

**Atf İçin:** Gerni, S. (2025). Karboksilik Asit Bağlantılı Tiyazol Türevlerinin Laktoperoksidaz (LPO) Enzimi Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 15(4), 1472-1479.

**To Cite:** Gerni, S. (2025). Investigation of The Effects of Carboxylic Acid-Linked Thiazole Derivatives on Lpo Enzyme. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 15(4), 1472-1479.

## Karboksilik Asit Bağlantılı Tiyazol Türevlerinin Laktoperoksidaz Enzimi Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması

Serpil GERNİ<sup>1\*</sup>

### **Öne Çıkanlar:**

- Tiyazol grubu taşıyan moleküller tercih edildi.
- Tiyazol türevlerinin laktoperoksidaz enzimi üzerindeki inhibitör etkileri incelendi.
- Tiyazol 5-karboksilik asit en yüksek inhibitör etkiyi gösterdi.

### **Anahtar Kelimeler:**

- Laktoperoksidaz
- Tiyazol Türevleri
- İnhibisyon
- Sığır Sütü

### **ÖZET:**

Bu çalışmada, karboksilik asit fonksiyonel grubuna sahip tiyazol türevlerinin Laktoperoksidaz (LPO) enzimi üzerindeki inhibitör etkileri detaylı olarak incelenmiştir. Enzim saflaştırma işlemi, sığır sütünden elde edilen LPO'nun Sepharose 4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolon kromatografisi ile başarılı bir şekilde izole edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. İnhibisyon çalışmalarında substrat olarak 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) kullanılmış ve elde edilen kinetik veriler doğrultusunda, karboksilik asit içeren tiyazol türevlerinin LPO enzim aktivitesini etkili biçimde inhibe ettiği belirlenmiştir. Test edilen beş farklı tiyazol türevinin inhibisyon parametreleri değerlendirilmiş; bileşiklerin  $K_i$  değerleri sırasıyla  $1.734 \pm 0.810 \mu\text{M}$ ,  $1.988 \pm 0.934 \mu\text{M}$ ,  $1.226 \pm 0.148 \mu\text{M}$ ,  $1.128 \pm 0.053 \mu\text{M}$  ve  $3.818 \pm 0.264 \mu\text{M}$  olarak saptanmıştır. Yapılan inhibitör tip analizleri sonucunda yalnızca 2-bromo-tiyazol-5-karboksilik asidin (a) yarışmalı (kompetitif) inhibisyon mekanizması gösterdiği, diğer dört bileşimin ise yarışmasız (nonkompetitif) inhibitör olarak davrandığı belirlenmiştir. Özellikle tiyazol-5-karboksilik asit türevi (d),  $1.128 \pm 0.053 \mu\text{M}$ 'lik en düşük  $K_i$  değeri ve  $2.840 \mu\text{M}$ 'lik  $IC_{50}$  değeri ile çalışmada en güçlü inhibitör etkiyi gösteren bileşik olmuştur. Bu sonuç, söz konusu bileşimin LPO enzimi için potansiyel bir inhibitör aday olarak değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır.

## Investigation of the Effects of Carboxylic Acid-Linked Thiazole Derivatives on the Lactoperoxidase Enzyme

### **Highlights:**

- Molecules bearing thiazole groups were preferred.
- The inhibitory effects of thiazole derivatives on the lactoperoxidase enzyme were examined.
- Thiazole 5-carboxylic acid showed the highest inhibitory effect

### **Keywords:**

- Lactoperoxidase
- Thiazole Derivatives
- Inhibition
- Bovine Milk

### **ABSTRACT:**

In this study, the inhibitory effects of thiazole derivatives containing a carboxylic acid functional group on the lactoperoxidase (LPO) enzyme were investigated in detail. LPO was successfully purified from bovine milk using Sepharose 4 B-L-tyrosine-sulfanilamide affinity column chromatography. In the inhibition studies, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) was used as the substrate. Based on the obtained kinetic data, it was determined that thiazole derivatives bearing a carboxylic acid group effectively inhibited LPO enzyme activity. The inhibition parameters of five different thiazole derivatives were evaluated, and their  $K_i$  values were determined as  $1.734 \pm 0.810 \mu\text{M}$ ,  $1.988 \pm 0.934 \mu\text{M}$ ,  $1.226 \pm 0.148 \mu\text{M}$ ,  $1.128 \pm 0.053 \mu\text{M}$ , and  $3.818 \pm 0.264 \mu\text{M}$ , respectively. Inhibitor type analyses revealed that only 2-bromothiazole-5-carboxylic acid (a) exhibited a competitive inhibition mechanism, while the remaining four compounds acted as non-competitive inhibitors. Notably, the thiazole-5-carboxylic acid derivative (d) demonstrated the strongest inhibitory effect in the study, with the lowest  $K_i$  value of  $1.128 \pm 0.053 \mu\text{M}$  and an  $IC_{50}$  value of  $2.840 \mu\text{M}$ . These results suggest that this compound may serve as a promising inhibitor candidate for the LPO enzyme.

<sup>1</sup> Serpil GERNİ (Orcid ID: 0000-0001-7699-1697), Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Erzurum, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Serpil GERNİ, e-mail: gerni-serpil@outlook.com

## GİRİŞ

Peroksidazlar (POD), geniş uygulama potansiyeline sahip oksidoredüktaz enzim ailesinin önemli bir üyesidir ve tüm hücre tiplerinde yaygın olarak dağılım göstermektedir (Oztekin ve ark., 2019). Çeşitli biyolojik kaynaklardan (bakteriler, mayalar, yüksek bitkiler, mantarlar, süt ve süt ürünleri dahil olmak üzere) elde edilebilen bu enzimler, biyolojik sistemlerde metabolik süreçler sonucu oluşan ve oksitleyici özelliklere sahip olan hidrojen peroksitin ( $H_2O_2$ ) uzaklaştırılmasında kritik bir rol üstlenirler. Hücrelerde antioksidan savunma mekanizmalarının temel bileşenleri olan katalaz ve peroksidaz enzimleri,  $H_2O_2$ 'nin zararlı etkilerini bertaraf ederek hücrel homeostazın korunmasına katkıda bulunurlar (Almaz ve ark., 2021).

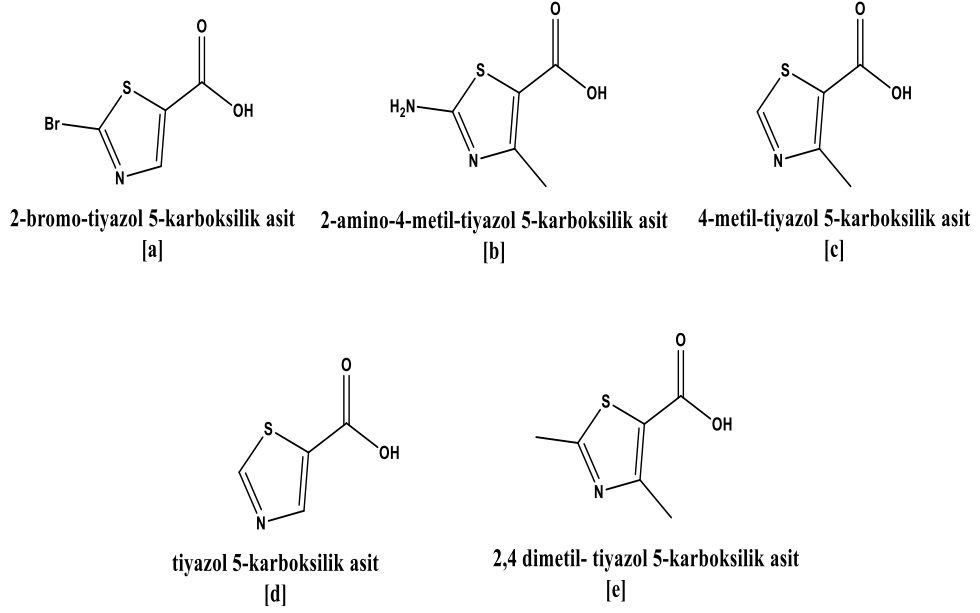
Laktoperoksidaz (LPO: EC 1.11.1.7), tüm memeli sütünde doğal olarak bulunan bir peroksidaz enzimidir (Kalın ve ark., 2022; Bayrak ve ark., 2024). Sütten elde edilen bu peroksidaz enzimi, tükürük ve gözyaşında bulunan peroksidazlarla benzer karakteristik özellikler sergilemektedir. LPO, sığır sütünde ksantin oksidazdan sonra en yüksek konsantrasyonda bulunan enzimdir (De Wit ve van Hooydonk, 1996) ve aynı zamanda sütteki temel enzim olarak kabul edilmektedir (Arnold, 1881; Köksal ve ark., 2016). Yaklaşık 78 kDa moleküler kütleyle sahip olan LPO,  $H_2O_2$  ile tiyosiyanatın ( $SCN^-$ ) hipotiyosiyanite ( $OSCN^-$ ) dönüşümünü katalize eden tek zincirli, hem içeren bir glikoproteindir (Abul ve ark., 2023). Ayrıca LPO, yenidoğan bebeklerin gastrointestinal sistemindeki savunma mekanizmalarında kritik bir rol üstlenerek patojenik mikroorganizmalara karşı koruyucu etki gösteren bir enzimdir (Kavaz ve ark., 2022; Gerni ve ark., 2024).

Tiyazol, elektron veren (-S-) ve elektron alan (C=N) grupları içeren beş üyeli heterosiklik bir halkadır. Tiyazol halkası içeren moleküllerin sentezi, tiyazol türevlerinin farmasötik ve ziraat endüstrilerindeki yaygın uygulamaları ve bu uygulamaların temelini oluşturan biyolojik aktiviteleri nedeniyle gittikçe daha önemli bir hale gelmektedir (Zhou ve ark., 2015). Tiyazol iskeleti farmasötik kimyada en çok çalışılan farmakofor grupları arasındadır ve bugün tiyazol çekirdeğini içeren birçok ilaç molekülü bilinmektedir (Singh ve ark., 2022). Tiyazol çekirdeği taşıyan bileşiklerin antimikrobiyal (Nural 2018; Al-Shemary ve ark., 2023), antikanser (Al-Shemary ve ark., 2023), antioksidan (Alfi ve ark., 2022), DNA parçalanması (Doğan ve ark., 2021) vb. gibi etkilerin yanı sıra CAs (Sever ve ark., 2021; Efeoglu ve ark., 2024), AChE (Efeoglu ve ark., 2024),  $\alpha$ -glukozidaz (Taha ve ark., 2023), BChE (Hussain ve ark., 2022; Khan ve ark., 2023) ve  $\alpha$ -amilaz (Mor ve ark., 2022) enzim inhibitör aktivitesi gösterdiği bilinmektedir.

Bu çalışmada, karboksilik asite bağlı tiyazol türevlerinin LPO enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkileri belirlendi. Karboksilik asite bağlı tiyazol türevlerinin  $IC_{50}$ ,  $K_i$  değerleri ve inhibisyon tipi bulundu.

## MATERYAL VE METOT

Çalışmada kullanılan sığır sütü yerel bir marketten temin edilmiştir. Amberlit CG-50-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, CNBr ile aktive edilmiş Sepharose 4B, L-tirozin, sülfanilamid, 2-bromo tiyazol 5-karboksilik asit(a), 2-amino 4-metil tiyazol 5-karboksilik asit(b), 4-metil tiyazol 5-karboksilik asit(c), tiyazol 5-karboksilik asit(d) ve 2,4-dimetil tiyazol 5-karboksilik asit(e) bileşikleri Sigma-Aldrich'ten ticari olarak temin edildi.



Şekil 1. Karboksilik asite bağlı tiyazol türevlerinin yapıları

### LPO Aktivitesinin Ölçümü

LPO enzim aktivitesi, Shindler ve Bardsley (1975) tarafından oluşturulan ve substrat olarak kullanılan 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS)'nin  $H_2O_2$  tarafından oksidasyonu ve renkli bileşiğin 412 nm'deki absorpsiyon artışının belirlenmesine dayanan yöntemin bazı modifikasyonları yoluyla değerlendirildi (Abul ve ark., 2023).

### LPO'nun saflaştırılması

LPO enziminin saflaştırılması amacıyla kullanılan yöntem şu şekilde uygulandı: Öncelikle yağsız sığır sütü, 4 °C'de 2000 × g kuvvetinde 15 dakika boyunca santrifüj edilerek yağ fazı ve tortu uzaklaştırıldı. Elde edilen süt örneği, 4,4 g/150 mL oranında Amberlite CG-50  $NH_4^+$  iyon değişim reçinesi ile yaklaşık 2 saat boyunca muamele edildi (Kumar ve ark., 1995). Reçine daha sonra sırasıyla damıtılmış su ve 0.5 mM sodyum asetat tamponu (pH 6.8) ile yıkanarak iyonik kalıntılardan arındırıldı. Elüsyon işlemi 2.0 M sodyum asetat çözeltisi (pH 6.8) kullanılarak gerçekleştirildi. Hazırlanan homojenat Sepharose 4B-L-tirozin-sülfanilamid kolonu kullanılarak gerçekleştirildi. Afinite kolonu olarak hazırlanan bu sistem, 10 mM pH 6,8  $Na_2HPO_4$  çözeltisiyle dengelendi. Homojenatın kolona uygulanmasını takiben, kolon 400 mL, 25 mM pH 6.8  $Na_2HPO_4$  ile muamele edilerek yıkandı. Bağlı enzimlerin elüsyonu ise  $NaCl/Na_2HPO_4$  çözeltisi (1 M/0.25 M, pH 6.8) kullanılarak gerçekleştirildi ve fraksiyonlar toplandı (Gerni ve ark., 2023; Bayrak ve ark., 2024).

### LPO üzerindeki karboksilik asite bağlı tiyazol türevlerinin inhibisyon çalışmaları

[a], [b], [c], [d] ve [e] LPO enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerini değerlendirmek amacıyla, spektrofotometrik bir yöntem kullanılarak bu moleküllere ait kinetik parametreler ( $IC_{50}$  ve  $K_i$  değerleri) belirlendi.  $IC_{50}$  değeri, enzimin aktivitesini %50 oranında azaltan inhibitör konsantrasyonunu ifade etmektedir. %Aktivite - İnhibitör konsantrasyonu grafikleri üzerinden türetilen denklemler kullanılarak, her bir molekülün  $IC_{50}$  değerleri belirlendi (Köksal ve ark., 2024).  $IC_{50}$  değerlerinin saptanması amacıyla, sabit bir substrat konsantrasyonu varlığında beş farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak LPO enzim aktivitesi analiz edildi.

LPO enzim aktivitesi, inhibisyon sabitini ( $K_i$ ) belirlemek amacıyla beş farklı sabit substrat konsantrasyonu ve her bir molekül için üç farklı inhibitör konsantrasyonunda incelendi. Elde edilen kinetik verilerden Lineweaver-Burk grafikleri oluşturulmuş ve bu grafikler aracılığıyla her bir inhibitör

molekülünün  $K_i$  değeri ile inhibisyon türü tespit edildi (Lineweaver and Burk., 1934; Gerni ve ark., 2023).

## BULGULAR VE TARTIŞMA

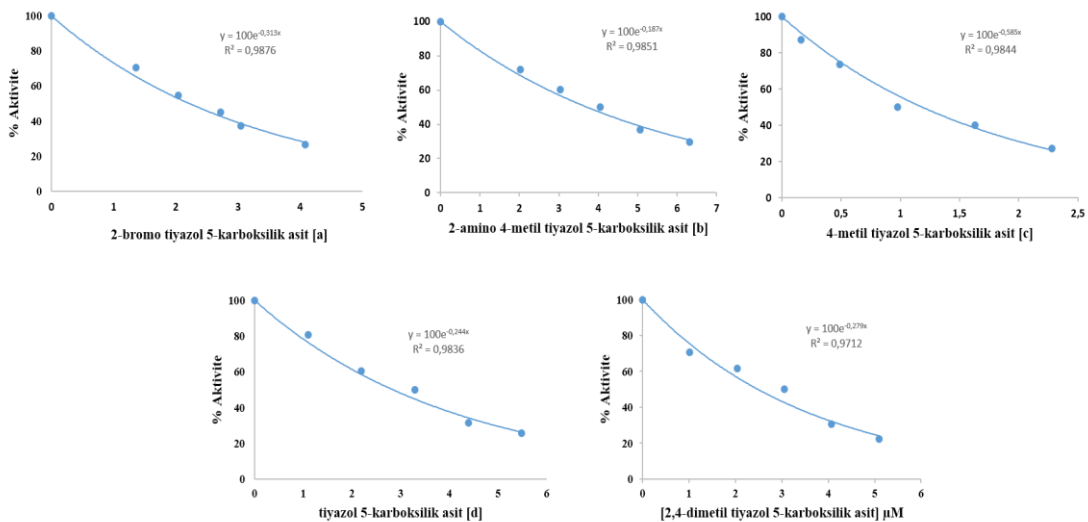
Süt, yeni doğan memelileri ve kendisini zararlı mikroorganizmalara karşı koruyan çeşitli bileşenleri içermektedir (Köksal ve ark., 2017a). Bu bileşenlerden biri olan laktoperoksidaz (LPO), oksidoredüktaz aktivitesine sahip olup sütte tanımlanan ilk enzim olma özelliğini taşımaktadır. Sütte mevcut olan LPO (EC 1.11.1.7), yenidoğanların bağırsak ve meme dokularını patojenik mikroorganizmalara karşı korumanın yanı sıra, metabolik süreçlerde bakteriyel proliferasyonu inhibe etme ve baskılama işlevini de yerine getirmektedir (Korkmaz et al., 2025).

Daha önce literatürde LPO inhibitörü olarak test edilen bazı bileşiklerin (hidrazin, sülfanilamid, tiyazol, metil benzoat, fenolik bileşikler) LPO inhibitörü olduğu tespit edilmiştir (Köksal ve ark., 2017b; Korkmaz 2022; Kavaz ve ark., 2022; Abul ve ark., 2023; Gerni ve ark., 2024). Ancak literatürde karboksilik asite bağlı tiyazol bileşiklerinin LPO üzerindeki inhibitör etkisini inceleyen hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Elde edilen bu veriler doğrultusunda, karboksilik asit içeren tiyazol türevlerinin LPO enzim aktivitesi üzerindeki etkilerine ait parametreler saptandı (Çizelge 1).

**Çizelge 1.** Bileşiklerin LPO enzim üzerine inhibisyon sonuçları

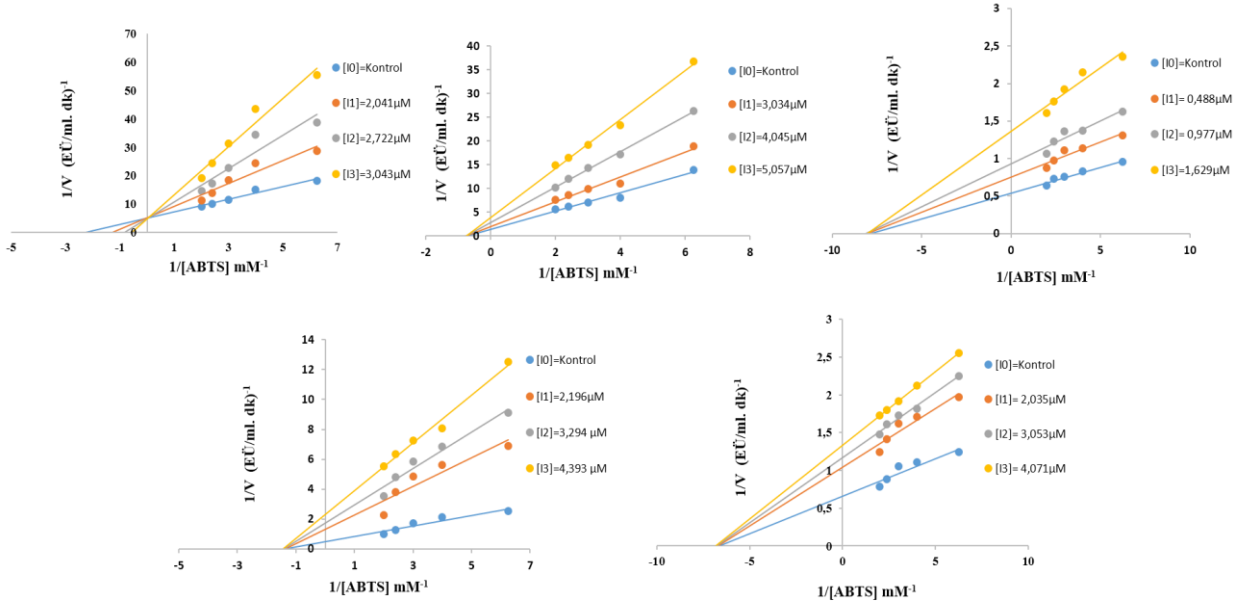
Bileşikler	IC <sub>50</sub> (µM)	K <sub>i</sub> (µM)	İnhibisyon Tipi
a	2.214	1.734 ± 0.810	Yarışmalı
b	3.705	1.988 ± 0.934	Yarışmasız
c	1.184	1.226 ± 0.148	Yarışmasız
d	2.840	1.128 ± 0.053	Yarışmasız
e	2.483	3.818 ± 0.264	Yarışmasız

(a), (b), (c), (d), (e) bileşiklerin farklı konsantrasyonlarda aktiviteleri ölçülmüş ve bu verilere dayanarak çizilen grafiklerden IC<sub>50</sub> değerleri saptanmıştır (Şekil 2). Bu değerler sırasıyla (a) 2.214 µM, (b) 3.705 µM, (c) 1.184 µM, (d) 2.840 µM ve (e) 2.483 µM olup, ilgili tiyazol moleküllerine aittir (Çizelge 1).



**Şekil 2.** LPO enziminin karboksilik asite bağlı tiyazol türevlerinin Aktivite(%)-[İnhibitör] grafikleri

Aktivite ölçümlerinden elde edilen verilerle çizilen Lineweaver-Burk eğrileri (Şekil 3) aracılığıyla, karboksilik asite bağlı tiyazol türevlerinin  $K_i$  değerleri ve inhibisyon türleri tespit edilmiştir. Tiyazol moleküllerine ait  $K_i$  değerleri (a), (b), (c), (d) ve (e) için sırasıyla  $1.734 \pm 0.810 \mu\text{M}$ ,  $1.988 \pm 0.934 \mu\text{M}$ ,  $1.226 \pm 0.148 \mu\text{M}$ ,  $1.128 \pm 0.053 \mu\text{M}$  ve  $3.818 \pm 0.264 \mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir (Çizelge 1). 2- bromo tiyazol 5-karboksilik asit (a) molekülü yarışmalı inibisyon tipi gösterirken, diğer moleküller yarışmasız inibisyon tipi göstermiştir.



Şekil 3. LPO enziminin karboksilik asite bağlı tiyazol türevleri için 1/V ve 1/[S] grafikleri

Literatürde tiyazol türevlerinin çeşitli enzimler üzerindeki inhibitör etkilerine dair birçok çalışma bulunmaktadır. Örneğin, Efeoğlu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada tiyazol-naftokinon hibrit bileşiklerinin karbonik anhidraz (CA) ve kolinesteraz (ChE) enzimleri üzerindeki inhibitör aktiviteleri değerlendirilmiştir; bu bileşiklerin butirilkolinesteraz (BChE) için  $45.03\text{--}84.43 \text{ nM}$ , asetilkolinesteraz (AChE) için  $26.12\text{--}98.42 \text{ nM}$ , hCA I için  $67,86\text{--}161,60 \text{ nM}$  ve hCA II için  $55.27\text{--}87.48 \text{ nM}$  aralığında  $K_i$  değerlerine sahip olduğu bildirilmiştir (Efeoğlu ark. 2024). Benzer şekilde, Biçer ve arkadaşları, 4-fenil-2-aminotiyazol türevlerinin AChE ve CA izoenzimlerine karşı nanomolar düzeyde güçlü inhibitör etkiler göstermiştir (Biçer ve ark., 2024). Diğer bir çalışmada, Sever ve arkadaşları tiyazol bazlı yeni bileşiklerin aldoz redüktaz enzimi üzerindeki etkilerini araştırmış; bu bileşiklerin mikromolar düzeyde güçlü inhibitör aktiviteye sahip olduğunu ve etkinliklerinin referans inhibitör kuersetin ile karşılaştırılabilir olduğunu ortaya koymuştur (Sever ve ark., 2020). Her ne kadar bu enzimlerin biyolojik rolleri LPO enzimiyle farklılık gösterse de, söz konusu çalışmalar tiyazol iskeletinin genel inhibitör potansiyelini açıkça ortaya koymakta ve bu bileşiklerin geniş bir biyolojik etki yelpazesinde değerlendirilebileceğine işaret etmektedir.

LPO enzimi üzerindeki inhibitör etkileri değerlendirmeye yönelik literatürde çeşitli molekül sınıflarıyla yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Örneğin, Köksal ve arkadaşları, tiyazol, pirimidin, piridin, izoksazol ve tiadiazol gruplarını içeren sekonder sülfonamid türevlerini sentezlemiş ve bu bileşiklerin LPO üzerindeki in vitro inhibitör etkilerini incelemiştir. Elde edilen bulgulara göre, bu bileşiklerin  $K_i$  değerleri  $1.096 \times 10^{-3}$  ile  $1203.83 \mu\text{M}$  arasında değişmekte olup, inhibitör potansiyellerinin oldukça geniş bir aralıkta dağıldığı görülmüştür (Köksal ve ark., 2017b). Korkmaz tarafından yapılan bir çalışmada ise 2-amino tiyazol türevlerinin LPO üzerindeki etkilerini analiz etmiş ve bu türevlerin  $0,39 \pm 0,05\text{--}0,67 \pm 0,06 \mu\text{M}$  aralığında değişen  $K_i$  değerleriyle güçlü inhibitör

özellikler gösterdiğini bildirmiştir (Korkmaz 2022). Benzer şekilde, Köksal ve arkadaşları tarafından yürütülen bir diğer çalışmada, bazı karnasol ve karnosik asit türevlerinin LPO enzimine karşı inhibisyon parametreleri değerlendirilmiş ve bu bileşiklerin  $K_i$  değerleri  $34.64 \pm 1.93$  ile  $392.9 \pm 59.3$   $\mu\text{M}$  arasında bulunmuştur (Köksal ve ark., 2024). Ayrıca Korkmaz ve ekibi, bazı fenolik antrakinin türevlerinin LPO enzimi üzerindeki inhibitör etkilerini araştırmış ve bu bileşiklerin  $0,4964 \pm 0,042$  ile  $2.0907 \pm 0.1044$   $\mu\text{M}$  aralığında değişen  $K_i$  değerleri ile rekabetçi inhibitörler olduğunu raporlamıştır (Korkmaz ve ark., 2025). Bu bağlamda, yürüttüğümüz çalışmada elde edilen  $1.128 \pm 0.053$   $\mu\text{M}$  ve  $3.818 \pm 0.264$   $\mu\text{M}$  aralığındaki  $K_i$  değerleri, literatürde bildirilen birçok güçlü inhibitörle benzer düzeyde olup, tiyazol türevlerinin LPO enzimi üzerindeki inhibitör potansiyelini bir kez daha teyit etmektedir. Bu sonuçlar, tiyazol temelli bileşiklerin LPO inhibitörleri olarak değerlendirilmesinde önemli bir katkı sağlamaktadır.

## SONUÇ

Bu çalışma, karboksilik asit fonksiyonel grubu içeren tiyazol türevlerinin LPO enzimi üzerindeki inhibitör etkilerini sistematik olarak değerlendiren özgün bir enzim inhibisyon araştırmasıdır. LPO enzimi; süt, tükürük ve gözyaşı gibi vücut sıvılarında doğal olarak bulunan, oksidoredüktaz sınıfına ait bir enzim olup, başta patojen mikroorganizmalara karşı olmak üzere çeşitli antimikrobiyal savunma mekanizmalarında kritik rol üstlenmektedir. Bu biyolojik önemi nedeniyle LPO, gıda güvenliği, kozmetik formülasyonları ve sağlık sektöründeki uygulamalarda biyolojik katkı maddesi olarak geniş bir kullanım alanına sahiptir. Çalışmada, karboksilik asit grubu taşıyan beş farklı tiyazol türevi LPO enzimi ile etkileştirilmiş ve inhibitör etkileri detaylı olarak incelenmiştir. Elde edilen bulgular, özellikle tiyazol 5-karboksilik asit türevinin düşük  $K_i$  değeriyle en güçlü inhibisyon etkisini gösterdiğini ortaya koymuştur. Literatürde karboksilik asit içeren tiyazol türevlerinin LPO enzime karşı inhibitör etkilerini inceleyen bir çalışmaya daha önce yer verilmemiş olması nedeniyle bu araştırma, literatüre öncü ve özgün bir katkı sunmaktadır. Bu kapsamda, tiyazol türevlerinin LPO üzerindeki etkilerinin daha geniş bir molekül yelpazesıyla araştırılması, inhibitör etki mekanizmalarının moleküler modelleme ve docking çalışmalarıyla desteklenmesi ve elde edilen bileşiklerin in vivo sistemlerde doğrulanmasına yönelik ileri çalışmalar yapılması önerilmektedir.

## Çıkar Çatışması

Makalede herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Abul, N., Gerni, S., Korkmaz, I. N., Demir, Y., Özdemir, H., Gülçin, İ. (2023). Screening of in vitro inhibition of lactoperoxidase enzyme by methyl benzoate derivatives with molecular docking studies. *Chemistry & Biodiversity*, 20(8), e202300687.
- Alfi, A. A., Alharbi, A., Qurban, J., Abualnaja, M. M., Abumelha, H. M., Saad, F. A., El-Metwaly, N. M. (2022). Molecular modeling and docking studies of new antioxidant pyrazole-thiazole hybrids. *Journal of Molecular Structure*, 1267, 133582.
- Almaz, Z., Oztekin, A., Abul, N., Gerni, S., Erel, D., Kocak, S. M., Sengül, M. E., Ozdemir, H. (2021). A new approach for affinity-based purification of horseradish peroxidase. *Biotechnology and applied biochemistry*, 68(1), 102-113.
- Al-Shemary, R. K., Mohapatra, R. K., Kumar, M., Sarangi, A. K., Azam, M., Tuli, H. S., Ansari, A., Mohapatra, P.K., Dhama, K. (2023). Synthesis, structural investigations, XRD, DFT, anticancer and molecular docking study of a series of thiazole based Schiff base metal complexes. *Journal of Molecular Structure*, 1275, 134676.

- Arnold, C. (1881). Einige neue reactionen der Milch. *Archiv der Pharmazie*, 219(1), 41-42.
- Bayrak, S., Gerni, S., Öztürk, C., Almaz, Z., Bayrak, Ç., Kılınç, N., Özdemir, H. (2024). Lactoperoxidase Inhibition of Celecoxib Derivatives Containing the Pyrazole Linked-Sulfonamide Moiety: Antioxidant Capacity, Antimicrobial Activity, and Molecular Docking Studies. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 38(11), e70055.
- Biçer, A., Çağlayan, C., Demir, Y., Türkeş, C., Altundaş, R., Akyıldız, H., Beydemir, Ş. (2024). Synthesis of N-substituted 4-phenyl-2-aminothiazole derivatives and investigation of their inhibition properties against hCA I, II, and AChE enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 761, 110159.
- De Wit, J. N., & Van Hooydonk, A. C. M. (1996). Structure, functions and applications of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 50.
- Doğan, A., Özdemir, S., Yalcin, M., Sari, H., Nural, Y. (2021). Naphthoquinone-thiazole hybrids bearing adamantane: Synthesis, antimicrobial, DNA cleavage, antioxidant activity, acid dissociation constant, and drug-likeness. *Journal of Research in Pharmacy*, 25(3).
- Efeoglu, C., Selcuk, O., Demir, B., Sahin, E., Sari, H., Türkeş, C., Demir, Y., Nural, Y., Beydemir, Ş. (2024). New naphthoquinone thiazole hybrids as carbonic anhydrase and cholinesterase inhibitors: Synthesis, crystal structure, molecular docking, and acid dissociation constant. *Journal of Molecular Structure*, 1301, 137365.
- Gerni, S., Öztürk, C., Kılınç, N., Özdemir, H., Küfrevioğlu, Ö. İ. (2024). Unveiling the Suppressive Potential of Phenolic Compounds on Bovine Milk Lactoperoxidase. *ChemistrySelect*, 9(11), e202304844.
- Hussain, R., Ullah, H., Rahim, F., Sarfraz, M., Taha, M., Iqbal, R., Rehman, W., Khan, S., Shah, S.A.A., Hyder, S., Alhomrani, M., Alamri, A.S., Abdulaziz, O., Abdelaziz, M. A. (2022). Multipotent cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: Synthesis, biological analysis and molecular docking study of benzimidazole-based thiazole derivatives. *Molecules*, 27(18), 6087.
- Jagadale, S. M., Abhale, Y. K., Pawar, H. R., Shinde, A., Bobade, V. D., Chavan, A. P., Sarkar, D., Mhaske, P. C. (2022). Synthesis of new thiazole and pyrazole clubbed 1, 2, 3-triazol derivatives as potential antimycobacterial and antibacterial agents. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 42(6), 3216-3237.
- Kalin, R., Köksal, Z., Bayrak, S., Gerni, S., Ozyürek, I. N., Usanmaz, H., Karaman, M., Atasever, A., Özdemir, H., Gülçin, İ. (2022). Molecular docking and inhibition profiles of some antibiotics on lactoperoxidase enzyme purified from bovine milk. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(1), 401-410.
- Kavaz, N. M., Erel, D., Korkmaz, I. N., Gerni, S., Abul, N., Bayrak, S., Köksal, Z., Kalin, R., Öztekin, A., Özdemir, H. (2022). A New Affinity Matrixe Synthesized from Aminobenzohydrazide Derivatives for Purification of Lactoperoxidase Enzyme. *ChemistrySelect*, 7(27), e202200657.
- Khan, S., Ullah, H., Taha, M., Rahim, F., Sarfraz, M., Iqbal, R., Iqbal, N., Hussain, R., Shah, S.A.A., Ayub, K., Albalawi, M.A., Abdelaziz, M.A., Alatawi, F.S., Khan, K. M. (2023). Synthesis, DFT studies, molecular docking and biological activity evaluation of thiazole-sulfonamide derivatives as potent Alzheimer's inhibitors. *Molecules*, 28(2), 559.
- Korkmaz, I. N. (2022). In Vitro Inhibition Effects of 2-Amino Thiazole Derivatives on Lactoperoxidase Enzyme Activity. *Cumhuriyet Science Journal*, 43(1), 33-37.

- Korkmaz, I. N., Şenol, H., Kalın, R. (2025). Inhibition Effects of Some Phenolic Anthraquinone Derivatives on Lactoperoxidase Activity: A Detailed in Vitro and in Silico investigation. *Food Biophysics*, 20(2), 1-17.
- Köksal, Z., Güller, P., Keskin, A. (2024). Lactoperoxidase inhibition by some carnosol and carnosic acid derivatives: In vitro, In silico and statistical approaches. *Food Bioscience*, 62, 105485.
- Köksal, Z., Kalın, R., Gerni, S., Gülçin, İ., Özdemir, H. (2017a). The inhibition effects of some natural products on lactoperoxidase purified from bovine milk. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 31(9), e21939.
- Köksal, Z., Kalın, R., Gülçin, İ., Özdemir, H., Atasever, A. (2016). Impact of some avermectins on lactoperoxidase in bovine milk. *International journal of food properties*, 19(6), 1207-1216.
- Köksal, Z., Kalın, R., Camadan, Y., Usanmaz, H., Almaz, Z., Gülçin, İ., Gökçen, T., Gören, A.C., Özdemir, H. (2017b). Secondary sulfonamides as effective lactoperoxidase inhibitors. *Molecules*, 22(6), 793.
- Kumar, R., Bhatia, K. L., Dauter, Z., Betzel, C. H., Singh, T. P. (1995). Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of lactoperoxidase from buffalo milk. *Biological Crystallography*, 51(6), 1094-1096.
- Lineweaver, H., & Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American chemical society*, 56(3), 658-666.
- Mor, S., & Khatri, M. (2022). Synthesis, antimicrobial evaluation,  $\alpha$ -amylase inhibitory ability and molecular docking studies of 3-alkyl-1-(4-(aryl/heteroaryl) thiazol-2-yl) indeno [1, 2-c] pyrazol-4 (1H)-ones. *Journal of Molecular Structure*, 1249, 131526.
- Nural, Y. (2018). Synthesis, antimycobacterial activity, and acid dissociation constants of polyfunctionalized 3-[2-(pyrrolidin-1-yl) thiazole-5-carbonyl]-2 H-chromen-2-one derivatives. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 149, 1905-1918.
- Oztekin, A., Almaz, Z., Gerni, S., Erel, D., Kocak, S. M., Sengül, M. E., Özdemir, 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.
- Sever, B., Altıntop, M. D., Demir, Y., Çiftçi, G. A., Beydemir, Ş., Özdemir, A. (2020). Design, synthesis, in vitro and in silico investigation of aldose reductase inhibitory effects of new thiazole-based compounds. *Bioorganic Chemistry*, 102, 104110.
- Sever, B., Türkeş, C., Altıntop, M. D., Demir, Y., Akalın Çiftçi, G., Beydemir, Ş. (2021). Novel metabolic enzyme inhibitors designed through the molecular hybridization of thiazole and pyrazoline scaffolds. *Archiv der Pharmazie*, 354(12), 2100294.
- Shindler, J. S., & Bardsley, W. G. (1975). Steady-state kinetics of lactoperoxidase with ABTS as chromogen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 67(4), 1307-1312.
- Singh, A., Malhotra, D., Singh, K., Chadha, R., Bedi, P. M. S. (2022). Thiazole derivatives in medicinal chemistry: Recent advancements in synthetic strategies, structure activity relationship and pharmacological outcomes. *Journal of Molecular Structure*, 1266, 133479.
- Taha, M., Hayat, S., Rahim, F., Uddin, N., Wadood, A., Nawaz, M., Gollapalli, M., Rehman, A.U., Khan, K.M., Farooq, R. K. (2023). Exploring thiazole-based Schiff base analogs as potent  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitor: their synthesis and in-silico study. *Journal of Molecular Structure*, 1287, 135672.
- Zhou, W., Ni, S., Mei, H., Han, J., Pan, Y. (2015). Cyclization reaction of N-allylbenzothioamide for direct construction of thiazole and thiazoline. *Tetrahedron Letters*, 56(27), 4128-4130.