



**THERMAL STABILIZATION OF HORSERADISH PEROXIDASE BY
COVALENT CONJUGATION WITH DEXTRAN**

Melda ALTİKATOĞLU*¹, Yeliz BAŞARAN², Candan ARIÖZ², Huriye KUZU²

¹Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Esenler-İSTANBUL

²Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Esenler-İSTANBUL

Received/Geliş: 25.03.2009 Revised/Düzeltilme: 17.08.2009 Accepted/Kabul: 21.10.2009

ABSTRACT

In this study, Horseradish Peroxidase-Dextran covalent conjugates were synthesized whose resistance was increased against high temperature. Firstly HRP was purified by affinity chromatography using immobilized Con A. Enzyme-dextran conjugates with different molar ratios were synthesized using dextran aldehyde derivatives (Dextrans 17.500, 75.000, 188.000 Da) and purified enzyme.

Activities of synthesized conjugates and purified enzyme at pH 7 is determined after keeping them for 0, 15 and 30 minutes in a 25, 30, 35, 40, 50, 60,70, 80 °C temperatured waterbaths and results are compared. In all keeping periods, a slight decline in the activities of HRP-Dextran conjugates against increasing temperatures is observed when it is compared to purified enzyme. Especially the conjugate with 1/10 molar ratio displayed quite well stability against high temperatures.

Keywords: HRP, dextran aldehyde, conjugate, activity, thermal stability.

**“HORSERADISH” PEROKSİDAZIN DEKSTRAN İLE KOVALENT KONJUGASYON SONUCU
TERMAL STABİLİZASYONU**

ÖZET

Bu çalışmada yüksek sıcaklığa dirençli Horseradish Peroksidaz-Dekstran kovalent konjugatları sentezlendi. Öncelikle, HRP immobilize Con A kullanılarak affinite kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı. Dekstranların (Mw 17.500, 75.000, 188.000 Da) aldehid türevleri ve saf enzim örneği kullanılarak farklı mol oranlarında enzim-dekstran konjugatları sentezlendi.

Sentezlenen konjugatların ve saflaştırılan enzimin 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80 °C sıcaklıklardaki su banyosunda, 0, 15 ve 30 dakika bekleme süreleri sonunda pH 7’de aktiviteleri tayin edildi ve sonuçlar kıyaslandı. Tüm bekleme sürelerinde HRP-Dekstran konjugatlarının aktivitelerinde, artan sıcaklığa karşı saf enzime göre daha yavaş bir düşme gözlemlendi. Özellikle 1/10 oranlı konjugat sıcaklığa karşı oldukça iyi direnç gösterdi.

Anahtar Sözcükler: HRP, dekstran aldehit, konjugat, aktivite, termal stabilite.

*Corresponding Author/Sorumlu Yazar: e-mail/e-ileti: maltikatoglu@yahoo.com, tel: (532) 643 80 77

1. GİRİŞ

Biyoteknolojik uygulamalarda enzimlerin yüksek sıcaklıklardaki hızlı inaktivasyonu büyük bir problem oluşturmaktadır. Enzimlerin biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilmesi için çalışma koşullarında uzun süre stabil olmaları gerekmektedir. Stabilitenin uzatılması enzim yinelenmelerinin sayısını azaltacak ve böylece enzimin kullanımdaki maliyetini de düşürecektir [1]. Enzimlerin kimyasal modifikasyonlarla yapılarını daha “rijid” kılmak suretiyle stabilize edilmesi, çabuk sonuç alınabilirliği, nispeten ucuz ve kolay uygulanabilirliği nedeniyle en sık başvurulan stabilizasyon yöntemlerinden biridir [2].

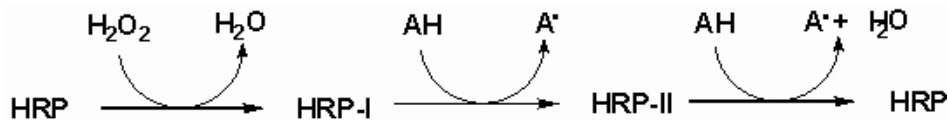
Enzimler protein mühendisliği, immobilizasyon teknikleri, stabilize edici katkı maddeleri ya da kimyasal modifikasyon yöntemleri ile uygulama koşullarında daha dirençli bir yapıya getirilmektedir. Kimyasal modifikasyon amacıyla doğal ve sentetik polimerler başlıca kullanılmaktadır. Enzimlerin hidrofilik yapıda doğal bir polimer olan dekstranın çoklu kovalent bağlanması ile modifikasyonu, onlara başlıca termal direnç kazandırmaktadır [3-7]. Diğer taraftan suda çözünebilirleri, biyoyumlu olmaları, biyolojik bozunmaya uğrayabilmeleri ve toksik olmamaları polisakaritlerin enzim teknolojisinde çeşitli alanlarda kullanılmalarına neden olmuştur [8,9].

Peroksidazlar (EC 1.11.1.7), oksidleyici (oksidant) olarak hidrojen peroksid veya organik hidrojen peroksidleri kullanan oksidoredüktazlardır. Peroksidazların çoğu N-bağlı oligosakkarid bulunduran glikoproteinlerdir. Peroksidazlar başlıca tıbbi tanı kitlerinin hazırlanmasında, gıda proseslerinde oluşan reaktif oksijen türleri için indikatör olarak ve ticari amaçlı fenolik reçinelerin sentezinde katalizör olarak kullanılmaktadır [10].

Yapısında “Hem” grubu bulunduran peroksidazlar, amino asit dizilimleri dikkate alınarak üç gruba ayrılmaktadır. **I. Grup** sitokrom c peroksidaz (CcP), askorbat peroksidaz (APX), ve bakterial katalaz peroksidazları içeren hücre içi peroksidazlardır. **II. Grup** manganaz peroksidaz, lignin peroksidaz (LiP) gibi salgılanan “fungal enzimleri” kapsamaktadır. **III. Grup** ise bitki peroksidazlarını bulundurmaktadır. Kararlı olması ve yabancı turp (horseradish) köklerinden kolayca izole edilmesi nedeniyle birçok uygulamada yer alan “horseradish peroksidaz” izoenzim C (HRP) **III. Grup**’ta yer almaktadır. Peroksidaz ailesinin yapı-fonksiyon ilişkileri ile ilgili çalışmaların çoğu, III. grup’un temsilcisi gibi alınan HRP ile gerçekleştirilmiştir [11,12].

“Horseradish” Peroksidaz (HRP, E,C 1.11.1.7), (bayır turpu peroksidazı) başlıca tıbbi tanı kitlerinde kullanılmaktadır. Fenoller, bifenoller, anilinler gibi aromatik bileşiklerin ve azo boyalarının giderilmesinde etkili olduğu da bilinmektedir [1,13-16]. HRP molekülünde ferriprotoporfirin (protohem) içeren bir haloenzimdir [16,17]. Yapısında %18-22 arasında değişen karbohidrat artığı ve iki farklı tipte metal merkezi içermektedir. Bunlar, demir (III) protoporfirin IX (hem grubu) ve iki kalsiyum atomudur. Her ikisi de enzimin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü için gereklidir. [1,18,19].

Peroksidazlar H_2O_2 ile Bileşik I, II ve III olmak üzere üç farklı yapı oluşturmaktadır. HRP’nin genel çalışma mekanizması aşağıda verildiği gibidir. HRP-I ve HRP-II, sırasıyla Bileşik I ve Bileşik II’yi, AH ise indirgenen substratı göstermektedir [18,20].



Şekil 1. HRP enziminin çalışma mekanizması [14]

HRP’nin enzimatik aktivitesi, hem grubunda bulunan demir atomunun oksidasyon ve redüksiyonundan ileri gelmektedir. Son zamanlarda HRP’nin aromatik hidrokarbonların oksidasyonunda da kullanıldığı bilinmektedir [20].

Bu çalışmada nötral yapıda bir polimer olan dekstran ile konjuge edilen, "Horseradish" peroksidaz'ın termal stabilizasyonu incelenmiştir. Bu amaçla farklı molekül ağırlıklarında (17.500, 75.000, 188.000Da) dekstranlar kullanılarak elde edilen enzim-dekstran konjugatlarının ve saflaştırılan enzimin 25, 30, 35, 40, 50, 60,70, 80 °C sıcaklıklardaki su banyosunda, 0, 15 ve 30 dakika bekleme süreleri sonunda pH 7'de aktiviteleri tayin edildi ve sonuçlar kıyaslandı.

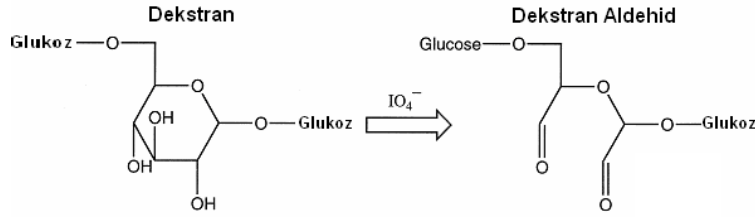
2. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

2.1. Ticari HRP Enziminin Affinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

Protein konsantrasyonu 8 mg/ml olacak şekilde hazırlanan HRP çözeltisi Bio-Rad marka protein saflaştırma sisteminde 1,5 cm x 30 cm kolonda, dolgu maddesi 'Concanavalin A-Sepharose 4B' kullanılarak affinite kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı. Enzim 0,1M asetat tamponu (pH 6) ile kolona verildi. Bağlanmayan materyalin 0,1M NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MnCl₂ içeren asetat tamponu ile yıkanıp uzaklaştırılmasından sonra, bu maddelere ek olarak 0,1M metil mannopiranosid (MMP) bulunduran tampon kullanılarak, 1,5 ml/ dakika akış hızı ile saf HRP fraksiyonlar halinde kolondan alındı. Saflaştırılan enzimin 280 ve 403 nm'deki absorpsansları UV spektrofotometrede okundu. Saflaştırılan tüplerdeki enzimin saflığının bir ölçüsü olarak RZ (Reinheitzahl ratio) değeri (A_{403} / A_{280}) hesaplandı [21,22].

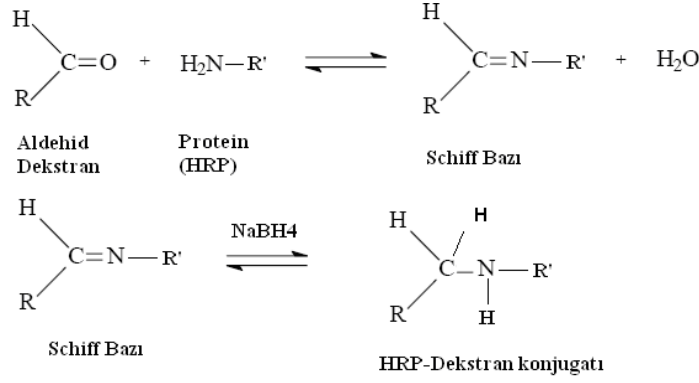
2.2. HRP -Dekstran Konjugatının Sentezi

3,33g dekstran (17.500Da, 75.000Da, 188.000Da) 30ml, 8 g NaIO₄ 70ml destile suda çözüldü. Dekstran çözeltisine NaIO₄ çözeltisi yavaş yavaş ve karıştırılarak eklendi. Dekstran aldehid türevini elde etmek üzere reaksiyonun gerçekleşmesi için çözelti içeriği karanlıkta, oda sıcaklığında 24 saat süreyle karıştırarak bekletildi. Elde edilen yükseltgenmiş dekstran ile birlikte ortamda bulunan fazla iyonları uzaklaştırmak için ürün 24 saat karanlıkta, oda sıcaklığında destile suya karşı diyalize bırakıldı. Liyofilizatörde kurutma ile katı halde dekstranın aldehid türevi elde edildi [9,23].



Şekil 2. Dekstran aldehid türevinin sentezi

Saf enzimin, farklı boyutlardaki dekstranın (17.500Da, 75.000Da, 188.000Da) aldehid türevi ile kovalent konjugatları sentezlendi.



Şekil 3. HRP-dekstran konjugatının sentezi

Bu reaksiyon 4 ml, 0.1 M pH 7 sodyum fosfat tamponunda gerçekleştirildi. Schiff bazı oluşması aşamasında belirtilen çözelti 25°C'da 16 saat bekletildi. Reaksiyonun durdurulması amacıyla ortamın pH değerini yükseltmek üzere 4 ml reaksiyon çözeltisine +4°C'deki 100 mM sodyum bikarbonat çözeltisinden 5,6 mL eklendi. Daha sonra reaksiyona girmeyen aldehid gruplarının ve schiff bazının indirgenmesi için 9,6 mg sodyum borhidrür (NaBH₄) ortama ilave edildi. 0.1M HCl ile çözeltinin pH değeri 7' ye ayarlandıktan sonra elde edilen konjugat ultrafiltrasyon cihazında konsantre edildi [22].

Saflaştırılan HRP konsantrasyonu sabit tutularak (0,1mg/ml), dekstran aldehid türevinin farklı konsantrasyonlarda çözeltileri aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

$$\frac{n_{\text{HRP}}}{n_{\text{D}}} = \frac{c_{\text{HRP}} \cdot M_{\text{D}}}{c_{\text{D}} \cdot M_{\text{HRP}}} = 1/1; 1/5; 1/10; 1/15; 1/20; 10/1; 20/1$$

2.3. Aktivite Tayini

25° C deki çalkalamalı su banyosunda bekletilen deney tüplerine sırası ile 885 µl 0,01 M PBS (pH 7), 20 µl 10 mM o-dianisidin, 10 µl (0,0025mg/ml) enzim çözeltisi konuldu ve 10 µl %3'lük H₂O₂ eklenerek reaksiyon başlatıldı. 10 dakika sonra 75 µl 1M NaOH ilave edilerek reaksiyon durduruldu ve UV spektrofotometrede absorpsiyon spektrumları alınarak A₄₆₀ değerleri okundu [24,25].

1 unite enzim aktivitesi, standart koşullar altında 1 dakikada 1µmol substratı oksitleyen peroksidaz miktarı olarak tanımlanmaktadır [26,27].

$$\text{U/mg} = \frac{A_{460} \times 10^6}{M_e \times t \times c_{\text{HRP}}}$$

M_e= o-dianisidinin molar absorpsiyon katsayısı (11.300 M⁻¹ cm⁻¹)

t= Bekleme süresi (10 dakika)

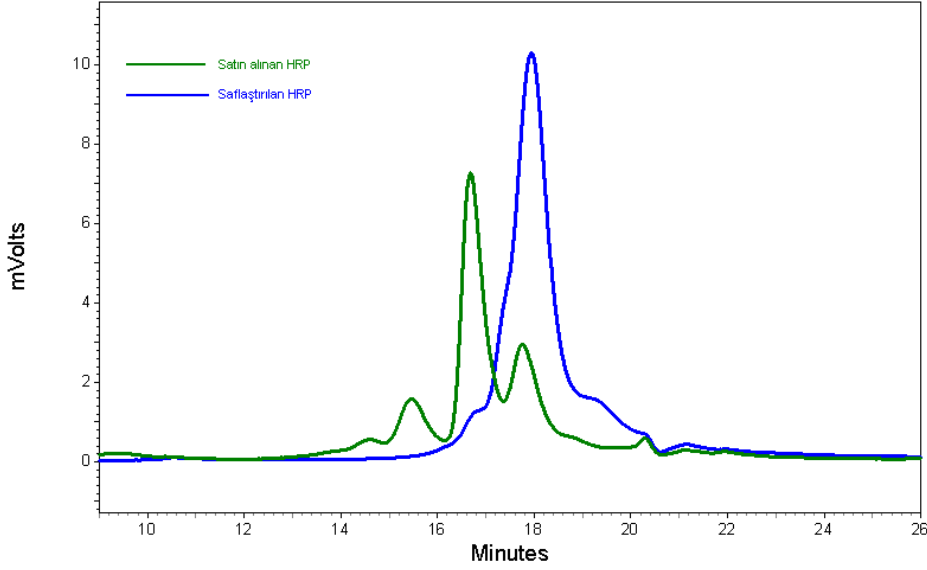
1 mol= 10⁶ µmol

c_{HRP}= Enzim konsantrasyonu (0,0025mg/ml)

HRP-Dekstran konjugatları ve saf enzimin bu yöntem ile pH 7'de, farklı sıcaklık değerlerindeki (25, 30, 35, 40, 50, 60, 70 °C) su banyosunda 0, 15 ve 30 dakika bekletilerek termal aktiviteleri tayin edildi.

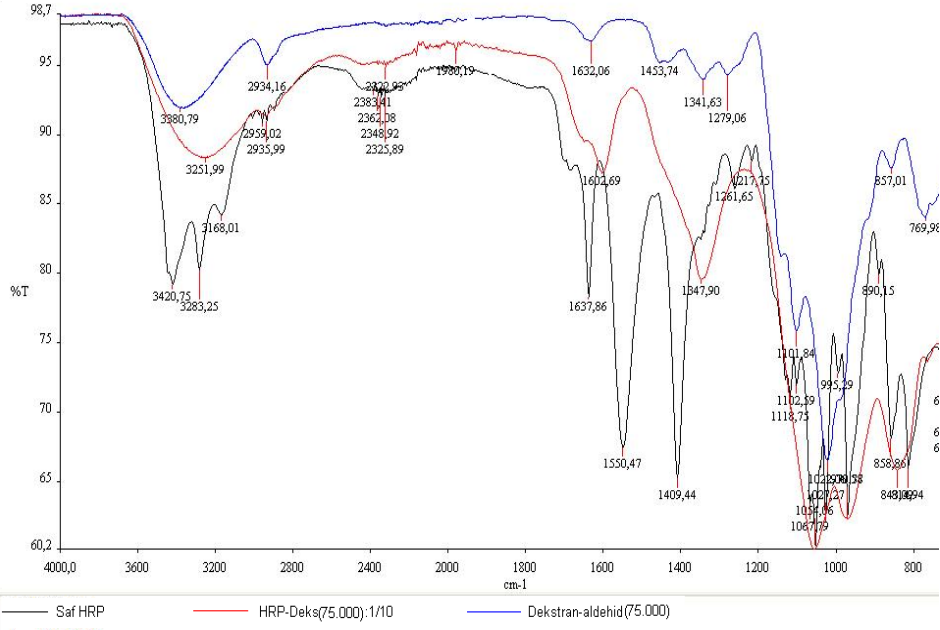
3. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, sulu ortamlarda Horseradish Peroksidaz enziminin yüksek sıcaklıkta daha dirençli duruma getirilmesi amaçlandı. HRP enzimi ile dekstranın kovalent bağlanmasıyla sentezlenen konjugatların termal stabilitesinin pH 7'de arttığı gözlenmiştir. Bu maksatla, öncelikle satın alınan Horseradish Peroksidazın (HRP) HPLC cihazları ile safsızlık bulunduğunu belirlendi ve enzimin saflaştırılmasına karar verildi (Şekil 4). Satın alınan HRP'nin RZ değeri 0,85 iken, affinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırıldıktan sonra RZ değeri 2,1 dolayında hesaplandı.



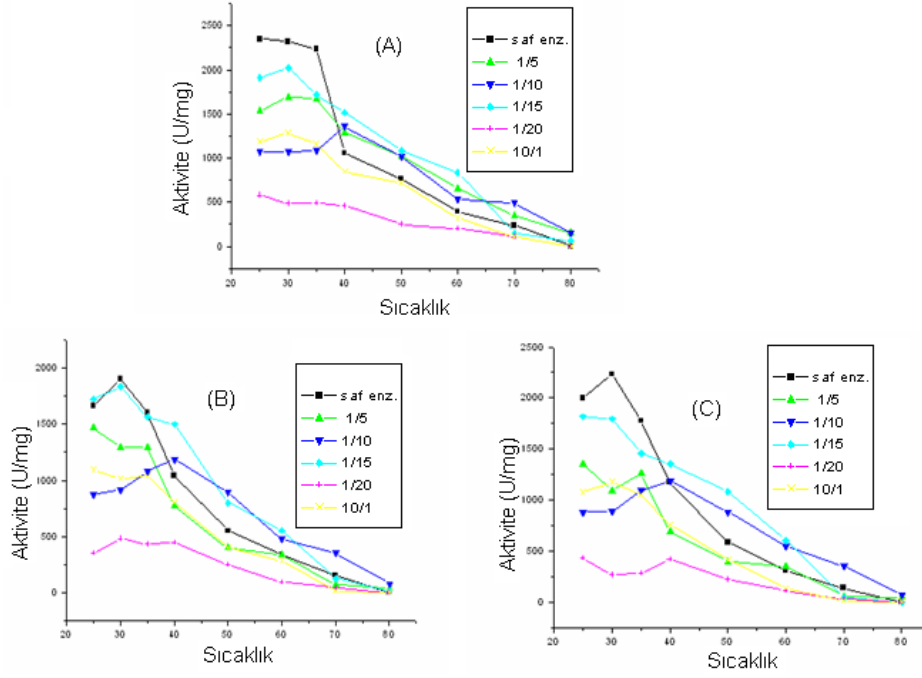
Şekil 4. Satın alınan ve saflaştırılan HRP'nin HPLC cihazı ile alınan kromatogramları

Optimum değerlerin belirlenmesi de dikkate alınarak, farklı molekül ağırlıklı (17.500, 75.000, 188.000Da) dekstran ile farklı mol oranlarında HRP-Dekstran kovalent konjugatları sentezlendi. Elde edilen enzim-polimer konjugatları FTIR spektroskopisi yöntemiyle incelendi (Şekil 5). Saf HRP'nin spektrumunda 3420 ve 3283 cm^{-1} dalga boylarındaki iki pik primer amin gruplarını göstermektedir. Konjugatların spektrumlarında, 2939 cm^{-1} dalga boyundaki aldehyd grubuna ait bandın kaybolduğu ve 1669 cm^{-1} dalga boyunda 1.amid (C=O), 1647 cm^{-1} 'de 2.amid(N-H), 1352 cm^{-1} dalga boyunda ise 3.amid bandının (C-N) oluştuğu görülmüştür.



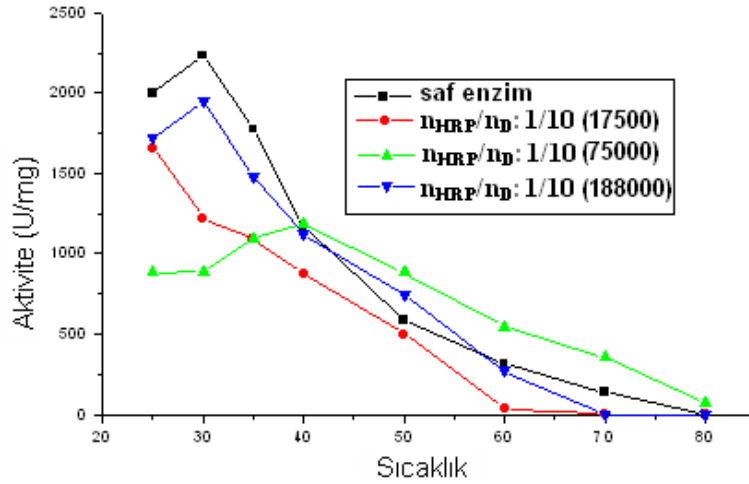
Şekil 5. Saf HRP, dekstran aldehid türevi ($M_D:75.000$) ve $n_{HRP}/n_D:1/10$ konjugatın FTIR spektrumları

Farklı sıcaklıklarda bekleme yapılmadan gerçekleştirilen aktivite tayinlerinde (Şekil 6A) saf enzimin aktivitesinin 35°C'dan sonra hızla düştüğü, bu sıcaklığın üzerinde 1/5, 1/10, 1/15 oranlı konjugatların daha yüksek aktivite verdiği ve konjugatların aktivitelelerinde sıcaklık yükselmesi ile ani değişimler olmadığı görülmüştür. 15 dakika beklemede (Şekil 6B) 35°C'dan düşük sıcaklıklarda saf enzim ile birlikte 1/15 oranlı konjugat yüksek aktivite verirken, 35°C-60°C arasında 1/15 ve 1/10 oranlı konjugatlar, 60 °C üzerinde ise 1/10 oranlı konjugat yüksek aktivite göstermiştir. 30 dakika beklemede (Şekil 6C) 35°C altında sıcaklıklarda saf enzim ile 1/15 oranlı konjugat, 40°C-60°C arasında 1/10 ve 1/15 oranlı konjugatlar, 60°C-80°C arasında ise 1/10 oranlı konjugat yüksek aktivite vermesi, dolayısıyla sıcaklığa direnmesi dikkat çekicidir.



Şekil 6. Saf HRP ve HRP-Dekstran(75.000) konjugatlarının 0 dak.(A), 15 dak. (B) ve 30 dak. (C) bekleme ile tayin edilen aktivite değerlerinin sıcaklığa bağlı olarak değişmesi.

Şekil 7’de saf enzim ile farklı molekül boyutlarındaki dekstranlarla hazırlanan $n_{HRP}/n_D=1/10$ konjugatın 30 dak. bekleme sonunda termal stabilitesindeki değişme gösterilmiştir. Aktivite sonuçları, özellikle 75.000 Da molekül ağırlıklı dekstran ile hazırlanan konjugatın, sıcaklığa karşı oldukça kararlı bir tutum sergilediğini göstermiştir.



Şekil 7. Saf HRP ve farklı molekül boyutlarındaki $n_{\text{HRP}}/n_{\text{D}}=1/10$ konjugatın 30 dak. bekleme ile tayin edilen aktivite değerlerinin sıcaklığa bağlı olarak değişmesi.

Literatüre göre, sentezlenen konjugatlarda enzim/polimer mol oranı ve kullanılan polimerin mol tartısı stabilite yönünden önem taşımaktadır. Düşük molekül ağırlıklı dekstran-aldehidin önemli bir stabilizasyon etkisi yapmadığı görülmüş ve bunun protein yüzeyi etrafında yeterli kalınlıkta kılıf oluşmamasından ileri geldiği öne sürülmüştür. Çok yüksek molekül ağırlıklı dekstran kullanıldığında ise enzim yüzeyini tamamıyla sarılmadığı, ki bunun da destabilize etkiye yol açtığı iddia edilmiştir. Bağlı bulunan büyük boyutlu dekstran molekülü sterik engellemeden dolayı enzim molekülüne diğer bir dekstran molekülünün bağlanmasını önlediği ayrıca düşünülmüştür [9].

Irazogui vd., (2007), β -galaktosidaz enzimi polialdehit dekstran ile modifiye edilerek, enzim molekülü etrafında hidrofilik bir mikroçevre oluşması sağlanmıştır. Bu çalışmada, modifiye enzimin organik solventlere ve yüksek sıcaklıklara karşı stabilitesi incelenmiştir. Casa vd., (2002), farklı molekül ağırlıklarında dekstranlar kullanılarak lipaz enzimin modifiye etmiş, ve sonuçta termal stabilitenin ticari lipaza göre arttığını gözlemişlerdir.

Bu çalışmada, Horseradish Peroksidaz enziminin yüksek sıcaklıktaki sulu ortamlarda daha dirençli duruma getirilmesi amaçlandı. Bu maksatla, optimum değerlerin belirlenmesi de dikkate alınarak, farklı molekül ağırlıklı (17.500, 75.000, 188.000Da) dekstran ile farklı mol oranlarında HRP-Dekstran kovalent konjugatları sentezlendi. Saf enzime kıyasla, 75.000 Da molekül ağırlıklı dekstran ile hazırlanan konjugatlar, özellikle $n_{\text{HRP}}/n_{\text{D}}=1/10$ oranlı konjugat yüksek sıcaklıklarda oldukça iyi termal kararlılık (stabilite) gösterdi.

REFERENCES / KAYNAKLAR

- [1] Klibanov, A. M., Stabilization of enzymes against thermal inactivation, Adv. Appl. Microbiol., 29, 1-28, 1983.
- [2] Nemeth, A., Kamondi, S., Szilagy, A., Magyar, C., Kovari, Z., Zavodszky, P., Increasing the Thermal Stability of Cellulase C Using Rules Learned from Thermophilic Proteins: A Pilot Study, Biophysical Chemistry, 132, 229-241, 2002.
- [3] Marshall, J.J., Manipulation of the Properties of Enzymes by Covalent Attachment of Carbohydrate, TIBS, 3, 79-83, 1978.
- [4] Rupley, J.A., Gratton, E., Careri, G., Water and Globular Proteins, TIBS, 8, 18-22, 1983.

- [5] Lenders, J.P., Crichton, R.R., Thermal Stabilization of Amylolytic Enzymes by Covalent Coupling to Soluble polysaccharides, *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 1343-1351, 1984.
- [6] Gaertner, H.F., Wtanabe, T., sinisterra, J.V., Puigserveer, A.J., Peptid Synthesis Catalyzed by Modified Chymotrypsin in Low-Water Organic Media, *J. Org. Chem.*, 56, 3149-3153, 1991.
- [7] Longo, M.A., Combes, D, Thermostability of Modified Enzymes:A Detailed Study, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 74, 25-32, 1999.
- [8] Kazan, D., Erarslan, A., Effect of dextran polymers on the stability of soluble Escherichia coli penicilin G acylase, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 74, 1157-1164, 1999.
- [9] Betancor, L., Gallego, F., L., Hidalgo, A., v.d., Prevention of interfacial inactivation of enzymes by coating the enzyme surface with dextran-aldehyde, *Journal of Biotechnology*, 110, 201-207, 2004.
- [10] Miranda, M.V., Magri, M.L., Cabrera, R.B., Fernandez, L. Ve Cascone, O., Optimisation of Peroxidase Adsorption on Concanavalin A-Agarose, *Latin American Applied Research*, 33, 67-71, 2003.
- [11] Rodriguez-Lopez, J.N., Smith, A.T., Thorneley, R.N., Role of Arginine 38 in Horseradish Peroxidase, *The Journal of Biological Chemistry*, 271:8, 4023-4030, 1996.
- [12] Gui, F., Chen, F., Wu, J., Wang, Z., Liao, X., Hu, X., Inactivation and Structural Change of Horseradish peroxidase Treated with Supercritical Carbon Dioxide, *Food Chemistry*, 97, 480-489, 2006.
- [13] Dec J, Bollag J-M., Use of plant material for the decontamination of water polluted with phenols, *Biotechnol Bioeng.*, 44:1132-1139, 1994.
- [14] Bhunia, A., Durani, S., Wangikar, P.P., Horseradish Peroxidase Catalyzed Degradation of Industrially Important Dyes, *Biotechnology And Bioengineering*, 72:5, 562-567, 2001.
- [15] Liu, J.Z., Wang, T.L., Ji, T.L., Enhanced dye decolorization efficiency by citraconic anhydride-modified horseradish peroxidase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 41, 81-86, 2006.
- [16] Franco Fraguas, L., Batista-Viera F., Carlsson J., Preparation of high-density Concanavalin A adsorbent and its use for rapid high-yield purification of peroxidase from horseradish roots, *J. Chromatogr. B.*, 803, 237-241, 2004.
- [17] Leon, J.C., Alpeeva, I.S., Chubar, T.A., v.d., Purification and Substrate Specificity of Peroxidase from Sweet Potato Tubers, *Plant Science*, 163, 1011-1019, 2002.
- [18] Desphande, S.S., *Enzyme Immunoassays*, chapter 5, Chapman & Hall, New York, 1996.
- [19] Veitch, N.C. ve Nigel, C., Horseradish Peroxidase: A Modern View of a Classic Enzyme, *Phytochemistry*, 65,3:249-259, 2004.
- [20] Carvalho, A.S.L., Neves-Petersen, M.T., Peterson, S.B., v.d., Formation of a misfolded conformation during refolding of HRP A1 in the presence of calcium, *Biochim. Et Biophys. Acta*, 1747, 99-107, 2005.
- [21] Brattain, M.G., Marks, M.E., Pretlow II, T.G., The purification of horseradish peroxidase by affinity chromatography on sepharose-bound concanavalin A, *Analytical Biochemistry*, 72, 346-352, 1976,
- [22] Altıkatoğlu, M., HRP-Dextran Konjugatları, Doktora tezi, Fen-Bilimleri Enstitüsü, Y.T.Ü, 2007.
- [23] Sacco, D., Bonneaux, F., Dellacherie, E., Interaction of haemoglobin with dextran sulphates and the oxygen-binding properties of the covalent conjugates, *J. Biol. Macromol.*, 10, 305-310, 1988.
- [24] Kuzu-Karsilayan, H., Eryılmaz, E., Yıllar, G., Deniz, G., Yanıkaya Demirel, G., Spectrophotometric Determination of Leukocytes in Blood, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16(5),233-236, 2002.
- [25] Eryılmaz, E., Kuzu-Karsilayan, H., Ogan, A., Spectrophotometric Determination of Leukocytes in Urine, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 18(4),251-254, 2004.

- [26] Keyhani, J., Keyhani, E., et al., Heterogeneous inhibition of horseradish peroxidase activity by cadmium, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1621, 140– 148, 2003.
- [27] Franco Fraguas, L., Batista-Viera F., Carlsson J., Preparation of high-density Concanavalin A adsorbent and its use for rapid high-yield purification of peroxidase from horseradish roots, *J. Chromatogr. B.*, 803, 237-241, 2004.
- [28] Irazoqui, G., Giacomini, C., Batista-Viera, F., Brena, B.M., Hydrophilization of immobilized model enzymes suggests a widely applicable method for enhancing protein stability in polar organic co-solvents, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 46, 43–51, 2007.