



Doctoral Thesis

## **Pectinolytic enzymes from actinomycetes for the degumming of ramie bast fibers**

**Author(s):**

Brühlmann, Fredi

**Publication Date:**

1994

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001401783> →

**Rights / License:**

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

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

Diss. ETH No. 10911

**PECTINOLYTIC ENZYMES FROM ACTINOMYCETES FOR  
THE DEGUMMING OF RAMIE BAST FIBERS**

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

presented by  
FREDI BRÜHLMANN  
dipl. Natw. ETH  
born January 20, 1960  
citizen of Sitterdorf, TG

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. A. Fiechter, examiner  
Prof. Dr. R. Amadò, co-examiner  
Prof. Dr. K. H. Erismann, co-examiner

Zürich 1994

---

## SUMMARY

In this work, the isolation of pectinolytic actinomycetes and the identification of their polysaccharide-degrading enzymes are reported. The particular objective was to study the application of pectinolytic enzymes from actinomycetes for the degumming process of ramie (*Boehmeria nivea*). Furthermore, the pectate lyase of a highly pectinolytic *Amycolata* sp. was purified and characterized in order to investigate its function in the degumming of ramie bast fibers.

Actinomycetes isolated from different soil and compost samples were screened for pectinolytic enzyme activities when grown on pectin-containing solid and liquid media. Mainly pectate lyases and low activities of pectinesterases were observed with plate diffusion tests in a medium containing plant residues from ramie as the sole carbon source. Polygalacturonases and polymethylgalacturonases were not produced. Multiple forms of pectate lyase were detected in culture supernatants of some of the strains using the zymogram technique applied to isoelectric focusing gels. Xylanolytic and cellulolytic activities were always found to be associated with pectinolytic activities. None of the pectinolytic enzymes were produced in a medium with glucose as the sole carbon source.

Treatment of ramie bast fibers with crude enzyme preparations from a selection of strains showed a good correlation between the pectate lyase activity introduced and the degumming effect resulting in a good separation of the bast fibers. Xylanases from actinomycetes did not show a significant degumming effect on ramie bast fibers neither in the absence nor in the presence of pectate lyases.

One strain, tentatively identified as an *Amycolata* sp. showing good degumming effects was selected for further characterization of its extracellular enzyme activities. This strain produced a single pectate lyase when grown in a medium with decorticated bast fibers from ramie as the carbon source. Activities of pectinesterase, xylanase, and CMCase were also found. The extracellular pectate lyase (EC 4.2.2.2) was purified to homogeneity by anion and cation exchange chromatography, followed by hydrophobic interaction chromatography. This enzyme cleaved polygalacturonate but not highly esterified pectin randomly by a transeliminative mechanism leading to the formation of a wide range of

unsaturated oligogalacturonates. As shown by HPAEC-PAD analyses, these unsaturated oligogalacturonates were further depolymerized by the enzyme to the unsaturated dimer and trimer as final products. The pectate lyase had a molecular weight of 31,000 determined by SDS-PAGE and a molecular mass of 30,000 Da determined by MALDI-MS. The isoelectric point of the protein was at pH 10. Maximum activity occurred at pH 10.25. Calcium was essential for activity while EDTA inactivated the enzyme under standard assay conditions. Interestingly, EDTA did not inhibit the ability of the enzyme to cleave the native pectin (protopectin) of ramie fibers. The  $K_m$  value with sodium polygalacturonate as the substrate was 0.019 mg ml<sup>-1</sup>. The purified enzyme lost its activity after a one hour incubation at 50°C but was stabilized by calcium or polygalacturonate. The N-terminal sequence showed high similarity within a stretch of 13 amino acids to the N-terminal sequences of the pectate lyases PLa and PLe from *Erwinia chrysanthemi*.

Degumming of ramie bast fibers was more efficient with the crude enzyme than with the purified pectate lyase. The relevance of this observation and the possible involvement of other enzymes which aid the pectate lyase in the degumming of ramie bast fibers are discussed.

## ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird die Isolierung pektinabbauender Aktinomyceten sowie die Identifizierung ihrer Glykanasen beschrieben. Insbesondere wird die Anwendbarkeit von Rohenzymen aus Aktinomyceten für die Degummierung von Bastfasern aus Ramie (*Boehmeria nivea*) geprüft. Die Reinigung und Charakterisierung einer Pektatlyase eines Aktinomyceten (*Amycolata* sp.) wird präsentiert. Damit ist es erstmals möglich, die Rolle eines gereinigten pektinabbauenden Enzyms bei der biochemischen Degummierung von Ramie zu untersuchen.

Aktinomyceten konnten aus zahlreichen Boden- und Kompostproben isoliert und bezüglich der Produktion pektinabbauender Enzyme auf Fest- bzw. in Flüssigkulturen näher untersucht werden. Mit Hilfe von Plattentests gelang der Nachweis von Pektatlyasen und Pektinesterasen in Flüssigmedien mit Ramiefasern als einziger Kohlenstoffquelle. Polygalakturonasen, Polymethylgalakturonasen und Pektinlyasen wurden hingegen nicht gefunden. Die Pektatlyase trat in einigen Isolaten in multiplen Formen in Erscheinung. Xylanasen und Zellulasen wurden in sämtlichen Kulturen mit pektinabbauenden Aktivitäten festgestellt. Glukose als Kohlenstoffquelle induzierte keine pektinabbauenden Enzyme.

Die Behandlung von Ramiebastfasern mit zellfreien Kulturüberständen einer Auswahl von Aktinomyceten ergab eine gute Korrelation zwischen der eingesetzten Pektatlyase-Aktivität einerseits und dem degummierenden Effekt andererseits. Hohe pektinabbauende Aktivitäten in den Kulturüberständen führten zu einer guten Trennung der Bastfaserbündel in Einzelfasern. Kein degummierender Effekt trat auf in Kulturüberständen mit hohen Xylanase-Aktivitäten in Abwesenheit von Pektatlyasen.

Ein Aktinomycetenisolat mit guten degummierenden Eigenschaften wurde als eine Spezie von *Amycolata* identifiziert und für die weiteren Arbeiten ausgewählt. Dieser Stamm produzierte eine einzelne Pektatlyase sowie Aktivitäten von Pektinesterase, Xylanase und Zellulase. Mit Hilfe verschiedener chromatographischer Verfahren, welche Anionentausch, Kationentausch und hydrophobe Interaktion

beinhalteten, konnte die extrazelluläre Pektatlyase (EC 4.2.2.2) zur Homogenität gereinigt werden. Das gereinigte Enzym wies gegenüber Polygalakturonsäure eine ausgeprägte Endo-Aktivität auf. Hochverestertes Pektin wurde nicht gespalten. Mit Hilfe von HPAEC-PAD-Analysen wurden ungesättigte Di- und Trigalakturonsäuren als Endprodukte des Abbaus von Polygalakturonsäure identifiziert. Die Ermittlung des Molekulargewichts der gereinigten Pektatlyase mittels SDS-PAGE ergab einen Wert um 31'000. Die mittels MALDI-MS ermittelte Molmasse betrug 30'000 Da. Der isoelektrische Punkt lag bei pH 10. Maximale Aktivität wurde bei pH 10.25 gemessen. Das Enzym benötigte Kalzium für die Spaltung von Polygalakturonat und wurde durch EDTA völlig inaktiviert. Interessanterweise war das Enzym in der Lage, natives Pektin der Ramiefasern in Gegenwart von EDTA zu spalten. Der  $K_m$ -Wert für Polygalakturonsäure lag bei 0.019 mg ml<sup>-1</sup>. Das gereinigte Enzym wurde bei 50°C innerhalb einer Stunde inaktiviert, konnte jedoch durch Kalzium oder Polygalakturonat stabilisiert werden. Ein Vergleich N-terminaler Sequenzen zeigte innerhalb 13 Aminosäuren sehr grosse Ähnlichkeit mit den Pektatlyasen PLa und PLe von *Erwinia chrysanthemi*.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Ramiefasern, welche mit der ungereinigten und gereinigten Pektatlyase behandelt wurden, ergaben eine geringere Degummierwirkung beim gereinigten Enzym. Die Bedeutung dieser Beobachtung sowie der Einfluss weiterer Enzyme auf die biochemische Degummierung von Ramie werden diskutiert.