

**Е. Ю. Кохановская**

*Белорусский государственный медицинский университет  
г. Минск, Республика Беларусь*

## **ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ПРОЦЕССА ТЕРМОИНАКТИВАЦИИ ЛАКТОПЕРОКСИДАЗЫ КОЗЬЕГО МОЛОКА**

*Цель исследования заключалась в определении кинетических и термодинамических параметров инактивации ЛПО молока козы при температуре 67–71 °С. В результате проведенных экспериментов была установлена линейная зависимость между логарифмом остаточной активности ЛПО молока козы и временем инкубации при каждом значении температуры, определены константы скоростей инактивации, установлены значения энергии активации, энтальпии, энтропии и свободной энергии Гиббса активации процесса термоинактивации для ЛПО молока козы. Кинетические и термодинамические параметры термоинактивации ЛПО молока козы позволят в полной мере разработать технологию получения этого фермента из подсырной сыворотки и обосновать использование ЛПО коровы наряду с ЛПО козы в различных видах продукции.*

► **Ключевые слова:** *лактопероксидаза, молочная сыворотка, термостабильность, термоинактивация, термодинамические параметры.*

### **Введение**

Лактопероксидаза (ЛПО) катализирует окисление тиоцианат-ионов и некоторых галогенидов (бромид-, иодид-ионы). В результате реакции образуются продукты с широким спектром противомикробной активности. ЛПО, благодаря своему механизму действия, может найти применение, как в пищевой промышленности, так и в медицине и ветеринарии. Так, например, ЛПО может использоваться в ветеринарии при инфекционных болезнях пчел и других сельскохозяйственных животных, продукция от которых используется в пищу человека, т. к. это могло бы решить проблему присутствия антибиотиков в продуктах питания; в медицине (офтальмология, стоматология, проктология, гинекология, хирургия); в пищевой промышленности; в косметологии; в растениеводстве для защиты растущих цветов, фруктов, клубней, и т.п. В настоящее время в этом направлении ведутся разработки, и некоторые продукты проходят этап клинических испытаний.

В продукции, содержащей ЛПО, в настоящее время применяется лактопероксидаза коровы, которая у некоторых людей может вызвать аллергические реакции. Использование ЛПО козы в данном случае было бы более безопасной альтернативой, однако видовые отличия, характерные для ЛПО разных животных, изучены недостаточно, что может ограничить применение ЛПО молока козы.

Для получения лактопероксидаз можно использовать отходы молочной промышленности – молочную сыворотку, однако при производстве многих продуктов питания молоко подвергается термической обработке. Термостабильность ЛПО коровы изучена в достаточной степени [1–3], однако сведений относительно термостабильности ЛПО других видов животных мало. Сравнительный анализ термостабильности и термодинамических параметров инактивации ЛПО козы поможет в полной мере разработать технологию получения этого фермента из термически обработанной сыворотки и позволит обосновать использование ЛПО коровы наряду с ЛПО козы в различных видах продукции.

Лактопероксидазы разных видов животных различаются первичной структурой, степенью гликозилирования и др. [4], вследствие этого процесс термической инактивации лактопероксидаз разных видов животных будет характеризоваться разными кинетическими и термодинамическими параметрами.

Цель данного исследования заключалась в определении кинетических и термодинамических параметров инактивации ЛПО молока козы при температуре 67–71 °С.

### **Методы исследований**

Для определения термостабильности ЛПО растворяли в деионизированной воде (0,3 мг/мл) и добавляли равный объем реакционной смеси. 1 мл данной смеси нагревали на водяной бане, затем охлаждали до комнатной температуры, затем определяли сохранившуюся активность ЛПО [1].

Каждая точка была получена как результат среднего значения по трем экспериментам. Обработка результатов проводилась при помощи программы Statistica 7.0.

Термодинамические параметры ЛПО (6,4 мкг/мл) определяли по активности фермента после термостатирования в 0,1 М NaCl (67 °С, 69 °С, 71 °С, экспозиция до 60 мин, водяная баня SHELLAB W6M-2). Начальную скорость окисления естественного субстрата (4 мМ KI) в присутствии 0,2 мМ пероксида водорода определяли на спектрофотометре Solar UV-VIS PB 2201 при длине волны 353 нм в области линейного изменения оптической плотности. Каждая точка была получена как результат среднего значения по трем экспериментам.

Константу скорости температурной инактивации ( $k$ ) рассчитывали при помощи графика зависимости натурального логарифма остаточной активности от времени термоинактивации.

Значение  $D$  и константа скорости инактивации связаны уравнением:

$$D = 2.303/k. \quad (1)$$

Энергию активации процесса термоинактивации определяли по графику зависимости экспериментально установленных значений  $Lgk$  от  $1/T$ . Тангенс угла наклона прямой, равный  $-E_a/2,303R$ , позволяет рассчитать энергию активации реакции [5, с. 105].

Термодинамические параметры рассчитывали по формулам:

$$\Delta H^* = E_a - RT; \quad (2)$$

$$\Delta G^* = -RT \ln(kh/KT); \quad (3)$$

$$\Delta S^* = (\Delta H^* - \Delta G^*)/T, \quad (4)$$

где  $\Delta H^*$  – энтальпия активации,  $\Delta G^*$  – свободная энергия Гиббса активации,  $\Delta S^*$  – энтропия активации процесса термоинактивации;  $E_a$  – энергия активации,  $R$  – универсальная газовая постоянная,  $T$  – абсолютная температура,  $k$  – константа скорости инактивации,  $h$  – постоянная Планка,  $K$  – постоянная Больцмана.

Для всех зависимостей были получены 95% и выше пороги значимости. Обработка результатов проводилась при помощи программы Statistica 7.0.

### Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований было установлено, что остаточная активность ЛПО снижается с увеличением температуры и продолжительности инкубации и наблюдается линейная зависимость между логарифмом остаточной активности ЛПО и временем термостатирования при каждом значении температуры (рис. 1) ( $p \ll 0,05$  при 67, 69 и 71 °С).

На рисунке 1 видно, что анаморфозы для каждого значения температуры прямые, без изломов, что указывает на равномерность процесса инактивации и можно утверждать, что реакция термоинактивации ЛПО молока козы в данных условиях подчиняется кинетике первого порядка. Также можно предположить, что инактивация ЛПО в данных условиях проходит без существенного процесса агрегации молекул, так как в случае, если бы это происходило, анаморфозы имели бы изломы [6]. Полученные нами результаты соответствуют данным литературы [7, 8].

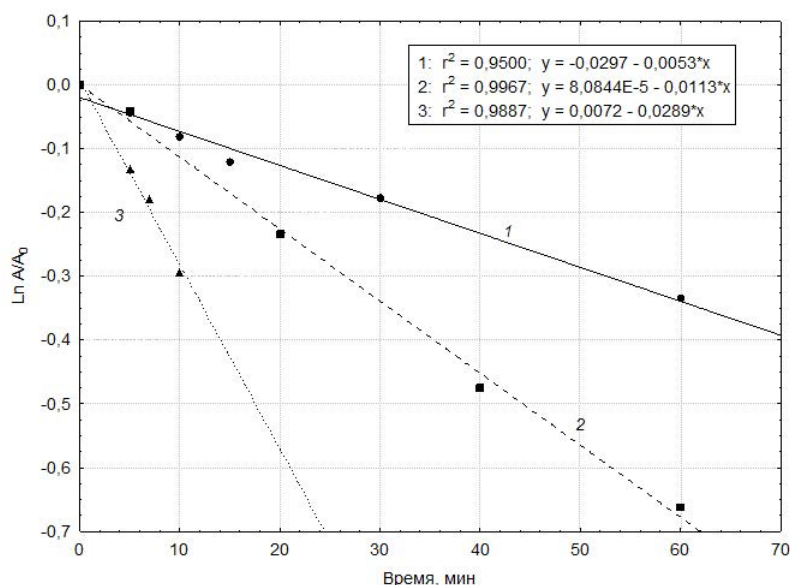


Рисунок 1 – Временная зависимость температурной инактивации ЛПО сыворотки молока козы при: 1–67 °С, 2–69 °С, 3–71 °С (результаты представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего,  $n = 3$ ,  $A$  – остаточная активность,  $A_0$  – исходная активность ЛПО)

Из тангенса угла наклона прямых, которые характеризуют временную зависимость температурной инактивации ЛПО сыворотки молока (рис. 1), были получены значения константы скорости инактивации при каждой температуре (табл. 1).

Таблица 1

Кинетические характеристики инактивации ЛПО молока козы

Температура (°С)	D (мин)	k (с <sup>-1</sup> )
67	426,48	8,83×10 <sup>-5</sup>
69	202,02	18,83×10 <sup>-5</sup>
71	79,14	48,58×10 <sup>-5</sup>

Скорость инактивации ЛПО молока козы значительно возрастает при повышении температуры инкубирования. Процесс термоинактивации ЛПО характеризуется наименьшей константой скорости при 67 °С, при 69 °С константа инактивации выше в 2,1 раза, а при 71 °С – в 5,5 раза (табл. 1). Эти параметры могут изменяться в зависимости от состава среды. Так, например, при кинетическом анализе термальной инактивации ЛПО в фосфатном буфере, в молоке и в сыворотке молока при температуре 60–70 °С было установлено, что при 62,5 °С константа инактивации для ЛПО в фосфатном буфере в 1,03 раза меньше, чем в молоке и в 1,38 раз меньше, чем в сыворотке [9]. При повышении температуры до 67,5 °С константа инактивации для ЛПО в фосфатном буфере также ниже, чем в других средах: в 1,06 раза меньше, чем в молоке и в 1,76 раз меньше, чем в сыворотке [9]. На основании этих данных авторы делают вывод, что фермент в фосфатном буфере проявляет более выраженную термостабильность, чем в молоке и в сыворотке.

Таким образом, ЛПО молока козы более чувствительна к возрастанию температуры свыше 69 °С, чем к увеличению продолжительности инкубации, но при более низких температурах. ЛПО других видов животных в целом проявляют схожие свойства. Так, например, чтобы снизить активность ЛПО в молоке буйволицы на 50% при температуре 67 °С требуется 106 минут [7], а для потери 50% активности ЛПО козы при той же температуре потребуется 128 минут, но при 69 °С время полуинактивации ЛПО козы составляет 61 минуту.

На основании модели, которая описывает реакции первого порядка, было установлено время десятикратного уменьшения исходной активности при данной температуре (D, табл. 1).

При проведении кинетического анализа термостабильности ЛПО молока козы была установлена термоинактивация ЛПО, что выражается в снижении D (рис. 2, табл. 1). Так, при температуре 69 °С и 71 °С значение D в 2,1 и в 5,5 раз меньше, чем при 67 °С. Для ЛПО других видов животных при повышении температуры значение D также снижается [8, 9]. Например, ЛПО молока буйволицы инактивируется в большей степени, чем ЛПО козы, так как значение D, полученное при 69 °С и 71 °С в 6,5 и 43 раза меньше по сравнению со значением при 67 °С [7].

На изменение этих параметров также оказывает влияние состав среды. Так, время десятичной редукции активности ЛПО уменьшается с возрастанием температуры инкубации, однако с разной интенсивностью. При повышении температуры с 60 °С до 70 °С в фосфатном буфере этот параметр уменьшается в 5 раз, в молоке – в 6,38, в сыворотке – в 7 раз [9].

Энергию активации исследуемой реакции ( $E_a$ ) определяли по графику зависимости логарифма  $k$  от величины  $1/T$  (рис. 2) по тангенсу угла наклона прямой [5, с. 105]. Энергия активации для термоинактивации ЛПО молока козы составила 409,61 кДж/моль. Энергия активации для инактивации ЛПО других видов животных выше и составляет в молоке буйволицы – 920,43 кДж/моль, для ЛПО молока коровы, по данным разных авторов – 737,69 и 800 кДж/моль [6, 7, 9].

С другой стороны, выделенная нами ЛПО сыворотки молока козы характеризуется более высоким значением энергии активации процесса термоинактивации, чем ЛПО непосредственно в козьем молоке (225,98 кДж/моль) [7], а также более высоким, чем ЛПО в молоке верблюда (346 кДж/моль) [7].

На скорость инактивации фермента при термообработке может повлиять также значение энтропии активации, так как даже при близких значениях энергии активации скорость будет выше у той реакции, энтропия активации которой будет больше [10, с. 290], вследствие этого, для сравнения скоростей инактивации разных ферментов определения только энергии активации недостаточно.

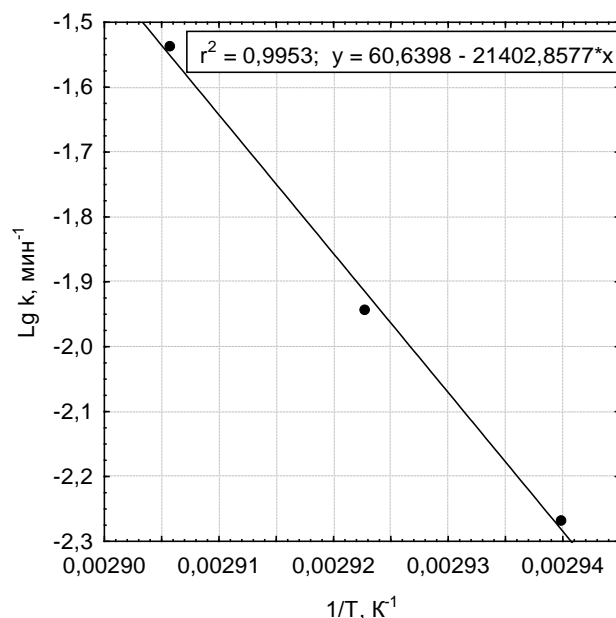


Рисунок 2 – График Аррениуса для реакции термоинактивации ЛПО молока козы

Далее по формулам, приведенным в материалах и методах, были рассчитаны значения энтальпии активации процесса инактивации при различных температурах, а также другие термодинамические параметры процесса термоинактивации ЛПО молока козы (табл. 2).

Таблица 2

Термодинамические параметры инактивации ЛПО молока козы

E <sub>a</sub> 409,61 кДж/моль			
T, °C	ΔH*, кДж/моль	ΔG*, кДж/моль	ΔS*, кДж/(моль*К)
67	406,78	104,90	0,88
69	406,77	102,82	0,89
71	406,75	100,16	0,89

Значения изменения энтальпии активации процесса инактивации для выделенной ЛПО козы ниже, чем ЛПО коровы (917,59 кДж/моль) и буйволицы (917,59 кДж/моль) [7], но выше, чем для ЛПО верблюда (346 кДж/моль) [8]. Значение энтропии процесса термоинактивации ЛПО козы сопоставимо со значением энтропии активации для ЛПО в верблюжьем молоке [8] и ниже, чем для ЛПО в молоке буйволицы [7].

Несмотря на значительную энтальпию активации (табл. 2), инактивация ЛПО при высокой температуре (свыше 70 °C) происходит довольно быстро. Это может быть связано с тем, что свободная энергия активации этой реакций мала вследствие возрастания значения энтропии активации (табл. 2), что, в свою очередь, может вызываться различными причинами: разрывом при активации части солевых мостиков между кислотными и основными группами, «разрыхлением» структуры белка и т.п. [12]. Значения свободной энергии Гиббса активации процесса инактивации для ЛПО молока козы соответствует значениям для инактивации других ферментов в принципе [6] и значениям для ЛПО других видов животных в частности [7–9].

### Заключение

В результате проведенных исследований было установлено, что ЛПО молока козы более чувствительна к возрастанию температуры свыше 71 °C, чем к увеличению продолжительности инкубации, но при более низких температурах. Также была установлена линейная зависимость между логарифмом остаточной активности ЛПО молока козы и временем инкубации при каждом значении температуры в данных условиях, что согласуется с данными других авторов. Помимо этого, скорость инактивации ЛПО молока козы значительно возрастает при повышении температуры инкубирования, что подтверждается константами скорости инактивации для каждого значения температуры. Как и в случае с лактопероксидазами других видов животных, значение D при инактивации ЛПО козы снижается с повышением температуры. E<sub>a</sub> для выделенной нами ЛПО молока козы незначительно

превышает значение энергии активации для ЛПО в козьем молоке, а значение энтропии процесса термоинактивации ЛПО козы сходно со значением энтропии активации для ЛПО в верблюжьем молоке [7], однако ниже, чем для ЛПО в молоке буйволицы [6].

Кинетические и термодинамические параметры термоинактивации ЛПО молока козы позволят в полной мере разработать технологию получения этого фермента из подсырной сыворотки.

### **Список литературы**

1. Sato, K. Effects of ionic strength on thermostability of lactoperoxidase / K. Sato [et al.] // *Biosci. Biotech. Biochem.* – 1992. – No. 56. – Pp. 2054–2055
2. Ludikhuyze, L. R. Effect of temperature and/or pressure on lactoperoxidase activity in bovine milk and acid whey / L.R. Ludikhuyze [et al.] // *J Dairy Res.* – 2001. – Vol. 68 (11). – P. 625–637.
3. Sciancalepore, V. Influence of mono- and divalent cations on thermostability of lactoperoxidase in model systems / V. Sciancalepore [et al.] // *Milchwissenschaft.* – 1996. – Vol. 51 (9). – P. 512–514.
4. Sharma, S. Lactoperoxidase: structural insights into the function, ligand binding and inhibition / S. Sharma [et al.] // *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology.* – 2013. – Vol. 4 (3). – Pp. 108–128.
5. Равич-Щербо, М. И. Физическая и коллоидная химия / М. И. Равич-Щербо, В. В, Новиков. – М.: Высшая школа, 1975. – 255 с.
6. Метелица, Д. И. Кинетические аспекты необратимой термической инактивации ферментов / Д. И. Метелица, А. Н. Еремин // *Успехи химии.* – 1987. – Т. LVI (11). – С. 1924–1948.
7. Tayefi-Nasrabadi, H. Effect of heat treatment on Buffalo (*Bubalus bubalis*) lactoperoxidase activity in raw milk / H. Tayefi-Nasrabadi, R. Asadpour // *Journal of Biological Sciences.* – 2008. – Vol.8 (8). – Pp. 1310–1315.
8. Tayefi-Nasrabadi, H., Thermodynamic Analysis of Lactoperoxidase activity in camel milk / H. Tayefi-Nasrabadi, M.A. Hosseinpour-Feizi, M. Mohasseli // *International Conference on Life Science and Technology IPCBEE.* – Singapore: IACSIT Press. – 2011. – Т. 3. – Pp. 4–6.
9. Borda, D. Thermal inactivation kinetics of lactoperoxidase in model system, milk and whey / D. Borda et al. // *Journal of Faculty of Food Engineering.* – 2013. – Vol. XII (1). – Pp. 53–58.
10. Евстратова, К. И. Физическая и коллоидная химия: учеб. пособие для фарм. вузов и факультетов / К. И. Евстратова, Н. А. Купина, Е. Е. Малахова. – М.: Высшая школа, 1990. – 486 с.

***E. Yu. Kakhanouskaya***

## **THE THERMODYNAMIC PARAMETERS OF THE LACTOPEROXIDASE GOAT MILK HEAT INACTIVATION PROCESS**

*The aim of the study was to determine the kinetic and thermodynamic parameters of goat milk LPO inactivation process (67–71 °C). Linear dependences between the logarithm of the residual activity of goat milk LPO and the incubation time at each temperature were established. Also the inactivation reaction rate constant, the value of the activation energy, enthalpy, entropy and Gibbs free energy of activation for thermal inactivation LPO goat's milk were determined.*

*The kinetic and thermodynamic parameters of goat milk LPO thermal inactivation will make it possible to develop the technology for the production of this enzyme from cheese whey and justify the use of goat milk LPO along with cow milk LPO in a variety of products.*