

Inactivación de una peroxidasa comercial por peróxido de hidrógeno.

Inactivation of a commercial peroxidase by hydrogen peroxide.

Diego Alberto Morales Urrea^{1,2}, Edgardo Martín Contreras¹.

1. Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA). CCT - Mar del Plata CONICET. Av. Juan B. Justo 4302 (7600) Mar del Plata, Argentina.
2. Departamento de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP). Av. Juan B. Justo 4302 (7600) Mar del Plata, Argentina.

E-mail: edgardo.contreras@fi.mdp.edu.ar

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la estabilidad de una peroxidasa comercial (HRP) en condiciones de reacción. Espectrofotométricamente se pudieron identificar tres estados de la enzima. En ausencia de peróxido (P), la enzima está en su estado basal (E_0). Aunque la literatura indica que en presencia de P el estado basal E_0 se oxida a un estado E_1 perdiendo dos electrones, solo se observó el estado intermedio E_2 , el cual está un electrón debajo de E_0 . En presencia altas concentraciones de P se identificó una tercera especie E_3 , la cual decae a E_0 . Además, la HRP pudo catalizar la descomposición del peróxido, evidenciando la actividad catalásica de la HRP. El decaimiento de E_3 también generó una especie Ex, la cual resultó catalíticamente inactiva. Asimismo, la formación de la especie inactiva se correlacionó con la pérdida de actividad peroxidasa. Experimentos similares en presencia de OII como sustrato reductor externo, empleando bajas concentraciones de P y tiempos cortos, muestran también una disminución de la actividad peroxidasa. Considerando que en estas condiciones la formación de E_3 es despreciable, los resultados sugieren una ruta alternativa de inactivación, independiente de la formación de E_3 . Por lo tanto, se concluye que en las condiciones estudiadas la pérdida de actividad enzimática es una característica intrínseca de la HRP estudiada.

Palabras clave: peroxidasa, inactivación, peróxido de hidrógeno, orange II.

Abstract

The objective of the present work was to evaluate the stability of a commercial peroxidase (HRP) under reaction conditions. Three states of the enzyme could be identified spectrophotometrically. In the absence of peroxide (P), the enzyme is under its basal state (E_0). Although the literature indicates that the ground state E_0 can be readily oxidized by P to a state E_1 losing two electrons, only the intermediate state E_2 was observed, which is one electron below E_0 . In the presence of high concentrations of P, a third species E_3 was identified, which slowly decays to E_0 . Furthermore, HRP was able to catalyze the decomposition of peroxide, demonstrating the catalytic activity of HRP. The decay of E_3 also generated a species Ex, which was catalytically inactive. Likewise, the formation of the inactive species was correlated with the loss of peroxidase activity. Experiments in the presence of OII as an external reducing substrate, using low concentrations of P and short times, also show a decrease in peroxidase activity. Considering that under these conditions the formation of E_3 is negligible, results suggest an alternative inactivation pathway, independent of the formation of E_3 . Therefore, it is concluded that in the studied conditions the loss of enzymatic activity is an intrinsic characteristic of the studied HRP.

Keywords: peroxidase, inactivation, hydrogen peroxide, orange II.

1. Introducción

En los últimos años, la biocatálisis se ha convertido en una tecnología estándar en varios procesos industriales (Straathof *et al.*, 2002). Además del clásico uso de oxidasas para degradar colorantes (Morales *et al.*, 2018a) y en la polimerización de compuestos fenólicos (Agarwal *et al.*, 2016;

Morales *et al.*, 2018b), estas enzimas se han empleado en la biosíntesis de varios fármacos, como antibióticos policétidos (Julsing *et al.*, 2008), en la degradación de lignina para la producción de biocombustible (Hoyos *et al.*, 2017), en oxidaciones asimétricas de aminoácidos (Wohlgemuth, 2011) y para preparar conjugados

anticuerpo-enzima para kits de ELISA (Supriya *et al.*, 2016).

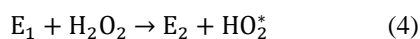
Diversos estudios sugieren que el ciclo catalítico de las peroxidasas involucra varias especies enzimáticas (Valderrama, 2010; Morales *et al.*, 2018a). El ciclo comienza con la oxidación del estado basal de la enzima (E_0) por el peróxido de hidrógeno (P), formando la especie E_1 :



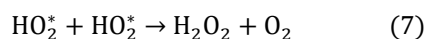
La reacción (1) sería muy rápida y completamente desplazada hacia E_1 (Tanaka *et al.*, 2003). La especie E_1 está dos equivalentes por encima de E_0 . En presencia de un sustrato reductor adecuado (S), se produce una secuencia de dos transferencias de un electrón:



La reacción (2) produce el estado E_2 , el cual está un equivalente por encima de E_0 , mientras que la (3) restaura el estado basal E_0 . En ambas reacciones se genera un radical S^* , el cual puede seguir reaccionando. Varios autores (Arnao *et al.*, 1990; Hiner *et al.*, 2001; Hernández-Ruiz *et al.*, 2003) informan que las peroxidasas también pueden catalizar la conversión de peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, en el llamado ciclo catalásico (por analogía con la catalasa) de las peroxidasas:



Los radicales hidroperoxilo restituyen parte del peróxido consumido en las reacciones anteriores, liberando, además, oxígeno molecular (Hiner *et al.*, 2001):



Varios autores informan que la especie E_3 puede decaer lentamente formando una especie catalíticamente inactiva E_X (Grey *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2017):



De hecho, debido a la reacción (8), los usos comerciales de las peroxidasas se ven limitados por

la baja estabilidad de la enzima en presencia de peróxido de hidrógeno. En este sentido, es necesario un conocimiento más profundo del proceso de desactivación de las peroxidasas para desarrollar procesos biocatalíticos más robustos. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la estabilidad de una peroxidasa comercial (HRP) en condiciones de reacción.

2. Materiales y métodos

Se estudió una peroxidasa de rábano picante (HRP, Tipo I, RZ = 1,1) de Sigma-Aldrich. De acuerdo a las especificaciones del fabricante, la actividad específica era 146 unidades/mg de polvo liofilizado (una unidad corresponde a la cantidad de enzima que forma 1 mg de purpurogalina de pirogalol en 20 s a pH 6 y 20 °C). Para evaluar la actividad peroxidasa se empleó un peróxido de hidrógeno (P, 30 %) y una sal sódica de Orange II (OII) de grado analítico (> 98 %) de Sigma-Aldrich. Las demás sales empleadas en el presente estudio fueron adquiridas a Anedra (San Fernando, Argentina).

Para obtener los espectros UV/Vis de las especies E_0 , E_1 , y E_2 , se disolvieron 50 mg de enzima en 100 mL de buffer fosfato (BF, 100 mM, pH 9). Se colocaron 3 mL de la solución en una cubeta de cuarzo y se obtuvo el espectro correspondiente al estado basal de la enzima. Luego, se realizaron adiciones sucesivas de 20 μ L de peróxido de hidrógeno (1 mM). En cada caso, se registraron los espectros en un equipo Shimadzu UV-1800 empleando un ancho de banda espectral de 1 nm y una velocidad de barrido de 1200 nm/min. El espectro UV/Vis correspondiente a la especie E_3 se obtuvo de forma similar, pero haciendo agregados de 20 μ L de peróxido 260 mM (Valderrama, 2010). Finalmente, luego de 6 hs de reacción, se obtuvo el espectro correspondiente a la especie E_X (Grey *et al.*, 2007).

La cinética de inactivación de HRP por P se realizó como sigue. Se disolvieron de 2,5 a 12,5 mg de enzima en 25 mL de BF, se registró el espectro UV/Vis, y se inició la reacción mediante la adición de 15 μ L de P (9,8 M). A diferentes tiempos se tomaron muestras para medir la concentración de P, actividad peroxidasa y el espectro UV/Vis de la mezcla de reacción. La concentración de P se midió por el método de Trinder. La actividad peroxidasa (AP) se evaluó mediante la reacción de decoloración del OII. Se mezclaron 200 μ L de la mezcla de reacción, 2 mL de BF, 100 μ L de OII (2 mM), y la reacción se inició con la adición de 100 μ L de P (9,8 mM). El progreso de la reacción en función del tiempo se siguió a 485 nm (Morales *et al.*, 2018a).

Para estudiar la inactivación de HRP por el peróxido, pero en presencia de OII, se preparó una solución de 75 mg/L de HRP en BF (100 mM, pH 9). Se colocaron 2 mL de esta solución en una cubeta de cuarzo, se agregaron 0,05 mL de OII (2 mM) y se inició la reacción con 0,1 mL de P (2 mM). El progreso de la reacción en función del tiempo se siguió a 485 nm. En las condiciones del ensayo, la absorbancia que aportaba tanto el peróxido como la enzima era despreciable respecto al aporte del colorante (Morales *et al.*, 2018a). Una vez finalizada la reacción, se agregaron pulsos sucesivos de 0,05 mL de OII (2 mM) y 0,1 mL de P (2 mM), y se continuó midiendo la absorbancia 485 nm para monitorear la reacción. Ensayos control con 75 mg/L de enzima disuelta en BF (100 mM, pH 9) indicaron que no se observa una pérdida significativa de actividad peroxidasa durante al menos 4 hs.

3. Resultados y Discusión

La Figura 1 muestra el espectro correspondiente al estado basal (E_0) de la peroxidasa estudiada. Además de la banda de Soret a 403 nm (Figura 1a), se pueden observar otras dos bandas a 498 y 640 nm (Figura 1b) características de la especie E_0 (Arnao *et al.*, 1990; Ortiz de Montellano, 2010). El espectro correspondiente a E_2 se obtuvo mediante agregados sucesivos de P sobre la misma muestra. Durante las primeras adiciones, los espectros observados fueron inestables y luego de unos segundos se obtenía el espectro correspondiente a E_0 . Sin embargo, luego de varias adiciones de P, el espectro correspondiente a E_2 se volvió estable durante al menos unos 10 minutos. La Figura 1a muestra que el máximo de la banda de Soret correspondiente a E_2 se desplazó a 420 nm. Además, se observan dos bandas características de E_2 a 527 y 555 nm (Figura 1b). Para obtener E_3 , la enzima se puso en contacto con un exceso de peróxido de hidrógeno (Valderrama, 2010). Debe notarse que, en este caso, el peróxido agregado fue más de 200 veces la cantidad de peróxido de hidrógeno requerida para obtener E_2 . La Figura 1a muestra que el máximo de la banda de Soret pasó de 403 a 417 nm. Además, aparecieron otras dos nuevas bandas a 544 y 580 nm (Figura 1b). Se observó que el espectro correspondiente a E_3 (Figura 1) cambiaba lentamente en función del tiempo. Este nuevo espectro corresponde la forma inactiva de la enzima (E_x) (Grey *et al.*, 2007; Valderrama, 2010). La Figura 1a muestra que la banda de Soret está casi ausente en el espectro de la mezcla de reacción obtenida después de 6 horas. Sin embargo, el espectro contenía una nueva banda a 670 nm (Figura 1b) debido a la acumulación de

biliverdina, resultado de la descomposición del grupo hemo de la peroxidasa (Grey *et al.*, 2007).

Aunque se estudiaron diferentes condiciones experimentales (p.e., diferentes relaciones peróxido de hidrógeno a enzima y tiempos de contacto), no se pudo demostrar la formación de E_1 . Según Ortiz de Montellano (2010), E_1 presenta una banda de absorción a 400 nm y otras bandas tres menores a 577, 622 y 651 nm. Aunque el máximo de la banda de Soret asociada con E_1 estaba cerca de la correspondiente a E_0 , las bandas a 577, 622 y 651 nm propias de E_1 , estaban ausentes en todos los espectros obtenidos (Figura 1). En este sentido, varios trabajos demuestran que por regla general las reacciones (2) y (4) son más rápidas que las reacciones (3) y (5) (Kummer *et al.*, 1996; Adediran, 1996). Por consiguiente, se puede esperar que la concentración de E_1 sea mucho menor a E_2 y, por lo tanto, la especie E_1 sea difícil de detectar en la mezcla de reacción.

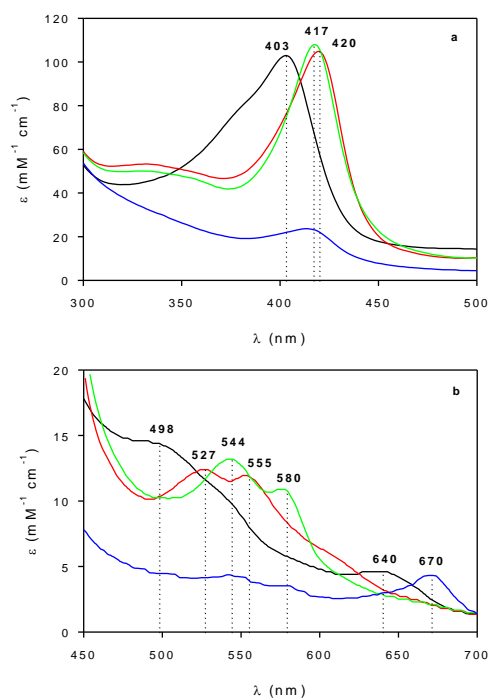


Figura 1. Banda de Soret (a) y detalle del espectro visible (b) correspondiente a las especies E_0 (negro), E_2 (rojo), E_3 (verde), y E_x (azul). Las líneas punteadas indican las bandas características de cada especie.

En la Figura 2 se muestran los cambios en el espectro UV/Vis en función del tiempo correspondiente a la mezcla de reacción como respuesta a pulsos repetidos de peróxido. En cada pulso, la relación peróxido/enzima era de 1,3 mol/mol, es decir que había un ligero exceso de peróxido, suficiente como para asegurar la

formación de E_1 (reacción 1). Luego del primer pulso (Figura 2p1) se observó una ligera modificación del espectro, el cual retomó rápidamente su forma original. De los pulsos 2 a 5 (Figuras 2p2-p5) los espectros exhibieron al menos tres puntos isobásticos (es decir, longitudes de onda tal que no cambia la absorbancia durante el transcurso de la reacción) a 412, 453 y 524 nm. Rodríguez-Lopez *et al.* (1997) informaron que los espectros correspondientes a E_0 y E_2 tienen un punto isobástico a 412 nm. Aunque esos autores también informan un isobástico a 395 nm, correspondiente a la transformación E_1 a E_2 , este isobástico estaba ausente en todos los espectros obtenidos, lo que confirma que la formación de E_1 era despreciable en las condiciones estudiadas.

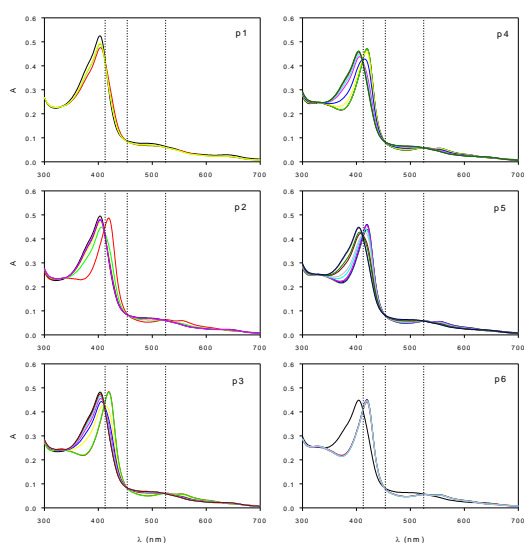


Figura 2. Cambios en el espectro de la mezcla de reacción en función del tiempo luego de pulsos repetidos de 20 uL de peróxido de hidrógeno (1 mM) a 3 mL de HRP (500 mg/L en BF 100 mM, pH 9). Las líneas punteadas indican los puntos isobásticos.

A partir de los espectros correspondientes a las especies enzimáticas identificadas (Figura 1) y empleando los espectros mostrados en la Figura 2, para cada pulso de peróxido se calculó la concentración de cada especie enzimática en función del tiempo. La Figura 3 muestra que a medida que luego de un pulso de P, se generaba predominantemente la especie E_2 , la cual decaía para regenerar E_0 a medida que se consumía el peróxido. Sin embargo, el tiempo que tardaba en regenerarse E_0 aumentaba en función del número de pulso, sugiriendo una pérdida de actividad de la enzima. Además, se observó que la suma de las especies E_0 , E_2 , y E_3 disminuía en cada pulso, lo que también sugería una pérdida de las especies activas de la enzima.

Con el objeto de verificar si los cambios observados en los espectros eran el resultado de la descomposición del peróxido por parte de la enzima, se estudió el efecto de la concentración de enzima y de peróxido en la reacción. En estos experimentos, la reacción fue monitoreada a través de la absorbancia a 420 nm (A_{420}), la cual corresponde al máximo del espectro de la especie E_2 . A esta longitud de onda, la absorbancia de E_0 es aproximadamente la mitad que la correspondiente a E_2 (Figura 1a).

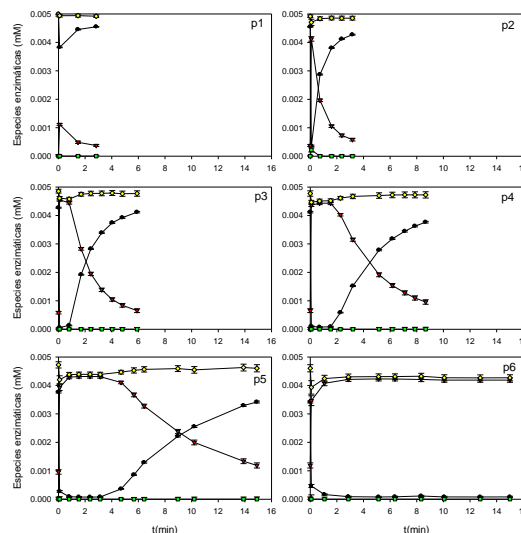


Figura 3. Concentración de las especies E_0 (negro), E_2 (rojo), E_3 (verde), y suma de las especies activas (amarillo) en función del tiempo luego de pulsos repetidos de 20 uL de peróxido de hidrógeno (1 mM) a 3 mL de HRP (500 mg/L en BF 100 mM, pH 9).

La Figura 4 muestra que, para todas las condiciones ensayadas, el agregado de peróxido producía un incremento de A_{420} , consistente con la transición de la especie E_0 a E_2 . Una vez que se formaba E_2 , la A_{420} decaía levemente, y a partir de un cierto tiempo crítico (t_c), retornaba al valor inicial. De acuerdo a lo mostrado en la Figura 4, el valor de t_c aumentaba con el incremento de la concentración inicial de peróxido (Figura 4a), y disminuía cuando se aumentaba la enzima (Figura 4b). Estos resultados confirman que los cambios observados en los espectros son el resultado del cambio en la concentración de peróxido debido a la actividad catalásica de la HRP estudiada.

Se realizaron ensayos con una mayor concentración inicial de peróxido (5,9 mM) en relación a los experimentos de pulso ($\sim 6,5 \mu\text{M}$), con el objeto de verificar la pérdida de actividad catalásica de la HRP mostrados en las Figuras 2 y 3. Debido a que la relación entre la concentración inicial de peróxido y la de enzima era de 980 mol/mol, la

especie dominante en la mezcla de reacción era E_3 (Figura 5a). Se observó además que a medida que se agotaba el peróxido (Figura 5b), la especie E_3 desaparecía y se incrementaba la concentración de E_2 . Asimismo, en todo momento estuvo prácticamente ausente la forma basal de la enzima (E_0). Los resultados claramente demuestran la actividad catalásica de la enzima estudiada. Sin embargo, la Figura 5a muestra que la suma de las especies catalíticamente activas (E_0 , E_2 , E_3) disminuía en función del tiempo. Es importante observar que cuando se agotó el peróxido, también disminuyó la velocidad de decaimiento de las especies activas (Figura 5a), la cual además, era similar a la pérdida de actividad peroxidasa (Figura 5b), confirmando que las altas concentraciones de peróxido favorecen la degradación de la enzima.

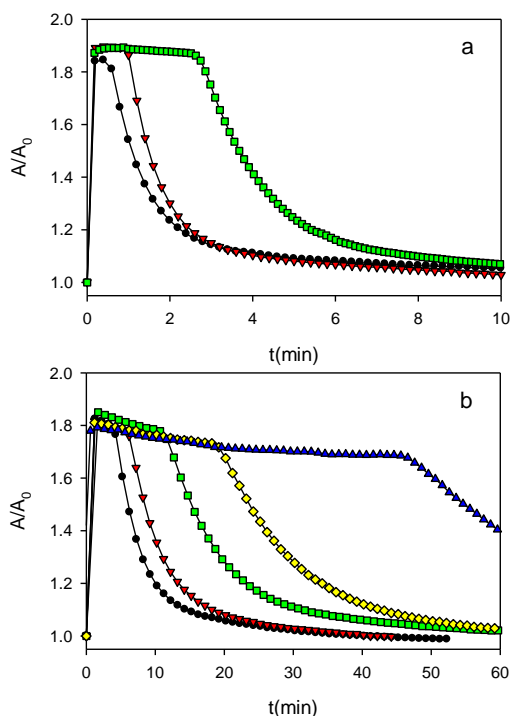


Figura 4. a) Efecto de la concentración inicial de peróxido de hidrógeno (P_0), y b) de enzima, en la absorbancia de la mezcla de reacción a 420 nm. Condiciones experimentales (a): HRP = 5 μM ; P_0 (μM) = 13 (negro), 19 (rojo), 26 (verde). Condiciones experimentales (b): HRP (μM) = 5 (negro), 4,2 (rojo), 3,3 (verde), 2,5 (amarillo), 1,7 (azul); P_0 = 26 μM .

Diversos autores sugieren que la presencia de un sustrato reductor exógeno (S) previene la inactivación de la enzima por el peróxido (Valderrama, 2010; Ortiz de Montellano, 2010; Sahare *et al.*, 2016). Esto se debería a que el sustrato reductor prevendría la formación de E_3 (reacción 5) al favorecer la reducción de E_2 a E_0 mediante las reacciones (2) y (3). En este sentido,

debe destacarse que los experimentos de inactivación previamente descritos (Figuras 2 a 5) fueron realizados en ausencia de un sustrato externo. Por lo tanto, se realizaron experimentos para estudiar la inactivación de la actividad peroxidasa de HRP por el peróxido, pero en presencia de Orange II (OII) como sustrato reductor exógeno.

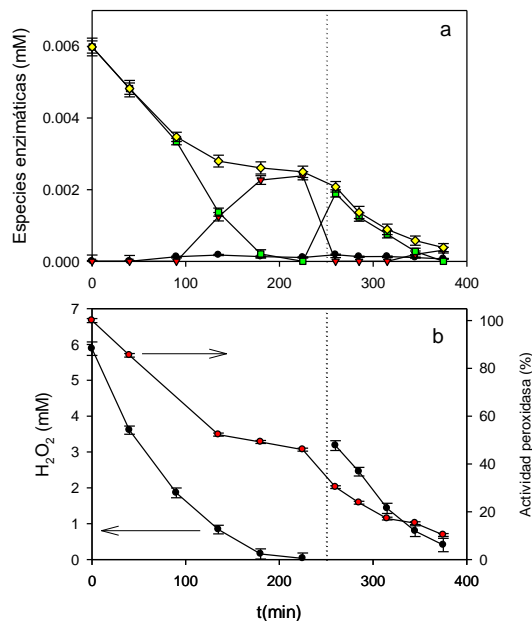


Figura 5. a) Concentración de las especies E_0 (negro), E_2 (rojo), E_3 (verde), y suma de las especies activas (amarillo) en función del tiempo. b) Concentración de peróxido (negro) y actividad peroxidasa (rojo). La línea punteada indica un segundo pulso de peróxido.

La Figura 6 muestra que la enzima seguía siendo activa aún después de seis pulsos sucesivos de peróxido, la actividad peroxidasa disminuyó aproximadamente un 30 % respecto del valor inicial (Figura 7). Debe destacarse que en ensayos control (enzima en BF) no se observó una pérdida significativa de actividad durante al menos 4 horas. De esta forma, aún en los ensayos realizados en presencia de un sustrato reductor (OII), con bajas concentraciones iniciales de peróxido ($\sim 90 \mu\text{M}$) y durante cortos tiempos (el tiempo total del ensayo no superaba los 30 min), la enzima estudiada pierde paulatinamente actividad.

Teniendo en cuenta que en estas condiciones experimentales la formación de E_3 es despreciable (Figuras 2 y 3), los resultados sugieren la existencia de una ruta alternativa de inactivación, la cual debe ser independiente de la formación de E_3 (reacciones 5 y 8). Por lo tanto, se puede concluir que la pérdida de actividad de la peroxidasa

estudiada es una característica intrínseca de la misma

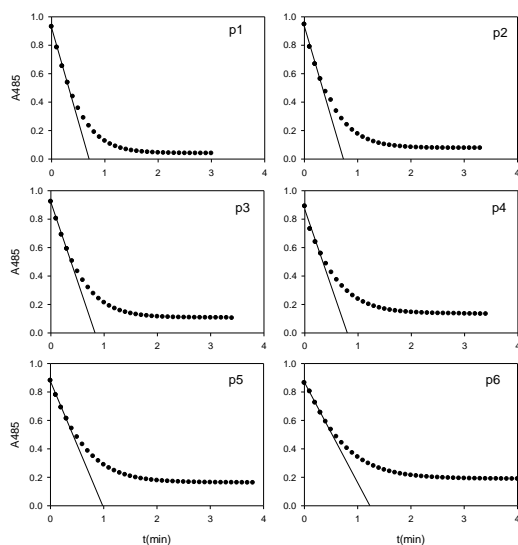


Figura 6. Pulsos sucesivos (p1 - p6) de Orange II (45 μM) y H_2O_2 (90 μM). Concentración de HRP = 75 mg/L en BF (100 mM, pH 9). La pendiente de las líneas corresponde a la velocidad inicial de decoloración.

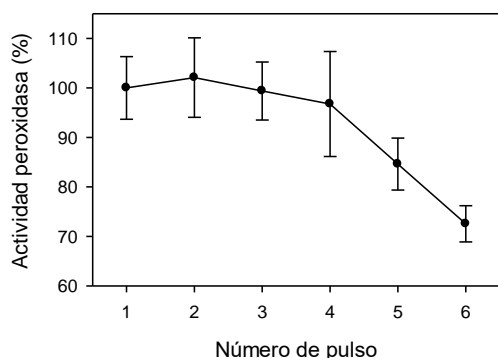


Figura 7. Actividad peroxidasa en función del número de pulsos sucesivos de Orange II (45 μM) y H_2O_2 (90 μM). Concentración de HRP = 75 mg/L en BF (100 mM, pH 9). Las barras indican el desvío estándar.

4. Conclusiones

En el presente trabajo se estudió la estabilidad catalítica de una peroxidasa comercial (HRP) en condiciones de reacción. Se pudieron identificar tres estados de la enzima: el estado basal (E_0) en ausencia de peróxido, el estado E_2 en presencia de concentraciones bajas del oxidante, y la forma E_3 en con exceso de peróxido. Además, en estas condiciones, decaimiento de E_3 generó una especie Ex, la cual resultó catalíticamente inactiva. La HRP estudiada pudo catalizar la descomposición del peróxido, evidenciando la actividad catalásica de la

HRP. Experimentos en presencia de OII como sustrato reductor externo, empleando bajas concentraciones de P y tiempos cortos, muestran también una disminución de la actividad peroxidasa. Los resultados sugieren una ruta alternativa de inactivación, independiente de la formación de E_3 .

5. Referencias

Adediran, S.A. (1996). *Kinetics of the formation of p-670 and of the decay of Compound III of horseradish peroxidase*, Arch. Biochem. Biophys. 327, 279-284.

Agarwal, P.; Gupta, R.; Agarwal, N. (2016). *A Review on Enzymatic Treatment of Phenols in Wastewater*, J. Biotechnol. Biomater. 6, 1-12.

Arnao, M.B.; Acosta, M.; del Rio, J.A.; Varón, R.; García-Cánovas, F. (1990). *A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide*, Biochim. Biophys. Acta 1041, 43-47.

Grey, C.E.; Hedstrom, M.; Adlercreutz, P. (2007). *A mass spectrometric investigation of native and oxidatively inactivated chloroperoxidase*, ChemBioChem 8, 1056-1062.

Hernández-Ruiz, J.; Arnao, M.B.; Hiner, A.N.P.; García-Canovas, F.; Acosta, M. (2001). *Catalase-like activity of horseradish peroxidase: relationship to enzyme inactivation by H_2O_2* , Biochem. J. 354, 107-114.

Hiner, A.N.P.; Hernández-Ruiz, J.; Williams, G.A.; Arnao, M.B.; García-Canovas, F.; Acosta, M. (2001). *Catalase-like oxygen production by horseradish peroxidase must predominantly be an enzyme-catalyzed reaction*, Arch. Biochem. Biophys. 392, 295-302.

Hoyos, P.; Hernáiz, M.J.; Alcántara, A.R. (2017). *Biocatalyzed Production of Fine Chemicals*. Comprehensive Biotechnology (Third Edition). Volume 3, pp. 334-373. ISBN: 978-0-12-809633-8.

Julsing, M.J.; Cornelissen, S.; Bühler, B. Schmid, A. (2008). *Heme-iron oxygenases: powerful industrial biocatalysts?* Curr. Opin. Chem. Biol. 12, 177-186.

Kummer, U.; Valeur, K.R.; Baier, G.; Wegmann, K.; Olsen, L.F. (1996). *Oscillations in the peroxidase-oxidase reaction: a comparison of different peroxidases*. Biochim. Biophys. Acta 1289, 397-403.

Lee, M.J.Y.; Wang, Y.; Jiang, Y.; Li, X.; Ma, J.; Tan, H.; Turner-Wood, K.; Rahman, M.N.; Chen, G.; Jia, Z. (2017). *Function Coupling Mechanism of PhuS and HemO in Heme Degradation*. Scientific Reports 7, 11273.

Morales Urrea, D.A.; Haure, P.M.; García Einschlag, F.S.; Contreras, E.M. (2018a). *Horseradish peroxidase-mediated decolourization of Orange II: modelling hydrogen peroxide utilization efficiency at different pH values*. Environ. Sci. Pollut. Res. 25, 19989-20002.

Morales Urrea, D.A.; Haure, P.M.; Contreras, E.M. (2018b). *Monitoring the enzymatic oxidation of xenobiotics by hydrogen peroxide through oxidation-reduction potential measurements*. Ind. Eng. Chem. Res. 57, 16518-16525.

Ortiz de Montellano, P.R. (2010). *Catalytic Mechanisms of Heme Peroxidases*. En: Biocatalysis Based on Heme Peroxidases (Torres E.; Ayala M.; Eds.) Springer-Verlag, Berlin.

Rodriguez-Lopez, J.N.; Hernandez-Ruiz, J.; Garcia-Canovas, F.; Thorneley, R.N.F.; Acosta, M.; Arnao, M.B. (1997). *The Inactivation and Catalytic Pathways of Horseradish Peroxidase with m-Chloroperoxybenzoic Acid. A spectrophotometric and transient kinetic study*. J. Biol. Chem. 272, 5469-5476.

Sahare, P.; Ayala, M.; Vazquez-Duhalt, R.; Pal, U.; Loni, A.; Canham, L.T.; Osorio, I.; Agarwal, V. (2016). *Enhancement of peroxidase stability against oxidative self-inactivation by co-immobilization with a redox-active protein in mesoporous silicon and silica microparticles*. Nanoscale Res. Lett. 11, 417-427.

Straathof, A.J.; Panke, S.; Schmid, A. (2002). *The production of fine chemicals by biotransformations*. Curr. Opin. Biotechnol. 13, 548-56.

Supriya, B.S.; Nagaraja, P.; Shashikanth, S.; Ningaraju, M.K.; Chamaraja, N.A.; Byrappa, K. (2016). *Evaluation of Horseradish Peroxidase Activity Using 3-Methyl-2-Benzothiazolinone Hydrazone Hydrochloride Monohydrate and N-(1-Naphthyl) Ethylenediamine Dihydrochloride as Co-Substrates. Application In Vegetable Extracts*. J. Chem. Bio. Phy. Sci. 6, 172-183.

Tanaka, M.; Matsuura, K.; Yoshioka, S.; Takahashi, S.; Ishimori, K.; Hori, H.; Morishima, I. (2003). *Activation of Hydrogen Peroxide in*

Horseradish Peroxidase Occurs within ~200 ms Observed by a New Freeze-Quench Device. Biophysical Journal 84, 1998-2004.

Valderrama, B. (2010). *Deactivation of Hemeperoxidases by Hydrogen Peroxide: Focus on Compound III*. En: Biocatalysis Based on Heme Peroxidases (Torres, E.; Ayala, M.; Eds.) Springer-Verlag; Berlin.

Wohlgemuth, R. (2011). *Green Production of Fine Chemicals by Isolated Enzymes (Chapt. 11)*. En: Biocatalysis for Green Chemistry and Chemical Process Development. (Tao, J.; Kazlauskas R.; Eds.) Wiley Online Library.