

Guaiakol Peroksidazın Soğan Köklerinden Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

Aykut ÖZTEKİN^{1*}

ÖZET: Peroksidazlar, hidrojen peroksit varlığında çeşitli organik substratların oksidasyonunu katalizleyen ve yapılarında hem grubu bulunduran enzimlerdir. Özellikle bitki peroksidazları, endüstride, klinik tanıda, biyosensör yapımında ve organik sentez reaksiyonlarında sıklıkla kullanılır. Ticari değerleri nedeniyle bu enzimlerin farklı kaynaklarda tanımlanması ve saflaştırılması büyük öneme sahiptir. Bu çalışmada peroksidaz enzimi ilk kez aminobenzohydrazide tabanlı afinite kromatografi tekniği kullanılarak soğan köklerinden 37.7 verimle 750 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığını belirlemek için SDS-PAGE yapıldı ve 51.2 kDa'da tek bant gözlemlendi. Ayrıca enzimin guaiakol, ABTS ve pirogallol substratları için K_M değerleri sırasıyla 3.44, 0.46 ve 21.27 mM olarak hesaplandı.

Anahtar Kelimeler: Soğan (*Allium cepa*) kökü, peroksidaz, afinite kromatografisi, saflaştırma

Separation of Guaiacol Peroxidase from Onion Roots with Affinity Chromatography

ABSTRACT: Peroxidases are enzymes that catalyze the oxidation of various organic substrates in the presence of hydrogen peroxide and contain heme group in their structure. In particular, plant peroxidases are frequently used in industry, clinical diagnosis, biosensor construction and organic synthesis reactions. Due to their commercial value, the identification and purification of these enzymes in different sources is of great importance. In this study, peroxidase enzyme was purified for the first time by using aminobenzohydrazide-based affinity chromatography technique from onion roots 750-fold with a yield of 37.7. SDS-PAGE was performed to determine the molecular weight of the purified enzyme and a single band was observed at 51.2 kDa. In addition, K_M values of the enzyme for guaiacol, ABTS and pyrogallol substrates were calculated as 3.44, 0.46 and 21.27 mM, respectively.

Keywords: Onion (*Allium cepa*) root, peroxidase, affinity chromatography, purification

¹ Aykut ÖZTEKİN (Orcid ID: 0000-0003-1418-179X), Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Ağrı, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Aykut ÖZTEKİN, e-mail: aoztekin@agri.edu.tr

Geliş tarihi / Received: 20-10-2019

Kabul tarihi / Accepted: 01-02-2020

GİRİŞ

Enzimler stabil ve spesifik biyokatalizörlerdir. Son yıllarda çeşitli endüstriyel işlemlerde çevreye duyarlı biyoteknolojik yaklaşımlar olarak kullanımları yaygınlaşmaktadır. Bu sebeple, çeşitli süreçlerde kullanım potansiyeli olan enzimlerin ve enzim kaynaklarının belirlenmesi ekonomik ve çevresel öneme sahiptir (Pandey ve ark., 2017).

Oksidoredüktazlar sınıfına ait peroksidazlar (E.C. 1.11.1.7) yaygın olarak bitkilerde, hayvanlarda bakterilerde ve funguslarda bulunur (Oztekin, 2019). Bu enzimler çoğunlukla protoporfirin IX içeren hem grubu proteinlerdir ve moleküler ağırlıkları 30 kDa ila 150 kDa arasında değişmektedir (Regalado ve ark., 2004). Peroksidazlar hücre duvarı oluşumunda, oksin metabolizmasında, lignifikasyonda, reaktif oksijen türlerinin giderilmesinde, meyve olgunlaşmasında ve bitki savunma sisteminde önemli rol oynar (Passardi ve ark., 2005).

Peroksidazlar, güçlü oksidasyon-redüksiyon katalizörü olmalarından dolayı endüstriyel üretimde ve uygulamalarda kullanılan başlıca enzim gruplarından birini oluştururlar. H₂O₂ varlığında birçok fenolik veya fenolik olmayan substratı okside edebilirler ve bu özelliklerinden dolayı da biyosensör yapımında (Jia et al., 2002), analitik kitlerde ve teşhis kitlerinde (Heller ve Vreeke, 1997; Agostini ve ark., 2002), fenolik bileşiklerin uzaklaştırılmasında (Tatsumi ve ark., 1996; Bhunia ve ark., 2001), organik polimerizasyon reaksiyonlarında (Liu ve ark., 1999), kağıt endüstrisinde (Pandey ve ark., 2017) ve endüstriyel boyaların zehirsizleştirilmesinde (Chivukula ve ark., 1995) sıklıkla kullanılmaktadır. Günümüze kadar, farklı endüstrilerde kullanım kapasitesine sahip olan peroksidaz enzimlerinin saflaştırılması ve karakterizasyonu için birçok çalışma yapılmıştır. Ağaç kavunundan (*Citrus medica*) (Mall ve ark., 2013), brokoliden (*Brassica oleracea* var. *Italica*) (Thongsook ve Barrett, 2005), kividenden (*Actinidia deliciosa*) (Soda ve ark., 1991), kaba limondan (*Citrus jambhiri*) (Mohamed ve ark., 2008), palmyeden (*Roystonea regia*) (Sakharov, 2001) ve maruldan (*Lactuca sativa* L.) (Hu ve ark., 2012) yapılan peroksidaz saflaştırmaları bu çalışmalara örnek olarak verilebilir.

Afinite kromatografisi özgüllük, tekrarlanabilirlik ve zaman tasarrufu açısından mevcut saflaştırma yöntemlerinin en etkilisidir. Çok aşamalı tekniklerle bile ayrılamayan birçok biyolojik materyal, bu yöntemle tek basamakta kolaylıkla ayrılabilir (Gu ve ark., 2003). Peroksidazların saflaştırılması için yeni afinite yöntemlerinin geliştirilmesi ve var olan afinite yöntemlerinin çeşitli peroksidazlar için optimize edilmesi, hem bu enzimlerin saf olarak eldesini kolaylaştırır, hem de maliyeti dikkate değer bir şekilde düşürür.

Önceki çalışmamızda Sefaroz 4B-L-Tirozin-4-amino 2-metoksi benzohidrazid afinite jeli bitki peroksidaz enzimlerinin saflaştırılması için yeni bir metot olarak sunuldu ve peroksidaz enzimleri turp türlerinden tek kademedede ve yüksek verimde saflaştırılması başarılı bir şekilde gerçekleştirildi (Oztekin ve ark., 2019).

Bu çalışmada ise, Sefaroz 4B-2-aminofenol-4-amino 2-metoksi benzohidrazid afinite jeli ilk kez sentezlendi ve yine ilk kez soğan kökü peroksidaz enzimi yüksek saflık ve verimle tek kademedede saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin çeşitli biyoproseslerde kullanım potansiyelinin belirlenebilmesi için moleküler ağırlığı, guaiakol, ABTS ve pirogallol substratları için K_M afiniteleri ve V_{max} değerleri hesaplandı. Ayrıca çalışmamızda uzantı kolu olarak tirozin yerine 2-aminofenol kullanılarak da etkili bir saflaştırma yapılabileceği gösterildi.

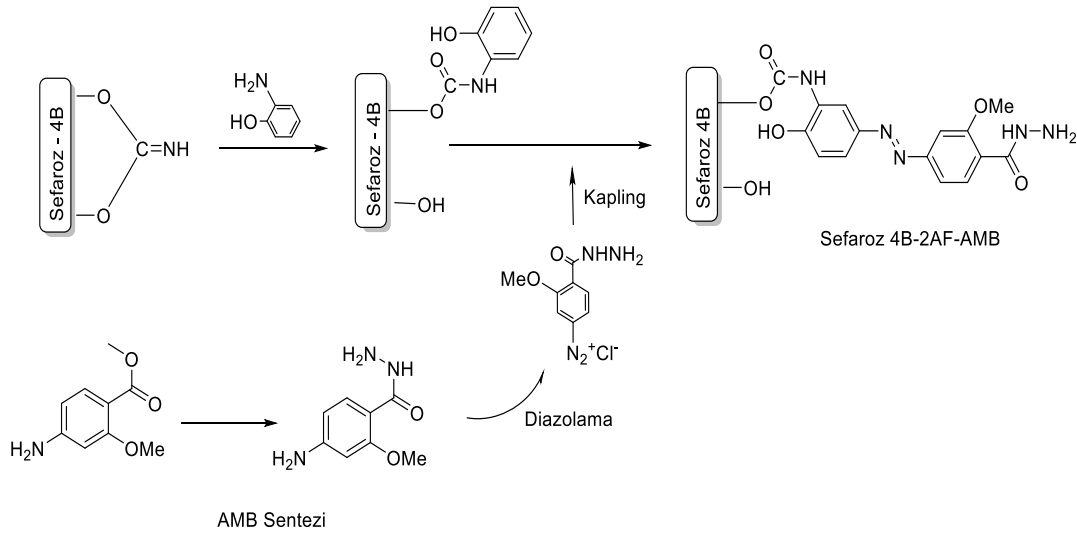
MATERYAL VE YÖNTEM

Kullanılan Kimyasallar

CNBr-Sefaroz 4B, ABTS (2,2'-Azido-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit diamonyum tuzu), guaiakol, 2-aminofenol, pirogallol (1,2,3-trihidroksibenzen), hidrazin monohidrat, Coomassie boyası (R 250) ve H₂O₂ Sigma-Aldrich'ten, 4-amino-2-metoksi metilbenzoat ise Alfa-Aesar'dan temin edildi. Standart proteinler Thermo Scientific'ten satın alındı. Açıkça belirtilmediği takdirde, afinite jeli sentezinde, saflaştırma adımlarında ve kinetik parametrelerin ölçümünde kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik standartlarda kullanıldı.

Afinite Jelinin Sentezi

4-amino 2-metoksi metilbenzoat ticari olarak temin edildi ve önceki çalışmamızda detaylı bir şekilde açıklandığı gibi bu molekül kullanılarak 4-amino 2-metoksi benzohidrazid (AMB) sentezlendi (Oztekin ve ark., 2019). Daha sonra 1.0 g CNBr-Sefaroz 4B ve 10 mg 2-aminofenol (2AF) reaksiyona sokuldu ve Sefaroz 4B-2AF yapısı oluşturuldu. 10 mg AMB uygun şartlarda diazolandı ve oluşturulan tuz Sefaroz 4B-2AF'ye kenetlendirildi. Sentezlenen Sefaroz 4B-2AF-AMB afinite jelinde; Sefaroz-4B destek materyalini, 2AF uzantı kolunu, AMB ise ligantı oluşturdu. Afinite jelinin sentez aşamaları Şekil 1'de gösterildi.



Şekil 1. Sefaroz 4B-2AF-AMB afinite jeli sentezi

Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

Peroksidaz aktivitesi, H₂O₂ varlığında guaiakol kromojenik substratının oksidasyonu ile oluşan renkli türev bileşiklerin (max: 470 nm) sebep oldukları absorbans artışının izlenmesiyle ölçüldü. Nihai reaksiyon ortamı, 15 mM guaiakol, 7.5 mM H₂O₂, 30 mM fosfat tamponu (pH 6.0) ve 10 µL enzimden oluşturuldu. Aktivite (EU), dakikada bir µmol türev ürünün oluşumunu katalizleyen enzim miktarı olarak belirlendi. Saflaştırılan peroksidaz enziminin ABTS ve pirogallol substaratlarına olan ilgisinin belirlenmesinde ise sırasıyla Jakop ve ark. (2000) ve Bach ve ark. (2013) tarafından önerilen metotlar kullanıldı.

Soğan kökü peroksidaz enziminin saflaştırılması

Soğan kökleri gövdeden ayrılarak küçük parçalar halinde kesildi. Bu parçalardan 5 gram tartıldı ve sıvı azot kullanılarak un kıvamına gelene kadar havanda dövüldü. Daha sonra 20 ml fosfat tamponu (0.3 M, pH 7.0) içine alındı. Ultraturax kullanılarak tamamen homojenize edildi. Homojenat 20000

rpm'de 4 °C'de 30 dakika santrifüj edildi, pellet atıldı. Süpernatant, 10 mM fosfat tamponu (pH 6.8) ile dengelenmiş afinite kolonuna (1 x 10 cm) yüklendi. Bağlanmayan enzim ve diğer bileşenler, 25 mM fosfat tamponu ile yıkandı ve peroksidaz enzimi, 1 M NaCl içeren fosfat tamponu ile elüe edildi. Protein miktarlarının belirlenmesinde Bradford yöntemi kullanıldı (Bradford, 1976).

SDS-PAGE

Saflaştırılan soğan peroksidaz enziminin moleküler ağırlığını ve saflığını belirlemek için denatüre edici koşullar altında SDS-PAGE yapıldı. İlk olarak, numuneler yığma jeline (% 3) yüklendi ve yürüme çizgisi ayırma jeli tabanından (% 10) 0.5 cm'ye geç edene kadar elektrik akımı uygulandı (Laemmli, 1970). Daha sonra, protein bantları Coomassie boyası (R-250) ile boyandı ve fazla boya uygun çözücü ile uzaklaştırılarak bantlar görünür hale getirildi (Merril, 1990).

K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi

Saflaştırılan peroksidaz enziminin guaiakol, ABTS ve pirogallol substratlarına karşı ilgisini belirleyebilmek için 5 farklı substrat konsantrasyonunda, H_2O_2 konsantrasyonu doymuş-sabit tutularak, peroksidaz aktivitesi ölçüldü ve aktivite-konsantrasyon ($1 [V]^{-1} - 1 [S]^{-1}$) grafikleri çizildi. Her bir substrat için K_M ve V_{max} değerleri bu grafiklerden faydalanılarak hesaplandı.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Afinite kromatografisi, enzimlerin kompleks karışımlardan kolayca ayrılması için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir (Wilchek ve Chaiken, 2000). Bu teknik, çeşitli enzimlerin saflaştırılmasında etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Benzohidrazid türevlerinin afinite kromatografisinde ligant olarak kullanılarak bitki peroksidazlarının etkili bir şekilde saflaştırılabileceği önceki çalışmamızda gösterilmiştir (Oztekin ve ark., 2019).

Afinite kromatografisinde kullanılan uzantı kolları, enzim-matriks etkileşimini etkileyeceği için saflaştırma verimi ile doğrudan ilişkilidir. Verimlilik, enzim ve matriks arasındaki mesafeyi değiştirerek artırılabilir. Bu çalışmada, afinite jeli hazırlanmasında önceki çalışmamızda kullandığımız tirozin yerine 2AF uzatma kolu olarak tercih edilmiş ve Sefaroz 4B-2AF-AMB ilk defa sentezlenmiştir. 2AF'de bulunan -OH grubu orto-para yönlendirici olduğundan, AMB'nin diazolanması sonucu oluşan tuz kolayca 2AF'ye bağlanmıştır. Afinite jelinin sentez aşamaları Şekil 1'de gösterilmiştir.

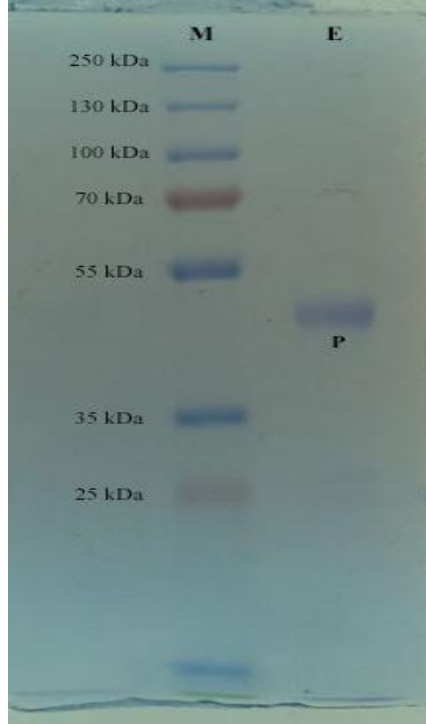
Peroksidazlar, oksitleyici olarak hidrojen peroksit veya organik peroksitleri kullanan oksidoredüktaz enzim sınıfının bir üyesidir. Organik moleküllerin sterospesifik biyotransformasyonunda (Adam ve ark., 1999; Zilbeyaz ve ark., 2012) fenolik reçinelerin sentezinde, gıda proseslerinde, tıbbi tanı kitlerinin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Kwak ve ark., 1996). Ayrıca peroksidaz enzimlerinin kimya ve ilaç sanayisinde kullanımı son yıllarda dikkat çekici boyutlara ulaşmıştır. Uygulama alanlarının yaygın olması ve ticari öneme sahip enzimler olmalarından dolayı bitki peroksidaz enzimlerinin saf olarak eldesinin amaçlandığı saflaştırma çalışmaları gün geçtikçe artmaktadır. Önceki çalışmalarda peroksidaz enzimi yaban turpundan %71 verimle 291 kat (Lavery ve ark., 2010), maruldan 2.67 verimle 18 kat (Hu ve ark., 2012), papayadan %44 verimle 30 kat (Pandey ve ark., 2012) ve yapılan en son çalışmada ise afinite kromatografisi tekniği kullanılarak şalgamdan %55 verimle 665 kat saflaştırılmıştır (Oztekin ve ark., 2019). Bu çalışmada ise Sefaroz 4B-2AF-AMB afinite jeli kullanılarak soğan köklerinden peroksidaz enzimi ilk kez %38 verimle 750 kat saflaştırılmıştır. Ayrıntılı saflaştırma verileri Çizelge 1'de gösterilmiştir.

Saflaştırılan enzimin saflığı ve molekül ağırlığı SDS-PAGE yapılarak kontrol edilmiştir. Şekil 2'de görülebileceği gibi 51.2 kDa'da tek bant gözlenmiştir.

Çizelge 1. Soğan kökü peroksidaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması

	Toplam hacim	Aktivite (EU mL ⁻¹)	Protein (mg mL ⁻¹)	Toplam aktivite (EU)	Toplam Protein (mg)	Spesifik aktivite (EU mg ⁻¹)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	6	10.2	1.39	61.2	8.34	7.3	100	1
A.F.J*	3	7.9	0.0013	21.9	0.004	5475	37.7	750

*Sefaroz 4B-2AF-AMB afinite jeli

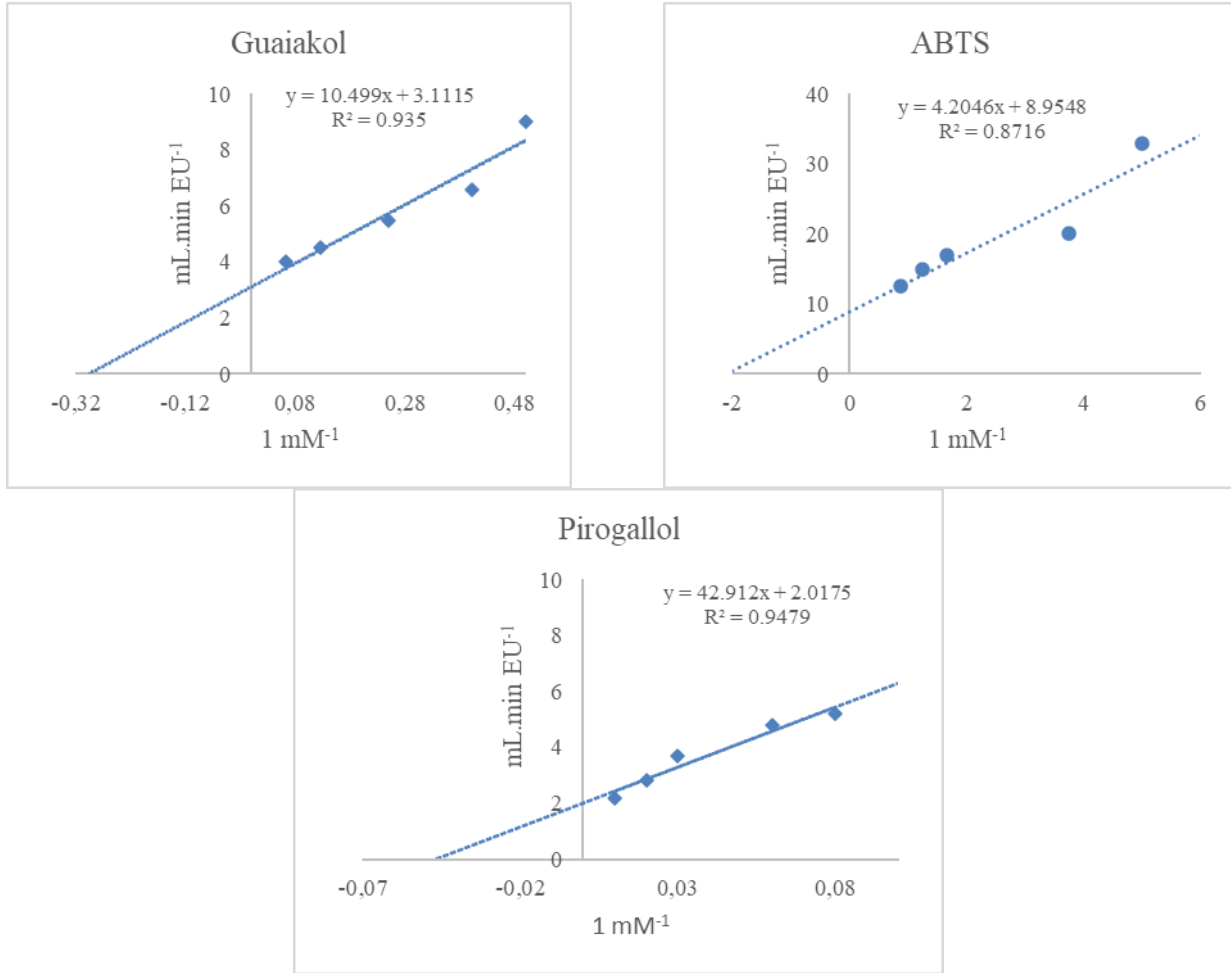


Şekil 2. Saflaştırılan soğan peroksidaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü (*M: Protein işaretleyicileri, *P: Saflaştırılan peroksidaz enzimi)

Literatürde soğan peroksidazının kullanıldığı çeşitli çalışmalar vardır. Bu çalışmalarda enzim ya kısmi saflaştırılmış (Takahama, 2004) ya da ham ekstrakt olarak kullanılmıştır (El Agha ve ark., 2008; Moussouni ve ark., 2010; Osman ve Makris, 2011). Bu enzimi saf olarak elde etmek, katalize edilmiş reaksiyonlarda özgülüğü arttıracak ve girişimi önleyecektir. Ayrıca enziminin tek kademede saflaştırılması ve atık bir ürün olan soğan köklerinin peroksidaz kaynağı olarak kullanılması çalışmamızın önemini arttırmaktadır.

Peroksidazlar substrat özgülüğü düşük olan enzimlerdir ve çeşitli organik maddelerin oksidasyonunu katalizleyebilirler. Bu nedenle saflaştırılan soğan kökü peroksidaz enziminin bilinen bazı peroksidaz substratlarına olan ilgisini belirleyebilmek için çalışmalar yapıldı. Guaiakol substratı için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 3.44 mM, 0.32 EU ml min⁻¹, ABTS için 0.46 mM, 0.11 EU ml min⁻¹ ve pirogallol için ise 21.27 mM, 0.49 EU ml min⁻¹ olarak hesaplandı. Hesaplamada kullanılan Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 3'te gösterildi.

Önceki çalışmalarda marul peroksidazının K_M afinitesi guaiakol için 4.74 mM, pirogallol için ise 1.96 mM (Hu ve ark., 2012), papaya peroksidazının guaiakol için K_M afinitesi 0.8 mM (Pandey ve ark., 2012), limon peroksidazının K_M afinitesi ise guaiakol için 8 mM, o-dianisidin için 1.8 mM (Mall ve ark., 2013) olarak belirlenmiştir. Literatürdeki çalışmalarda da görebileceğimiz gibi farklı kaynaklardan elde edilen peroksidazların farklı substrat afiniteleri vardır ve tanımlanan her peroksidaz için bu değerler belirlenmelidir.



Şekil 3. Saflaştırılan peroksidaz enziminin guaiakol, ABTS ve pirogallol substratları için Lineweaver-Burk grafikleri

SONUÇ

Peroksidazlar başlıca ticari enzim sınıflarından biridir. Bu yüzden, farklı ihtiyaçlara cevap verebilen, reaksiyon ortamındaki sıcaklık pH, tuzlar, metaller ve organik çözücüler gibi faktörlere karşı tolerans gösterebilen peroksidazların farklı kaynaklardan tanımlanması ve daha yüksek verimde saflaştırmasına ihtiyaç vardır. Bu çalışmada, hem soğan kökü peroksidaz enzimi ilk defa afinite kromatografisi tekniğiyle saflaştırılmış hem de kullanılan yöntem yeni peroksidazların saflaştırılmasına da öncülük edebilecek bir yöntem olarak sunulmuştur. Ayrıca saflaştırdığımız soğan kökü peroksidazının sanayide kullanılma potansiyeli olduğu düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

KAYNAKLAR

- Adam W, Lazarus M, Saha-Möller CR, Weichold O, Hoch U, Häring D, Schreier P, 1999. Biotransformations with peroxidases, Biotransformations, Springer, pp. 73-108, Berlin-Germany.
- Agostini E, Hernández-Ruiz J, Arnao MB, Milrad SR, Tigier HA, Acosta M, 2002. A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (*Brassica napus*) hairy-root cultures: inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kits. *Biotechnology and applied biochemistry*, 35(1): 1-7.

- Bach CE, Warnock DD, Van Horn DJ, Weintraub MN, Sinsabaugh RL, Allison SD, German DP, 2013. Measuring phenol oxidase and peroxidase activities with pyrogallol, L-DOPA, and ABTS: effect of assay conditions and soil type. *Soil Biology and Biochemistry*, 67: 183-191.
- Bhunia A, Durani S, Wangikar, PP, 2001. Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. *Biotechnology and Bioengineering*, 72(5): 562-567.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2): 248-254.
- Chivukula M, Spadaro JT, Renganathan V, 1995. Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfophenyl hydroperoxides. *Biochemistry*, 34(23): 7765-7772.
- El Agha A, Makris DP, Kefalas P, 2008. Hydrocaffeic acid oxidation by a peroxidase homogenate from onion solid wastes. *European Food Research and Technology*, 227(5): 1379-1386.
- Gu TY, Hsu KH, Syu MJ, 2003. Scale-up of affinity chromatography for purification of enzymes and other proteins. *Enzyme Microb Tech*, 33: 430-437.
- Heller A, Vreeke MS, 1997. Soybean peroxidase electrochemical sensor. In: Google Patents.
- Hu Y, Wu J, Luo P, Mo Y, 2012. Purification and partial characterization of peroxidase from lettuce stems. *African Journal of Biotechnology*, 11(11): 2752-2756.
- Jacob BM, Antony KE, Sreekumar B, Haridas M, 2000. Thiocyanate mediated antifungal and antibacterial property of goat milk lactoperoxidase. *Life sciences*, 66(25): 2433-2439.
- Jia J, Wang B, Wu A, Cheng G, Li Z, Dong S, 2002. A method to construct a third-generation horseradish peroxidase biosensor: self-assembling gold nanoparticles to three-dimensional sol-gel network. *Analytical Chemistry*, 74(9): 2217-2223.
- Kwak SS, Kim SK, Park IH, Liu JR, 1996. Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato. *Phytochemistry*, 43(3): 565-568.
- Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259): 680.
- Lavery CB, MacInnis MC, MacDonald MJ, Williams JB, Spencer CA, Burke AA, D'Cunha GB, 2010. Purification of peroxidase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(15): 8471-8476.
- Liu J, Ye L, Weiping Y, 1999. Copolymerization of lignin with cresol catalysed by peroxidase in reversed micellar systems. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2(2): 7-8.
- Mall R, Naik G, Mina U, Mishra SK, 2013. Purification and characterization of a thermostable soluble peroxidase from *Citrus medica* leaf. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 43(2): 137-151.
- Merril CR 1990. Gel-staining techniques. *Methods in enzymology* Vol. 182, pp. 477-488, Elsevier.
- Mohamed SA, El-Badry MO, Drees EA, Fahmy AS, 2008. Properties of a cationic peroxidase from *Citrus jambhiri* cv. Adalia. *Applied biochemistry and biotechnology*, 150(2): 127-137.
- Moussouni S, Detsi A, Majdalani M, Makris DP, Kefalas P, 2010. Crude peroxidase from onion solid waste as a tool for organic synthesis. Part I: Cyclization of 2', 3, 4, 4', 6'-pentahydroxy-chalcone into aureusidin. *Tetrahedron Letters*, 51(31): 4076-4078.
- Osman A, Makris D, 2011. Oxidation of morin (2', 3, 4', 5, 7-Pentahydroxylavone) with a peroxidase homogenate from onion. *International Food Research Journal*, 18(3).
- Oztekin A, Almaz Z, Gerni S, Erel D, Kocak SM, Sengül ME, Ozdemir H, 2019. Purification of peroxidase enzyme from radish species in fast and high yield with affinity chromatography technique. *Journal of Chromatography B*, 1114: 86-92.

- Oztekin A, 2019. Determination of some flavonoid derivatives inhibitory effect on bovine milk lactoperoxidase enzyme, *Turkish journal of science*, 4(1): 15-21.
- Pandey VP, Awasthi M, Singh S, Tiwari S, Dwivedi UN, 2017. A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, 6(1): 308.
- Pandey VP, Singh S, Singh R, Dwivedi UN, 2012. Purification and characterization of peroxidase from papaya (*Carica papaya*) fruit. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167(2): 367-376.
- Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C, 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant cell reports*, 24(5): 255-265.
- Regalado C, García-Almendárez BE, Duarte-Vázquez MA, 2004. Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochemistry Reviews*, 3(1-2): 243-256.
- Sakharov IY, 2001. Long-term chemiluminescent signal is produced in the course of luminol peroxidation catalyzed by peroxidase isolated from leaves of African oil palm tree. *Biochemistry (Moscow)*, 66(5): 515-519.
- Soda I, Hasegawa T, Suzuki T, Ogura N, 1991. Purification and some properties of peroxidase from kiwifruit. *Agricultural and biological chemistry*, 55(6): 1677-1678.
- Takahama U, 2004. Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: physiological significance of the oxidation reactions. *Phytochemistry Reviews*, 3(1-2): 207-219.
- Tatsumi K, Wada S, Ichikawa H, 1996. Removal of chlorophenols from wastewater by immobilized horseradish peroxidase. *Biotechnology and Bioengineering*, 51(1): 126-130.
- Thongsook T, Barrett DM, 2005. Heat inactivation and reactivation of broccoli peroxidase. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(8): 3215-3222.
- Wilchek M, Chaiken I, 2000. An overview of affinity chromatography. *Affinity Chromatography*, pp. 1-6: Springer.
- Zilbeyaz K, Kilic H, Sisecioglu M, Ozdemir H, Güngör AA, 2012. Preparation of enantiomerically pure p-substituted phenylethyl hydroperoxides by kinetic resolution and their use as enantioselective oxidants in the asymmetric Weitz–Scheffer epoxidation of E-chalcone. *Tetrahedron: Asymmetry*, 23(8): 594-601.