

## Laktoperoksidaz Enziminin Farklı Kaynaklardan Saflaştırılması: Kapsaisin ve Pirogallol'ün İnhibisyon Profili

Zeynep KÖKSAL<sup>1</sup>

**ÖZET:** Peroksidazlar (POD), gıda ve ilaç endüstrisi başta olmak üzere metabolik fonksiyonlar, enzimatik reaksiyonlar ve klinik teşhislerde önemli kullanım alanına sahiptirler. Memeli POD enzimlerinden laktoperoksidaz (LPO) süt, tükürük ve gözyaşında (hidrojen peroksit oksidoredüktaz E.C 1.11.1.7) lokalize olurken, miyeloperoksidaz lökositler ve trombositlerde lokalizedir. LPO enzimi hidrojen peroksit eşliğinde tiyosiyanatın antibakteriyel özelliklere sahip hipotiyosiyanata dönüşümünü katalizler. Bu çalışmanın amacı, farklı memeli (Sığır, manda, koyun ve keçi) sütlerinden saflaştırılmış LPO enzimi üzerine kapsaisin ve pirogallolün *in vitro* etkilerini belirlemektir. Kapsaisin ve pirogallolün LPO enzimi üzerindeki inhibisyon etkisini belirlemek için her bir memeli sütünden LPO enzimi saflaştırıldı, daha sonra, enzim aktiviteleri ölçülerek her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi;  $K_i$  sabiti ve inhibisyon tipleri bu çizilen grafiklerden hesaplandı. Kapsaisin ve pirogallolün  $K_i$  değerleri 0.0035-36.178  $\mu\text{M}$  aralığında bulundu. Pirogallol, en etkili inhibitör özelliğini yarışmasız inhibisyon tipi ile koyun sütünden saflaştırılmış LPO enzimi üzerine  $0.0035 \pm 0.0012 \mu\text{M}$   $K_i$  değeri ile göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Enzim inhibisyonu, kapsaisin, laktoperoksidaz, memeli sütleri, pirogallol



## Lactoperoxidase Enzyme Purified from Different Milk Sources: Inhibition Profile of Capsaicin and Pyrogallol

**ABSTRACT:** Peroxidases (POD) have an important use in metabolic functions, enzymatic reactions and clinical diagnoses, especially in the food and pharmaceutical industry. Mammalian POD enzymes, Lactoperoxidase (LPO) (hydrogen peroxide oxidoreductase E.C. 1.11.1.7) is localized in milk, saliva and tears, while myeloperoxidase is localized in leukocytes and platelets. LPO enzyme catalyses the conversion of hypothiocyanate with antibacterial properties of thiocyanate in the presence of hydrogen peroxide. The purpose of this study was to determine the *in vitro* inhibition effects of capsaicin and pyrogallol on LPO enzyme purified from different milk sources (Bovine, buffalo, sheep and goat). To determine the inhibition effects of capsaicin and pyrogallol on LPO, LPO enzyme was purified from different mammalian milk and then, Lineweaver-Burk graphs were drawn for each inhibitor by measuring enzyme activities;  $K_i$  values and inhibition types were determined from these plotted graphs. The  $K_i$  values of capsaicin and pyrogallol were found in ranging of 0.0035-36.178  $\mu\text{M}$ . Pyrogallol was shown the most effective inhibitor feature with a non-competitive inhibition type with  $0.0035 \pm 0.0012 \mu\text{M}$   $K_i$  value on LPO enzyme purified from sheep milk.

**Keywords:** Capsaicin, enzyme inhibition, lactoperoxidase, mammalian milk, pyrogallol

<sup>1</sup> Zeynep KÖKSAL (0000-0001-8203-4623), İstanbul Medeniyet University, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Chemistry, İstanbul, Turkey  
Sorumlu yazar/Corresponding Author: Zeynep KOKSAL, zeynepkoksal77@gmail.com

## GİRİŞ

Eski çağlardan beri süt ve süt ürünlerinin beslenmede hayati bir role sahip olduğu ve insan sağlığına önemli katkıda bulunduğu bilinmektedir. İmmünoglobülinler, enzimler, hormonlar, büyüme faktörleri, antibakteriyel maddeler, yağ asitleri, vitaminler ve mineralleri içeren zengin içeriğinden dolayı yaşam üzerinde çok önemli etkileri vardır (Koksal et al., 2016).

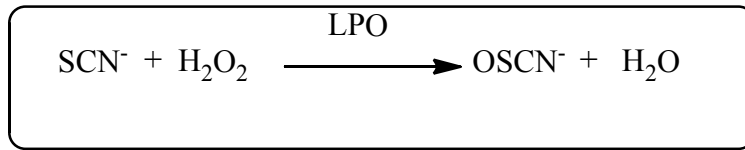
Peroksidazlar (POD:  $H_2O_2$ -Oksidoredüktaz E.C.1.11.1.7), oksidoredüktaz enzimleridir ve metabolizma sırasında oluşan reaktif oksijen türlerini katalize eder ve zararsız moleküllere dönüştürürler (Davies, 1995). Bunlar, antioksidan özellikler sergilemekte ve elektron alıcısı olan hidrojen peroksit ile birlikte organik ve inorganik substratların oksidasyonunu katalizlemektedir (Hussain et al., 1995). Bu enzimler ökaryotlarda, prokaryotlarda ve fotosentetik hücrelerde bulunurlar (Van Huystee, 1987).

LPO enzimi genellikle insan, sığır, manda, keçi, koyun, lama, inek, deve ve fare gibi memelilerde,

tükürük, gözyaşları, meme, tükürük ve gözyaşı bezlerinde bulunur (Koksal et al., 2017).

Laktoperoksidaz (LPO, E.C. 1.11.1.7) oksidoredüktaz aktivitesi olan sütün önemli enzimlerinden biridir. Sütten izole edilen peroksidaza laktoperoksidaz adı verilmiştir (Reiter and HaÈrnulv, 1984) ve sütte bulunduğu bildirilen ilk enzimdir (Arnold, 1881). Enzimin ana işlevi, hidrojen peroksit varlığında moleküllerin oksidasyonunu katalize etmek ve geniş bir antimikrobiyal aktivite ile ürünlerin üretimine yardımcı olmaktır. Psödohalojenler, tiyosiyanatlar veya halojenler, enzim için bu gibi antimikrobiyal etkileri gösteren ikinci substratlar olarak işlev görürler (Reiter and Perraudin, 1991).

LPO enzimi, sığır sütünde önemli bir koruyucu etki göstermektedir. Sistemin aktivasyonu iki reaksiyon maddesinin tiyosiyanat ve hidrojen peroksit konsantrasyonuna bağlıdır. Bu enzim hidrojen peroksit varlığında, tiyosiyanatın antibakteriyel özelliklere sahip hipotiyosiyanata dönüşmesini katalize eder (Haddain et al., 1996; Gulcin et al., 2006).



Pek çok çalışma, bu enzimin birçok bakteri ve mantar suşunu yok ettiğini göstermektedir (Gulcin et al., 2006). Laktoperoksidaz geniş bir antifungal aktiviteye sahiptir (Jacob 1998; Sisecioglu 2009). Mastit memelilerde bakteri inflamasyonudur. Birkaç antibakteriyel ve antifungal suş üzerinde farklı konsantrasyonlarda tiyosiyanat- $H_2O_2$  maddesinin etkileri, bu süt endüstrisi sorununu çözmek için incelenmiştir (Uguz and Ozdemir, 2005; Sisecioglu 2010). Bakteriyel büyümeyi hücre zarlarına zarar vererek ve çeşitli sitoplazmik enzimlerin aktivitelerini inhibe ederek azaltabilirler.

LPO enzimi % 8-10 karbonhidrattan oluşan bir glikoproteindir, 612 amino asidi ihtiva eden bir zincir içerir. Yaklaşık 78 kDa'lık molekül ağırlığına sahip tek bir polipeptit zincirinden oluşur (Ozdemir et al., 2001). İzoelektrik pH değeri 9.2 olan Prostetik grubu olarak hem içeren temel bir proteindir (Pourtois et al., 1991). Ayrıca, asidik pH'ta çok aktiftir (Wever et al., 1982). LPO molekülü oldukça hacimlidir (Sievers, 1980).

$Ca^{2+}$  iyonu enzimi dengede tutar.  $Ca^{2+}$  iyonu pH 5.0 altında kaybolur ve buda enzimin kararlılığını azaltır (Kussendrager and van Hooijdonk, 2000).

Bu enzimin biyolojik önemi, mikroorganizmaların istilasına karşı doğal bir koruma sistemi içermesidir. Bu antiviral etki yanında hayvan hücrelerini çeşitli zararlar ve peroksidatif etkilere karşı koruduğu bildirilmektedir (Reiter and HaÈrnulv, 1980; Wolfson and Sumner, 1993). Laktoperoksidaz, yenidoğan bebeklerinin sindirim sistemindeki patojen mikroorganizmalara karşı savunma sisteminin önemli bir ajanıdır. LPO enzimi, memelilerin immün olmayan biyolojik savunma sisteminin doğal bir bileşeni olarak işlev görür ve tiyosiyanat iyonunun antibakteriyel hipotiyosiyanata oksidasyonunu katalize eder (Kumar and Bhatla, 1995).

Fenolik maddeler en önemli doğal antioksidan bileşiklerdir (Atamer et al., 1999) ve biyolojik, farmakolojik ve tıbbi özelliklerinden dolayı en önemli doğal maddelerdir. Antikanserojenik, antibakteriyel, antiviral, anti-inflamatuar etkilere sahiptirler. Aynı

zamanda güçlü antioksidan aktivite gösterirler. Şimdiye kadar, enzimlerin fenolik maddelerle etkileşimini incelemek için birçok çalışma yapılmıştır. Örneğin propofol, dimerik fenol türevlerinin antioksidan özelliklere sahip oldukları ve antioksidan gıda katkı maddeleri veya ilaçlar olarak kullanıldığı gösterilmiştir (de Wit and van Hooydonk, 1996; Wolfson and Sumner, 1993; Demir and Beydemir, 2015).

Örneğin, yapılan son araştırmada, ellajik asit, gallik asit, ferulik asit, kafeik asit, p- kumarik asit, p-hidroksibenzoik asit ve syrinjik asitin insan karbonik anhidraz I (hCAI) ve II (hCAII) izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi incelendi ve bu fenolik asitlerin, hCAI ve hCAII izoenzimleri üzerine güçlü inhibisyon etkisi olduğu gösterilmiştir (Sarıkaya et al., 2010). Başka bir çalışmada, farklı fenolik bileşiklerin glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ve 6-fosfoglukonat dehidrogenaz üzerindeki etkilerini incelemiştirler (Adem et al., 2014). Kafeik asit, ellajik asit, ferulik asit ve sinapik asitin her iki enzimin aktivitelerinde inhibisyon etkileri olduğunu ancak klorojenik asit, p-kumarik asit ve syrinjik asit'in iki enzim aktivitesinde bir etki göstermediğini bildirdiler (Adem et al., 2014). Ek olarak, Sarıkaya ve ark. (Sarıkaya et al. 2015) ellajik asit, gallik asit, ferulik asit, kafeik asit, p-kumarik asidin sığır LPO enzimi üzerindeki inhibisyon etkilerini araştırdılar. Bu çalışma bulgularına göre, fenolik asitler, sığır LPO enzimi üzerinde güçlü inhibisyon etkisi sergilemektedir (Sarıkaya et al., 2015).

Bununla birlikte, sığır sütünden saflaştırılmış LPO üzerine tannik asit, 3,4-dihidroksibenzoik asit, 3,5-dihidroksibenzoik asit, klorojenik asit, sinapik

asit, 4-hidroksibenzoik asit, vanilik asit, salisilik asit ve 3-hidroksibenzoik asidin etkileri araştırılmış, güçlü inhibisyon etkisi bulunmuştur (Koksal et al., 2016a). Bu çalışmada, yaygın olarak antioksidan gıda katkı maddeleri, ön ilaçlar veya ilaçlar olarak kullanılan basit fenolik maddelerin LPO üzerindeki inhibitör etkilerini araştırmayı amaçladık. Bu fenolik maddeler, önemli biyoaktif bileşiklerdir ve bunlar çeşitli farmakolojik faaliyetlerle ilişkilendirilirler. Bu amaçla LPO enzimi çeşitli memeli sütlerinden saflaştırılmış, daha sonra bu fenolik maddeler için IC<sub>50</sub> değerleri, K<sub>i</sub> sabitleri ve inhibisyon tipleri belirlenmiştir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

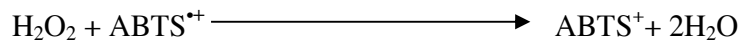
### Kimyasal maddeler ve malzemeler

Memeli sütleri ticari olarak satın alındı ve LPO bu sütlerden saflaştırıldı. Afinite Kolonu ve saflaştırma malzemeleri; CNBr-aktifleştirilmiş Sefaroz 4B, L-tirozin, sülfanilamid, Amberlit CG-50-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> reçine, Sığır serum albümin (BSA) (liyofilize toz). Kapsaisin, pirogallol ve diğer tüm kimyasallar Sigma-Aldrich şirketten temin edildi (Sigma-Aldrich Taufkirchen, Germany).

### Laktoperoksidaz Aktivitesinin Ölçümü

Aktivite ölçümü, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından 2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sulfonik asit) (ABTS) kromojenik substratın yükseltgenmesi ve oluşan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 412 nm'de izlenmesi esasına dayanır (Shindler and Bardsley, 1975).

LPO



(İndirgenmiş form)

(Yükseltgenmiş form)

Aktivite tayininde şu prosedür takip edildi: 3 mL'lik spektrofotometre küvetine 2.8 mL 1 mM ABTS ve 0.1 mL 3.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pipetlendi. 0.1 mL enzim çözeltisi ilave edilerek, küvet alt üst edildikten sonra spektrofotometreye yerleştirilerek köre karşı 412 nm'de absorbans artışı, 3 dakika süreyle her 60 saniyede bir olmak üzere kaydedildi. Kör olarak enzim çözeltisi yerine 0.1 M fosfat tamponu pH=6,0 konularak diğer çözeltiler aynı oranda kullanıldı. Aktivite hesabında 1 dakikalık absorbans artışı esas alınmıştır.

### Sığır, Manda, Koyun ve Keçi Sütlerinden Laktoperoksidaz Enziminin Saflaştırılma Prosedürü

Memeli sütlerinin yağının çıkarılması için sığır sütü, 3000 x g'da 4 ° C'de 15 dakika santrifüjlendi. Amberlit CG50NH<sub>4</sub><sup>+</sup> reçinesi, 4.4 g/ 150 mL oranında ilave edildi. Daha sonra reçine damıtılmış su ve sodyum asetat çözeltisi (0.5 mM, pH 6.8) ile yıkandı. Bağlanan proteinler, sodyum asetat çözeltisi (2 M, pH 6.8) ile yıkandı. Elde edilen madde saflaştırılmış LPO'yu elde

etmek için Sefaroz-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolonuna uygulandı (Koksal et al., 2016a).

### İn Vitro İnhibisyon Araştırmaları

Sabit substrat konsantrasyonunda (ABTS) 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda her bir inhibitör için aktivite değerleri hesaplandı, %Aktivite ve buradan %50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu değerleri  $IC_{50}$  çalışıldı. Daha sonra 5 farklı sabit substrat konsantrasyonun da ve her bir inhibitör için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Linewaver–Burk grafikleri yardımıyla  $K_i$  değerleri tespit edildi (Koksal et al., 2017; Koksal et al., 2016a)

### Protein Konsantrasyonu Belirleme

Protein konsantrasyonu sığır serum albüminin standart olarak kullanılması ile Bradford metodu ile hesaplanmıştır (Bradford, 1976).

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Fenolik veya polifenol bileşikleri, bitki ikincil metabolitlerinin en çok bilinen gruplarından birini oluşturmaktadır. 8000'den fazla yapı olduğu bilinmektedir. Doğal fenoller, basit moleküllerden (benzoik ve sinamik asit) yüksek polimerize bileşenlere (lignin, melanin, tanen) kadar flavonoidler en sık görülen ve yaygın dağılım gösteren alt gruptan oluşabilir (Bravo, 1998). Fenolik asitler, bir benzen halkası, bir karboksil gruplaması ve moleküldeki bir veya daha fazla hidroksil veya metoksil grubunun varlığı ile

karakterizedir ve bunlar antioksidan özelliklere sahiptir (Bravo, 1998). Örneğin, metabolit gallik asit, sekonder metabolizmanın bir ara ürünü olan şikimik asitten türetilir ve bitkilerde hidrolize olabilen tanenlerin bir bileşenidir (Grundhofer et. al., 2001).

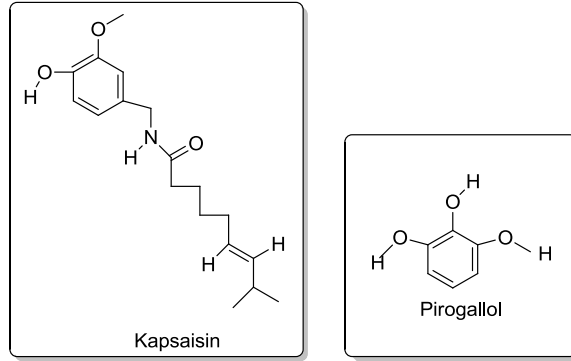
Pirogallol, anti mikrobiyal etkisi kanıtlanmış bir hidroksile edilmiş bileşiktir, böylece etki mekanizması oksidize bileşikler tarafından enzimatik inhibisyon yoluyla oluşur. Kapsaisin (trans-8-metil-N-vanilil-6-nonenamid; CAP), doğal olarak Kapsikum familyası bitkilerinden türetilen, ve bir uçta amid ve lipofilik karbon zinciri ve diğeri üzerinde bir hidrofilik halka içeren fenolik bir bileşiktir (Simoes, 2008). Kapsaisin, biberlerin başlıca keskin kesici bileşeni olup, giderek gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılmaktadır (Lima et al., 2016). Kapsaisin, vücuda analjezi, antikanser, antiinflamasyon, antioksidan ve antiobezite gibi çeşitli farmakolojik ve fizyolojik etkiler uygular (Santos et al., 2011). Üstelik son çalışmalar, kapsaisin'in postpranyal kan şekerini azaltmaya ve insülin direncini artırmaya yardımcı olabileceğini göstermiştir (Coutinho et al., 2005). Buna ek olarak, bazı çalışmalar, kapsaisin'in ağırlı diyabetik nöropati hastalarında ağrıyı azaltmada etkili olabileceğini göstermiştir (Coutinho et al., 2008). Bununla birlikte, Pirogallol ve kapsaisin'in LPO enzim aktivitesi üzerindeki etkisi bilinmemektedir. Bunun için dört farklı süt kaynağından saflaştırılmış olan LPO üzerine bu maddelerin inhibisyon etkileri incelenmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Pirogallol ve kapsaisin üzerine memeli sütlerinden saflaştırılan LPO enziminin inhibisyon etkisi

Moleküller	Memeli sütleri	$IC_{50}$ değeri $\mu M$	Ortalama $K_i$ sabiti $\mu M$	İnhibisyon tipi
Pirogallol	Sığır	2.0941 $\mu M$	4.3501 $\pm$ 1.8879	Yarışmasız
Pirogallol	Manda	0.5743 $\mu M$	0.2695 $\pm$ 0.0458	Yarışmalı
Pirogallol	Koyun	0.0193 $\mu M$	0.0035 $\pm$ 0.0012	Yarışmasız
Pirogallol	Keçi	0.03648 $\mu M$	0.0172 $\pm$ 0.0037	Yarışmasız
Kapsaisin	Sığır	99.0210 $\mu M$	36.1777 $\pm$ 11.3336	Yarışmasız
Kapsaisin	Manda	77.0164 $\mu M$	26.6138 $\pm$ 5.6982	Yarışmasız
Kapsaisin	Koyun	43.3217 $\mu M$	19.4699 $\pm$ 2.7197	Yarışmalı
Kapsaisin	Keçi	57.7623 $\mu M$	20.6809 $\pm$ 3.7886	Yarışmasız

Sonuçlardan da görüleceği üzere (Çizelge 1) Pirogallol ve kapsaisin için en küçük  $IC_{50}$  ve  $K_i$  değerleri koyun sütü için elde edilmiştir. Fenolik asitler biyoaktif bileşiklerin önemli grubunu oluşturmaktadır. Fenolik bileşiklerin antioksidan davranışına ve potansiyel sağlıkla ilgili yararına artan ilgi vardır. Fakat yürütülen bazı çalışmalarda fenolik bileşiklerin çeşitli zararlı etkileri belirtilmiştir. Fenolik asit içeren besinleri tüketirken dikkatli olmalıyız, çeşitli çalışmalarla

gösterilmiştir ki bu moleküllerin farklı enzimler üzerine etkisi vardır. Bazı fenolik bileşiklerin etkisi örneğin (ellajik asit, gallik asit, kafeik asit, kuerçetin, p-kumarik asit, katekol, siyrinjik asit, tannik asit, 3,4-dihidroksibenzoik asit, 3,5-dihidroksibenzoik asit, klorojenik asit, sinapik asit, 4-hidroksibenzoik asit, vanillik asit, salisilik asit, ve 3-hidroksibenzoik asit) Sığır sütü LPO enzimi aktivitesi üzerine etkilerine bakılmıştır (Sarıkaya et al., 2015; Koksall et al., 2016a).



Şekil 1. Pirogallol ve Kapsaisin moleküllerinin kimyasal yapıları

Bu çalışmadan görülüyor ki her iki maddede 4 farklı sütü inhibe etmiştir. Pirogallol için  $K_i$  sonuçları kıyaslandığında sırasıyla koyun sütü için  $0.0035 \pm 0.0012 \mu\text{M}$ ; keçi sütü için  $0.01721 \pm 0.0037 \mu\text{M}$ ; manda sütü için  $0.2695 \pm 0.0458 \mu\text{M}$  ve sığır sütü için  $4.3501 \pm 1.8879 \mu\text{M}$  bulunmuştur. Kapsaisin için  $K_i$  değerleri sırasıyla koyun sütü için  $19.4699 \pm 2.7197$

$\mu\text{M}$ ; keçi sütü için  $20.6809 \pm 3.7886 \mu\text{M}$ ; manda sütü için  $26.6138 \pm 5.6982 \mu\text{M}$  ve sığır sütü için  $36.1777 \pm 11.3336 \mu\text{M}$  olarak bulunmuştur. LPO enziminin saflaştırma sonuçları sığır, manda, koyun, keçi sütleri için sırası ile %74.00 verimle 428.57 kat, %1.88 verimle 36.69 kat, %7 verimle 65.00 kat, %2.85 verimle 36.85 kat saflaştırılmıştır (Çizelge 2).

Çizelge 2. Memeli sütlerinden saflaştırılan Laktoperoksidaz enziminin saflaştırma basamakları

sülfanilamid		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Aktivite (EU)	Total Protein Miktarı	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	S. Katsayısı
Sığır	Amberlit CG 50 H <sup>+</sup> Elüsyonu	60.00	1.10	15.00	66.00	900.00	0.07	100.00	1.00
	Sefaroz 4B Afinite	10.00	4.90	0.16	49.00	1.65	30.00	74.00	428.57
Manda	Amberlit CG-50 H <sup>+</sup> Elüsyonu	60.00	46.29	12.00	2760.00	720.00	3.83	100	1.00
	Sefaroz 4B Afinite	10.00	5.22	0.04	52.00	0.37	140.54	1.88	36.69
Koyun	Amberlit CG 50 H <sup>+</sup> Elüsyonu	60.00	5.06	14.00	303.70	840.00	0.36	100	1.00
	Sefaroz 4B Afinite	10.00	2.34	0.10	23.40	1.00	23.40	7.00	65.00
Keçi	Amberlit CG 50 H <sup>+</sup> Elüsyonu	60.00	0.46	13.00	28.00	780.00	0.03	100	1.00
	Sefaroz 4B Afinite	10.00	0.08	0.06	0.80	0.62	1.29	2.85	36.85



Bu saflaştırılmış enzimler inhibisyon çalışmalarında kullanıldı. Bazı fenolik maddelerin enzim aktivitesi üzerindeki önleyici etkileri *in vitro* şartlar altında test edildi; IC<sub>50</sub> değerleri aktivite% - [inhibitör] grafikleri kullanılarak hesaplandı.

Pirogallolün IC<sub>50</sub> değerleri her bir süt için sırası ile 2.0941 µM; 0.5743 µM; 0.0193 µM; 0.03648 µM olarak, Kapsaisin için ise sırası ile 99.0210 µM; 77.0164 µM; 43.3217 µM; 57.7623 µM olarak bulunmuştur.

K<sub>i</sub> değerleri Lineweaver-Burk eğrileri kullanılarak hesaplanarak, Çizelge 1'de verilmiştir. Çizelge 1'de gösterildiği gibi, saflaştırılmış her bir LPO için, pirogallol ve kapsaisin maddeleri K<sub>i</sub> sabitleri 0.0035 ± 0.0012 µM ile 36.1777 ± 11.3336 µM aralığındaydı.

Pirogallol manda sütü için yarışmalı inhibisyon sergilerken, diğer sütler için yarışmasız inhibisyon etkisi sergiledi; Kapsaisin ise koyun sütü için yarışmalı inhibisyon etkisi gösterirken diğer sütler için yarışmasız inhibisyon etkisi sergilemiştir.

Bilindiği üzere fenoller, aromatik halkaya bir ya da daha fazla hidroksil grubunun bağlandığı aromatik bileşiklerdir (Bravo, 1998).

Moleküllerin yapıları incelendiğinde pirogallolün 3 adet -OH grubuna sahip olduğu görülürken, kapsaisin için ise 1 adet -OH grubuna sahip olduğu görülmektedir. Dört farklı süt için elde edilen kinetik sonuçlar (IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub>) incelendiğinde ise pirogallolün daha iyi inhibitör özelliği gösterdiği görülmektedir. Bunun nedenini yapısında sahip olduğu -OH gruplarına atfedebiliriz.

## KAYNAKLAR

- Adem S, Comakli V, Kuzu M, Demirdag R, 2014. Investigation of the effects of some phenolic compounds on the activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase from human erythrocytes. *J Biochem Mol Toxicol.*, 28(11): 510-514.
- Arnold C, 1881. Einige neue Reactionen der Milch. *Archiv der Pharmazie*, 219: 41-42.
- Atamer M, Kocak C, Cimer A, Odabasi S, Tamucay B, Yamaner N, 1999. Some quality characteristics of Kasar cheese manufactured from milk preserved by activation of lactoperoxidase/thiocyanate/hydrogen peroxide (LP) system. *Milchwissenschaft*, 54: 553-556.
- Bravo L, 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, *Nutr. Ver.* 56: 317-333.

## SONUÇ

Sonuç olarak Pirogallol ve kapsaisin sığır ve keçi sütlerinde aktif bölgeden başka bir yere enzimle bağlanarak inhibisyona neden olmuştur ve pirogallol manda sütünde, kapsaisin ise koyun sütünde, enzimin aktif bölgesine bağlanarak inhibisyona neden olmuştur. LPO enziminin biyosidal aktivitesi, katalize ettiği kimyasal reaksiyonların ürünlerinden kaynaklanmaktadır. Reaksiyonun ana ürünü olan hipotiyosiyanat, çeşitli proteinlerin tiyol grupları ile etkileşime girer ve bu da patojenlerin hayatta kalması için kritik öneme sahiptir. LPO enziminin bakteriler üzerindeki etkisi, sülfhidrilin oksidasyonundan kaynaklanır. -SH gruplarının oksidasyonu bakteriyel sitoplazmik zarın glikoz, potasyum iyonları, amino asitler ve peptidleri taşıma yeteneğini kaybetmesine neden olur. Bu çalışma gösteriyor ki bu fenolik bileşikler LPO enziminin aktivitesini azaltmaktadır. LPO enziminin aktivitesi ve tiyosiyanat bileşimi laktasyon periyodunda çok öneme sahiptir. Bundan dolayı LPO enzimi yenidoğanların bağışıklık sisteminde büyük öneme sahiptir.

Antioksidan özellik sergileyen fenolik bileşiklerin bazı çalışmalarda çeşitli zararlı etkileri de belirtilmiştir. Örneğin fenolik asit içeren besinlerin farklı enzimler üzerine etkisi vardır. Örneğin Laktoperoksidaz enzimi bu enzimlerden bir tanesidir. Bu çalışmada kullanılan moleküllerden pirogallol yapı itibarı ile daha fazla -OH grubuna sahiptir ve LPO enzimini daha iyi inhibe ettiği görülmektedir bu ise enzim aktivitesinin azalması immun sistemin zayıflaması anlamına gelmektedir. Bundan dolayı fenolik bileşiklerin kullanımına dikkat edilmelidir.

- Coutinho H.D.M, Cordeiro L.N, Bringel K.P, 2005. Antibiotic resistance of pathogenic bacteria isolated from the population of Juazeiro do Norte-Ceara, *Rev. Bras. Cienc Saúde* 9: 127-138.
- Coutinho H.D.M, Costa J.G.M, Siqueira-Júnior J.P, Lima E.O, 2008. In vitro antistaphylococcal activity of Hyptis martiusii Benth against methicillin resistant Staphylococcus aureus-MRSA strains, *Rev. Bras. Farmacogn.*, 18: 670-675.
- Davies KJ, 1995. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposium*, 61: 1-31.
- de Wit JN, van Hooydonk ACM, 1996. Structure, functions and applications of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems. *Netherlands Milk & Dairy Journal*, 50: 227-244.
- Demir Y, Beydemir Ş, 2015. Purification, refolding, and characterization of recombinant human paraoxonase-1. *Turkish Journal of Chemistry*, 39(4): 764-776.

- Grundhöfer P, Niemetz R, Schilling G, Gross G.G, 2001. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins, *Phytoch* 57: 915-927.
- Gulcin I, Mshvildadze V, Gepdiremen A, Elias R, 2006. Screening of antioxidant and antiradical activity of monodesmosides and crude extract from *Leontice smirnowii* Tuber. *Phytomedicine*, 13: 343-351.
- Haddain MS, Ibrahim SA, Robinson RK, 1996. Preservation of raw milk by activation of the natural lactoperoxidase systems. *Food Control*, 7: 149-152.
- Hussain S, Slikker W, Ali SF, 1995. Age related changes in antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione in different region of mouse brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 13: 811-817.
- Jacob BM, Monoj NK, Haridas M, 1998. Antibacterial property of goat milk lactoperoxidase. *Indian Journal of Experimental Biology*, 31: 808.
- Koksal Z, Usanmaz H, Bayrak S, Ozdemir H, 2017. Improved chromatographic method for purification of lactoperoxidase from different milk sources. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47(2): 129-136.
- Koksal Z, Alim Z, Beydemir S, Ozdemir H, 2016a. Potent Inhibitory Effects of Some Phenolic Acids on Lactoperoxidase. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 30(11): 533-538.
- Koksal Z, Gulcin I, Ozdemir H, 2016. An Important Milk Enzyme: Lactoperoxidase. In *Milk Proteins-From Structure to Biological Properties and Health Aspects*. InTech, Chapter 7: 142-156.
- Kumar R, Bhatla KL, 1995. Purification, crystallization and preliminary x-ray crystallographic analysis of lactoperoxidase from buffalo milk. *Acta Crystallographica*, 51: 1094.
- Kussendrager KD, van Hooijdonk ACM, 2000. Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *British Journal of Nutrition*, 84: 19-25.
- Lima V.N, Oliveira-Tintino C.D, Santos E.S, Morais L.P, Tintino S.R, Freitas T. S, Coutinho H.D, 2016. Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. *Microbial pathogenesis*, 99: 56-61.
- Ozdemir H, Aygul I, Kufrevioglu OI, 2001. Purification of lactoperoxidase from bovine milk and investigation of the kinetic properties. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 31: 125-134.
- Pourtois M, Binet C, Van Tieghem N, Courtois PR, Vandenabeele A, Thirty L, 1991. Saliva can contribute in quick inhibition of HIV infectivity. *AIDS*, 5: 598-600.
- Reiter B, Perraudin JP, 1991. Lactoperoxidase: biological functions. In: *Peroxydases in Chemistry and Biology*. Boca Raton: CRC Press, 143-180.
- Santos N.K.A, Coutinho H.D.M, Viana G.S.B, Rodrigues F.F.G, Costa J.G.M, 2011. Chemical characterization and synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Vanillosmopsis arborea*, *Med. Chem. Res.*, 20: 637-641.
- Sarikaya SBO, Gulcin I, Supuran CT, 2010. Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of human erythrocyte isozymes I and II with a series of phenolic acids. *Chem Biol Drug Des.*, 75(5): 515-520.
- Sarikaya SBO, Sisecioglu M, Cankaya M, Gulcin I, Ozdemir H, 2015. Inhibition profile of a series of phenolic acids on bovine lactoperoxidase enzyme. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30(3): 479-483.
- Shindler JS, Bardsley WG, 1975. Steady-state kinetics of lactoperoxidase with ABTS as chromogen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 67: 1307.
- Sievers G, 1980. Structure of milk lactoperoxidase. A study using circular dichroism and difference absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 624: 249.
- Simoes C.C, Araújo D.B.D, Araújo R.P.C.D, 2008. Estudo in vitro e ex vivo da ação de diferentes concentrações de extratos de *pr\_opolis* frente aos microrganismos presente na saliva de humanos, *Rev. Bras. Farmacogn.* 18: 84-89.
- Sisecioglu M, Cankaya M, Ozdemir H, 2009. Effects of some vitamins on lactoperoxidase enzyme activity. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 79: 188-194.
- Sisecioglu M, Gulcin I, Cankaya M, Atasever A, Ozdemir H, 2010. The effects of norepinephrine on lactoperoxidase enzyme. *Scientific Research and Essays*, 5: 1351-1356.
- Uguz MT, Ozdemir H, 2005. Purification of bovine milk lactoperoxidase and investigation of antibacterial properties at different thiocyanate mediated. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41: 397-401.
- Van Huystee RB, 1987. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Annual Review of Plant Physiology*, 38: 205.
- Wever R, Kast WM, Kasinoedin JH, Boelens R, 1982. The peroxidation of thiocyanate catalysed by myeloperoxidase and lactoperoxidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 709: 212-219.
- Wolfson LM, Sumner SS, 1993. Antimicrobial activity of the lactoperoxidase system: a review. *Journal of Food Protection*, 56: 887-892.