

JenBiOxzyme®

X S - E X P L O R E R - T E S T K I T

JenaBios GmbH
Löbstedter Straße 80
D-07749 Jena

P: +49 (0)3641 3096525
F: +49 (0)3641 3096550
info@jenabios.de

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	2
Wissenschaftlicher Hintergrund	3
Anwendungsgebiete	5
Inhalt des Enzym-Kits	7
Datenblätter	8
Mangan-Peroxidase (EN-201)	8
Lignin-Peroxidase (EN-202)	8
Versatile Peroxidase (EN-203)	9
Laccase (EN-204)	9
Literatur	10
Weitere Enzymprodukte	13
Enzym-Aktivitätsassays	14

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat)
Da	Dalton
DMP	2,6-Dimethoxyphenol
EC	<i>enzyme commission numbers</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid (30 %)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
Lacc	Laccase
LiP	Lignin-Peroxidase
Mn	Mangan
MnP	Mangan-Peroxidase
MW	Molekulargewicht (engl. <i>molecular weight</i>)
U	Unit
VA	Veratrylalkohol (3,4-Dimethoxybenzylalkohol)
VP	Versatile Peroxidase

Wissenschaftlicher Hintergrund

Streu- und holzbewohnende Weißfäulepilze besitzen ein spezielles extrazelluläres „Enzymbesteck“ – das ligninolytische System. Es bildet in der Natur die Grundlage für den effektiven Abbau von Lignin und besteht unter anderem aus verschiedenen extrazellulären Hämperoxidasen wie Lignin-Peroxidase, Mangan-Peroxidase sowie die so genannte versatile Peroxidase. Aus Untersuchungen zur Spaltung von Modellverbindungen (Abbildung 1) und zur Depolymerisation von Ligninpräparaten wurde deutlich, dass diese Enzyme verschiedene Bindungstypen im Lignin unspezifisch durch Radikalbildung („Ein-Elektron-Oxidationen“) zu spalten vermögen. Sie wurden deshalb als ligninolytische bzw. Lignin modifizierende Enzyme bezeichnet (Abbildung 2). Im Verlauf der 80iger bis Anfang der 90iger Jahre wurden weitere extrazelluläre Enzyme der Weißfäulepilze gefunden (u.a. Glyoxalat-Oxidase, Arylalkohol-Oxidase, Cellobiose-Chinon-Oxidoreduktase), die zwar Lignin nicht direkt anzugreifen vermochten, denen jedoch „unterstützende“ Funktionen, wie Bildung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Beseitigung toxischer Abbauprodukte des Lignins (Chinone), zugeschrieben wurden. Unter natürlichen Bedingungen agieren die genannten Enzyme wahrscheinlich zusammen, sodass der Lignin-Abbau letztlich durch eine „konzertierte Aktion“ verschiedener Enzyme zustande kommt (Abbildung 2).

Es handelt sich bei diesen Enzymen um extrazelluläre multifunktionale Biokatalysatoren, welche in der Lage sind biochemische Veränderungen an komplexen Strukturen wie Lignin oder Xenobiotika vorzunehmen. Zurzeit gibt es eine Vielzahl von industriellen Anwendungen für diese Strukturen (Hofrichter 2010; Hofrichter *et al.* 2010a; Schmid *et al.* 2007). So werden Peroxidasen beispielsweise in der Papierindustrie als alternatives Verfahren zur Bleichung mit chlorhaltigen Verbindungen oder zur Cellulose-Gewinnung (*Biopulping*) eingesetzt. Aber auch in der Textil- und Waschmittelindustrie (u.a. bei der Jeansherstellung) spielen enzymvermittelte biokatalytische Prozesse eine zunehmende Rolle. Die Anwendungen sind sehr vielfältig, so werden zum Teil Abwässer oder Klärschlämme mit Enzymen vorbehandelt oder sogar Umweltschadstoffe zu verträglicheren Verbindungen abgebaut (Arora *et al.* 2010; Leonowicz *et al.* 2001; Martinez *et al.* 2005; Mayer *et al.* 2002). Selbst in der medizinischen Diagnostik oder der Arzneimittelherstellung, beispielsweise zur Modifizierung von Antibiotika (Conesa *et al.* 2002; Nakayama *et al.* 1999), werden Peroxidasen eingesetzt. Die folgende Tabelle 1 gibt eine Übersicht zu ligninolytischen Enzymen aus Basidiomyceten sowie deren bevorzugten biochemischen Reaktionen.

Peroxidasen weisen ein sehr breites Substratspektrum auf. Bei diesem Reaktionsmechanismus handelt es sich um eine radikalische Ein-Elektron-Oxidation (Dehydrogenierung von organischen phenolischen Verbindungen, wie z.B. Aminophenole oder Aminosäuren). Es wird der Transfer von insgesamt 2 Elektronen katalysiert. Der grundlegende Unterschied zu Laccasen besteht in der Anhängigkeit von Cosubstraten und einem 4 Elektronen Transfer. Hierbei werden Peroxide, in der Regel H_2O_2 oder organische Hydroperoxide als Elektronenakzeptor benötigt (Abbildung 1 und 2). Das Reaktionsoptimum dieser Enzym-Gruppe liegt zwischen pH 3 und 5 (Hofrichter *et al.* 2010b; Lundell *et al.* 2010). Das aktive Zentrum bildet bei Peroxidasen ein Häm-Histidin-System mit einem Eisenzentralatom (Arora *et al.* 2010; Hofrichter *et al.* 2010b).

Tabelle 1: Übersicht reaktionsspezifischer Eigenschaften ausgewählter pilzlicher Oxidoreduktasen. (verändert nach (Hofrichter *et al.* 2010a))

Enzym (EC-Bez.)	Reaktionseigenschaften	Molekulargewicht
Mangan-Peroxidase (1.11.1.13)	Katalysiert die Oxidation von Mn^{2+} zu Mn^{3+} , dieses hochreaktive Oxidationsmittel reagiert weiter mit vielen organischen Verbindungen über eine Radikalbildung (= indirekte Oxidation von aromatischen Substraten), Benötigen neben H_2O_2 noch Mn^{2+} als Cofaktor, Lignindegradation bis zur Mineralisierung (Hofrichter 2002) <ul style="list-style-type: none"> • Bsp.: <i>Nematoloma forwardii</i>, <i>Clitocybula dusenii</i> • Modellsubstrate: Mn^{2+}, Lignin 	39-50 kDa
Lignin-Peroxidase (1.11.1.14)	Spielt eine Schlüsselrolle beim Ligninabbau, Katalysiert direkt Oxidation von nicht-phenolischen Ligninbestandteilen und phenolischen Verbindungen zu Phenoxy- und Arylradikalen (Hofrichter <i>et al.</i> 2010b) <ul style="list-style-type: none"> • Bsp.: <i>Phanerochaete chrysosporium</i> • Modellsubstrate: VA, Lignin 	40-50 kDa
Versatile-Peroxidase	Kombiniert die katalytischen Eigenschaften von MnP und LiP durch zwei räumlich getrennte Substratbindungsstellen, Katalysiert die Oxidation von Mn^{2+} und Mn^{2+} -unabhängig LiP-Substraten (z.B. 2,6-Dimethoxy-phenol, VA, nicht-phenolische Ligninbestandteile) (Hofrichter <i>et al.</i> 2010b) <ul style="list-style-type: none"> • Bsp.: <i>Bjerkandera adusta</i>, <i>Coprinopsis cinerea</i> • Modellsubstrate: VA, Mn^{2+}, DMP, ABTS, Lignin 	43-44 kDa
Laccase (1.10.3.2)	Oxidation von Phenolen und Polyphenolen, Abbau von Lignin, Glycosidierungsgrad 10-30% (Arora <i>et al.</i> (2010); Lundell <i>et al.</i> (2010)) <ul style="list-style-type: none"> • Bsp.: <i>Cerrena unicolor</i>, <i>Trametes versicolor</i> • Modellsubstrate: ABTS, Lignin 	60-80 kDa

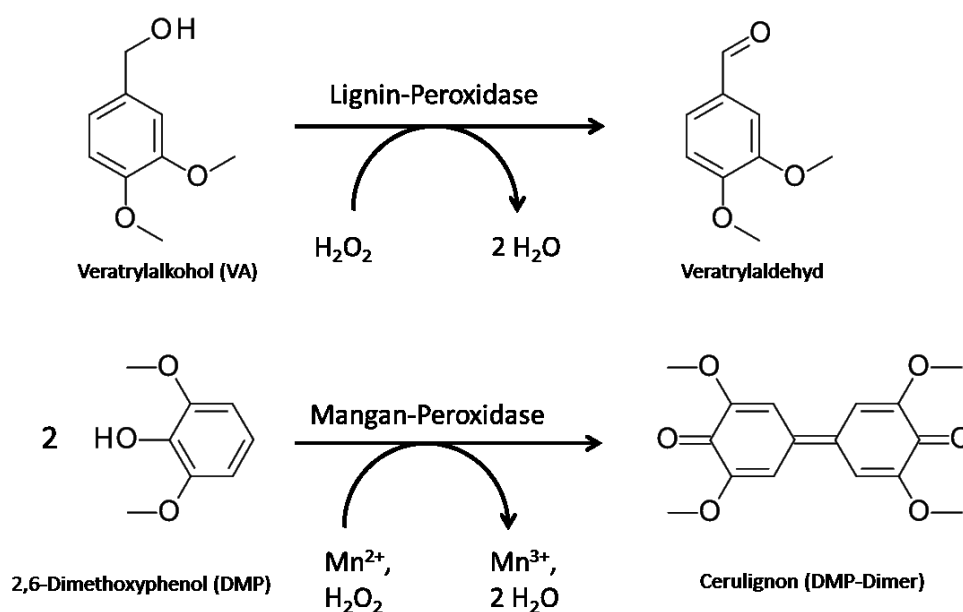


Abbildung 1: Reaktionsmechanismen von Mangan-Peroxidase bzw. Lignin-Peroxidase, dargestellt an zwei Modell-Substraten (verändert nach (Franssen *et al.* 2013), siehe auch Tab. 1)

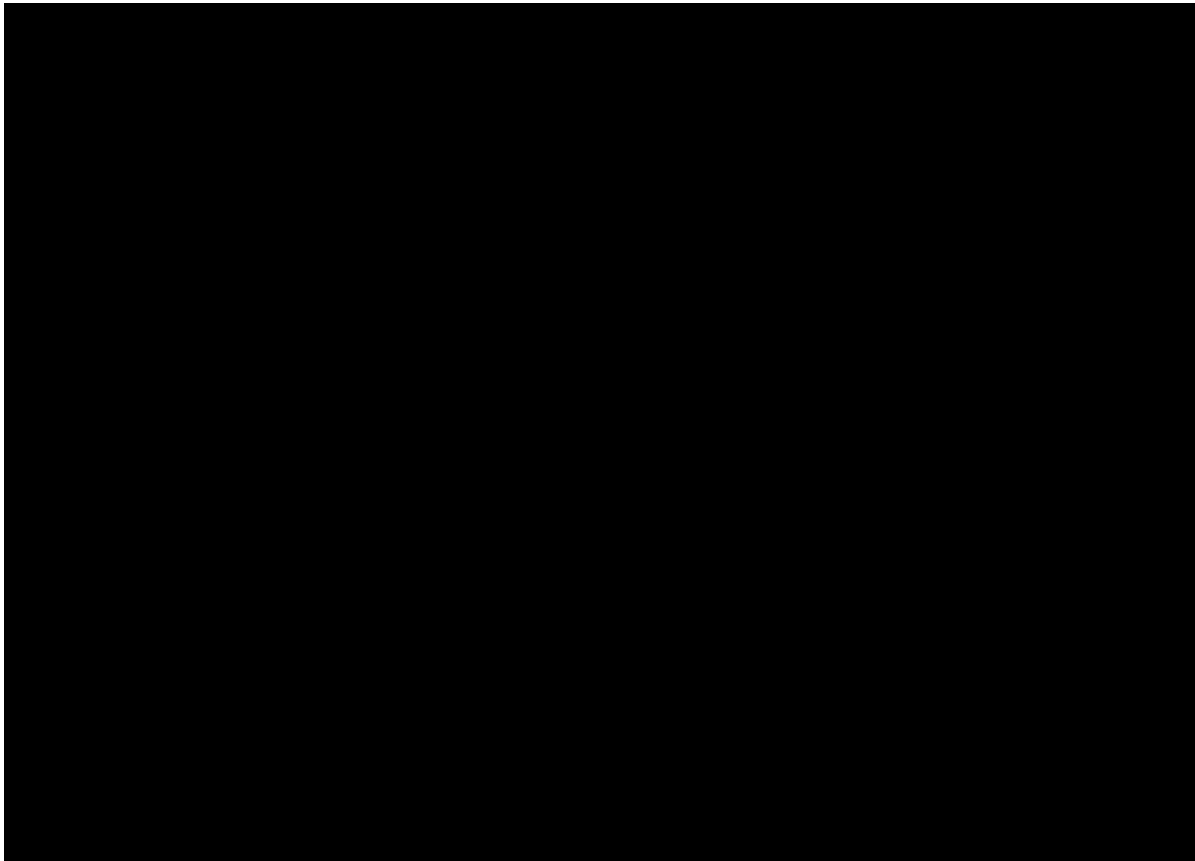


Abbildung 2: Enzymatischer Lignin-Abbau durch extrazelluläre pilzliche Oxidoreduktasen (Peroxidasen, Laccasen). Der Abbau erfolgt hierbei über die Bildung eines Radikal-Kations durch Ein-Elektronen-Oxidationen in unterschiedlicher Weise: (1) MnP (Cosubstrat H_2O_2 ; Mn^{2+} ; Mn^{3+} stabilisiert in Chelatkomplexen); (2) LiP (Cosubstrat H_2O_2); (3) Laccase (O_2 Elektronenakzeptor). (Schema verändert nach Fuchs [Hrsg], 2006 und Hatakka, 2004).

Anwendungsgebiete:

Eine Beispielsammlung möglicher Degradations- bzw. Biotransformationsprozesse durch die Enzymaktivitäten: Mangan-Peroxidase, Versatile Peroxidase, Lignin-Peroxidase und Laccase

Das vorliegende Enzym-Kit kann umfassende Einblicke in mögliche großtechnische Anwendungsgebiete dieser Naturstoffe ermöglichen. Es richtet sich nicht nur an die industriennahe Forschung sondern hilft bei der Vorauswahl von geeigneten Methoden zur Biopolymerentwicklung (z.B. Auf- und Abbauprozessen von Lignin-haltigen Teilstrukturen) aber auch bei der Spezialentsorgung von hochbelasteten Abwässern (Kliniken, Landwirtschaftseinrichtungen oder Entsorgungsunternehmen) mit kleinen Volumenströmen, dies schließt den in der Literatur sehr umfassend beschriebenen Abbau/Umbau von Xenobiotika (Wirkstoffentwicklung) mit ein. Aktuelle Forschungsergebnisse konnten bereits den Abbau hormonähnlicher und antibiotischer Wirkstoffe durch den Einsatz von Laccase bzw. Peroxidasen nachweisen (Wen *et al.* 2009; Lloret *et al.* 2012; Gassara *et al.* 2013). Weiterhin sind auch Anwendungen in der Textil- und Papierindustrie, sowie der Biogasgewinnung (Aufschlussverfahren ligninhaltiger Biogassubstrate wie Stroh oder Festmist) denkbar.

Aromatische Verbindungen (Knop *et al.* 2014)

- Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (Koschorreck *et al.* 2008, Novotny *et al.* 1999)
- Naphthalen (Hadibarata *et al.* 2013)
- TNT - 2,4,6-Trinitrotoluen (Fernando *et al.* 1990)

Mykotoxine

- Aflatoxin (Alberts *et al.*, 2009; Yehia, 2014)

Pflanzenschutzmittel/halogenierte Strukturen (Torres-Duarte *et al.* 2009)

- Pentachlorphenol (Okeke *et al.* 1997)
- Fluorin (Hadibarata *et al.* 2014)
- Endosulfan Kullmann & Matsumura 1996)
- 2,4-Dichlorphenol (Tsujiyama *et al.* 2013)
- Diuron (da Silva *et al.* 2013)
- Fenthion (Zacchi *et al.* 1999)

Antibiotika

- Tetracycline/Oxytetracyclin (Wen *et al.* 2009, 2010)

Biooxidation/Remidation (Pointing 2001, Salvachua *et al.* 2014, Ruiz-Duen *et al.* 2009)

- Abwasserbehandlungen (Libra 2004)
- Textilbehandlung/Entfärbung (Vasquez *et al.* 2014, Minussi *et al.* 2001)

Lignin und -haltige Verbindungen (Polymere Strukturen)

- Auf- und Abbau von Lignin (Hataka, 2004; Leonowicz *et al.* 2001, 1999, Wong 2009, Knezevic *et al.* 2013)
- Nachwachsende Rohstoffe (Kühne & Dittler 1999)

Inhalt des Enzym-Kits

Das JenBiOxyzyme® XS-EXPLORER-TESTKIT beinhaltet die folgenden Abfüllungen:

EN-201	Mangan-Peroxidase, Lyophilisat (2 Tubes á 20 Units)
EN-202	Lignin-Peroxidase, Lyophilisat (2 Tubes á 10 Units)
EN-203	Versatile Peroxidase, Lyophilisat (2 Tubes á 20 Units)
EN-204	Laccase, Lyophilisat (2 Tubes á 20 Units)
H ₂ O ₂	30%iges Konzentrat (2 Tubes)
MnCl ₂	gebrauchsfertige Lösung (2 Tubes)
Puffer 1	60 ml Na-Malonat (pH 4,5), gebrauchsfertig
Puffer 2	60 ml Na-Tartrat (pH 3,3), gebrauchsfertig
Puffer 3	60 ml McIlvain (pH 4,5), gebrauchsfertig

1. Je zwei Tubes der Enzymaktivitäten mit 10 bzw. 20 Units (XS-Packet) als Lyophilisat und ist ausreichend pro Tube für mind. 10 Reaktionen a 2 Units
2. Je zwei Tubes der entsprechenden Puffer (gebrauchsfertig, siehe oben)
3. Entsprechende Cosubstrate MnCl₂ (EN-201, EN-203) und H₂O₂ (EN-202).

Allgemeiner Ansatz für die Umsetzung in einem Volumen von 2000 µl, es sind vor dem Beginn Stammlösungen herzustellen:

Substrat: je nach Löslichkeit 100-200 µM

Enzym: ca. 1-2 Units pro Ansatz verwenden, d.h. Inhalt des Tubes in 1 ml deionisiertes Wasser lösen und 100 µl (entspricht 2 Units bei den Enzymen EN-201, 203, 204 und 1 Unit pro Ansatz bei EN-202) pro Reaktionsansatz verwenden.

Achtung: Enzymlösung ist im Kühlschrank maximal 2-5 d haltbar, bei späterer Verwendung kann die Aktivität drastisch abnehmen. Wenn die Aktivität länger gewährleistet bleiben muss, dann sollten Aliquots der Enzymlösung bei -20°C gelagert werden (ca. 6 Monate).

Tipp: steril-filtrierte Enzymlösung ist länger haltbar

Cosubstrate: Bei einigen Enzymen sind entsprechende Cosubstrate nötig. Hierfür sind ebenfalls entsprechende Stammlösungen herzustellen:

- a) H₂O₂ ca. 20 mM, d.h. 200 µl ad 10 ml deionisiertes Wasser und pro Reaktionsansatz von 2000 µl ca. 20 µl verwenden (EN-202)
- b) MnCl₂ 20 mM, gebrauchsfertig und pro Ansatz mit EN-201 bzw. EN-203 100 µl verwenden.

Puffer: Puffer 1: Mangan-Peroxidase, Versatile Peroxidase

Puffer 2: Lignin-Peroxidase

Puffer 3: Laccase

Allgemeines Vorgehen:

Gesamtansatz berechnen: Bsp. 200 µl Substratlösung, 100 µl Enzymlösung und 100 µl Cosubstrat-Lösung entsprechen 400 µl, dazu werden dann 1600 µl des angegebenen Puffers pipetiert und bei Raumtemperatur 0,5-2 h inkubiert (alle 5-10 min Invertieren). Die Gesamtprobe steht zur weiteren Analytik (z.B. HPLC oder Gaschromatografie) bereit.

Datenblätter

Product No.: EN- 201

Manganese Peroxidase from *Nematoloma frowardii*

Mn(II): hydrogen-peroxide oxidoreductase (EC 1.11.1.13, CAS 114995-15-2)

Lot No.: N-09-JB13

Source: *Nematoloma frowardii*

Reaction: $2 \text{Mn(II)} + 2 \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2 \text{Mn(III)} + 2 \text{H}_2\text{O}$

Activity: 12.6 U/mg

26.3 U/mg protein

Unit definition: One unit will oxidize 1.0 μmole of Mn(II) per minute at pH 4.5 at 25°C.

Assay method: The reaction velocity of the enzyme-catalyzed reaction is determined by the increase in absorbance at 270 nm.

Form: Lyophilisate, containing 477 μg protein/mg (BCA-Assay, Pierce)

Appearance: Brownish powder

Impurities: Laccase: 0.16 U/mg

Lignin peroxidase: 0.09 U/mg

Stability: Stable up to 12 months, when stored at -18°C

pH-Optimum: Mn(II) oxidation (50 mM malonate buffer): pH 4.5

Notes: This hemoprotein is involved in the oxidative degradation of lignin in white-rot basidiomycetes.

Product No.: EN- 202

Lignin-Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*

Diarylpropane:oxygen, hydrogen-peroxide oxidoreductase (EC 1.11.1.14 , CAS 93792-13-3)

Lot No.: P-16-JB03

Source: *Phanerochaete chrysosporium*

Reaction: $3,4\text{-dimethoxybenzyl alcohol} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 3,4\text{-dimethoxybenzaldehyde} + 2 \text{H}_2\text{O}$

Activity: 12.6 U/mg

26.3 U/mg protein

Unit definition: One unit will oxidize 1.0 μmole of 3,4-dimethoxybenzyl alcohol (veratryl alcohol) per minute at pH 3.3 at 25°C

Assay method: The reaction velocity of the enzyme-catalyzed reaction is determined by the increase in absorbance at 310 nm.

Form: Freeze-dried powder containing 298 μg protein/mg (BCA-Assay, Pierce)

Appearance: Brownish powder

Impurities: Laccase: 0.16 U/mg

Manganese Peroxidase: 0.09 U/mg

Stability: Stable up to 12 months, when stored at -18°C

pH-Optimum: 3,4-dimethoxybenzyl alcohol oxidation (100 mM sodium tartrate buffer): pH 3.3

Notes: A hemoprotein, involved in the oxidative breakdown of lignin by white-rot basidiomycete fungi. The enzyme from *P. chrysosporium* oxidizes typical peroxidase dye substrates at the heme iron, a reaction involving the formation of compound II (FeIV=O); it also oxidizes 3,4-dimethoxybenzyl alcohol (veratryl alcohol) to the radical cation. The bound veratryl alcohol radical is proposed to bring about the oxidative cleavage of C-C and ether (C-O-C) bonds in lignin model compounds of the diarylpropane and arylpropane-aryl ether type.

Product No.: EN- 203

Versatile Peroxidase from *Bjerkandera adusta*

Mn(II): hydrogen-peroxide oxidoreductase (EC 1.11.1.16, CAS 42613-30-9, 114995-15-2)

Lot No.: U-09-JB53

Source: *Bjerkandera adusta*

Reaction: $2 \text{ Mn(II)} + 2 \text{ H}^+ + \text{ H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2 \text{ Mn(III)} + 2 \text{ H}_2\text{O}$
 $3,4\text{-dimethoxybenzyl alcohol} + \text{ H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 3,4\text{-dimethoxybenzyl aldehyde} + 2 \text{ H}_2\text{O}$

Activity: 3.6 U/mg Lyo. Mn(II)-oxidizing activity; 15.6 U/mg protein
 0.2 U/mg Lyo. 3,4-dimethoxybenzyl alcohol-oxidizing activity; 0.8 U/mg protein

Unit definition: The amount of one unit will oxidize 1.0 μmole of Mn(II) per minute at pH 4.5 at 25°C, or 0.05 μM of 3,4-dimethoxybenzyl alcohol per minute at pH 3.0 (25°C).

Assay method: The reaction velocity of the enzyme-catalyzed reaction is determined by the increase in absorbance at 270 nm resulting from the formation of Mn(III)-malonate, or in absorbance at 310 nm resulting from the formation of 3,4-dimethoxybenzyl aldehyde.

Form: Freeze-dried powder, containing 232 μg protein/mg (BCA-Assay, Pierce)

Appearance: Brownish powder

Impurities: Lignin peroxidase: 0.19 U/mg

Stability: Stable up to 12 months, when stored at -18°C

pH-Optimum: Mn(II) oxidation (50 mM malonate buffer): pH 4.5; 3,4-dimethoxybenzyl alcohol (veratryl alcohol) (100 mM tartrate buffer): pH 3.0

Notes: Versatile peroxidase (syn. manganese-lignin peroxidase) is a new ligninolytic enzyme, combining catalytic properties of manganese peroxidase (oxidation of Mn(II)), lignin peroxidase (Mn-independent oxidation of non-phenolic aromatic compounds) and plant peroxidase (oxidation of hydroquinones and substituted phenols).

Product No.: EN- 204

Laccase from *Cerrena unicolor*

Benzenediol:oxygen oxidoreductase (EC 1.10.3.2, CAS 80498-15-3)

Lot No.: C-16-JB04

Source: *Cerrena unicolor*

Reaction: $4 \text{ benzenediol} + \text{ O}_2 \longrightarrow 4 \text{ benzosemiquinone} + 2 \text{ H}_2\text{O}$

Activity: 123 U/mg
 123 U/mg protein

Unit definition: One unit will oxidize 1.0 μmole of ABTS per minute at pH 4.5 and 25°C.

Assay method: The velocity of the enzyme-catalyzed reaction is determined by the increase in absorbance at 420 nm.

Form: Freeze-dried powder, containing 1234 μg protein/mg (BCA-Assay, Pierce)

Appearance: Brownish powder

Impurities: Mn-Peroxidase: 123 U/mg

Stability: Stable up to 12 months, when stored at -18°C

pH-Optimum: ABTS-oxidation (50 mM citrate/phosphate buffer): pH 4.5

Notes: A group of multi-copper proteins of low specificity acting on both o- and p-quinols, and often acting also on aminophenols and phenylenediamine. The semiquinone may react further either enzymically or non-enzymically.

Literatur

Alberts JF, Gelderblom WCA, Botha A, van Zyl WH (2009): Degradation of aflatoxin B1 by fungal laccase enzymes. *International Journal of Food Microbiology* 135: 47-52.

Arora DS, Sharma RK (2010): Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications. *Applied biochemistry and biotechnology* 160 (6): 1760-1788

Conesa A, Punt PJ, van den Hondel C (2002): Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *Journal of biotechnology* 93 (2): 143-158.

Franssen MCR, Steunenbergh P, Scott EL, Zuilhof H, Sanders JPM (2013): Immobilised enzymes in biorenewables production. *Chemical Society Reviews* 42 (15): 6491-6533.

Fuchs [Hrsg.] (2006): *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme Verlag.

Gassara F, Brar SK, Verma M, Tyagi RD (2013): Bisphenol A degradation in water by ligninolytic enzymes. *Chemosphere* 92 (10): 1356-1360.

Fernando T, Bumpus JA, Austi SD (1990): Biodegradation of TNT (2,4,6-Trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 1666-1671.

Hatakka (2004) Biodegradation of Lignin. (in Steibüchel [Ed.] *Biopolymers*. Wiley-VHC).

Hadibarata T, The ZC, Rubiyatno, Zubir MMFA, Khudhair AB, Yusoff ARM, Salim MR, Hidayat T (2013): Identification of naphthalene metabolism by white rot fungus *Pleurotus eryngii*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36: 1455-1461.

Hadibarata T, Kristani RA (2014): Potential of a white-rot fungus *Pleurotus eryngii* F032 for degradation and transformation of fluorine. *Fungal Biology* 118: 222-227.

Hofrichter M, Wesenberg D, Rogalski J (2001): Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microbiol.* 41 (3-4): 185-227.

Hofrichter M (2002): Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and microbial technology* 30 (4): 454-466.

Hofrichter M, Ullrich R (2010a): *New Trends in Fungal Biooxidation*. In *Industrial Applications*, Hofrichter M, Ed. Springer Berlin Heidelberg: Vol. 10, pp 425-449.

Hofrichter M, Ullrich R, Pecyna MJ, Liers C, Lundell T (2010b): New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Applied microbiology and biotechnology* 87 (3): 871-97.

Knezevic A, Milovanovic I, Stajic M, Loncar N, Brceski I, Vukojevic J, Cilerdzic J (2013): Lignin degradation by selected fungal species. *Bioresource Technology* 138: 117-123.

Knop D, Ben-Ari J, Salame TM, Levinson D, Yarden O, Hadar Y (2014): Mn²⁺-deficiency reveals a key role for the *Pleurotus ostreatus* versatile peroxidase (VP4) in oxidation of aromatic compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 6795-6804.

Koschorreck K, Richter SM, Swierczek A, Beifuss U, Schmid RD, Urlacher VB (2008): Comparative characterization of four laccases from *Trametes versicolor* concerning phenolic C-C coupling and oxidation of PAHs. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 474: 213-219.

Kullmann SW, Matsumura F (1996): Metabolic Pathways Utilized by *Phanerochaete chrysosporium* for Degradation of the Cyclodiene Pesticide Endosulfan. *Biology* 593-600.

Kühne G, Dittler B (1999): Enzymatische Modifizierung nachwachsender lignocelluloser Rohstoffe für die Herstellung bindemittelfreier Faserwerkstoffe. *Holz als Roh- und Werkstoff* 57: 264.

Leonowicz A, Matuszewska A, Luterek J, Ziegenhagen D, Wojtas M, Cho NS, Hofrichter M, Rogalski J (1999): Biodegradation of Lignin by White Rot Fungi. *Fungal Genetics and Biology* 27: 175-185.

Leonowicz A, Cho NS, Luterek J, Wilkolazka A, Wojtas-Wasilewska M, Matuszewska A, Hofrichter M, Wesenberg D, Rogalski J (2001): Fungal laccase: properties and activity on lignin. *Journal of basic microbiology* 41 (3-4): 185-227.

Libra J (2004): Methoden- und Prozessentwicklung in der Umweltverfahrenstechnik. Kapitel Behandlung von farbstoffhaltigen Abwässern der Textilveredlung. Habilitationsschrift. TU Berlin.

Lloret L, Eibes G, Feijoo G, Moreira MT, Lema JM (2012): Degradation of estrogens by laccase from *Myceliophthora thermophila* in fed-batch and enzymatic membrane reactors. *Journal of hazardous materials* 213-214: 175-183.

Lundell TK, Makela MR, Hilden K (2010): Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes - ecological, functional and phylogenetic review. *Journal of basic microbiology* 50 (1): 5-20.

Martinez AT, Speranza M, Ruiz-Duenas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillen F, Martinez MJ, Gutierrez A, del Rio JC (2005): Biodegradation of lignocellulosics: microbial chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* 8 (3): 195-204.

Mayer AM, Staples RC (2002): Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60 (6): 551-565.

Minussi RC, de Moraes SG, Pastore GM, Duran N (2001): Biodecolorization screening of synthetic dyes by four white-rot fungi in a solid medium: possible role of siderophores. *Letters in Applied Microbiology* 33: 21-25.

Nakayama T, Amachi T (1999): Fungal peroxidase: its structure, function, and application. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 6 (3): 185-198.

Novotný C, Erbanová P, Sasek V, Kubátová A, Cajthaml T, Lang E, Krahl J, Zadrazil F. (1999): Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white rot fungi. *Biodegradation* 10: 159-168.

Okeke C, Paterson A, Smith JE, Watson-Craik IA (1997): Comparative biotransformation of pentachlorophenol in soils by solid substrate cultures of *Lentinula edodes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 563-569.

Pointing B (2001): Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 20-33.

Ruiz-Duen FJ, Morales M, Garcia E, Miki Y, Martinez MJ, Martinez AT (2009): Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. *Journal of Experimental Botany* 60: 441-452.

Salvachua D, Prieto D, Mattinen ML, Tamminen T, Liitia T, Lille M, Willfor S, Martinez AT, Martinez MJ, Faulds CB (2013): Versatile peroxidase as a valuable tool for generating new biomolecules by homogeneous and heterogeneous cross-linking. *Enzyme and Microbial Technology* 52: 303-311.

Schmid RD, Urlacher V (2007): *Modern Biooxidation*. Wiley.

da Silva Coelho-Moreira J, Bracht A, da Silva de Souza AC, Oliveira RF, de Sá-Nakanishi AB, Marques de Souza CG, Peralta RM (2013): Degradation of Diuron by *Phanerochaete chrysosporium*: Role of Ligninolytic Enzymes and Cytochrome P450. *BioMed Research International* ID 251354. 9 p.

Torres-Duarte C, Roman R, Tinoco R, Vazquez-Duhalt R (2009): Halogenated pesticide transformation by a laccase–mediator system. *Chemosphere* 77: 687-692.

Tsujiyama S, Muraoka T, Takada N (2013): Biodegradation of 2,4-dichlorophenol by shiitake mushroom (*Lentinula edodes*). *Biotechnol. Lett.* 35: 1079-1083.

Vasquez C, Anderson D, Oyarzun M, Carvajal A, Palma C (2014): Method for the stabilization and immobilization of enzymatic extracts and its application to the decolorization of textile dyes. *Biotechnol. Lett.* 36 (10): 1999-2010.

Wen X, Jia Y, Li J (2010): Enzymatic degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude manganese peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Hazardous Materials* 177: 924-928.

Wen X, Jia Y, Li j (2009): Degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude lignin peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium* – A white rot fungus. *Chemosphere* 75: 1003-1007.

Wong DWS (2009): Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 157: 174-209.

Yehia RS (2014): Aflatoxin detoxification by manganese peroxidase purified from *Pleurotus ostreatus*. *Brazilian Journal of Microbiology* 45 (1): 127-133.

Zacchi L, Cox JR, Cheke RA, van der Walt E, Harvey PJ (1999): Biodegradation of Fenthion by *Phanerochaete Chrysosporium*. Workshop on Research Priorities for Migrant Pests of Agriculture in Southern Africa, Plant Protection Research Institute, Pretoria, South Africa, 24–26 March 1999.

Weitere Enzymprodukte:

Einzelne Pilzenzyme

Die JenaBios GmbH ist in der Lage gemeinsam mit seinem Kooperationspartnern eine umfassende Zahl von Enzymen aus den Klassen der Oxidoreduktasen bzw. Hydrolasen über Wildstammfermentation herstellen zu können (s.u.). Diese extrazellulären multifunktionalen Biokatalysatoren sind in der Lage biochemische Veränderungen an komplexen Strukturen wie Lignin oder Xenobiotika (z. B. Antibiotika, Pestizide oder Arzneistoffen) vorzunehmen. Sie katalysieren u.a. die Oxidation von nicht-phenolischen Ligninbestandteilen und phenolischen Verbindungen. Für diese Biotransformation benötigen diese Pilzenzyme zwar auch entsprechende Cosubstrate, wobei es sich um preisgünstige Verbindungen wie Hydroperoxide (z.B. H₂O₂) oder Mangan handelt.

Weitere zentrale Punkte unseres Produktportfolios umfassen die Analytik, Charakterisierung von Enzymaktivitäten über Referenzsubstrate, sowie *Scale-up*-Prozesse neuer Fermentationsverfahren (bis zum 30-l-Maßstab).

Wir liefern unsere Enzyme als Lyophilisat in den Packungsgrößen 200 bzw. 1000 Units, größere Mengen sind auf Anfrage erhältlich.

Verfügbare Enzyme	Kat.Nr.
Mangan-Peroxidase (<i>Nematoloma frowardii</i>)	EN-201
Lignin-Peroxidase (<i>Phanerochaete chrysosporium</i>)	EN-202
Versatile Peroxidase (<i>Bjerkandera adusta</i>)	EN-203
Laccase (<i>Cerrena unicolor</i> , <i>Trametes versicolor</i> *)	EN-204

Weitere Pilzenzyme:

Peroxygenasen (*Agrocybe aegerita*, *Marasmius rotula*)*

Alkoholreduktasen*

Hydrolasen (u.a. Esterase, Glycosidase, Amylase)*

*) Produktion bei Bedarf

Single Fungal Enzymes

The JenaBios GmbH is able to produce in a position together with its partners a large number of enzymes from the classes of oxidoreductases and hydrolases on wild strain fermentation (see below). This extracellular multifunctional biocatalysts are able to carry out diverse biochemical changes in complex structures such as lignin or xenobiotics (e.g., Antibiotics, pesticides or drugs). They catalyze the oxidation of non-phenolic lignin and phenolic compounds. These fungal enzymes needs for the biotransformation reactions some co-substrates, who are economically priced and very simple to use (e.g. hydroperoxides such H₂O₂) or manganese).

Other key points of our product portfolio consisting the analysis, characterization of enzyme activities on reference substrates, as well as scale-up processes of new fermentation processes (up to 30-L scale).

We are produce our fungal enzymes from different organisms as freeze dried powder. The standard packages are 200 and 1,000 units (bulk amounts on request).

Available Enzymes	Cat.No.
Manganese-Peroxidase (<i>Nematoloma frowardii</i>)	EN-201
Lignin-Peroxidase (<i>Phanerochaete chrysosporium</i>)	EN-202
Versatile Peroxidase (<i>Bjerkandera adusta</i>)	EN-203
Laccase (<i>Cerrena unicolor</i> , <i>Trametes versicolor</i> *)	EN-204

Further Enzymes

Peroxygenases (*Agrocybe aegerita*, *Marasmius rotula*)*

Alcohol reductases*

Hydrolases (e.g.. Esterase, Glycosidase, Amylase)*

*) will be produced on demand

Assays

Enzymatic Assay of Manganese- and Versatile Peroxidase

Principle: Manganese peroxidase catalyzes the oxidation of Mn(II) to Mn(III) by H₂O₂. The highly reactive Mn(III) is stabilized via chelation in the presence of dicarboxylic acid [1].

Versatile peroxidase catalyzes the oxidation of Mn(II) to Mn(III) by H₂O₂. The highly reactive Mn(III) is stabilized via chelation in the presence of dicarboxylic acid [1].

Reaction: $2 \text{Mn(II)} + 2 \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2 \text{Mn(III)} + 2 \text{H}_2\text{O}$

Method: Continuous spectrophotometric determination of the increase in absorbance at 270 nm resulting from the formation of Mn(III)-malonate ($\epsilon_{270\text{nm}} = 11,590 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [2].

Conditions: Temperature: 25°C
pH: 4.5
Wavelength: 270 nm
Light path: 1 cm

Unit definition: The amount of enzyme that oxidizes 1.0 µmole of Mn(II) per minute at pH 4.5 and 25°C.

Reagents: Sodium-malonate buffer 50 mM, pH 4.5
H₂O₂ 20 mM
MnCl₂ 20 mM
Enzyme solution ca. 0.5 U/ml

All reagents should be prepared from deionized, distilled water. Dissolve the enzyme at a concentration of 0.3 mg/ml in distilled water. Dilute further in distilled water if necessary.

Procedure: *Pipette into a suitable quartz cuvette:*

buffer	690 µl
MnCl ₂ -solution	100 µl
Enzyme solution	200 µl

Incubate at 25°C and check the temperature, place the reaction mixture into the photometer and monitor the absorbance until constant, start the enzymatic reaction by adding

H ₂ O ₂	10 µl
-------------------------------	-------

Immediately mix and record the increase in absorbance at 270 nm for ca. 1 minute. Calculate the $\Delta A/\text{min}$ from the linear range of the curve (initial range: standardized as 10 sec after start).

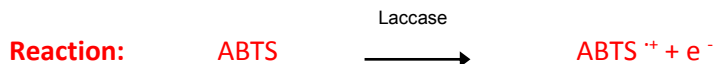
Calculation:

$$\begin{aligned} \text{Volume activity} &= \frac{\Delta A/\text{min} \cdot 1000 \cdot \text{volume}_{\text{reaction mixture}} (\mu\text{l})}{11,590 \cdot \text{volume}_{\text{enzyme solution}} (\mu\text{l})} \\ &= [\text{U/ml enzyme solution}] \end{aligned}$$

References: [1] Hofrichter M *et al.* (1998). *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 399-404.
[2] Wariishi H *et al.* (1992). *J. Biol. Chem.* 267: 23688-23695.

Enzymatic Assay of Laccase

Principle: Fungal laccase oxidizes 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) (ABTS) to the stable green-colored cation radical (ABTS^{•+}).



Method: Continuous spectrophotometric determination of the increase in absorbance at 420 nm [1;2].

Conditions: Temperature: 25°C
 pH: 4.5
 Wavelength: 420 nm
 Light path: 1 cm

Unit definition: The amount of enzyme that oxidizes 1.0 μmole of ABTS per minute at pH 4.5 and 25°C.

Reagents: Phosphate-citrate-buffer 100 mM, pH 4.5
 ABTS 6 mM
 Enzyme solution ca. 0.1 U/ml
 All reagents should be prepared from deionized, distilled water. Prepare an enzyme solution in deionized, distilled water containing approximately 0.1 U/ml.

Procedure: *Pipette into a suitable quartz cuvette:*

buffer	700 μl
Enzyme solution	100 μl

Incubate at 25°C and check the temperature, place the reaction mixture into the photometer and monitor the absorbance until constant, start the enzymatic reaction by adding

ABTS-solution	200 μl
---------------	--------

Immediately mix and record the increase in absorbance at 420 nm for ca. 1 minute. Calculate the ΔA/min from the linear range of the curve (initial range: standardized as 10 sec after start).

Calculation:

$$\begin{aligned} \text{Volume activity} &= \frac{\Delta A/\text{min} \cdot 1000 \cdot \text{volume}_{\text{reaction mixture}} (\mu\text{l})}{36,000 \cdot \text{volume}_{\text{enzyme solution}} (\mu\text{l})} \\ &= [\text{U/ml enzyme solution}] \end{aligned}$$

References: [1] Childs RE & Bardsley WG (1975). *Biochem. J.* 145: 93-103.
 [2] Wolfenden BS & Willson RL (1982). *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 7:* 805-812.

Enzymatic Assay of Lignin-Peroxidase

Principle: Lignin peroxidase catalyzes the oxidation of non-phenolic aromatic rings into aryl cation radicals by H₂O₂. Aryl cation radicals are unstable and undergo various following reactions. A typical example is the oxidation of veratryl alcohol into veratryl aldehyde via the intermediary formation of veratryl cation and benzyl radicals [1].

Reaction: 3,4-dimethoxybenzyl alcohol + H₂O₂ → 3,4-dimethoxybenzaldehyde + 2 H₂O

Method: Continuous spectrophotometric determination of the increase in absorbance at 310 nm resulting from the formation of veratryl aldehyde ($\epsilon_{310\text{nm}} = 9,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [2].

Conditions: Temperature: 25°C
pH: 3.3
Wavelength: 310 nm
Light path: 1 cm

Unit definition: The amount of enzyme that oxidizes 1.0 µmole of 3,4-dimethoxybenzyl alcohol (veratryl alcohol) per minute at pH 3.3 at 25°C.

Reagents: Sodium-tartrate buffer 100 mM, pH 3.3
H₂O₂ 20 mM
Veratryl alcohol 50 mM
Enzyme solution ca. 0.5 U/ml

All reagents should be prepared from deionized, distilled water. Dissolve the enzyme at a concentration of 0.4 mg/ml in distilled water. Dilute further in distilled water if necessary.

Procedure: *Pipette into a suitable quartz cuvette:*

buffer	675 µl
veratryl alcohol	75 µl
Enzyme solution	200 µl

Incubate at 25°C and check the temperature, place the reaction mixture into the photometer and monitor the absorbance until constant, start the enzymatic reaction by adding

H ₂ O ₂	50 µl
-------------------------------	-------

Immediately mix and record the increase in absorbance at 270 nm for ca. 1 minute. Calculate the $\Delta A/\text{min}$ from the linear range of the curve (initial range: standardized as 10 sec after start).

Calculation:

$$\begin{aligned} \text{Volume activity} &= \frac{\Delta A/\text{min} \cdot 1000 \cdot \text{volume}_{\text{reaction mixture}} (\mu\text{l})}{9,300 \cdot \text{volume}_{\text{enzyme solution}} (\mu\text{l})} \\ &= [\text{U/ml enzyme solution}] \end{aligned}$$

References: [1] Schoemaker H et al. (1994). *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 321-332.
[2] Tien M & Kirk TK (1984). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 2280-2284