



## Doctoral Thesis

# **Thermostabile Xylanasen von Thermomonospora fusca KW3 Produktion, Isolierung, Charakterisierung und Anwendung zur enzymatischen Zellstoffbleichung**

**Author(s):**

Casimir Schenkel, Jutta Juliane

**Publication Date:**

1992

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000692882> →

**Rights / License:**

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

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

Diss. ETH Nr. 9845

**Thermostabile Xylanasen von *Thermomonospora fusca* KW3:  
Produktion, Isolierung, Charakterisierung und Anwendung zur  
enzymatischen Zellstoffbleichung**

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels  
Doktorin der Naturwissenschaften  
der  
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE  
ZÜRICH

vorgelegt von  
JUTTA JULIANE CASIMIR SCHENKEL  
dipl. phil. II, Univ. Zürich  
geboren am 10. Januar 1959  
in Lüdenscheid, Deutschland

Angenommen auf Antrag von  
Prof. Dr. A. Fiechter, Referent  
Prof. Dr. R. Amadò, Korreferent  
Dr. W. K. Zimmermann, Korreferent

Zürich 1992

## Zusammenfassung

Ein neuer, aus Kompost isolierter thermophiler Actinomycet *Thermomonospora fusca* KW 3 wurde taxonomisch bestimmt und als hervorragender Xylanasebildner charakterisiert. Die Produktion dieser thermostabilen Enzyme wurde untersucht und ihre hemicellulolytische Wirkung auf Zellstoff aus dem Kraft-Verfahren geprüft.

Zum ersten Mal gelang es, eine prominente Xylanase aus dem multiplen Xylanasesystem von *Thermomonospora fusca* KW 3 zur Homogenität zu reinigen, zu charakterisieren und ihre Funktion beim Xylanabbau zu untersuchen.

Als Neuisolat unterscheidet sich dieser Stamm von den bereits bekannten in der Resistenz gegenüber Kristallviolett, einer oberen Wachstumsgrenze bei 60°C und der Alkalitoleranz bis pH 11. Der Stamm wurde bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen unter der Nummer DSM 6013 hinterlegt.

Das Xylanasesystem des isolierten Actinomyceten ist mit Haferspelzenxylan oder Buchenholzxytan induzierbar. Nach Kultivationen in Schüttelkolben und im 1.4 l Bioreaktor konnten aus 3 unterschiedlichen Induktionsmedien 6 bis 7 unterschiedliche Xylanasen (Xylanasesystem) isoliert werden. Die Xylanasesynthese wird in Anwesenheit von Glucose reguliert und unterliegt der Endprodukthemmung.

Für die präparative Darstellung der Xylanasen eignet sich das einfachere Batchverfahren besser als die kontinuierliche Kultur (Chemostatmodus). Das im Batchansatz benutzte verbesserte Medium Mor 4 führte zu einer 3.2-fach höheren Xylanase-Ausbeute als das Ausgangsmedium. Auch konnten erste Beobachtungen zur Regulation der Xylanasesynthese einschliesslich Wachstumsgekoppelung und Inhibition gemacht werden.

Anfänglich verhinderte der Feststoffanteil des Substrates die uniforme Mediumszufuhr im Chemostatbetrieb, und die Myzelbildung erschwerte die Biomassebestimmung und somit auch die Ermittlung der kritischen Verdünnungsrate  $D_c$ . Zur Abhilfe wurden ein Zulaufleitungsschüttler sowie eine Rührerdrehzahlschaltung installiert. Im einfachen Chemostaten liess sich keine Steigerung der Xylanaseproduktion erreichen. Die im Überstand gemessene Xylanaseaktivität blieb weiter unter jener aus Batchkulturen.

Die Xylanasen im Kulturüberstand weisen ein Temperatur-Optimum von 80°C und ein pH-Optimum von 6-7 auf. Die Halbwertszeit dieses Xylanasesystems beträgt 168 h bei 60°C.

Mit den thermostabilen alkaliaktiven Xylanasen aus dem isolierten Stamm konnte eine neue Zellstoffbleichsequenz für Kraftzellstoff entwickelt werden. Die Reduktion der Kappazahl um 2.2 Einheiten wird innerhalb von 3 h erreicht, was bedeutet, dass 10 kg aktives Chlor pro Tonne Zellstoff (=15%) eingespart werden können. Im Sinne des Umweltschutzes drängt sich daher eine Aufnahme der neuen Bleichsequenz in die grosstechnische Verarbeitung von Zellstoff auf.

Die gereinigte Xylanase pl 8.2 weist die gleichen Temperatur- und pH-Optima auf wie das Xylanasesystem im unbehandelten Kulturüberstand. Sie bleibt bei 60°C während 24 h stabil; die Molekularmasse beträgt 5300 Da. Damit gehört das Enzym zu den kleinsten der bekannten Xylanasen. Anhand der Aminosäurezusammensetzungen des Enzyms konnte diese mit Sicherheit den Xylanasen zugeordnet werden.

Die enzymatische Hydrolyse von Arabinoxylan durch die Xylanasen pl 8.2, 6.5, 6.0, 5.5 und 4.6 führt zu einem einheitlichen Abbaumuster mit Xylobiose und Xylotriose als Hauptendprodukte sowie nicht weiter identifizierbaren höheren Xylooligomeren. Demgegenüber hydrolysiert die Xylanase pl 7.0 Arabinoxylan kaum. Die Xylanase pl 8.2 wurde als eine xylosefreisetzende Endoxylanase identifiziert.

Die Xylanasen des Organismus *Thermonomospora fusca* KW 3 und deren Anwendung sind unter der Int. Patent Appl. No. 91810652.7 (1991) unter dem Titel: "A thermostable alcaliactive xylanase from a new actinomycete strain and application to wood pulp treatment" patentiert.

## Summary

In the present work, thermostable xylanases from a thermophilic actinomycete was investigated.

A thermophilic actinomycete, *Thermomonospora fusca* KW 3 was isolated, catalogued and found to be an excellent producer of xylanases. The production of thermostable xylanases was investigated and their hemicellulolytic activity on Kraft-pulp analyzed.

For the first time, a prominent xylanase from the multiple xylanase system of *Thermomonospora fusca* KW 3 was purified to homogeneity, characterized, and its involvement in xylan degradation was analyzed.

The newly isolated actinomycete differs from known strains by showing resistance against crystal violet and its ability to grow at temperatures of up to 60°C as well as at high pH values. The strain was deposited at the Deutsche Sammlung für Mikroorganismen under the number DSM 6013.

The xylanase system of the isolated strain can be induced by xylan from oat spelt or beech. 6 or 7 xylanases (xylanase system) were isolated following cultivation in shake flasks and a 1.4 l bioreactor using 3 different induction media. The xylanase synthesis shows end product inhibition and is regulated in the presence of glucose.

Using the improved medium Mor 4 in batch cultivation, the yield of xylanases was 3.2 times higher than in the original medium. First studies were showing that xylanase synthesis is growth-dependent.

Batch cultivation had several advantages over continuous cultivation. Using the chemostat, initially, the insolubility of the substrate lead to a variable concentration in the input stream. In addition, the mycelia forming organism prevented the determination of the critical dilution rate  $D_c$ . As a counter measure, a constant shaker and a rpm controlled stirrer were installed. However, this did not result in an increased production of xylanases. The measured xylanase activity was much lower than that obtained in batch cultures.

The xylanases in crude supernatant of *Thermomonospora fusca* KW 3 showed a temperature optimum of 80°C and a pH optimum of 6-7. The half-life of this xylanase system was 168 h at 60°C. A new bleaching sequence for

Kraft pulp was developed with the new thermostable alcaliactive xylanases. A decrease of 2.2 in the kappa number was achieved within 3 h. 10 kg of active chlorine (=15%) per ton of pulp can be saved. For environmental reasons, the application of the new bleaching sequence should certainly be introduced in the large scale processing of pulp.

The purified xylanase pl 8.2 shows the same temperature and pH optima as the xylanases of the crude supernatant. No decrease in activity was noted after 24 h at 60°C. The molecular mass is 5300 Da. The isolated enzyme is among the smallest xylanases known. However, on the basis of their amino acid compositions, the enzyme can be assigned with certainty to the xylanases.

The enzymatic hydrolysis of arabinoxylan by the xylanases pl 8.2, 6.5, 6.0, 5.5 and 4.6 showed similar degradation patterns with xylobiose and xylotriose as the major end products together with other non identified higher xylooligosaccharides. Xylanase pl 7.0 catabolized the degradation of arabinoxylan only poorly. The xylanase pl 8.2 was identified as a xylose monomer releasing endoxylanase.

The xylanases from *Thermomonospora fusca* KW 3 and their application are patented under the Int. patent Appl. No. 91810652.7 (1991): "A thermostable alcaliactive xylanase from a new actinomycete strain and its application to wood pulp treatment".