed by centrifugation at 100000×g and 4°C for 45 min. The resulting cell-free extract was filtered through a 0.22 µm-pore-size filter and finally used for enzyme assays and protein purification.

Purification of the carbon-nitrogen lyase (C-N lyase) and the IDS-epimerase. The cell-free extract was dialyzed overnight at 6°C (dialysis tubing size 3, molecular weight cut off of 12-14 kDa; Medicell Int. Ltd., London) against 0.05 M Tris/HCl (pH 8.0) and then applied to an anion exchange column (Q Sepharose HR, 1.6 by 10 cm; Pharmacia, Uppsala, Sweden) pre-equilibrated with 0.05 M Tris/HCl buffer (pH 8.0) at a flow rate of 1.5 ml min^{-1}. In order to optimize the separation of the two enzymes on the anion exchange column, the purification was done by stepwise elution.

Purification of the C-N lyase: A linear gradient (150 ml) of 0 to 0.75 M NaCl in 0.05 M Tris/HCl (pH 8.0) was used with a step at 0.325 M NaCl (8 ml). Fractions containing R,S-IDS-degrading activity were eluted at NaCl concentrations of 0.15 M to 0.3 M. The collected fractions were dialyzed as described above and loaded on a second anion exchange column (Mono Q HR, 1.6 by 10 cm; Pharmacia) pre-equilibrated with 0.05 M Tris/HCl buffer (pH 8.0) at a flow rate of 0.4 ml min^{-1}. The corresponding fractions were eluted from the column by a linear gradient (100 ml) of 0 to 1 M NaCl in 0.05 M Tris/HCl (pH 8.0) at NaCl concentrations of approximately 0.25 to 0.35 M. Ammonium sulfate was added to the combined fractions containing R,S-IDS-degrading activity to a final concentration of 1 M. Precipitated proteins were removed by centrifugation (5000×g, 15 min) and the supernatant applied to a Phenyl-Superose HR

column (1.0 by 10 cm; Pharmacia) pre-equilibrated with 1 M ammonium sulfate in 0.025 M Tris/HCl (pH 8.5) at a flow rate of 0.75 ml min^{-1}. The enzyme was eluted by a linear gradient (80 ml) of 1 to 0 M ammonium sulfate in 0.025 M Tris/HCl (pH 8.5) at a concentration of 0.625 to 0.55 M. Fractions containing R,S-IDS-degrading activity were pooled and subsequently concentrated with Vivaspin 2 and 6 concentrators (molecular weight cut off 10 kDa, Sartorius, Göttingen, Germany). Aliquots of 0.5 ml of the concentrated sample (4 ml) were applied on a gel filtration column (Superose 6 HR 1.0 by 30 cm; Pharmacia) pre-equilibrated with 2.5 mM K^+/Na^+-phosphate buffer (pH 7.5) at a flow rate of 1.0 ml min^{-1}. The collected samples were demineralized and then prepared for loading on a Hydroxyapatit column (Bio-Scale CHT-I, 5 ml, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A.). Fractions containing R,S-IDS-degrading activity were eluted from the column by a linear gradient (50 ml) of 2.5 to 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) at salt concentrations of 50 mM.

Purification of the IDS-epimerase: The IDS-epimerase was obtained from an anion exchange column (Q Sepharose HR, 1.6 by 10 cm; Pharmacia) by a linear gradient (230 ml) of 0 to 1 M NaCl in 0.05 M Tris/HCl (pH 8.0) with a step at 0.3 M NaCl (30 ml). IDS-epimerase activity was measured in the fractions with 0.4 to 0.5 M NaCl. The combined fractions were set to a final concentration of 1 M ammonium sulfate, precipitated proteins were removed by centrifugation (5000×g, 15 min) and the supernatant loaded on a Phenyl-Superose HR column (1.0 by 10 cm; Pharmacia). The column pre-equilibration and the gradient were performed the same way as described above for the R,S-IDS degrading enzyme. The epimerase was eluted with 0.7 to 0.55 M ammonium sulfate.

All purification procedures were carried out at 6°C. The protein concentration was estimated according to Bradford (5) with bovine serum albumine (Fluka) as standard. The purification procedure was monitored by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The molecular mass of the subunit and the subunit composition of the enzyme was determined using a discontinuous 10% SDS-polyacrylamide gel following the protocol of Lämmli (11). The proteins of the low-molecular-weight marker kit (Pharmacia) were used as standards. The gels were stained with Coomassie brilliant blue G-250. The native weight of the two enzymes were determined by analytical gel filtration (Superose 6 HR 1.0 by 30 cm; Pharmacia). The calibration curve was prepared with the Gel Filtration Calibration Kit (Pharmacia)

for high- and low molecular weight protein containing the following protein standards: ferritin (450 kDa), catalase (232 kDa), aldolase (158 kDa) and bovine serum albumine (68 kDa). The isoelectric point (pI) was analyzed with a PhastSystem (Pharmacia) and a PhastGel IEF 3-9 (Pharmacia).

Enzyme assays. The C-N lyase or IDS-epimerase activity were assayed by adding 5 to 10 µl of enzyme to 1.0 ml containing 5 mM R,S-IDS in 0.05 M Tris/HCl (pH 8.0) or 5 mM R,R-IDS in 0.05 M Tris/HCl (pH 8.5), respectively**.** Aliquots of 100 µl were taken, diluted with 10 µl copper sulfate (200 mM, pH 1.3 adjusted with phosphoric acid) to terminate the reaction. The activity of IDS-epimerase and the C-N lyase were determined by measuring the disappearance of the appropriate substrate by HPLC. Enzyme assays were performed at 23°C. For amino acid analysis from the lyase reaction the enzyme was inactivated by heating (3 min, 100°C) instead of acidification.

Determination of pH, temperature optima, and kinetic parameters. The enzyme assays were performed as described above. The specific activity was measured at various pH within the range of pH 5 to pH 10. A reaction buffer containing 50 mM Tris buffer (pH 7.5 to 9.0), Na-phosphate buffer (pH 5 to 7) and Na-carbonate buffer (pH 9.0 to 10) was used for the assay. For the C-N lyase activity 5 mM R,S-IDS was used as substrate, epimerase activity was tested with 5 mM S,S-IDS. The temperature optima of the two enzymes were determined at pH 8.5.

The kinetic parameters were determined using various substrate concentrations from 0.25 to 12.5 mM. Data were fitted by using the Michaelis-Menten equation. The enzyme assays were performed with 10 µl purified C-N lyase and 5 µl purified IDS-epimerase.

Analytical methods. For the separation of the IDS diastereomers and analysis of the metal-IDS complexes, ion pair chromatography was performed by using a Purospher® RP18 endcapped column (250×4.0 mm, Merck) and an isocratic eluent of 12.5% (v/v) methanol in formate buffer (15 mM sodium formate, 5 mM formic acid, and 2 mM tetrabutylammonium hydrogen sulfate). IDS diastereomers were measured as Cu^{2+}-complex at 240 nm. The metabolite fumaric acid was identified by co-chromatography with an authentic sample at 215 nm. The activities towards different metal-IDS complexes were measured after conversion to the respective copper complexes as described previously (7).

The sum of the IDS isomers was measured by a rapid photometric test (7). D- and L-aspartic acid were separated and identified by precolumn derivatization with the FLEC/ADAM system ((+)-1-(9-fluorenyl)ethyl chloroformate/ 1-aminoadamantane) according to Einarsson and Josefsson (8) on a Grom-Sil FLEC 1 250×4.0 mm (Grom, Herrenberg, Germany). Ammonia concentrations were determined spectro-photometrically by use of a commercial test system (Microquant® 14750, Merck, Darmstadt, Germany). The dissolved organic carbon (DOC) was measured with the TOC-Analyzator micro N/C (IDC, Langewiesen, Germany).

Quantification of S,S-IDS and R,R-IDS in equilibrium. The equilibrium composition of the three IDS isomers was determined with the help of a *Ralstonia* sp. SLRS7 cell free extract (7). Different concentrations of each IDS isomer (5-18.5 mM) were prepared as described in Enzyme assays by using 10 µl of purified epimerase. Aliquots were taken and measured until the equilibrium was established, approximately 18-24 h. Then the assay (500 µl) was heated for 10 min at 100°C to inactivate the IDS-epimerase activity and incubated with the cell-free extract until R,R-IDS was completely consumed. The cell-free extract from *Ralstonia* sp. SLRS7 is able to transform almost completely S,S-IDS and R,S-IDS whereas R,R-IDS remains intact. The S,S-IDS concentration in equilibrium was calculated from the difference of the starting concentration of R,R-IDS plus S,S-IDS and the remaining R,R-IDS after enzymatic treatment.

Conversion of IDS by whole cells. *A. tumefaciens* BY6 was grown in mineral salts medium with technical IDS (5 mM) and harvested immediately after complete IDS-consumption. The cells were resuspended in phosphate buffer (50 mM; pH 7.4) to an optical density of 3.5 at 546 nm and incubated with a mixture of 7.5 mM R,S-IDS and 7.1 mM S,S-IDS at 23°C on a rotary shaker (125 rpm). The cell suspension was divided into two samples when the maximum rate of R,R-IDS consumption was observed. One sample was further incubated until all IDS was consumed. The other sample was supplemented again with R,S-IDS.

Analysis of protein sequences. Purified proteins, approximately 500 pmol, were blotted onto a polyvinylidene difluoride membrane (ProSorb; Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) and were subjected to automatic sequencing (476A Protein Sequencer; Applied Biosystems). Database searches were performed with BLAST (1).

RESULTS

Biodegradation tests. A standardized OECD test (301F) was carried out to analyze the biodegradability of the three IDS isomers, technical grade IDS and the metal-IDS complexes. As shown in Fig. 1 biodegradation of all IDS isomers and the technical IDS attained approximately the level of the reference compound sodium benzoate. Interestingly, for the R,R-IDS isomer a significant degradation rate was observed not before day 3.

The pass level for ready biodegradability is reached at 60% of the theoretical O_2-consumption in a 10 day window within the 28 day period of the test. The 10 day window begins when the degree of biodegradation has reached 10% of theoretical O_2-consumption and must end before day 28 of the test. Therefore, all IDS isomers and the technical IDS (Baypure CX 100) are characterized as readily biodegradable substrates.

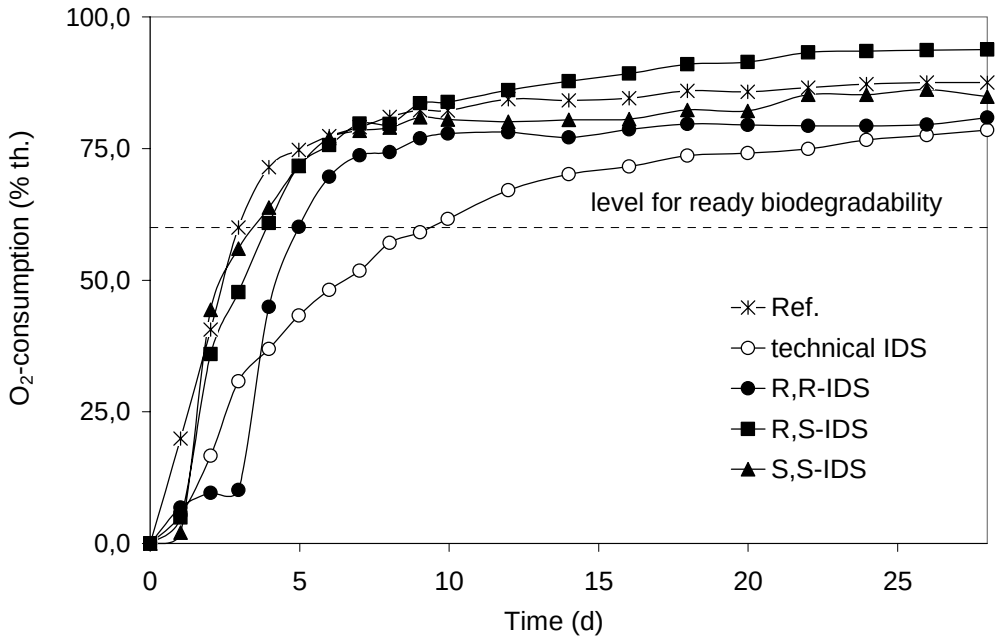


Fig. 1. OECD 301F Manometric Respirometry Test: Biodegradation of technical IDS and the three isomers R,R-IDS, S,S-IDS, and R,S-IDS with activated sludge inoculum from the waste water treatment plant in Bürrig (Leverkusen, Germany) as inoculum. Sodium benzoate was used as reference compound (Ref.). Data are expressed as % of the theoretical O_2 consumption for complete oxidation.

For the biodegradation test with metal-IDS complexes equimolar amounts of each metal and IDS were used. The test was followed over a time period of 42 days. Fig. 2 shows that Fe^{2+}-IDS and Ca^{2+}-IDS were readily biodegradable, whereas Mn^{2+}-IDS and Cu^{2+}-IDS revealed 55% and 40% biodegradation after 28 days, respectively. During the test on IDS chelates heavy metal hydroxide precipitation was observed, indicating liberation of free metal ions.

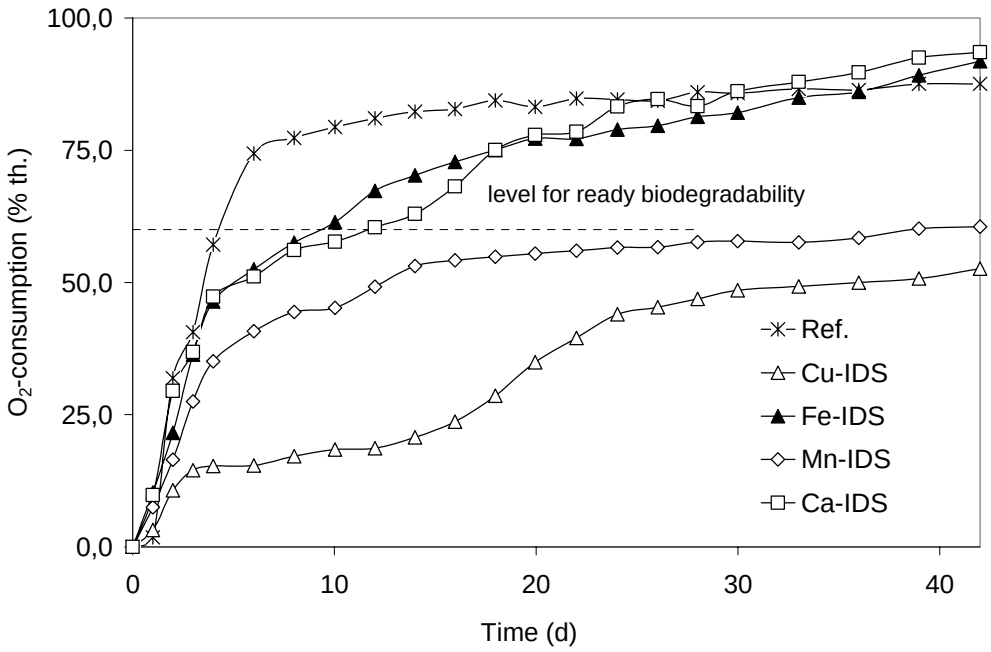


Fig. 2. OECD 301F Manometric Respirometry Test: Biodegradation of the metal-IDS complexes. Ca^{2+}-IDS, Fe^{2+}-IDS, Cu^{2+}-IDS, and Mn^{2+}-IDS with activated sludge inoculum from the waste water treatment plant in Bürrig (Leverkusen, Germany). Sodium benzoate was used as reference compound (Ref.). Data are expressed as % of the theoretical O_2 consumption for complete oxidation.

Isolation and identification of microorganism. The IDS-degrading microorganism of this study was isolated from activated sludge. It was enriched in batch culture using buffered mineral salts medium supplemented with 5 mM R,R-IDS as the sole source of carbon, nitrogen, and energy. The enrichment cultures were incubated in a baffled Erlenmeyer flask on a rotary shaker at 125 rpm and room temperature. The cultures were daily subcultivated for a period of 5 days. Subsequently, the cultures were repeatedly transferred on agar plates containing also 5 mM R,R-IDS until a pure culture (BY6) was isolated. The strain BY6 grew with R,R-IDS as the sole source of carbon, nitrogen, and energy. It was gram-negative, oxidase-positive and formed motile cocci of 1-1.5 µm size. Furthermore the strain BY6 was identified by 16 S-rDNA sequencing. Sequence alignment with BLAST (1) achieved highest homologies (99%) with

A. tumefaciens (accession number D14500) and *A. tumefaciens*, strain CIP111-78 (AJ389897). Thus, the organism was assigned herein *A. tumefaciens* strain BY6.

Growth of *A. tumefaciens* BY6 on IDS. *A. tumefaciens* BY6 grew in mineral salts medium with each of the three IDS isomers as the sole source of carbon, nitrogen, and energy. The doubling times on R,S-IDS, S,S-IDS and R,R-IDS at 23°C were 3 h, 3.3 h, and 3.8 h, respectively. During growth on R,S-IDS, R,R-IDS, or S,S-IDS, the pH increased as a result of ammonia excretion by the cells. The amount of ammonia released into the medium after 5 days corresponded to approximately 30% ± 5% of the nitrogen contained in IDS (data shown for R,R-IDS in Fig. 3)

In addition, growth of *A. tumefaciens* BY6 was also possible on different metal-IDS chelates, namely Mg^{2+}-, Ca^{2+}-, Fe^{2+}-, Cu^{2+}- and Mn^{2+}-IDS. The complexes of the metal ions were generated by adding their sulfate salts in equimolar amounts to the technical IDS. The degradation of metal-IDS complexes was followed by measuring the DOC. Mg^{2+}- and Ca^{2+}-IDS complexes were degraded completely within 3 days while only 75% of the Fe^{2+}-IDS was mineralized in this time span. Complete mineralization of Fe^{2+}-IDS and of about 75% Mn^{2+}-IDS were achieved within 10 days. In contrast, only about 25% Cu^{2+}-IDS was mineralized within 10 days (data not shown). Metal hydroxide precipitation was noted during growth on Fe^{2+}-, Cu^{2+}-, and Mn^{2+}-IDS. These results are corresponded with the observation during biodegradation tests with metal-IDS complexes.

In order to find out whether different isomers of IDS are simultaneously or sequentially used as growth substrates *A. tumefaciens* BY6 was incubated with R,R-IDS plus R,S-IDS. As shown in Fig. 4 these two isomers are not simultaneously consumed during the exponential growth phase. Significant decrease of R,R-IDS did not start until almost all R,S-IDS was consumed.

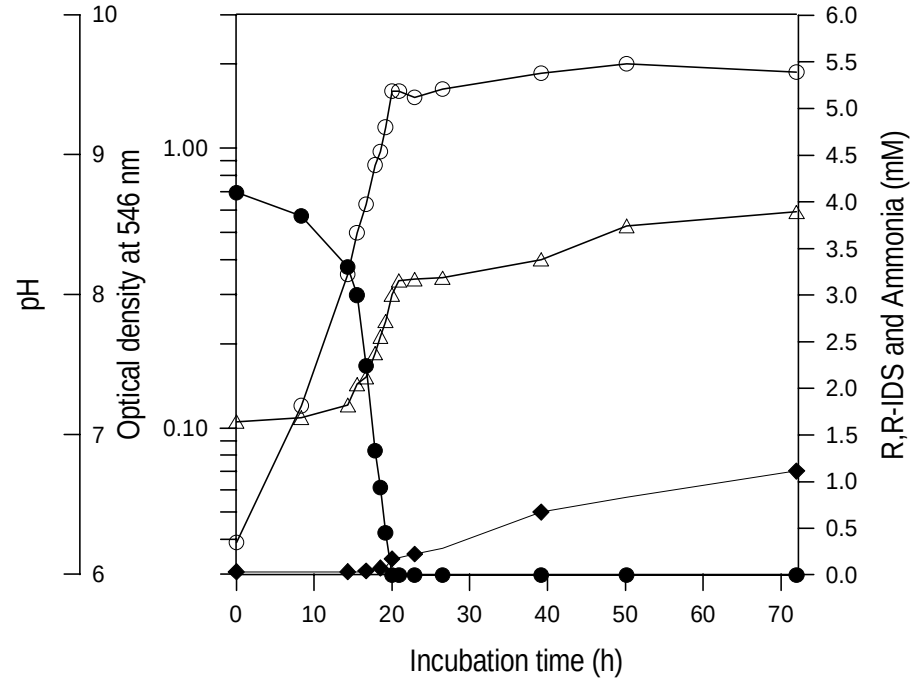


Fig. 3. Growth of *A. tumefaciens* BY6 in 500 ml Erlenmeyer flasks with 100 ml mineral salts medium containing 4.1 mM R,R-IDS (●) as the sole carbon, nitrogen, and energy source. The culture was inoculated with a 1% (v/v) pre-culture grown on R,R-IDS. Incubation temperature was 23°C on a rotary shaker at 125 rpm. Optical density (○), pH (△), and ammonia (◆).

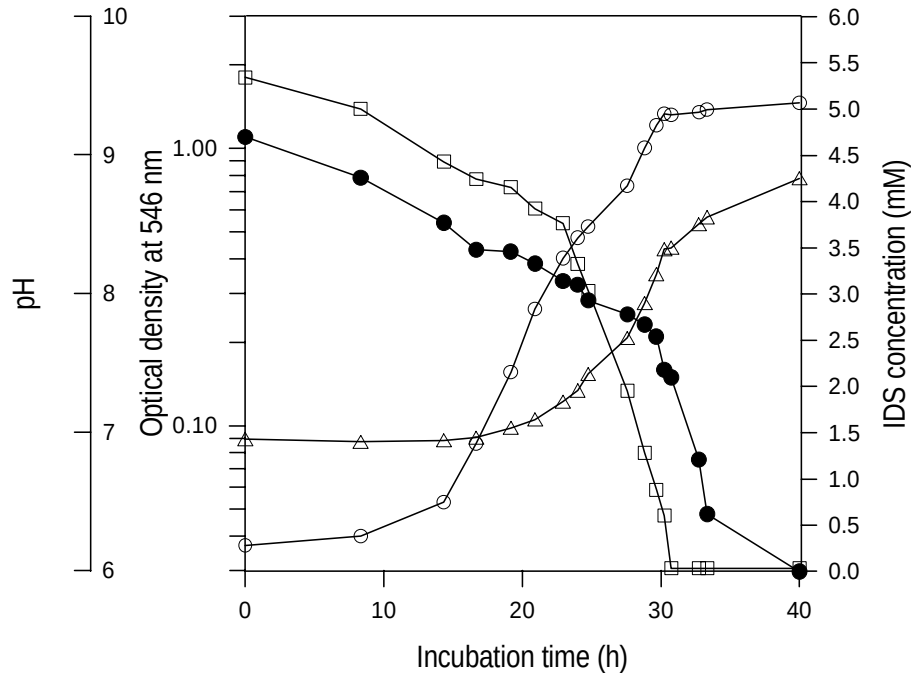


Fig. 4. Growth of *A. tumefaciens* BY6 in 500 ml Erlenmeyer flasks with 100 ml mineral salts medium containing 4.7 mM R,R-IDS (●) plus 5.3 mM R,S-IDS (□) as the sole source of carbon, nitrogen, and energy. The culture was inoculated with a 1% (v/v) pre-culture grown on technical IDS and incubated on a rotary shaker (125 rpm) at 23°C. Optical density (○) and pH (△).

Turnover experiments with whole cells of *A. tumefaciens* BY6 incubated with a mixture of R,S-IDS and R,R-IDS showed that the rate of R,R-IDS consumption dependent on the R,S-IDS concentration present (Fig. 5). If R,S-IDS was added during the maximum rate of R,R-IDS turnover (340 min), R,R-IDS turnover immediately stopped and started again after R,S-IDS concentration decreased to ≤1 mM. The same results were observed by using S,S-IDS instead of R,R-IDS (data not shown). The growth and turnover experiments indicate that R,S-IDS is the preferred substrate *of A. tumefaciens* BY6 in comparison to R,R-IDS and S,S-IDS.

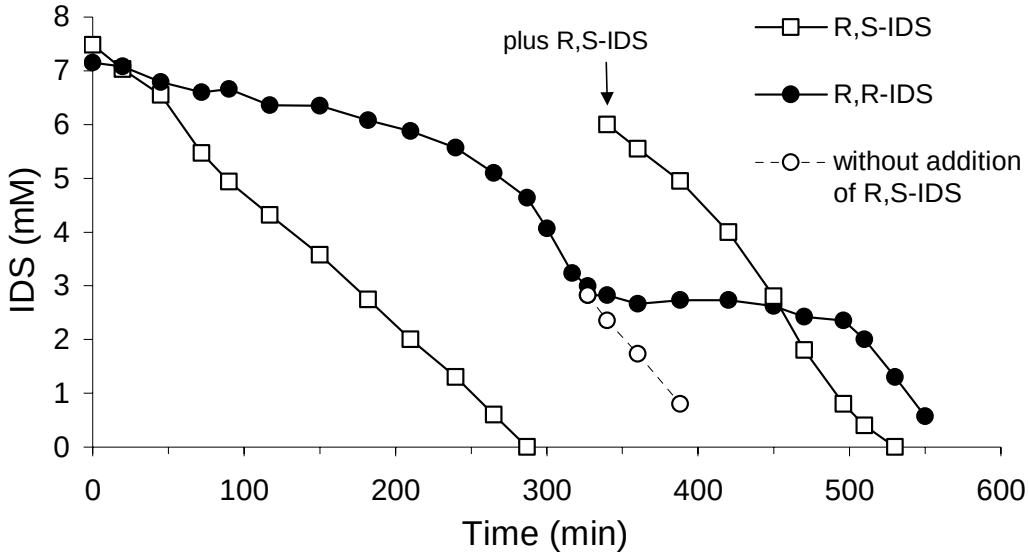


Fig. 5. Competitive consumption of R,S-IDS and R,R-IDS by whole cells of *A. tumefaciens* BY6. Cells were obtained by growth in mineral salts medium with technical IDS (5 mM). The cells were harvested, resuspended in phosphate buffer (optical density at 546 nm of 3.5) and incubated at 23°C with R,S-IDS plus R,R-IDS. When maximum rate of R,R-IDS degradation was observed, the cell suspension was split into two samples with the same volume. One sample was further incubated (dashed line). The other sample was amended with R,S-IDS.

A C-N lyase from *A. tumefaciens* BY6 cleaving R,S-IDS. The enzyme was purified in order to analyze the initial transformation of IDS. From the whole cell experiments, it was assumed that IDS-degradation was based on a single enzyme with stereoselective preference for R,S-IDS. During protein purification assays, it turned out that initial S,S-IDS and R,R-IDS degradation required two distinct enzymes whereas for R,S-IDS the lyase activity is necessary. In the first step an R,S-IDS-degrading enzyme was purified. The purification procedure is summarized in Table 1.

Table 1. Purification of the R,S-IDS cleaving C-N lyase from strain *A. tumefaciens* BY6.

Purification step	Vol (mL)	Total amt of protein (mg)	Sp act[a] (µmol of R,S-IDS min^{-1} mg^{-1})	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	45	572	1.15	100	1
Ultracentifugation	35	221	1.54	51.7	1.3
Q-sepharose HR 16/10	28	26.6	7.4	29.9	6.4
Phenyl-superose HR 10/10	11.5	3.7	16.2	9.1	14.1

[a]The specific activity was determined by measuring the disappearance of R,S-IDS.

The overall yield during purification was 9.1% and resulted in a 14.1 fold increase of the specific activity. The purified enzyme did not require any cofactors and transformed R,S-IDS to fumaric acid and D-aspartic acid. L-aspartic acid was not detected. These metabolites indicated that the purified R,S-IDS degrading enzyme is a C-N lyase. It catalyzes a non-hydrolytic cleavage of the C-N bond generating fumarate plus aspartate.

The C-N lyase catalyzes also the reverse reaction with an equilibrium constant K_{eq} of 90×10^{-3} for R,S-IDS (data not shown). The equilibrium constant was determined according to the equation K_{eq}=c(fumaric acid)^2/c(R,S-IDS). Hence, the equilibrium for the reaction is clearly in favor of R,S-IDS cleavage.

The C-N lyase showed no activity against the R,R-IDS isomer. Only a minor activity with S,S-IDS was observed (Table 2) generating L-aspartic acid and fumaric acid as products.

Table 2. Acitvities of the C-N lyase with various substrates.

Substrate	**Activity[a] (µmol/min/mg)**	**relative activity referred to R,S-IDS**
R,S-IDS	10.6	100
S,S-IDS	0.49	2.5
R,R-IDS	0	0
Ca^{2+}-R,R-IDS	4.2	40
Mg^{2+}-R,S-IDS	1.85	17
Mn^{2+}-R,S-IDS	0.31	2.9
Fe^{3+}-R,S-IDS	0	no transformation
Fe^{2+}-R,S-IDS	0	no transformation
Zn^{2+}-R,S-IDS	0	no transformation
Cu^{2+}-R,S-IDS	0	no transformation
S,S-EDDS	0	no transformation
techn. EDDS	0	no transformation
D/L-aspartic acid	0	no transformation
Nopaline	0	no transformation

[a]Enzyme Assays were performed with 5 mM as described in Materials and Methods. The specific activities were determined by measuring the disappearance of the substrate.

An epimerase from *A. tumefaciens* BY6. Further investigations were performed to find an R,R-IDS degrading enzyme activity. Obviously the key enzyme for R,R-IDS degradation is an epimerase. It was purified by applying several chromatographic steps, as reported in Table 3. The enzyme was purified 12.7 fold with a yield of 22.1%.

Table 3. Purification of the IDS-epimerase from *A. tumefaciens* BY6.

Purification step	Vol (mL)	Total amt of protein (mg)	Sp act[a] (µmol of R,R-IDS min^{-1} mg^{-1})	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	46	1139			
Ultracentifugation	35	812			
Q-Sepharose HR 16/10	29.5	284.4	1,.97	100	1
Mono Q HR 16/10	11.5	89.7	4.96	79.4	2.5
Phenyl-Superose HR 10/10	20	17	13	39.4	6.6
Superdex 200 HiLoad 16/60	4	9.6	19	32.6	9.6
Hydroxyapatit cHT5-I	5	4.95	25	22.1	12.7

[a]The specific activity was determined by measuring the disappearance of R,R-IDS.

The purified IDS-epimerase did not require any cofactors to transform R,S-IDS into S,S-IDS and R,R-IDS and *vice versa*. The percentage of each IDS isomer in equilibrium was 55.5% R,S-IDS, 27.8% S,S-IDS, and 16.7% R,R-IDS.

Cell free extract of *A. tumefaciens* BY6 cells grown with Nutrient-Broth medium as sole source of carbon, nitrogen, and energy exhibited no IDS-epimerase or C-N lyase activity at all, indicating inducibility of these enzymes.

Characterization of the C-N lyase. The purified C-N lyase gave a single band by SDS-PAGE and had a molecular weight of approximately 57 kDa. By analytical gel filtration the molecular weight of the native enzyme was determined to be 260 kDa. Therefore, it can be assumed that the C-N lyase is a homotetramer. N-terminal amino acid sequencing by automated Edman degradation revealed the following sequence: MRERLSASPNELIVKHLIGPRLFGNLDRDFLEM(X/S)KVN. The purified enzyme showed a typical protein absorption spectrum with a maximum at 280 nm. The pH--optimum for lyase activity was found to be at pH 8.0 to 8.5. No activity was left at pH 5.5 (Na^+-phosphate buffer) and pH 9.5 (Na^+-carbonate and Tris buffer). The enzyme showed maximum activity between 35 and 40°C whereas no activity was observed at 60°C. The isoelectric point (pI) was found to be at 5.95. The kinetic data for R,S-IDS were: K_m 1.0 ± 0.2 mM, V_{max} 170 µmol/min, k_{cat} 228 s^{-1}, and k_{cat}/K_m 2.3×10^6.

The C-N lyase activity with S,S-IDS as substrate was only 2.5% of the activity with R,S-IDS (Table 2). Therefore, enzyme kinetic parameters for S,S-IDS were not determined.

Some metal R,S-IDS complexes were transformed by the C-N lyase: Ca^{2+}-R,S-IDS was transformed with the highest specific activity, followed by Mg^{2+}-R,S-IDS and Mn^{2+}-R,S-IDS, whereas Fe^{2+}-, Fe^{3+}-, Zn^{2+}-, and Cu^{2+}-R,S-IDS were not transformed at all.

Further substrates like aspartic acid racemate, the aminopolycarboxylate ethylenediaminedisuccinate (EDDS), and the opine N,N´-(1,3-Dicarboxypropyl)-L-arginin (nopaline) were not transformed by the C-N lyase (Table 2).

Characterization of the IDS-epimerase. The molecular mass of native IDS-epimerase calculated by gel filtration was 170 kDa. The SDS-PAGE analysis gave a single protein band corresponding to a molecular weight of 48 kDa indicating that the enzyme is a homotetramer. The purified enzyme showed a typical protein absorption spectrum with a maximum at 280 nm. The N-terminal amino acid sequence of IDS-epimerase was determined to be MFTTKLAEKVVSAWKAKISQPALKAAQD. By protein sequence alignment with BLAST (1) no significant similarity to any known protein sequences were found.

The optimal pH for IDS-epimerase activity was 8.5, with 87%, 44%, and 8% of the optimal activity remained at pH 8.0, 7.5, and 9.0 respectively. The temperature optimum was 35°C, whereas no significant activity was observed at temperatures above 50°C. The pI was 6.3. The kinetic parameters are presented in Table 4.

Table 4. Kinetic parameters of the IDS-epimerase.

Substrate	K_m (mM)	V_{max} (µmol/min)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (s^{-1} M^{-1})
S,S-IDS	1.5 (0.3)	250 (20)	139	93
R,R-IDS	1.3 (0.3)	130 (10)	72	55
R,S-IDS	1.1 (0.2)	30 (5)	17	15

The values in parentheses are standard deviations.

Comparing the IDS isomers, S,S-IDS was transformed with the highest specific activity, twice as high as R,R-IDS and ten times faster than R,S-IDS. Only the earth alkaline metal IDS complexes Ca^{2+}-, Ba^{2+}-, and Mg^{2+}-R,R-IDS complexes showed moderate activity, with 52%, 44%, and 25% of the activity with S,S-IDS, respectively. The epimerase transformed Ca^{2+}-R,R-IDS and R,R-IDS with similar activities. The other metal-IDS complexes were transformed at very slow rates or not at all (Table 5). EDDS isomers were not epimerazed by the enzyme.

Table 5. Activities of the IDS-epimerase with IDS, different metal-IDS complexes, EDDS, and aspartic acid.

Substrate	Activity[a] (µmol/min/mg)	relative activity referred to S,S-IDS
S,S-IDS	46	100
R,S-IDS	4.88	9
R,R-IDS	24.5	53
Ca^{2+}-R,R-IDS	24	52
Ba^{2+}-R,R-IDS	20.1	44
Mg^{2+}-R,R-IDS	11,3	25
Mn^{2+}-R,R-IDS	$1*10^{-4}$	minimal
Fe^{3+}-R,R-IDS	$3*10^{-4}$	minimal
Fe^{2+}-R,R-IDS	$4.2*10^{-4}$	minimal
Zn^{2+}-R,R-IDS	0	no transformation
Cu^{2+}-R,R-IDS	0	no transformation
S,S-EDDS	0	no transformation
technical EDDS	0	no transformation
L-aspartic acid	0	no transformation

[a] Enzyme Assays were performed with 5 mM as described in Materials and Methods. The specific activities were determined by measuring the disappearance of the substrate.

DISCUSSION

The IDS isomers of the technical mixture are readily biodegradable according to OECD guideline 301F. Even some metal-IDS complexes fulfill the criteria of ready biodegradability like Ca^{2+}- and Fe^{2+}-IDS. Mn^{2+}-IDS revealed only 55% biodegradation after 28 days and Cu^{2+}-IDS 40% and 45% after 28 and 40 days, respectively. Interestingly, Cu^{2+}- and Mn^{2+}-IDS degradation rates were initially similar to that of Ca^{2+}- and Fe^{2+}-IDS followed by loss of reaction velocity after 3 days (Fig. 2). We assume that prolonged exposition to the released Cu^{2+}- and Mn^{2+}-ions led to inactivation of the microorganisms. We also assume that metal-IDS complexes were not transported into the cells, since heavy metal precipitation was observed in the medium during growth and biodegradation tests. Interestingly, the C-N lyase from *A. tumefaciens* BY6 showed no activity against Fe^{2+}-R,S-IDS although the strain BY6 degrades Fe^{2+}-R,S-IDS. This supports the assumption that metal-IDS complexes were not taken up by the cells. Witschel et al (26) reported EDTA uptake by the strain DSM 9103. Only free EDTA and complexes with low complex-formation constant, like the earth alkaline metal chelates, were taken up whereas heavy metal EDTA complexes remain outside the cells.

The initial transformations of the three IDS isomers by *A. tumefaciens* BY6 are summarized in Fig. 6. The strain *A. tumefaciens* BY6 causes a pH increase during growth on IDS. The metabolite ammonia was detected and should be a deamination product of aspartic acid, most likely cleaved by an L-aspartate ammonia-lyase. D-aspartate ammonia-lyases are still unknown. Hence, D-aspartic acid as a product of R,S-IDS degradation should be first transformed into L-aspartic acid probably by an aspartate racemase as described by Rahmanian et al. (20).

The isolated R,S-IDS degrading enzyme, classified as a C-N lyase (EC 4.3.3), had a clear preference for R,S-IDS and only a minor activity for S,S-IDS (Table 2). The C-N lyase cleaves only the S-configuration of IDS and requires the R-configuration at the other asymmetric carbon atom of IDS.

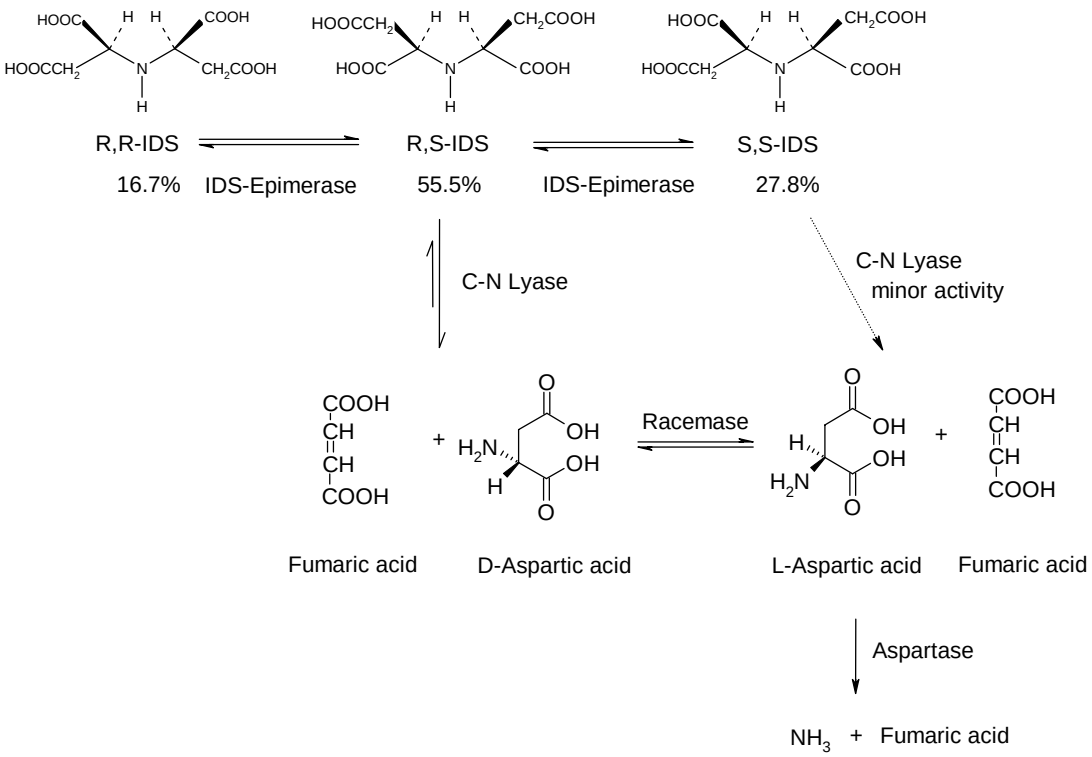


Fig. 6. Initial transformation of IDS isomers by the strain *A. tumefaciens* BY6 involving an IDS-epimerase and a C-N lyase . Further metabolism by an aspartate racemase and an L--aspartase is assumed from the known metabolism of aspartate. The dashed arrow documents side activity of the C-N lyase.

A similar IDS cleaving C-N lyase from *Ralstonia* sp. SLRS7 has been described previously (7). This enzyme cleaved also only the S-configuration of IDS but with equal specific activity towards S,S-IDS and R,S-IDS. The C-N lyases from *Ralstonia* sp. SLRS7 and *A. tumefaciens* BY6 resemble in molecular mass, subunit organisation, pH and temperature optima, K_m, equilibrium constant K_{eq}, and activity toward different metal-IDS complexes. The R,R-IDS isomer cannot be cleaved directly by both C-N lyases. Remarkably the S,S isomer of EDDS, an other important substitute of EDTA was transformed only by the *Ralstonia* sp. SLRS7 C-N lyase. Since the R,R-IDS isomer can be degraded and used by the strain *A. tumefaciens* BY6, an additional activity, an IDS-epimerase, is necessary. This activity transforms R,R-IDS and S,S-IDS into the C-N lyase substrate R,S-IDS.

Many isomerases, especially racemases, require pyridoxal 5`-phosphate (PLP) as a cofactor where racemization proceeds through the formation of aldimine Schiff base between the substrate amino acid and PLP (22). Since the spectrum of the purified IDS-epimerase showed no significant absorption in the range of 350-450 nm there is no indication of PLP as cofactor. Many other amino acid epimerases or racemases such as

diaminopimelic acid epimerase (23), 4-hydroxyproline epimerase (9), proline racemase (6, 21), aspartate racemase (27), and glutamate racemase (13) also require no cofactor. We assume, that enzyme-catalyzed epimerization of IDS is accomplished by a proton abstraction and subsequent return by a two-base mechanism as mostly proposed for PLP-independent epimerases and racemases (21, 23, 27). In a two-base mechanism, one enzyme base removes the proton from the substrate, and the conjugate base delivers a proton to the opposite direction (6). Furthermore, we propose to classify the IDS-epimerase as EC 5.1.99 (racemases and epimerases acting on other compounds).

The observed mechanism for the complete mineralization of all IDS isomers involving an epimerase offers an interesting possibility to circumvent an initial stereoselective catabolic step as described for C-N lyases involved in IDS and EDDS degradation (7, 25).

ACKNOWLEDGEMENT

We thank the Bayer AG, Leverkusen, Germany for partially funding this work and Dr. Torsten Groth (Bayer) for supplying us with technical IDS and the pure isomers. Thanks are also due to H. Weber (Prosequenz Bioanalytik, Kornwestheim, Germany) for N-terminal amino acid sequencing.

References

1. **Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI_BLAST; a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. **25:**3389-3402.

2. **Bayer AG.** 2001. Safety Data Sheet 857037/10, Baypure CX 100 solid. Bayer AG, Leverkusen, Germany.

3. **Bayer AG.** 1998. IDS Na-Salz. Eine neue umweltfreundliche Alternative zu klassischen Komplexierungsmitteln. Booklet of Bayer, Leverkusen, Germany.

4. **Bucheli-Witschel, M. and T. Egli.** 2001. Environmental fate and microbial degradation of aminopolycarboxylic acids. FEMS Microbiol. Rev. **25:**69-106.

5. **Bradford M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72:**248-254.

6. **Cardinale, G. J. and R. H. Abeles.** 1968. Purification and mechanism of action of proline racemase. Biochemistry **7:**3970-3978.

7. **Cokesa, Ž., S. Lakner, H.-J. Knackmuss, and P.-G. Rieger.** 2003. A stereoselective carbon-nitrogen lyase from *Ralstonia sp.* SLRS7 cleaves two of three isomers of iminodisuccinate. Submitted to Biodegradation, 12. September 2003.

8. **Einarsson, S. and B. Josefsson.** 1987. Separation of amino acid enantiomers and chiral amines using precolumn derivatization with (+)-1-(9-Fluorenyl)ethylchloroformate and reversed-phase liquid chromatography. Anal. Chem. **59:**1191-1195.

9. **Finlay, T.H. and E. Adams.** 1970. Kinetic and structural studies of hydroxyproline 2-epimerase. J. Biol. Chem. **245:**5248-5260.

10. **Kari, F. G., S. U. Hilger, and S. Cannonica.** 1995. Determination of the reaction quantum yield for the photochemical degradation of Fe(III)-EDTA - implications for the environmental fate of EDTA in surface waters. Environ. Sci. Technol. **29:**1008-1017.

11. **Lämmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227:**680-685.

12. **Lauff, J. J., D. B. Steele, L. A. Coogan, and J. M. Breitfeller.** 1990. Degradation of the ferric chelate of EDTA by a pure culture of an *Agrobacterium sp*. Appl. Environ. Microbiol. **56:**3346-3353.

13. **Nakajima, N., K. Tanizawa; H. Tanaka and K. Soda.** 1986. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the glutamate racemase gene from *Pediococcus pentosaceus*. Agric. Biol. Chem. **50:**2823-2830.

14. **Nörtemann, B.** 1992. Total degradation of EDTA by mixed cultures and a bacterial isolate. Appl. Environ. Microbiol. **58:**671-676.

15. **Nowack, B., H. Xue, and L. Sigg.** 1997. Influence of natural and anthropogenic ligands on metal transport during infiltration of river water to groundwater. Environ. Sci. Technol. **31:**866-872.

16. **Nowack, B., F. G. Kari, and H. G Krüger.** 2001. The remobilization of metals from iron oxides and sediments by metal-EDTA complexes. Water Air Soil Pollut. **125:**243-257.

17. **OECD.** 1993. Guidelines for Testing of Chemicals. The OECD Expert group on Degradation and Accumulation. Ready Biodegradability: 301 F Manometric Respirometry Test. Organization for Economic Cooperation and Development. Paris, France.

18. **Pfennig, N. and K. D. Lippert.** 1966. Über das Vitamin B_{12}-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. Arch. Mikrobiol. **55:**245-256.

19. **Reinecke, F., T. Groth, K.-P. Heise, W. Joentgen, N. Müller, and A. Steinbüchel.** 2000. Isolation and characterization of an *Achromobacter xylosoxidans* strain B3 and other bacteria capable to degrade the synthetic chelating agent iminodisuccinate. FEMS Microbiol. Lett. **188:**41-46.

20. **Rahmanian M, Waller G. R. and W. G. Smith.** 1971. Biosynthesis of D-aspartic acid by *streptococcus faecalis*. J. Biol. Chem. 246:823-830.

21. **Rudnick, G. and R. H. Abeles.** 1975. Reaction mechanism and structure of the active site of proline racemase. Biochemistry **14:**4515-4522.

22. **Snell, E. E. and S. J. Di Mari.** 1970. Kinetics and mechanism, p.353-370. In P. D. Boyer, H. Lardy, and K. Myrbäck (ed.), The Enzymes Vol. 2, Academic Press, New York NY.

23. **Wiseman, J. S. and J. S. Nichols.** 1984. Purification and properties of diaminopimelic acid epimerase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **259**:8907-8914.

24. **Witschel, M., S. Nagel, and T. Egli.** 1997. Identification of the two-enzyme system catalyzing oxidation of EDTA in the EDTA-degrading bacterial strain DSM 9103. J. Bacteriol. **179 (22)**:6937-6943.

25. **Witschel, M. and T. Egli.** 1998. Purification and characterization of a lyase from the EDTA-degrading bacterial strain DSM 9103 that catalyzes the splitting of [S,S]-ethylenediaminedisuccinate, a structural isomer of EDTA. Biodegradation **8:**419-428.

26. **Witschel, M., T. Egli, A. J. B. Zehnder, E. Wehrli, and M. Spycher.** 1999. Transport of EDTA into cells of the EDTA-degrading bacterial strain DSM 9103. Microbiology **145:**973-983.

27. **Yamauchi, T., S.-Y. Choi, H. Okada, M. Yohda, H. Kumagai, N. Esaki, and K. Soda.** 1992. Properties of aspartate racemase, a pyridoxal 5'-phosphate-independent amino acid racemase. J. Biol. Chem. **267:**18361-18364.

Anhang 3

In preparation

Characterization of the genes from *Agrobacterium tumefaciens* BY6 encoding a novel epimerase and a C-N lyase involved in IDS degradation

Željko Cokesa, Hans-Joachim Knackmuss, and Paul-Gerhard Rieger*

Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart, 70569 Stuttgart, Germany

*Corresponding author. Mailing address: Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart, 70569 Stuttgart, Germany.

Phone:49-711-6855480. Fax:49-711-6855725. E-mail:pg.rieger@po.uni-stuttgart.de

ABSTRACT

Biodegradation of iminodisuccinate (IDS) by *Agrobacterium tumefaciens* BY6 involved a two-enzyme system, a C-N lyase and an IDS-epimerase. The *icl* gene encoding the C-N lyase and the *ite* gene encoding the IDS-epimerase were cloned and sequenced. The gene *icl* encoded a protein of 534 amino acids with a subunit molecular mass of 58.4 kDa. The C-N lyase is homologous to the class II fumarase superfamily and within the superfamily closely related to the argininosuccinate lyase subfamily even though it was enzymatically inactive against argininosuccinate. Upstream of the gene *icl* an putative open reading frame with similarity to a regulatory protein from the *lys*R family was found. Downstream a fragment of an open reading frame with similarity to a transport protein exists.

The *ite* gene encoded a protein of 446 amino acids with a calculated subunit molecular mass of 47.6 kDa. The highest degree of sequence identities was observed for proteins with unknown function indicating a novel enzyme. However, the conserved domain search revealed similarity to the *prp*D gene and to the related *mmg*/*prp*D family signifying probably a multifunctional characteristic of the epimerase. Additionally, upstream of the *ite* gene an open reading frame with similarity to a transport protein was found.

The localization of the genes revealed no functional coupling of the two enzymes. The *ite* gene was on an approximately 180-kb circular plasmid in *A. tumefaciens* BY6 whereas the *icl* gene was part of the genomic DNA.

INTRODUCTION

Sodium iminodisuccinate (IDS) is a new synthetic, medium-strong chelator that can substitute EDTA in cases where moderate sequestration of metal ions is sufficient. The most widely used and effective chelating agent EDTA is largely persistent despite some encouraging degradation results under laboratory conditions (7). In contrast, all isomers of IDS are readily biodegradable (11) and also harmless from toxicological, ecotoxicological, and mutagenic standpoint (6). A further advantage of IDS is, that it is produced by a waste-free manufacturing process (12).

Initial biodegradation of IDS by the strain *Agrobacterium tumefaciens* BY6 is catalyzed by a two-enzyme system that involves an epimerase and a stereoselective C-N lyase (11). The epimerase equilibrates the isomers S,S-IDS, R,R-IDS, and R,S-IDS. The C-N lyase is stereospecific for the cleavage of R,S-IDS generating D-aspartic acid and fumaric acid. With minor activity the S,S-IDS isomer is cleaved into L-aspartic acid and fumaric acid (Fig. 1) whereas the R,R-IDS isomer cannot be cleaved directly by the C-N lyase. R,R-IDS metabolism first require transformation into the R,S-IDS epimer by the IDS-epimerase.

In the present study we describe the cloning and sequence analysis of the DNA fragments comprising the genes for the IDS-epimerase and the C-N lyase.

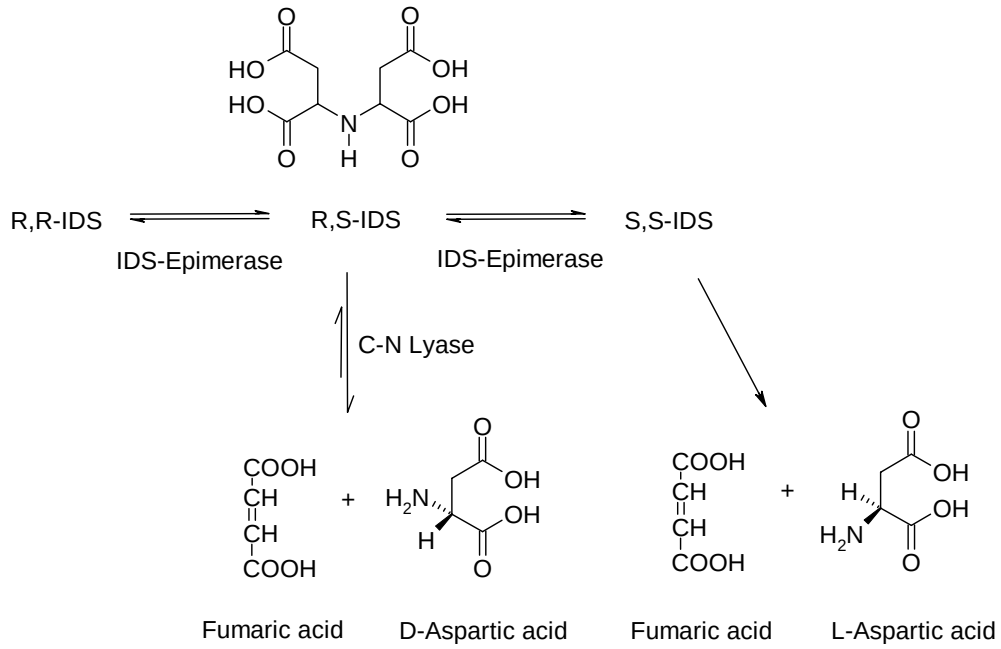


Fig. 1. Metabolism of the IDS isomers by strain *A. tumefaciens* BY6 (11). The dashed arrow indicates minor activity.

MATERIALS AND METHODS

Strains, plasmids, and growth conditions. The isolation of *A. tumefaciens* BY6 has been previously reported (11). *E. coli* DH5α and *E. coli* JM109 cells were used as host strains for recombinant DNA work. Usually, *E. coli* strains were grown aerobically on a rotary shaker at 125 rpm at 37°C in Luria-Bertani (LB) medium or dYT medium (22) which was supplemented with ampicillin (100 µg/ml), if appropriate. The plasmid pBluescript II SK(+) (2) was used for cloning experiments. The bacterial strains and plasmids are described in Table 1.

Table 1. Plasmids used in this study

Plasmid	Relevant characteristics	Reference or source
pBluescript II SK(+)	Phagemid derived from pUC19; P_{lac} lacZ' Apr; f1(+) origin; ColE1 origin	Stratagene, La Jolla, USA
p06L	Ap^r; 0.6-kb PCR product in a T-tailed *Eco* RV site of pBluescript II SK(+)	This study
pB37L	Ap^r; 3.7-kb *Bam* H1 fragment of *A. tumefaciens* BY6 DNA in pBluescript II SK(+)	This study
p11E	Ap^r; 1.1-kb PCR product in a T-tailed *Eco* RV site of pBluescript II SK(+)	This study
pB22E	Ap^r; 2.2-kb *Bam* HI fragment of *A. tumefaciens* BY6 DNA in pBluescript II SK(+)	This study
pX50E	Ap^r; 5-kb *Xho* I fragment of *A. tumefaciens* BY6 DNA in pBluescript II SK(+)	This study

[a]Ap^r, plasmid carries information for ampicillin resistance. Fragment sizes are as determined by agarose gel electrophoresis.

Protein purifications. The IDS-epimerase and the C-N lyase from *A. tumefaciens* BY6 were purified as described previously (11).

Protein cleavage, chromatographic separation of peptides, and sequencing of internal peptides. Trypsin digestion of the IDS-epimerase and the C-N lyase with subsequent separation of tryptic peptides by reversed-phase high-pressure liquid chromatography (HPLC) were performed as described by Stone et al. (25). Therefore, approximately 200 µg of each purified enzyme were digested for 18 h at 37°C with 10 µg trypsin sequencing grade (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The IDS-epimerase was separated by reversed-phase HPLC using a Grom-Sil ODS-5, 250×4 mm, column (Grom, Herrenberg, Germany), an aqueous solution of 0.1% (v/v) trifluoracetic acid as solvent A, 0.085% (v/v) trifluoracetic acid and 80% acetonitril in water (v/v) as solvent B. The following gradient was applied: 0 to 15 min, 7% solvent B; 15 to 115 min, 7 to 50% solvent B; 115 to 155 min, 50 to 98% solvent B (flow rate 0.5 ml/min; detection at 210 nm). The C-N lyase was fractionated by using a TSK-Gel Super-ODS (particle size, 2 µm; dimension, 100×2 mm) column (Tosoh, Stuttgart, Germany) with the following gradient: 0 to 15 min, 7% solvent B; 15 to 90 min, 7 to 50% solvent B; 90 to 120 min, 50 to 98 % solvent B (flow rate 0.2 ml/min; detection at 210 nm). Amino acid sequences (Prosequenz, Bioanalytik, Kornwestheim, Germany)

were determined by automated Edman degradation using an Applied Biosystems model 476A sequencer.

Isolation of genomic and plasmid DNAs. The genomic DNA from *A. tumefaciens* BY6 was prepared from 100 ml cultures grown in mineral salts medium supplemented with 10 mM technical IDS as the sole source of carbon, nitrogen, and energy (11).

The cells were harvested by centrifugation, washed once with 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) and resuspended in 6 ml 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) with 1 mg lysozyme (Fluka, Neu-Ulm, Germany) per ml. Then the cell suspension was incubated at 37°C for 2 h, pelleted by centrifugation and resuspended in 5.6 ml of TE-buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM sodium EDTA, pH 8.0). Proteinase K (Roth, Karlsruhe, Germany) and sodium dodecyl sulfate (SDS) were added to a final concentration of 100 µg/ml and 0.5% (w/v), respectively, in a total volume of 6 ml. The mixture was incubated at 37°C for 2 h. Purification of DNA was achieved by two extractions with 6 ml of phenol and one extraction with 6 ml of phenol-chloroform-isoamyl alcohol mixture (25:24:1(v/v/v)). The separation of the organic and the aqueous phase was accelerated by centrifugation at 6000×g for 10 min. The aqueous phase was then treated 15 min at room temperature and 5 min at 37°C with 30 µl of a 10 µg/ml concentrated RNase A (ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA) solution. The RNase A was set free of DNase by heating (100°C) for 3 min.

Small scale preparation of plasmid DNA from *E. coli* DH5α and JM109 were performed with the FlexiPrep Kit (AmershamBiosciences, Freiburg, Germany) or the GFX Micro Plasmid Prep Kit (AmershamBiosciences). The method of Lee and Rasheed (16) was scaled up and used for plasmid isolation from 25 ml *E. coli* cultures.

DNA manipulation techniques. Digestion of DNA with restriction endonucleases (MBI Fermentas; St. Leon-Rot, Germany), electrophoresis, purification and ligation with T4 DNA ligase (MBI Fermentas) were performed by standard methods (22). DNA was isolated from agarose gel by use of the EasyPure Kit (Biozym, Oldendorf, Germany) or the centrifugation method described by Heery et al (13). Transformation of *E. coli* was achieved by the method of Inoue et al. (15) or that of Chung et al (10). The identification of bacterial colonies that contain recombinant pBluescript II SK(+) were carried out by blue white selection due to the capability of α-complementation (22).

Amplification of fragments of the C-N lyase and IDS-epimerase. Oligonucleotides were custom-synthesized according to the known sequences of the N-terminal amino acid sequence and various internal peptides (Table 2). PCR mixtures (50 µl) for the amplification of genomic DNA contained 1 µl template DNA, 50 pmol of each primer, 0.1 mM each deoxynucleotide triphosphate, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.7 U Taq DNA polymerase and the corresponding reaction buffer (Eppendorf, Hamburg, Germany). Template DNA was obtained by suspending a bacterial colony of *A. tumefaciens* BY6 with a diameter of approximately 3 to 5 mm in 50 µl water. The cell suspension was boiled for 5 min at 100°C and unbroken cells were removed afterwards by centrifugation (6000×g; 2 min). For the amplification reaction with the primers deduced from the N-terminal sequence and appropriate internal peptide of the C-N lyase or IDS-epimerase, the following PCR program was used: an initial denaturation (95°C, 3 min) was followed by 35 cycles consisting of annealing at 58°C (C-N lyase) or 52°C (IDS-epimerase), 1 min, polymerization at 72°C, 1 min, and denaturation at 95°C, 30 s. The last polymerization step was extended to 5 min.

Cloning strategy and hybridization procedures. The PCR products were cloned into the T-tailed *Eco*RV-site of pBluescript II SK(+) (17). The inserts of 1037 bp (IDS-epimerase) and 581 kb (C-N lyase) were labeled with digoxigenin by using a DIG DNA Labeling and Detektion Kit (Boehringer Mannheim). All labeling and hybridization procedures were performed as described in the Boehringer manual. The hybridization temperature was set to 68°C. A Southern blot (Pall Biodyne Plus membranes) of 5 µg digested genomic DNA from *A. tumefaciens* BY6 run on a 1% agarose gel in 1×TAE buffer (3) was hybridized with the appropriate 1037 bp or 581 bp digoxigenin-labeled probe to detect the corresponding fragment. The areas that corresponded in size to the hybridization signals were excised from a second gel. The appropriate DNA was eluted from the gel slice and ligated into pBluescript II SK(+). After transformation of the ligation mixture into *E. coli*, the labeled probes were used to identify the positive clones by colony hybridization. The colonies to be screened were transferred on a membrane, lysed and denatured in situ as described in standard protocols (22). The resulting DNA-prints of the colonies were hybridized with the digoxigenin-labeled probes.

DNA sequencing and nucleotide sequence analysis. The DNA sequences were determined by sequencing of clones and subclones using the didesoxy-chain termination

method of Sanger et al. (24) in an automated DNA-sequencing system (ALFexpress-Sequencer; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) with fluorescently labelled primers or nucleotides. Additionally, for cloning the upstream and downstream regions of the 1037 bp or 581 bp fragment, respectively, primer walking PCR was performed using oligonucleotide primers from the known start and end sequence of the inserts and the appropriate internal sequence.

Database searches and comparisons were performed with the BLAST (3) search facilities at NCBI. The alignment of the C-N lyase was obtained with the program CLUSTALX using the default parameters.

Preparation of plasmids for the detection of megaplasmids. The isolation of plasmids from strain *A. tumefaciens* BY6 was basically performed as described by Barton et al. (5). The following protocol modifications were done: no RNase A or lysozyme was mixed into the melted agarose, solidified gel plugs were incubated overnight at 37°C with 20 µg/ml RNase A and 10 mg/ml lysozyme and the gel plugs were used immediately.

The agarose plugs (about 9×4×1 mm) were partly incubated for 5 min at 37°C with 1 U nuclease S1 (MBI Fermentas) to convert the plasmids into linear molecules and then directly used for contour-clamped homogeneous field electrophoresis (CHEF) (9). The electrophoresis was performed by using the CHEF mapper system of Bio-Rad. The agarose slab gels (1%, 14×14 cm) were run in 0.5×TBE buffer (4) at 14°C at 6 V cm^{-1} for 26 h with a pulse time 7 to 24 sec with a linear ramp. The Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs) was used as a high-molecular-mass DNA standard.

Stripping of the membranes. The membranes were stripped of the DIG-labeled probe as described in the Roche manual (21) and rehybridized with the other probe.

Nucleotide sequence accession number. The 4269 bp sequence carrying the epimerase-gene and the 3692 bp sequence carrying the lyase-gene will appear in the GenBank nucleotide sequence database under the accession number AY530098 and AY530099, respectively.

Analysis of argininosuccinate. Argininosuccinate (Sigma-Aldrich) was measured by high pressure liquid chromatography on a Purospher® RP18 endcapped, 250×4.0 mm, column (Merck) by using an isocratic eluent of 12.5% (v/v) methanol in formate buffer

(5 mM sodium formate, 15 mM formic acid, and 2 mM tetrabutylammonium hydrogen sulfate). Argininosuccinate (t_R 2.9 min) was detected at 210 nm.

RESULTS

Cloning of the C-N lyase and IDS-epimerase encoding genes. The purified IDS-epimerase was subjected to trypsin digestion and the resulting peptide mixture was fractionated by reversed-phase HPLC. The sequence information obtained from the isolated peptides (Table 2) was used for the design of oligonucleotides which then served as primers for PCR experiments.

With primers E-N and E-92 a 1037 bp fragment was produced. The PCR product was cloned into a pBluescript II SK(+) T-vector and the insert sequenced. In the deduced amino acid sequence the complete N-terminal amino acid sequence and 3 internal peptides were found. Thus, it was verified that the fragment of the IDS-epimerase has been amplified. The 1037-bp PCR product was digoxigenin labeled and used for the identification of corresponding bands on a Southern blot as well as for colony filter hybridization. Genomic DNA of *A. tumefaciens* BY6 was digested with several restriction endonucleases and the fragments were separated by agarose gel electrophoresis. Southern blot analysis from the genomic DNA fragments identified a 2.2 kb *BamH*I and a 5.0 kB *Xho*I insert. Clones carrying the appropriate insert in pBluescript SK II(+) were isolated by colony filter hybridization and designated pB22E (2.2 kb *BamH*I insert) and pX50E (5.0 kB *Xho*I insert).

For the C-N lyase, a 632 bp or a 581 bp fragment were amplified by the primer combination L-79 / N-L1 or L-79/ N-L2, respectively. The fragments were cloned into pBluescript II SK(+) and the insert sequenced. DNA sequencing demonstrated that they contained the deduced N-terminal amino acid sequence and an internal peptide. For further investigations only the 581 bp fragment was digoxigenin-labeled and used as a probe as described above. A clone carrying a 3.7 kb *Bam*HI insert in pBluescript SK II(+) was isolated and designated pB37L. The plasmids pB37L, pB22E, and pX50E were used for double strand sequencing.

Table 2. Sequences of N-termini, tryptic peptides, and deduced primers

Peptide (elution time in min)	Amino acid sequence[a]	Deduced oligonucleotides sequences	Primer name
IDS-epimerase			
N-terminus[b]	MFTTKLAEKVVSAWKAKISQPALKAAQD	AARGCNGCNCARGACGG	E-N
E(132.5)	AAQDGVIDTVAAALGGVTEH		
E(72.2)	WGVNQR		
E(130.8)	F(S/X)IEANIGAAL(F/L)DGEV(S/X)LA(S/X)FEIE		
E(91.7)	FDMPSETTFSGTTGY(Y/X)DIVVH	GTYTCNSWNGGCATRTCGAA	E-92
C-N lyase			
N-terminus[b]	MRERLSASPNELIVKHLIGPRLFGNLDRDFLEM(X/S)KVN	GARYTNATHGTNAARCA	L1-N
		NGMGAYTTYYTNGAAATG	L2-N
L(79.2)	TGELLGFDGLIENSLDAVGSR	ATNARGCCRTCRAAGCC	L-79
L(60.8)	NTIASVVIGNAPQLTSDE		
L(72.8)	FNLEHALIEDVGAD		
L(72.8)	TVMTGYTHGQPGQPI		

[a]Segments used for the design of oligonucleotides for PCR are underlined
[b]From reference (11)

Sequence analysis of the genes. Plasmid pB37L contained an insert of 3692 bp. The gene for the C-N lyase designated *icl* was unequivocally identified on the cloned fragment by the presence of the N-terminus and the tryptic peptides. The gene *icl* was found to be at position 1279 to 2883 and so almost in the middle of the sequenced insert. The gene encoded a protein consisting of 534 amino acids (Fig. 2) which corresponded to a protein with a molecular mass of 58.4 kDa

```
1279 ATGCGTGAACGCCTTAGCGCCAGTCCGAACGAATTGATCGTCAAACATTTGATTGGTCCTCGCCTTTTCGGGAACCTTGATCGAGATTTCCTCGAAATGTCG
      M  R  E  R  L  S  A  S  P  N  E  L  I  V  K  H  L  I  G  P  R  L  F  G  N  L  D  R  D  F  L  E  M  S
1381 AAGGTAAACCGCGCGCATGTTGTCATGCTGGCGGAAGCCAACGTCCTAGCCCCTGACGTGGCCGTCGGCTTGCTCGAAGGCCTTGCACGGATTGATGAACGG
      K  V  N  R  A  H  V  V  M  L  A  E  A  N  V  L  A  P  D  V  A  V  G  L  L  E .G  L  A  R  I  D  E  R
1483 GGGCTGAGTTCACTTGAGCTCAATCCGGATCGAGAAGAGCTTTATTTCAATCTTGAACATGCCTTGATCGAGGATGTAGGGGCCGACGTCGGTGGGAGGCTG
      G  L  S  S  L  E  L  N  P  D  R  E  E  L  Y  F  N  L  E  H  A  L  I  E  D  V  G  A  D  V  G  G  R  L
1585 CACACTGCGCGCAGCAGAAACGATCTTTATGCCACAGTCATGCGAATTAAGGTGCGCGGATACAGTGTGCAGATGTCGCATCTGCTGCTGGACCTGGTCGAA
      H  T  A  R  S  R  N  D  L  Y  A  T  V  M  R  I  K  V  R  G  Y  S  V  Q  M  S  H  L  L  L  D  L  V  E
1687 GCAGTCATCGCCAAGGCCTCAGCGGAAATGAAGACCGTTATGACCGGCTACACCCATGGGCAACCCGGGCAGCCGATCACTGCCGGTCACTACCTGTCCGGG
      A  V  I  A  K  A  S  A  E  M  K  T  V  M  T  G  Y  T  H  G  Q  P  G  Q  P  I  T  A  G  H  Y  L  S  G
1789 ATCAGCGAGGCTTTGTTGCGTGATGCAGCGCGCATTCTGGAAGGCTATGATCGCATCAACCTGAACCCTCTGGGGGCCTGTGCGCTTGCGACAACGACATTT
      I  S  E  A  L  L  R  D  A  A  R  I  L  E  G  Y  D  R  I  N  L  N  P  L  G  A  C  A  L  A  T  T  T  F
1891 CCCATCGACCGCAATCGCACCGGGGAGCTTCTGGGCTTTGATGGTTTGATCGAGAATTCGTTGGACGCTGTAGGTTCGCGCGACTACGTCCCGGAATTGATC
      P  I  D  R  N  R  T  G  E  L  L  G  F  D  G  L  I  E  N  S  L  D  A  V  G  S  R  D  Y  V  P  E  L  I
1993 TTCGGATTTGCAATGGCCGCTACAACGGTCAGCCGCTTCTGTGCGGATTTGCATATCTGGTACATGGCGGAGTTCAACTATATCGGCATTGATGATTCAATC
      F  G  F  A  M  A  A  T  T  V  S  R  F  C  A  D  L  H  I  W  Y  M  A  E  F  N  Y  I  G  I  D  D  S  I
2095 GCCGGGACGAGCAGCATTATGCCGCAAAAGAAGAACCCCAGCCCGATTGAACATCTCAAGGCCAAGGCAAGCCATCTCTACGGCGCATTGATGACTTCCCTT
      A  G  T  S  S  I  M  P  Q  K  K  N  P  S  P  I  E  H  L  K  A  K  A  S  H  L  Y  G  A  L  M  T  S  L
2197 GCCGCCCAACGGGGCGCCTTTTTTACCCATGGACGGGAAGTTGGTACGGAAAGCACGAGCGGATTTGGCGAAGCCGTCAAACAGTTCGAAGCGGTGGCAGAG
      A  A  Q  R  G  A  F  F  T  H  G  R  E  V  G  T  E  S  T  S  G  F  G  E  A  V  K  Q  F  E  A  V  A  E
2299 CTGGCCGGCGCCGTTGTCAATGGTCTCGTCTTTAATCGCGAGCGGCTGATCGAGGCTGTCGATTCAAACTTCTCGACGATGACAGAGTTGGCCGACACCTAT
      L  A  G  A  V  V  N  G  L  V  F  N  R  E  R  L  I  E  A  V  D  S  N  F  S  T  M  T  E  L  A  D  T  Y
2401 GTCACGGAATACGGCATATCGTTTCGTGATGCGCACAARATCGTTGGAGCGATTGCCCGCGAAGCCAGTTTGAAGAAGTTGGAAGGAACCAGCGATATCTCC
      V  T  E  Y  G  I  S  F  R  D  A  H  K  I  V  G  A  I  A  R  E  A  S  L  K  K  L  E  G  T  S  D  I  S
2503 GTCGAACTGGTCAATACGATCGCCTCATCCGTTATCGGGAATGCCCCGCAACTGACAAGTGACGAACTGCGCACAGCCCTTGATGCGCGGCGTGGCGTGGAG
      V  E  L  V  N  T  I  A  S  S  V  I  G  N  A  P  Q  L  T  S  D  E  L  R  T  A  L  D  A  R  R  G  V  E
2605 CGGCGACAGGTTCAGGGCGGCCCTTCGGAGAGGTCCGTCTCGAAAATGCTGGCCGATCAGGAAAAGCAGACGGCTCAAATGCGGAATTTGCTGAAGCAGCGG
      R  R  Q  V  Q  G  G  P  S  E  R  S  V  S  K  M  L  A  D  Q  E  K  Q  T  A  Q  M  R  N  L  L  K  Q  R
2707 GAAGGTGCATTGTCCACGCTGACGCCCGGCTGGCGTTGGCTATCTCCCAACTGTGCGAGTCGGTGGAGGCATGACCCTGTCTCGCGGGGCCCTCGTGGCGAT
      E  G  A  L  S  T  L  T  P  G  W  R  W  L  S  P  N  C  A  S  R  W  R  H  D  P  V  S  R  G  P  R  G  D
2809 CAATTATTCCGATCGGGGCCGTGCGACCTCCTGGAACCGGTTCAATCGGAACCGAGTGAAAACTTGGTGAAATGA 2883
      Q  L  F  R  S  G  P  C  D  L  L  E  P  V  Q  S  E  P  S  E  N  L  V  K  -
```

Fig. 2. DNA sequence and amino acid sequence of the C-N lyase from *A. tumefaciens* BY6. The N-terminus and the internal peptide sequences are underlined. The stop codon is indicated by a dash.

This value agrees sufficiently with the molecular mass of the C-N lyase subunit determined previously (57 kDa) (11). A BLAST search using the deduced amino acid sequence of the C-N lyase demonstrated that the highest degree of sequence similarity was achieved with a putative argininosuccinate lyase in *Methanosarcina barkeri* (accession number ZP00078839; 39% identity) followed by a putative argininosuccinate lyase in *Methanococcus jannaschii* (NP24778; 34% identity) and an argininosuccinate lyase in *Methanococcus maripaludis* (O74026; 34% identity). Conserved domain search resulted also in highest similarity to argininosuccinate lyases (COG0165). Therefore, activity of the C-N lyase towards the substrate argininosuccinate was tested but it showed no activity at all.

DNA sequencing of the insert of pB37L revealed further two putative open reading frames. The first one, position 166 to 1107, was transcribed in the opposite direction as the *icl* gene and showed the highest degree of sequence similarity to a regulatory protein (*lys*R superfamily) from *Ralstonia metallidurans* (33% identity). The other fragmentary open reading frame, from positions 2914 to 3690, showed the highest degree of sequence similarity to a probable transport protein from *Ralstonia solanacearum* (42% identity).

The DNA sequence of the insert in plasmid pB22E was first determined but unfortunately the plasmid pB22E did not carry the entire epimerase gene designated *ite*. In order to obtain the entire *ite* gene with its vicinity, the plasmid pX50E was partially sequenced (Fig. 3).

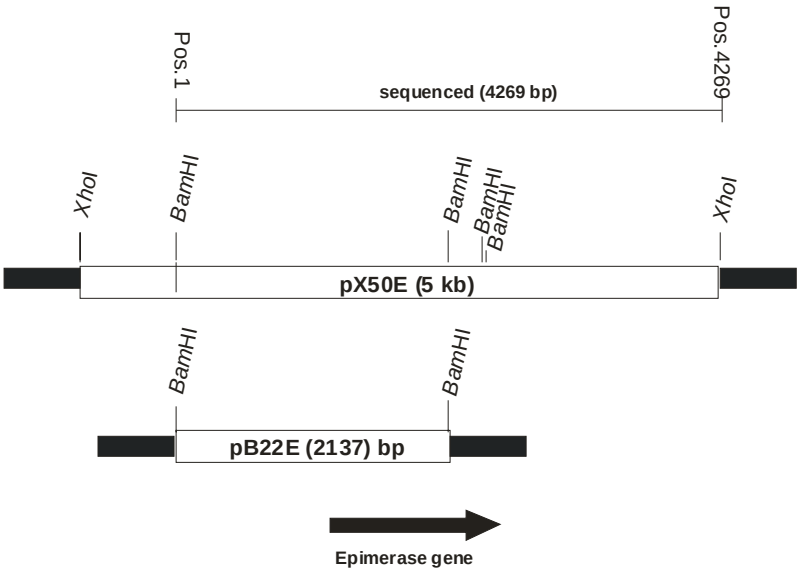


Fig. 3. Genetic organisation of the 5 kb *Xho*I fragment and the 2.2 kb *Bam*HI fragment. Plasmids pX50E and pB22E encoded the 5 kb *Xho*I fragment and the 2.2 kb *Bam*HI fragment, respectively.

The consisting sequence contained 4269 bp including the epimerase gene at positions 1197 to 2537. The deduced protein sequence of the epimerase exhibited 446 amino acids and included all determined peptides as well as the N-terminal sequence (Fig. 4).

```
1197 ATGTTCACCACAAAATTAGCCGAAAAGGTCGTTTCTGCCTGGAAAGCCAAGATATCGCAGCCCGCGCTCAAGGCTGCCCAAGACGGCGTGATCGACACTGTC
      M  F  T  T  K  L  A  E  K  V  V  S  A  W  K  A  K  I  S  Q  P  A  L  K  A  A  Q  D  G  V  I  D  T  V

1299 GCGGCAGCTTTGGGTGGCGTGACGGAGCATTCTGTCCAGGTGGCGCTGAAGTATGTGGCGGCGACGGGGGCCAGCGGCGACAGCAAGTTGTGGGGCGTGAAC
      A  A  A  L  G  G  V  T  E  H  S  V  Q  V  A  L  K  Y  V  A  A  T  G  A  S  G  D  S  K  L  W  G  V  N

1401 CAACGATCTAACATGTTCGACGCGGCCTTCGTGAATGGGATGGCGGCTCATGCCATTGATTTCGACGACAGTTTTCCCGTTATGCGGGGTCATCCCAGCAGT
      Q  R  S  N  M  F  D  A  A  F  V  N  G  M  A  A  H  A  I  D  F  D  D  S  F  P  V  M  R  G  H  P  S  S

1503 TCACTGGTGCCGGCGATTTTTGCCGTAGGCGAGCATGTTGGCGCCAACGGGCACAACTGCCTAAAGTCATATGTGCTAGGCATAGAGGTTGTAGCAACCTTG
      S  L  V  P  A  I  F  A  V  G  E  H  V  G  A  N  G  H  N  C  L  K  S  Y  V  L  G  I  E  V  V  A  T  L

1605 GGGCGAGCAGTGGGCAAGGGTCACTACTTGGCAGGTTGGCACCCTACCTCCACGCTCGGCGTATTCGGCGCGACCACAGCCGCGGCGCTGTTGCTTGGCGCC
      G  R  A  V  G  K  G  H  Y  L  A  G  W  H  P  T  S  T  L  G  V  F  G  A  T  T  A  A  A  L  L  L  G  A

1707 GATGAAGAACAGCTTCGCAATGCCTGGGGGATCGCAGCTTCCAATTCGTGCGGTATCATCAAAAACTTTGGTACGATGACCAAGCCGATGCATACCGGGTCG
      D  E  E  Q  L  R  N  A  W  G  I  A  A  S  N  S  C  G  I  I  K  N  F  G  T  M  T  K  P  M  H  T  G  S

1809 GCTGCTCGCAACGGCGTTTTGAGTGCATGGCTGTCCATGCAATCCTTTACCGGCTGCCAAACGGTCTTCGACGATGCCGAGGGCATTCTGGCGATGTATGGC
      A  A  R  N  G  V  L  S  A  W  L  S  M  Q  S  F  T  G  C  Q  T  V  F  D  D  A  E  G  I  L  A  M  Y  G

1911 GCTCAGCCAGGACCAGAGCTATTCAACGCCATGCAGAAATTTGGCACGCCATGGGCCATCATTGCACCTGGCCTCTACAAGAAGAGTTGGCCCTCCTGCTAC
      A  Q  P  G  P  E  L  F  N  A  M  Q  K  F  G  T  P  W  A  I  I  A  P  G  L  Y  K  K  S  W  P  S  C  Y

2013 GCCAATCACAAGCCTCTTGCCGGTCTCTTCGCTATAATGAAAGAGCACGGCCTGACCGGCCAGGACATAAGCCACGTCGACGTCGGTTTTCTGCCCGGCGTG
      A  N  H  K  P  L  A  G  L  F  A  I  M  K  E  H  G  L  T  G  Q  D  I  S  H  V  D  V  G  F  L  P  G  V

2115 GAAAAGCCTTTGCTCTATATGGATCCGCGCACCACCGAAGAGGCCAAGTTCAGCATCGAAGCCAATATCGGTGCTGCTCTCCTTGATGGTGAGGTCAGCTTG
      E  K  P  L  L  Y  M  D  P  R  T  T  E  E  A  K  F  S  I  E  A  N  I  G  A  A  L  L  D  G  E  V  S  L

2217 GCGTCATTCGAGATTGAACATCTCGATCGACCAGCGATGCGCGCGGCGATGAAGAAGGTCACCCGGTTCGACATGCCCTCCGAAACGACCTTTTCGGGCACC
      A  S  F  E  I  E  H  L  D  R  P  A  M  R  A  A  M  K  K  V  T  R  F  D  M  P  S  E  T  T  F  S  G  T

2319 ACAGGATATACCGACATCGTCGTCCATACCGCCGATGGGAAGATCGAGCGCCGTATCGAGGCCACGCCCGGATCCTTGGAGGATCCAATGGACGATGCCCAC
      T  G  Y  T  D  I  V  V  H  T  A  D  G  K  I  E  R  R  I  E  A  T  P  G  S  L  E  D  P  M  D  D  A  H

2421 CTGGAGCGCAAATTTAAGGATTGCACGGCATGGATGCCGTTTGGCGAGTCAGGTCTCCTGTTCGACCGGCTTCGCAGTCTCACGGCAGACCAGGGTATAAAG
      L  E  R  K  F  K  D  C  T  A  W  M  P  F  G  E  S  G  L  L  F  D  R  L  R  S  L  T  A  D  Q  G  I  K

2523 ACGGTGCAGCCGTAG 2537
      T  V  Q  P  -
```

Fig. 4. DNA sequence and amino acid sequence of the IDS-epimerase from *A. tumefaciens* BY6. The N-terminus and the internal peptide sequences are underlined. The stop codon is indicated by a dash.

The calculated molecular mass of 47.6 kDa correspond with the 48 kDa determined previously (11). A BLAST search using the deduced amino acid sequence of the epimerase showed the highest degree of sequence identities with a conserved hypothetical protein (NP888892) in *Bordetella bronchiseptica*, a conserved hypothetical protein (NP883595) in *Bordetella parapertussis*, and a hypothetical protein (ZP00032190) in *Burkholderia fungorum*. Conserved domain search revealed similarity to the *prp*D gene (COG2079) and to the related *mmg*/*prp*D family (pfam03972) encoding a methylcitrate dehydratase involved in propionate catabolism (14). Upstream of the gene *ite*, a putative open reading frame from position 106 to 1179 showed the highest degree of similarity to an ATP-binding-cassette-type transport protein from *Streptomyces coelicolor* A3 (42% identity).

Localization of the genes. It was found that strain *A. tumefaciens* contained a circular plasmid of 180 kb. The DNA was blotted and hybridized with the labelled 1037 bp fragment of the IDS-epimerase gene initially obtained by PCR (see above). Thus, a hybridization signal was obtained with the 180 kb plasmid. After stripping the blot membrane, it was rehybridized with the 581 bp probe of the C-N lyase. A hybridization signal was received on the chromosomal DNA (Fig. 5).

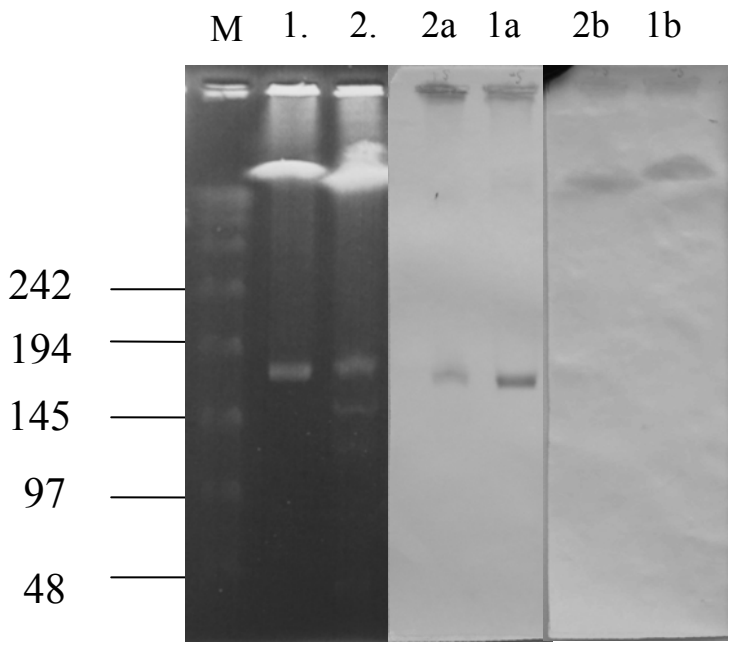


Fig. 5. Detection of large plasmids in *A. tumefaciens* BY6 by pulse-field gel electrophoresis and localization of the genes involved in IDS-degradation. Lanes: 1, DNA preparation without S1 nuclease treatment; 2, DNA preparation with S1 nuclease treatment; 1a and 2a, hybridization signal with the 1037 bp probe (IDS-epimerase); 1b and 2b, rehybridization signal with the 581 bp probe (C-N lyase), M, molecular mass markers. Number on the left are kilobases.

DISCUSSION

The IDS-degrading lyase from *A. tumefaciens* BY6 is homologous to the superfamily (fumarase II family) of enzymes including the subfamilies argininosuccinate lyase (31), δ-crystallin (18, 20, 33), class II fumarase (32), aspartate ammonia-lyase (27, 32), adenylosuccinate lyase (26), and 3-carboxy-cis,cis-muconate lactonizing enzyme (30). All these enzymes are homotetramers with a molecular mass of approximately 200 kDa and catalyze similar β-elimination reactions in which a C_α-N or C_α-O bond is cleaved with the subsequent release of fumarate as one of the products (23). Across the fumarase superfamily very low sequence similarity is observed, however three highly conserved regions (Fig. 6) have been proposed to be involved in forming the active site (8, 28, 29). Within the superfamily, the C-N lyase of *A. tumefaciens* BY6 is most closely related to the subfamily of argininosuccinate lyases, which are involved in the last step in biosynthesis of arginine in prokaryotes and in the urea cycle in eukaryotes. However, the C-N lyase exhibits no activity against argininosuccinate and also no activity against the fumarase II family substrates fumarate and aspartate (11).

Argininosuccinate lyases are direct homologous to δ-crystallin, the major structural proteins of the eye lenses of birds vertebrate. In duck genomes two distinct functional δ-crystallin genes, termed δI and δII are present in tandem. Only δII exhibits argininosuccinate lyase activity (19, 20). Extensive crystallographic studies (1, 28) and mutational analysis (8, 23) on δ-crystallins have confirmed a number of residues in the active site. In agreement with these results, we localized the corresponding catalytic residues on the C-N lyase from *A. tumefaciens* BY6. The fumarate moiety of argininosuccinate is anchored in the active site of duck δII-crystallin by direct interactions with residue N116, T161, and H162 and indirectly via a water molecule with residue K289, N291, and E296. It can be assumed that the equivalent amino acids N109, T154, H155, K282, N284, and E289 of the C-N lyase are integral parts of the binding domain of the fumarate moiety of R,S-IDS. The fumarate binding residues are highly conserved across the fumarase II superfamily (Fig. 6). The arginine moiety of argininosuccinate in duck δII-crystallin is oriented toward residues S29, R115, N116, Y323, Q328, K331 and via a water molecule with residue N27, D33, D89, H91, R238, K325, D330, (1, 8, 23, 28). Only 3 of these 13 amino acids are homologous between δII-crystallin and the C-N lyase, namely R115, N116, and R238. Due to this low homology, the C-N lyase cannot anchor the arginino residue of argininosuccinate and

therefore cannot catalyze argininosuccinate cleavage. Since the natural substrate is still unknown, it will be of further interest which substrates besides R,S-IDS could be cleaved by the lyase.

Surprisingly, the IDS-epimerase showed no obvious homology to aspartate racemases or generally to amino acid racemases. The database alignment of the deduced amino acid sequence indicated no significant similarity to any proteins with a known function. Hence, the epimerase is a novel enzyme with a still unknown natural substrate. The result of the conserved domain search identify similarity to methylcitrate dehydratase (*prp*D) which may signify multifunctional enzyme characteristic of the epimerase.

The genetic localization of the IDS-epimerase and the C-N lyase from *A. tumefaciens* BY6 showed that the genes are not clustered. The gene *ite* encoding the IDS-epimerase was located on a large plasmid whereas the gene *icl* encoding the C-N lyase was detected on the chromosomal DNA. Due to these results, the metabolism of R,R-IDS is obviously carried out by unique microorganisms. On the other hand, we assume, that mineralization of R,S- and S,S-IDS maybe a general property in natural organism communities, especially if argininosuccinate lyases or other enzymes from the fumarase II superfamily would cleave the ‘S-configuration’ of IDS.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank H. Weber (Frauenhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Stuttgart, Germany) for valuable advice on trypsin digestion.

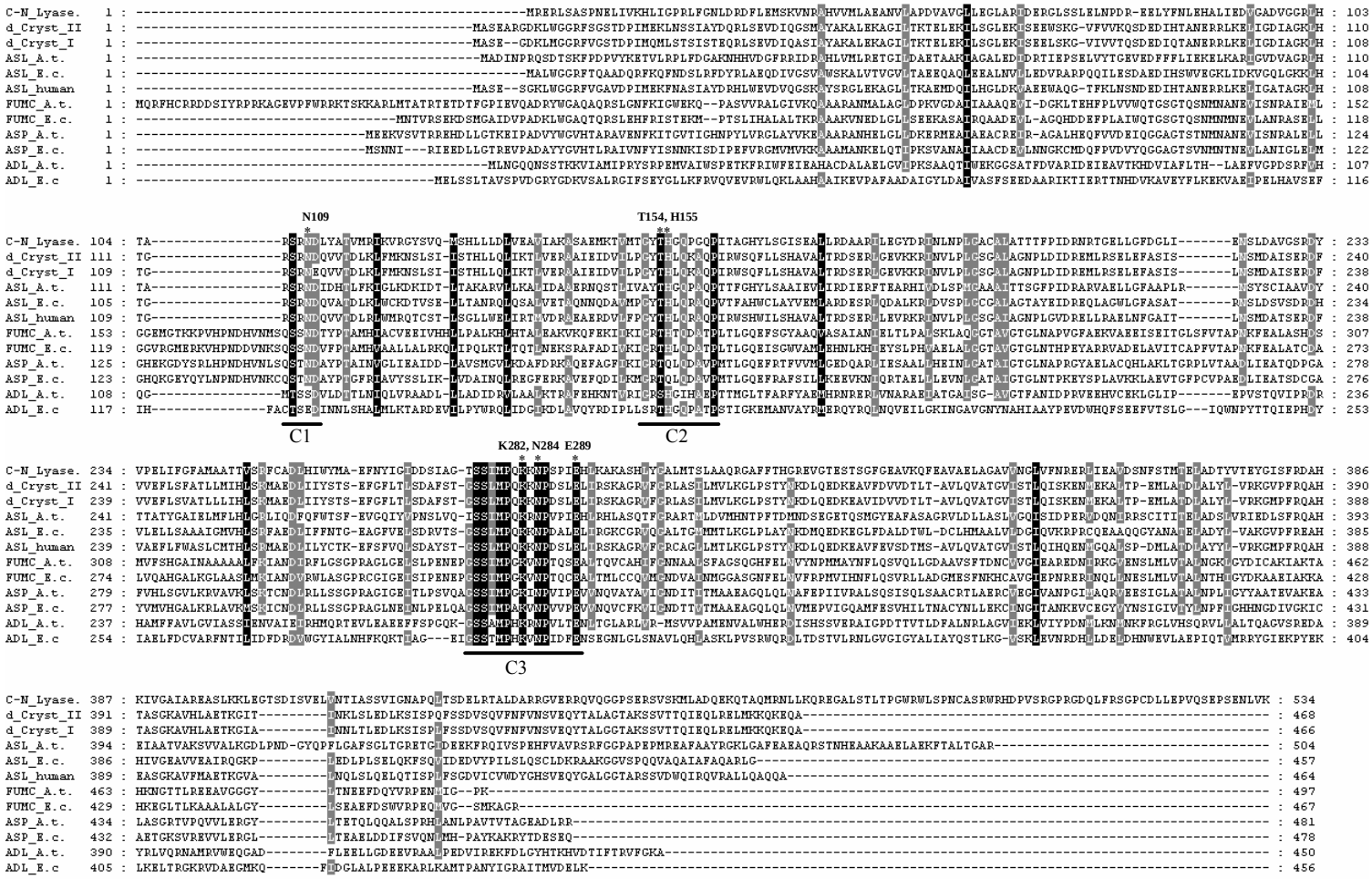


Fig. 6. Amino acid comparison of representatives of the fumarase II fumarase superfamily. The figure was prepared using the program GeneDoc. Amino acid residues that show 100% and 80% identity are shaded in black and gray, respectively. The three conserved amino acid sequences in the superfamily (C1-C3) are underlined and the tentative catalytic residues are marked with asterisk. Abbreviations: ASL, argininosuccinate lyase, ASP, aspartate ammonia lyase; ADL, adenylosucciante lyase; FumC, fumarase C; d_Cryst, δ-Crystallin; A. t., *Agrobacterium tumefaciens*; E. c., *Escherichia coli*.

REFERENCES

1. **Abu-Abed, M., M. A. Turner, F. Vallée, A. Simpson, C. Slingsby, and P. L. Howell.** 1997. Structural comparison of the enzymatically active and inactive forms of δ-crystallin and the role of histidine 91. Biochemistry 36:14012-14022.
2. **Alting-Mees, M. A, J. A. Sorge, and J. M. Short.** 1992. pBluescriptII: multifunctional cloning and mapping vectors. Methods Enzymol. 216:483-495.
3. **Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman.** 1997. Gapped Blast and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.
4. **Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl (ed.).** 1987. Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1. John Wiley & Sons, New York, NY.
5. **Barton, B. M., Hardening, G. P., and A. J. Zuccarelli.** 1995. A general method for detecting and sizing large plasmids. Anal. Biochem. 226:234-240.
6. **Bayer AG.** 2001. Safety Data Sheet 857037/10, Baypure CX 100 solid. Bayer AG, Leverkusen, Germany.
7. **Bucheli-Witschel, M. and T. Egli.** 2001. Environmental fate and microbial degradation of aminopolycarboxylic acids. FEMS Microbiol. Rev. 25:69-106.
8. **Chakraborty, A. R., A. Davidson, and P. L. Howell.** 1999. Mutational analysis of amino acid residues involved in argininosuccinate lyase activity in duck δ II crystallin. Biochemistry. 38:2435-2443.
9. **Chu, G., D. Vollrath, and R. W. Davis.** 1986. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. Science 234, 1582-1585.
10. **Chung, C. T., S. L. Niemela, and R. H. Miller.** 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cell in the same solution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:2172-2175.
11. **Cokesa, Ž., H.-J. Knackmuss, and P.-G. Rieger.** 2003. Biodegradation of all stereoisomers of the EDTA-substitute iminodisuccinate (IDS) by *Agrobacterium tumefaciens* BY6 involves an epimerase and a stereoselective Carbon-Nitrogen lyase. Submitted to Appl. Environ. Microbiol.
12. **EPA** (United States Environmental Protection Agency). June 2002. Document No. EPA744-K-02-002. Presidential green chemistry challenge. Award

recipients. Alternative synthetic pathway awards, p.16-17. [Online.] www.epa.gov/greenchemistry

13. **Heery, D. M., F. Gannon, and R. Powell.** 1990. A simple method for subcloning DNA fragments from gel slices. Trends Genet. 6:173.
14. **Horswill, A. R. and J. C. Escalante-Semerena.** 2001. In vitro conversion of propionate to pyruvate by *Salmonella enterica* enzymes: 2-methylcitrate dehydratase (PrpD) and aconitase Enzymes catalyze the conversion of 2-methylcitrate to 2-methylisocitrate. Biochemistry. 40:4703-4713.
15. **Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene 96:23-28.
16. **Lee, S.Y. and S. Rasheed.** 1990. A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA. BioTechnique 9:676-679.
17. **Marchuk, D., M. Drumm, A. Saulino, and F. S. Collins.** 1991. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. Nucleic Acids Res. 19:1154.
18. **Matsubasa, T., M. Takiguchi, Y. Amaya, I. Matsuda, and M. Mori.** 1989. Structure of the rat argininosuccinate lyase gene: close similarity to chicken δ-crystallin genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:592-596.
19. **Mori, M., T. Matsubasa, Y. Amaya, and M Takiguchi.** 1990. Molecular evolution from argininosuccinate lyase to δ-crystallin. Prog. Clin. Biol. Res. 344:683-699.
20. **Piatigorsky, J., W. E. O'Brien, B. L. Norman, K. Kalumuck, G. J. Wistow, T. Borras, J. M. Nickerson, and E. F. Wawrousek.** 1988. Gene sharing by δ-crystallin and argininosuccinate lyase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:3479-3483.
21. **Roche.** 2000. DIG Application Manual for Filter Hybridization.
22. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.
23. **Sampaleanu, L. M., B. Yu, and P. L. Howell.** 2002. Mutational analysis of duck δ2 crystallin and the structure of an inactive mutant with bound substrate provide insight into the enzymatic mechanism of argininosuccinate lyase. J. Biol. Chem. 277:4166-4175.

24. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74**:**5463-5467.

25. **Stone, K. L., M. B. LoPresti, J. M. Crawford, R. DeAngelis, and K. R. Williams.** 1989. Enzymatic digestion of proteins and HPLC peptide isolation. In A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing , pp. 31-47. Edited by P. T. Matsudaira. San Diego, CA: Academic Press.

26. **Stone, R. L., H. Zalkin, and J. E: Dixon.** 1993. Expression, purification, and kinetic characterization of recombinant human adenylosuccinate lyase. J. Biol. Chem. 268:19710-19716.

27. **Takagi, J. S., M. Tokushige, Y. Shimura, and M. Kanchisa.** 1986. L-aspartate ammonia-lyase and fumarate hydratase share extensive sequence homology. Biochem. Biophys. Res. Commun. 138:568-572.

28. **Vallée, F., M. A. Turner, P. L Lindley, and L. P Howell.** 1999.Crystal structure of an inactive duck δ II crystallin mutant with bound argininosuccinate. Biochemistry. 38:2425-2434.

29. **Weaver, T. M., D. G. Levitt, M. I. Donnelly, P. P. Wilkens Stevens, and L. J. Banaszak.** 1995. The multisubunit active site of fumarase C from *Escherichia coli*. Nat. Struct. Biol. 8:654-662.

30. **Williams, S. E., E.M. Woolridge, S. C. Ransom, J. A. Landro, P. C. Babbitt, and J. W. Kozarich.** 1992. 3-Carboxy-cis,cis muconate lactonizing enzyme from *Pseudomonas putida* is homologous to the class II fumarase family: A new reaction in the evolution of a mechanistic motif. Biochemistry 31:9768-9776.

31. **Woods, S.A., J.S. Miles, and J. R. Guest.** 1988. Sequence homologies between argininosuccinase, aspartase and fumarase: A family of structurally-related enzymes. FEMS Microbiol. Lett. 51:181-186.

32. **Woods, S. A., J. S. Miles, R. E. Roberts, and J. R. Guest.** 1986. Structural and functional relationships between fumarase and aspartase. Nucleotide sequences of the fumarase (fumC) and aspartase (aspA) genes of *Escherichia coli* K12. Biochem. J. 237:547-557.

33. **Yeh, L.-S., A. Elzanowski, L. T. Hunt, and W. C. Barker.** 1988. Homology of δ crystallin and argininosuccinate lyase. Comp. Biochem. Physiol. B 89:433-437.

Anhang 4

16S-rDNA Sequenz von *Ralstonia* sp. SLRS7

```
1      gtttgatcctggctcagattgaacgctggcggcatgccttacacatgcaagtcgaacggcagcacgggct
71     tcggcctggtggcgagtggcgaacgggtgagtaatacatcggaacgtgccctgtcgtgggggataactag
141    tcgaaagattagctaataccgcatacgacctgagggtgaaagcgggggaccggtaacggcctcgcgcgac
211    aggagcggccgatgtctgattagctagttggtggggtaaaagcctaccaaggcgacgatcagtagctggt
281    ctgagaggacgatcagccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggaggcagcagtggggaa
351    ttttggacaatgggggcaaccctgatccagcaatgccgcgtgtgtgaagaaggccttcgggttgtaaagc
421    acttttgtccggaaagaaatggctctggttaatacctggggtcgatgacggtaccggaagaataagcacc
491    ggctaactacgtgccagcagccgcggtaatacgtagggtgcgagcgttaatcggaattactgggcgtaaa
561    gcgtgcgcaggcggtttgataagacaggcgtgaaatccccgagctcaacttgggaatggcgcttgtgact
631    gtcaggctagagtatgtcagagggggggtagaattccacgtgtagcagtgaaatgcgtagagatgtggagg
701    aataccgatggcgaaggcagccccctgggacgtcactgacgctcatgcacgaaagcgtggggagcaaaca
771    ggattagataccctggtagtccacgccctaaacgatgtcaactagttgttggggattcatttcttcagta
841    acgtagctaacgcgtgaagttgaccgcctggggagtacggtcgcaagattaaaactcaaaggaattgacg
911    gggacccgcacaagcggtggatgatgtggattaattcgatgcaacgcgaaaaaccttacctacccttgac
981    atgccactaacgaagcagagatgcattaggtgcccgaaagggaaagtggacacaggtgctgcatggctgt
1051   cgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcccgcaacgagcgcaacccttgtctctagttgctacg
1121   caagggcactctagagagactgccggtgacaaaccggaggaaggtggggatgacgtcaagtcctcatggc
1191   ccttatgggtagggcttcacacgtcatacaatggtgcgtaccagagggttgccaacccgcgagggggagc
1261   caatcccagaaaacgcatcgtagtccggatcgtagtctgcaactcgactacgtgaagctggaatcgctag
1331   taatcgcggatcagcatgccgcggtgaatacgttcccgggtcttgtacacaccgcccgtcacaccatggg
1401   agtgggttttgccagaagtagttagcctaaccgcaaggagggcgattaccacggcagggttcatgactgg
1471   ggtgaagtcgtaacaaggtagccgta  1479
```

16S-rDNA Sequenz von *Agrobacterium tumefaciens* BY6

```
1      agggctggcggcaggcttaacacatgcaagtcgaacgccccgcaaggggagtggcagacgggtgagtaac
71     ccgtgggaacatacccttttcctgcggaatagctccgggaaactggaattaatacccgcatacgcctacgg
141    gggaaagatttatcggggaaggattggcccgcgttggattagctagttggtggggtaaaggcctaccaag
211    gcgacgatccatagctggtctgagaggatgatcagccacattgggactgagacacggcccaaactcctac
281    gggaggcagcagtggggaatattggacaatgggcgcaagcctgatccagccatgccgcgtgagtgatgaa
351    ggccttagggttgtaaagctctttcaccggagaagataatgacggtatccggagaagaagccccgcgcta
421    acttcgtgccagcagccgcggtaatacgaagggggctagcgttgttcggaattactgggcgtaaagcgca
491    cgtaggcggatatttaagtcaggggtgaaatcccagagctcaactctggaactgcctttgatactgggta
561    tcttgagtatggaagaggtaagtggaattccgagtgtagaggtgaaattcgtagatattcggaggaacac
631    cagtggcgaaggcggcttactggtccattactgacgctgaggtgcgaaagcgtggggagcaaacaggatt
701    agataccctggtagtccacgccgtaaacgatgaatgttagccgtcgggcagtatactgttcggtggcgca
771    gctaacgcattaaacattccgcctggggagtacggtcgcaagattaaaactcaaaggaattgacggggcc
841    cgcacaagcggtggagcatgtggtttaattcgaagcaacgcgcagaaccttaccagctcttgacattcgg
911    ggtttgggcagtggagacattgtccttcagttaggctggccccagaacaggtgctgcatggctgtcgtca
981    gctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcccgcaacgagcgcaaccctcgcccttagttgccagcattta
1051   gttgggcactctaaggggactgccggtgataagccgagaggaaggtggggatgacgtcaagtcctcatgg
1121   cccttacgggctgggctacacacgtgctacaatggtggtgacagtgggcagcgagacagcgatgtcgagc
1191   taatctccaaaagccatctcagttcggattgcactctgcaactcgagtgcatgaagttggaatcgctagt
1261   aatcgcagatcagcatgctgcggtgaatacgttcccgggccttgtacacaccgcccgtcacaccatggga
1331   gttggttttacccgaaggtagtgcgctaaccgcaaggaggcagctaaccacggtagggtcagcgactggg
1401   gtgaagtcgtaacaaggtagccgtaggggaacctgcggctggatcacct  1449
```

Lebenslauf

Name:	Cokesa, Željko	
Geburtsdatum:	24.11.1972	
Geburtsort:	Sombor / Serbien & Montenegro	
Schulbildung:		
1979 – 1983	Grundschule	Stuttgart-Zuffenhausen
1983 – 1992	Gymnasium	Stuttgart-Freiberg
Studium:		
1992 – 1994	Studium der Chemie an der Universität Stuttgart	
1994 – 1998	Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Stuttgart und an der Universität Hohenheim Abschluß: Staatsexamen für Lebensmittelchemiker Teil A	
1998 – 1999	Praktikant der Lebensmittelchemie am Chemischen- und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, Sitz Fellbach Abschluß: Staatsexamen für Lebensmittelchemiker Teil B	
Dissertation:		
Mai 2000	Beginn der experimentellen Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit bei Herrn Prof. Dr. H.-J. Knackmuss am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart	

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Knackmuss für die freundliche Aufnahme am Institut und für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsmöglichkeiten.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Paul-Gerhard Rieger für die Bereitstellung des Themas sowie für seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine zahlreichen Anregungen.

Herrn Dr. A. Stolz danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Des Weiteren möchte ich Frau Silvia Lakner, Herr Olaf Dickel und Herr Jan-Peter Hintner für die Einweisung in neue Arbeitstechniken danken. Den Mitarbeitern des Institutes danke ich für die sehr gute Arbeitsatmosphäre, die große Hilfs- und Diskussionsbereitschaft

Für das Korrekturlesen des Manuskripts bedanke ich mich bei Frau Katja Rothgerber und Frau Bettina Bäuerle

Von ganzem Herzen danke ich meiner Mutter Jelisaveta Cokesa und meiner Lebenspartnerin Jessica Wentz für ihre umfassende Unterstützung und so einen großen Anteil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.