

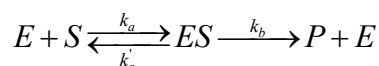
METODE DE EVALUARE A CAPACITĂȚII DE FERMENTARE A DROJDIEI DE BERE

1. SCOPUL LUCRĂRII

Determinarea vitezei de reacție a descompunerii apei oxigenate sub influența catalazei conținută în drojdie.

2. PRINCIPII TEORETICE

Studiile cantitative asupra activității enzimatice au început după 1913, an în care Michaelis și Menten au propus, ca mecanism de acțiune a enzimelor asupra substratului, formarea unui complex între enzimă și substrat, urmat de desfacerea acestuia în enzimă și produși:



a. Activitatea enzimatică

Determinările de activitate enzimatică se realizează, uneori, în condițiile în care concentrația substratului este suficient de mare pentru ca viteza reacției să fie determinată numai din cantitatea de enzimă.

La concentrații mici de substrat (mai mici decât cele necesare pentru ca toată enzima să fie transformată în complexul ES), viteza unei reacții enzimatice depinde de concentrația substratului. Relația dintre viteza unei reacții enzimatice și concentrația substratului, pentru o cantitate dată de enzimă, este dată de **ecuația Michaelis-Menten**:

$$v = \frac{v_{\max} [S]_o}{[S]_o + K_M} \quad (1)$$

$$v_{\max} = k_b [E]_o \quad (2)$$

unde $[E]_o$ și $[S]_o$ sunt concentrațiile *inițiale* ale enzimei, respectiv, substratului, K_M este **constantă Michaelis** reprezentată prin relația constantelor $(k'_a + k_b)/k_a$ și este caracteristică acțiunii unei enzime date pe un anumit substrat (având drept semnificație fizică concentrația de substrat la care viteza de reacție este jumătate din viteza maximă), $v_{\max}$ este viteza maximă de formare a produsului, proporțională cu concentrația inițială de enzimă.

Prin rearanjarea expresiei (1) într-o formă care poate fi analizată prin regresie liniară,

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} + \left(\frac{K_M}{v_{\max}} \right) \frac{1}{[S]_0} \quad (3)$$

se obține **graficul Lineweaver-Burk** care este reprezentarea lui $\frac{1}{v}$ în funcție de $\frac{1}{[S]_0}$, a cărui

pantă este $\frac{K_M}{v_{\max}}$; intersecția cu axa y este $\frac{1}{v_{\max}}$, iar intersecția cu axa x este $-\frac{1}{K_M}$.

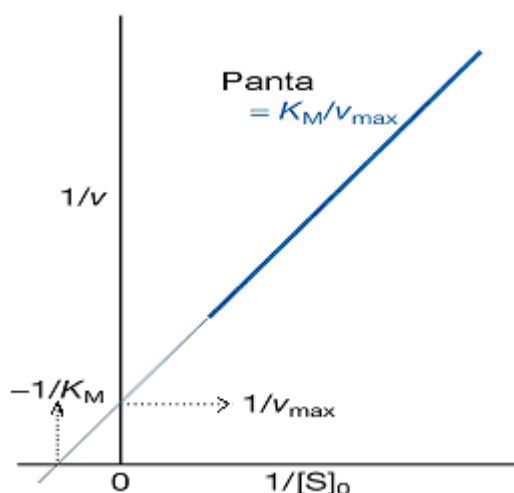


Fig. 1 Graficul Lineweaver - Burk pentru studiul reacțiilor catalizate enzimatic

b. Eficiența catalitică a enzimelor

Constanta catalitică a unei enzime, k_{cat} , sau **numărul turnover**, este numărul de cicluri catalitice (turnover) realizate de centrul activ într-un interval de timp dat, împărțit la durata intervalului. Această mărime este, în termenii mecanismului Michaelis - Menten, numeric echivalentă cu k_b (constanta de viteză pentru formarea produsului din complexul enzimă-substrat). Prin identificarea lui k_{cat} cu k_b (care rezultă din relația 2) rezultă că **eficiența catalitică**, ε , a unei enzime este raportul:

$$\varepsilon = \frac{k_{\text{cat}}}{K_M} \quad (4)$$

Contextul practic al lucrării

Capacitatea enzimelor de a cataliza specific reacțiile biochimice este o caracteristică importantă pentru utilizarea acestora în industrie.

Una din cele mai vechi aplicații ale enzimelor este obținerea brânzei. Acest proces are la bază coagularea laptelui, prin hidroliza cazeinei catalizată de enzima numită renină sau chimozină, care se găsește în cheag. În funcție de tipul de brânză care se dorește a fi obținut se

mai pot folosi și alte enzime, cum ar fi lactaza, lipaza și catalaza. De asemenea, enzimele pot fi folosite și în industria sucurilor (pectinază, xilanază și celulază). Cel mai vechi proces enzimatic cunoscut este fermentația berii. În timpul acestui proces, pe parcursul procesului de malțificare nivelul enzimatic al cerealelor este crescut, acestea fiind apoi eliberate pentru a hidroliza amidonul în zaharuri solubile fermentescibile. Drojdiile metabolizează zaharurile din cereale producând alcool și dioxid de carbon. O altă utilizare a enzimelor este în industria panificației. În timpul procesului de fabricare a pâinii, drojdia de panificație produce fermentarea zaharurilor prezente în aluat cu degajare de dioxid de carbon necesar creșterii pâinii. Procesul de fermentare începe din momentul frământării aluatului și continuă pe parcursul tuturor operațiilor tehnologice ulterioare, implicit în prima parte a coacerii. În practică, prin fermentarea aluatului (în cuve, în vrac) se înțelege procesul de maturizare al aluatului.

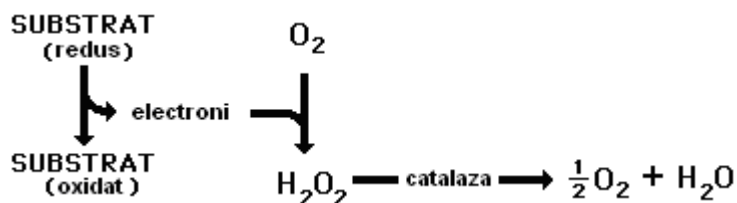
Drojdia de panificație reprezintă o biomasă de celule din specia *Saccharomyces cerevisiae* (drojdie de fermentație superioară - folosită și la fabricarea berii), biomasă formată din celule vii capabile să producă fermentarea zaharurilor din aluat cu formare de alcool etilic (ce se evaporă în cuptor în timpul coacerii) și dioxid de carbon (formează alveolele pâinii), agentul de afânare al aluatului și alte produse secundare, cu rol în formarea pâinii. Fermentația alcoolică este produsă de drojdia de panificație prin echipamentul său enzimatic. Sistemul enzimatic al drojdiei este de tip endocelular și nu difuzează în mediu rămânând în interiorul celulei. El este format dintr-un complex de enzime (printre ele fiind și *catalaza* având rol în protecția celulei) și coenzime, care catalizează reacțiile de esterificare ale glucidelor, transferul de grupe fosforice, oxidoreduceri, izomerizări, decarboxilări.

Enzimele sunt alcătuite din proteine produse de celulele vii. Acești componenți omniprezenți acționează în reacțiile biochimice drept catalizatori biologici având rolul de a crește viteza de reacție. Substanța asupra căreia enzimele își exercită acțiunea catalitică se numește **substrat (S)** (reactantul). În reacțiile catalizate enzimatic substratul se leagă reversibil la o anumită poziție din structura **enzimei (E)**, denumită **centru activ**, și conduce la formarea de produși de reacție. Structura centrilor activi este specifică reacției pe care o catalizează, datorită secvenței unice de aminoacizi din structura enzimei. Asemenea catalizatorilor, enzimele în general nu se transformă în timpul reacției, putând fi reciclate și refolosite.

Activitatea unei enzime este măsurată prin viteza reacției pe care o catalizează. Viteza reacției se exprimă prin cantitatea de substanță transformată în unitatea de timp.

PRINCIPIUL METODEI

Catalaza este o enzimă importantă din drojdia de panificație, a cărei activitate crește în prezența oxigenului (aerului). Principala funcție a catalazei în celulele vii este aceea de a preveni acumularea apei oxigenate care rezultă din procesele metabolice. Catalaza poate, de asemenea, să participe și la unele procese de oxidare care au loc în celule.



Studiul cineticii de descompunere a H₂O₂ sub acțiunea catalitică a catalazei se realizează prin măsurarea volumului de oxigen degajat la intervale de timp regulate. În această lucrare se va măsura eficiența catalitică a catalazei în drojdia proaspătă.

3. PARTE EXPERIMENTALĂ

3.1 APARATURĂ ȘI SUBSTANȚE

- pahar Erlenmeyer, cilindru gradat, agitator magnetic, bara magnetică de agitare, cristalizor, stativ, clemă, dop de cauciuc cu două găuri și un dop potrivit pentru una din găuri, furtun flexibil, tuburi de sticlă, seringă cu ac, apă distilată, apă oxigenată 20%, drojdie proaspătă.

3.2. MOD DE LUCRU

Se prepară o suspensie de drojdie de bere în apă distilată într-un pahar Erlenmayer în care se introduce, în prealabil, o bară magnetică (peștișor). Amestecul conține m g drojdie, un volum V mL apă distilată, conform tabelului 1. Se montează instalația (conform anexei) - aspirarea apei în cilindru se face cu ajutorul trompei de apă. Se pornește agitarea. Se pornește cronometrul concomitent cu adăosul a $V_{H_2O_2}$ mL soluție de H₂O₂ 20% ($\rho = 1,1 \text{ g/cm}^3$), măsurați cu seringă astfel încât volumul total al soluției să fie 50 mL. Volumul de O₂ degajat se citește (și se notează în tabelul de rezultate) pe gradațiile cilindrului din momentul adăugării H₂O₂ la fiecare 30 de secunde pentru primele 2 probe și din 15 în 15 secunde la următoarele 3 probe, timp de zece minute sau până la atingerea volumului maxim al cilindrului de 500 de mL.

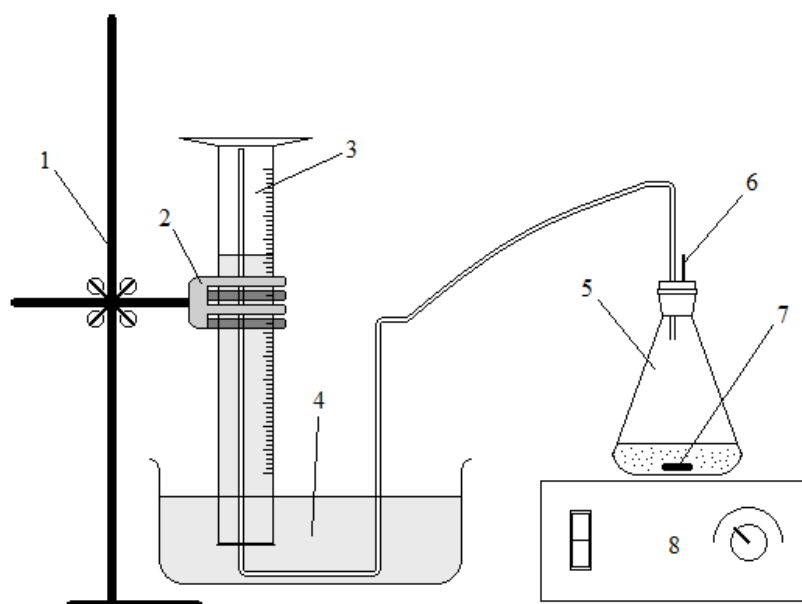


Fig. 1. Schema instalației experimentale

- | | |
|---|---|
| 1. Stativ | 5. Pahar Erlenmeyer |
| 2. Clemă | 6. Bucată de sârmă (dop pentru orificiul de injecție) |
| 3. Cilindru gradat întors umplut cu apă | 7. Bară magnetică (peștișor) |
| 4. Cristalizor cu apă | 8. Agitator magnetic |

1.1. Probe pentru evaluarea activității catalitice a drojdiei proaspete

Nr. crt	m_{drojdie} , g (proaspătă)	$V_{\text{apă distilată}}$, mL	$V_{\text{H}_2\text{O}_2}$, mL
DP 1	0,5	47	3
DP 2	0,5	45	5
DP 3	0,5	43	7
DP 4	0,5	41	9
DP 5	0,5	39	11

4. PRELUCRAREA DATELOR EXPERIMENTALE

4.1. Volumele măsurate se notează într-un tabel de forma:

Timp, min	V_{O_2} pentru Proba 1	V_{O_2} pentru Proba 2	Timp, min	V_{O_2} pentru Proba 3	V_{O_2} pentru Proba 4	V_{O_2} pentru Proba 5
0			0			
0,5			0,25			
...	...	...	...	...	...	...
10			5			

4.2. Se reprezintă grafic variația volumului de gaz din cilindru (V_{O_2}) în funcție de timp, pentru fiecare probă și se determină vitezele de reacție pentru sistemele studiate (tabel). Viteza de reacție este egală cu panta dreptei de liniarizare pe porțiunea inițială (pe intervalul de timp 0-5 minute);

4.3. Se calculează concentrația inițială a apei oxigenate (substratul) pentru fiecare probă;

4.4. Se reprezintă vitezele de reacție în funcție de concentrația de substrat, $w = f(c)$, din panta porțiunii inițiale, liniare;

4.5. Se reprezintă graficul Lineweaver-Burk, $1/w = f(1/c)$;

4.6. Se determină constanta Michaelis-Menten, K_M , viteza maximă, v_{max} , și eficiența catalitică a enzimei din drojdia proaspătă din parametrii dreptei Lineweaver-Burk.

Se cunosc concentrația enzimei în drojdie este de ~1% și masa molară a enzimei ~60000g/mol.

5. INTREBĂRI

5.1. Cum influențează concentrația de substrat din mediul de reacție, viteza enzimatică?

5.2. Cum variază viteza reacției enzimactice studiate în timp? De ce?