

Nume: _____ Data: _____



Analogie

Să presupunem că sunteți interesat de achiziționarea unui magazin (de Pizza) și doriți să investigați cât de productiv este magazinul, fără să știe proprietarul actual, temându-va că va ridica prețul. Astfel, în loc de să mergeți în magazin și să verificați ceea ce se întâmplă: să cereți să examinați registrele contabile și a profiturile, vă decideți să observați magazinul din afară.

De aici puteți observa cât de des ajung camioane cu aluat de pizza, garnituri de pizza (brânză, pepperoni, etc), precum și alte consumabile. Tot de aici observați, cât de des lucrătorii părăsesc magazinul pentru a livra pizza la clienți.

În această analogie, materiile prime pentru pizza sunt reactanți - SUBSTRAT iar cutiile cu pizza care sunt livrate clienților sunt produse finite. Lucrătorilor din cadrul magazin care modelează aluatul, adaugă topping-uri, coc în cuptoare pizza și în cele din urmă împachetează în cutii sunt echivalentul a ENZIMELOR.

Deși noi nu vedem efectiv, lucrătorii fac treaba lor. Astfel putem deduce că, dacă magazinul folosește cantități mari de reactanți (aluat și topping-uri) și / sau produce un număr mare de produse finite (pizza), atunci lucrătorii (enzimele) trebuie să fie foarte activi.

STUDIUL ACTIVITATII CATALAZEI



OBIECTIVE

* Evidențierea influenței temperaturii, pH-ului, și a concentrației enzimei asupra vitezei de reacție catalizată de enzime într-un experiment controlat.

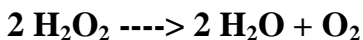
* Explicarea modului în care factorii de mediu afectează viteza reacției catalizate.

INTRODUCERE:

Ce s-ar întâmpla cu celulele noastre, dacă intra în contact cu o substanță chimică otrăvitoare? Ați putea crede că vor muri. De fapt, celulele nu numai că intra în contact cu substanțe otrăvitoare ci chiar produc substanțe chimice toxice. Motivul pentru care nu mor, se datorează existenței enzimelor capabile să descompună aceste substanțe chimice toxice în substanțe inofensive.

Enzimele sunt proteine (nemodificate în timpul unei reacții) care accelerează viteza reacțiilor biochimice care s-ar desfășura în absența acestora mult mai lent. Există sute de enzime diferite în fiecare dintre celulele voastre. Fiecare dintre aceste enzime este responsabilă pentru o reacție specială, care are loc în celulă.

In acest laborator, veti studia o enzimă care se găsește în majoritatea celulelor țesuturilor vii. Numele enzimei este catalaza, ea accelerează o reacție care descompune peroxidul de hidrogen, o substanță chimică toxică, în 2 substanțe inofensive - apa și oxigen.



Această reacție este importantă pentru celule, deoarece peroxidul de hidrogen (H_2O_2) este un produs secundar al multor reacții normale celulare. În cazul în care celulele nu ar descompune peroxidul de hidrogen, acestea ar fi otrăvite și ar muri.

In acest laborator, veti studia activitatea catalazei din celulele hepatice. Vei folosi ficat de pui sau de ficat de vita. Ar putea părea ciudată ideea de a utiliza celulele moarte pentru a studia funcția unor enzime, însă acest lucru este posibil deoarece atunci când o celulă moare, enzimele rămân intacte și active timp de câteva săptămâni, atât timp cât se păstrează refrigerat tesutul.

MATERIALE:

soluție de HCl 1 M (în flacon picurător)	cilindru gradat de 10-ml	Tija de amestecare
soluție NaOH 1M (în flacon picurător)	40 ml de soluție peroxid de hidrogen 3%	Ficat proaspăt, mere, cartofi
7 eprubete	Foarfece și Penseta	Support pentru eprubete
Pipeta pentru masurare		Baie de gheață Baie de apă

MODUL DE LUCRU

Prima parte

Observarea modului de acțiune al catalazei:

1. Introduceți 2 ml de soluție de peroxid de hidrogen 3% într-o eprubetă curată.

2. Utilizarea foarfecelor și pensetei și tăiați o bucată mică de ficat și adăugați-l în eprubetă. Împingeți-l în peroxid de hidrogen cu o tijă de amestecare. Observați bulele de gaz.

➤ Care este gazul eliberat? _____

În timpul sesiunii de laborator veți estima viteza de reacție (cât de rapid se degajă bulele în soluție), pe o scară de la 0-5

(0 = nici o reacție, 1 = lent, 5 = foarte repede). Să presupunem că reacția din pasul 2 s-a desfășurat cu o viteză corespunzătoare cifrei "4". Amintiți-vă cele 2 tipuri principale de reacții: endotermice și exotermice: o reacție care absoarbe căldură este endotermă, o reacție care cedează căldură este exotermă.

➤ Cum este temperatura eprubetei în care ați lucrat? Temperatura a crescut sau a scăzut? _____

➤ Reacția este exotermă sau endotermă?

Catalaza este epuizată (s-a consumat în reacție) sau se mai poate reutiliza (se regăsește la sfârșitul reacției nemodificată)?

1. Se toarnă faza lichidă din prima eprubetă într-o a doua eprubetă (solidul – ficat va rămâne în prima eprubetă).

➤ Presupunând că reacția este completă în prima eprubetă, din ce este compus acest lichid? _____

➤ Ce credeți că s-ar întâmpla dacă ați adăugat alte celule hepatice (ficat de pasare) în acest lichid? _____

➤ Testați această ipoteză și înregistrați viteza de reacție. Viteza de reacție este pe o scară de la 0-5 _____ (0 - 5)

2. Adăugați alți 2 ml din peroxidul de hidrogen peste ficatul rămas în prima eprubetă .

➤ Care este viteza de reacție? _____

- Este catalaza reutilizabila? Explicați modul în care ati ajuns la aceasta concluzie.

Partea a doua

Ce tesuturi conțin catalaza?

Veți testa si alte tesuturi pentru evidentierea prezenței catalazei.

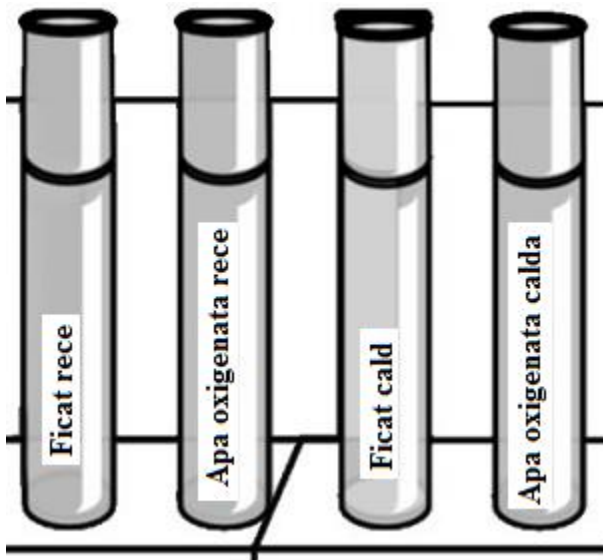
Introduceti cate 2 ml de peroxid de hidrogen, în fiecare dintre cele 3 eprubete curate ramase și apoi adăugați in fiecare dintre ele si substanțele de testare (cartof, mar si ficat). Pe măsură ce adăugați fiecare substanță in eprubete, înregistrați viteza de reacție (0-5) pentru fiecare tub.

Substanta	Viteza de reactie (0-5)
Cartof	
Mar	
Ficat	

- Care țesuturi conțin catalaza?

- Unele dintre probele analizate contin mai multa catalaza decat altele? Cum va puteti da seama?

Partea a treia



Care este efectul temperaturii asupra activității catalazei?

1. Puneti o bucată de ficat în partea de jos a unei eprubete curate și acoperiti cu o cantitate mică de apă. Plasați aceasta eprubeta într-o baie de apă care fierbe timp de 5 minute.

➤ Ce se va întâmpla cu enzima la temperatura de fierbere?
? _____

2. Scoateți eprubeta din baia de apă fierbinte, lăsați-o să se racească, apoi scoateți faza lichidă. Adăugați 2 ml de peroxid de hidrogen. ATENȚIE: Utilizați un suport de eprubete pentru eprubetele fierbinte.

➤ Care este viteza de reacție la utilizarea ficatului fiert și a peroxidului de hidrogen? _____

3. Puneti cantități egale de ficat în 2 eprubete curate și câte 1 ml H_2O_2 în alte două eprubete. Puneti câte un set de eprubete (ficat și peroxid de hidrogen) într-o baie de gheață și un alt set într-o baie de apă caldă (nu fierbinte - $40^{\circ}C$).

După 3 minute, se toarnă în fiecare tub de H_2O_2 în tubul corespunzător (având aceeași temperatură) de ficat și observați reacția

➤ Care este viteza de reacție pentru ficat rece / peroxid rece?

➤ Care este viteza de reacție pentru ficat cald / peroxid cald?

Partea a patra

Care este efectul pH-ului asupra activității catalazei ?

1. Adăugați câte 2 ml de peroxid de hidrogen la fiecare dintre cele 5 eprubete curate.

Eprubete 1 și 2:

1 - adăugați 4 picături de HCl (acid)

2 - adăugați HCl diluat (1 picătură / 3 ml de apă)

Eprubetele 3-5

3 - adăugați 4 picături de NaOH (Baza)

4 - adăugați NaOH diluat (1 picătură / 3 ml de apă)

5 - se adăugă 3 picături de apă (neutru)

Acum, adăugați ficat la fiecare dintre eprubete (încercați să îl adăugați aproximativ în același timp, astfel încât să puteți compara cu ușurință):

➤ Evaluați viteza de reacție pentru domeniul

Puternic acid _____

Slab acid _____

Puternic bazic _____

Slab bazic _____

Neutru _____

* Dacă este necesar, puteți ridica scara de evaluare până la 6.

➤ Care este pH-ul optim pentru catalaza (estimare)?

ANALIZA DATELOR

Raspunde-ti la urmatoarele intrebari într-un scurt paragraf. Atașati analiza datelor la raport.

- descrieti reacția și modul în care măsoară viteza de reacție
- descrieit modul în care temperatura și pH-ul afectează acțiunile enzimei catalaza, și de ce aceste elemente afectează viteza de reacție
- descrieti modul în care ati determinat temperatura si pH-ul optim al unei enzime, propune-ti un nou experiment

Determinarea activității catalazei

Catalaza este o enzimă din clasa oxido-reductazelor, răspândită în majoritatea microorganismelor aerobe, în celulele animalelor și plantelor superioare. Este o cromoproteidă heminică și conține patru subunități heminice într-o moleculă. Hemul din catalază conține Fe^{3+}

este $\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + 1/2 \text{O}_2$ următoarea: Reacția catalizată

Este una din cele mai active enzime, un mol de catalază transformând $5 \cdot 10^6$ moli de H_2O_2 , la 0°C timp de 1 minut.

Domeniul de temperatură la care acționează optim este cuprins între $0 \dots 10^\circ\text{C}$. Preparatele de catalază sunt folosite în industria alimentară pentru distrugere apei oxigenate utilizate la conservarea laptelui, prin pasteurizare “ la rece”.

Principiul metodei

Extractul enzimatic obținut dintr-o materie primă de origine animală, vegetală sau microorganisme este pus să acționeze asupra unei anumite cantități de apă oxigenată, la temperatura camerei un anumit timp. Apoi, în mediu acid, se titrează apa oxigenată rămasă

$5 \text{H}_2\text{O}_2 + \text{KMnO}_4 + 3 \text{H}_2\text{SO}_4 \longrightarrow 5 \text{O}_2 + \text{K}_2\text{SO}_4 + 8 \text{H}_2\text{O} + 2 \text{MnSO}_4$
netransformată cu permanganat de potasiu.

Reacția care are loc este următoarea:

Reactivi:

- apă oxigenată 1%;
- acid sulfuric 10%;
- permanganat de potasiu 0,1N;
- toluen.

Modul de lucru

Se iau 10 g de produs care conține catalază, bine mărunțit sau mojarat, se trece totul într-un cilindru gradat de 100 ml cu apă distilată, se adaugă câteva picături de toluen și se aduce la semn; se omogenizează bine și se lasă la temperatura camerei timp de 30 minute având grijă să se mai agite de câteva ori. După expirarea timpului, se filtrează prin filtru cutat într-un vas de sticlă curat și uscat. Din extract se iau în două baloane Erlenmeyer curate și uscate câte 20 ml. O probă se tratează termic (se fierbe) pentru inactivarea enzimei (proba martor). În ambele probe se adaugă 20 ml apă distilată, 3 ml apă oxigenată 1% și se lasă la temperatura camerei timp de 30 minute. Se adaugă apoi în cele două probe câte 5 ml acid sulfuric 10% și se titrează cu permanganat de potasiu 0,1N cantitatea totală de apă oxigenată luată în analiză în cazul probei martor și apa oxigenată rămasă nedescompusă în cazul probei cu enzimă activă. Titarea ambelor probe se face până la culoare roz care persistă 30 de secunde.

Modul de calcul

Diferența dintre cantitatea de permanganat de potasiu 0,1 N folosită la titrarea probei martor și a probei în care enzima a activat, corespunde apei oxigenate descompusă de catalaza din proba de analizat.

Activitatea catalazei se poate exprima în:

1) Mililitri de permanganat de potasiu 0,1N care corespunde apei oxigenate descompusă de catalaza dintr-un gram de produs după relația:

$$A = \frac{(V_m - V)}{G} d$$

2) Miligrame de apă oxigenată descompusă de catalaza dintr-un gram de produs:

$$A = \frac{1,7 \cdot (V_m - V)}{G} d$$

Se calculează titrul permanganatului de potasiu în raport cu apa oxigenată:

$$t_{KMnO_4 / H_2O_2} = \frac{0,1 \cdot 17}{1000} = 0,0017 \text{ g/ml} = 1,7 \text{ mg/ml}$$

3) Micromoli de apă oxigenată descompusă de catalaza dintr-un gram de produs într-un minut

$$1 \text{ micromol } H_2O_2 = 34 \cdot 10^{-6} \text{ g}$$

$$A = \frac{0,0017(V_m - V)}{34 \cdot 10^{-6} \cdot 30 \cdot G}, \text{ în care:}$$

A – activitatea enzimatică;

V_m – volumul de permanganat de potasiu 0,1 N folosit la titrarea cantității totale de apă oxigenată (proba martor), ml;

V – volumul de permanganat de potasiu 0,1 N folosit la titrarea excesului de apă oxigenată (proba cu enzimă activă), ml;

G – cantitatea de produs luată în analiză în g;

D – diluția efectuată;

30 – timpul cât a acționat enzima.

Studiul activitatii amilazei

Amilazele (EC 3.2.1)

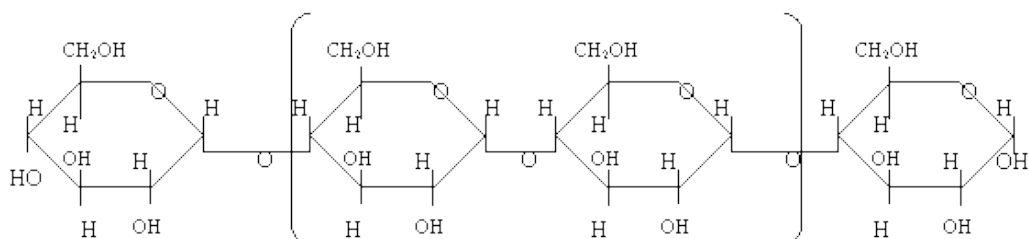
Multe procese industrial folosesc enzyme amilolitice pentru a hidroliza amidonul inaintea utilizarii acestuia in procese fermentative sau alte procese biochimice. Exista mai multe tipuri de enzime capabile sa hidrolizeze amidonul. Acestea pot ataca atat amidonul solubil, cat si granulele de amidon aflate in suspensie apoasa. In functie de utilizarile ulterioare ale hidrolizatului de amidon, se stabilesc conditii optime de realizare a hidrolizei enzimatice. Aceasta poate fi partiala sau totala. Gradul de hidroliza care se doreste sa se obtina dicteaza alegerea unui anumit sistem de enzime amilolitice. Pe de alta parte, inaintea desemnarii unui sistem de hidroliza potrivit, este nesesara cunosterea fenomenelor care influenteaza cinetica procesului de hidroliza desfasurat in prezenta sistemului de enzime ales. Este cunoscut faptul ca produsii finali rezultati in urma hidrolizei enzimatice a amidonului inhiba procesul printr-un mecanism atat competitive dupa unii autori, sau produc inhibitie exponential simpla dupa alti autori.

Sunt hidrolaze care catalizeaza hidroliza legaturilor α -1,4-glucan din polizaharide (amidon, glicogen, oligo si polizaharide înrudite). Fac parte din subgrupa glicozidazelor, enzime ce catalizeaza hidroliza compusilor în a caror constitutie intra grupari glicozil. Amilazele apar sub doua forme distincte:

α -amilazele - scindeaza specific legaturi glicozidice situate în mijlocul lantului polizaharidic care contine mai mult de trei unitati de D-glucoza α -1,4-legate (endo-amilaze), cu denumirea sistemica *α -1,4-glucan 4-glucanohidrolaza*

β -amilazele - actioneaza la capatul nereducator al lantului polizaharidic scindând resturi de maltoza (exo-amilaze), cu denumirea sistemica *α -1,4-glucan maltohidrolaza*

Substratul: Amidonul nu este o substanta unitara, ci un amestec de doua tipuri de polizaharide: amiloza si amilopectina. Amiloza este formata din polizaharide ce contin resturi de glucoza unite numai prin legaturi 1,4- α -glucozidice cu un grad de polimerizare între 100 si 2000. amilopectina spre deosebire de amiloza este ramificata prin legaturi 1,6- α -glucozidice. α -amilaza hidrolizeaza amidonul la un procent de 80% zahar reductor si 20% dextrine.



Prin folosirea concentratiilor mari de α -amilaza, amiloza este hidrolizata complet la un amestec de 13% glucoza si 87% maltoza. Amilopectina în aceleasi conditii este hidrolizata complet la un amestec de 19% glucoza, 72% maltoza si 8-9% izomaltoza, care contine toate legaturile 1,6- α -glicoizidice din ramificatii.

Amilazele din regnul animal apartin α -amilazelor. Pâna în prezent nu s-au identificat β -amilaze le animale. **α -amilazele** se gasesc în:

- boabe de cereale germinate. Se presupune ca ele exista si în cele negerminate sub forma de precursori inactivi care sunt activati în timpul germinarii prin enzimele proteolitice
- culturi de mucegaiuri de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*
- culturi bacteriene de *Bacillus subtilis*, *B. mesentericus*, *B. polymyxa* si *Clostridium acetobutylicum*
- animale în pancreasul de porc, pancreas sau saliva umana

β -amilazele se gasesc numai în plantele superioare, cereale germinate si negerminate, cartofi dulci, boabe de soia.

Proprietatile amilazelor de diferite origini difera prin conditiile optime de mediu si prin proprietatile lor fizico-chimice (amilaza umana este mai activa decât cea de origina suina).

α -amilazele sunt proteine pure fara grupa prostetica. Limitele de pH la care este stabila se încadreaza în intervalul 4.5-11, cu un optim de 6,9 (mai acid la amilazele de origine microbiana: 5.5-5.9). Activitatea creste cu temperatura pâna la 40⁰C, apoi descreste [Vasilescu, 1978].

α -Amilazele bacteriene hidrolizează parțial amidonul, păstrând configurația a a atomului anomic de carbon în produșii de reacție. Fragmentele de amidon rezultate în urma hidrolizei sunt dextrinele. Operația de hidroliză cu α -amilaze se numește dextrinizare. În industrie, această operație se mai numește fluidificare, datorită scăderii vâscozității suspensiei de amidon, la sfârșitul operației.

Microorganisme producătoare de α -amilaze

În general α -amilazele bacteriene sunt enzime termostabile. Cei mai importanți producători de α -amilaza bacteriană sunt speciile din genul *Bacillus* și anume *B. subtilis* și *B. amyloliquefaciens*. Aceste tulpini produc α -amilaze cu proprietăți similare dar cu reacții imunologice diferite. Primele preparate comerciale apărute pe piață conțineau enzime bacteriene produse de aceste specii. Mai târziu au apărut preparate enzimaticе conținând enzime cu înaltă termostabilitate produse de speciile *B. licheniformis* și *B. stearothermophilus*.

Hidroliza enzimatica a amidonului din cereale si cartofi are aplicatii intinse in fabricarea alcoolului si berii. In ambele aceste fabricatii se zaharifca intai amidonul din cereale sau cartofi, cu amilaza din orz incoltit (malt). Temperatura optima a acestei operatii este 55-65°, iar durata 20 de minute. Se obtin 70-80% maltoza si 20-30% dextrina. In cazul fabricarii berii, solutia astfel obtinuta se incalzeste (dupa adaugarea hameiului si filtrarea partilor insolubile) la 80° sau mai sus, distrugandu-se astfel amilaza. Dupa racire se fermenteaza cu drojdie. Berea rezultata contine deci dextrinele, care

determina in parte gustul acestei bauturi. La fabricarea alcoolului, solutia de maltoza si dextrina, rezultata din operatia de zaharifcare, se fermenteaza direct, fara a fi incalzita (si deci amilaza nu se distruge). Drojdia de bere, adaugata pentru producerea fermentatiei, contine si enzime de deramificare, care rup legaturile 1,6 din dextrine, punand la dispozitia amilazei dextrine neramificate, pe care aceasta le hidrolizeaza cantitativ la maltoza; aceasta este apoi hidrolizata, de a-glucozida (maltaza) din drojdie, la glucoza. In modul acesta intregul material este adus intr-o forma fermentabila prin drojdie.

Experienta: Intr-o eprubeta se dizolva la cald, in 5-6 ml. apa, un varf de spatula de amidon solubil. Separat se dizolva in 2-3 ml. apa, tot cald, un cristal de iod. Peste solutia rece de amidon se picura solutia de iod. Apare o coloratie albastra intensa. La incalzire (circa 70°) culoarea dispare complet; prin racire reapare coloratia initiala albastra.

Principiul metodei:

Amidonul rămas nehidrolizat în urma acțiunii enzimei din proba biologică este dozat colorimetric cu iod.

Reactivi:

1.Substrat tamponat: 13,3 g Na_2HPO_4 și 4,3 g acid benzoic. Se dizolvă în 250 ml. apă distilată la fierbere. Se adaugă 5 ml suspensie rece conținând 200 mg amidon. Se lasă să se răcească. Se aduce la 500 ml cu apă distilată. Se păstrează la 4°C (soluția trebuie să fie limpede).

2.Soluție stoc iod: 3,56 g KIO_3 și 45 g KI. Se dizolvă în 800 ml apă distilată. Se adaugă prin picurare 9 ml soluție HCl 12 M agitând continuu. Se aduce la 1 l cu apă distilată. Se păstrează la +4°C timp de maxim un an.

3.Soluția de iod pentru determinări: se face o diluție din soluția stoc 1:10 cu apă distilată. Se păstrează la +4⁰C maxim 2 luni.

4.Soluția acid clorhidric 1N.

5.Soluție amilază din comprimat: soluție enzimatică obținută prin triturarea unui comprimat de Mezym forte în mojar și extracția produsului fin pulverizat obținut cu 10 ml tamponat fosfat timp de 30 min. la temperatura camerei, urmată de filtrarea soluției. Soluția filtrată se aduce în balon cotat de 100 ml cu ser fiziologic tamponat.

Mod de lucru:

Se folosesc baloane cotate de 25 ml.

Reactivi (ml)	Probă	Martor
Substrat (amidon 37 ⁰ C)	2,5	2,5

Preincubare 15 minute la 37 ⁰ C		
Soluție amilaza din comprimat	0,05	-
Incubare 7,5 minute la 37 ⁰ C. Răcire pe gheață		
Acid clorhidric 1 N	1	1
Apă distilată	15	15
Soluție iod determinări	2,5	2,5
Soluție amilaza din comprimat	-	0,05
Se aduc ambele baloane la cotă cu apă distilată		
Se citește absorbanta la 660 nm față de apa distilată		

Calcul:

$$(A_M - A_P) / A_M \times 4200 = \text{unități amilazice/dl probă}$$

UI, o unitate internațională de activitate enzimatică fiind cantitatea de enzimă care transformă 1

μmol substrat (10^{-6} moli) în timp de 1 minut, la 25°C , în condiții optime de reacție.

Studiul cinetic al scindării enzimatică a lipidelor

Lipazele sunt enzime cu răspândire largă care s-au izolat dintr-o varietate de surse: animale, vegetale și microbiene. Lipazele de diferite proveniențe se deosebesc între ele sub aspectul proprietăților și caracterului acțiunii. Lipazele microbiene prezintă un potențial uriaș în domeniul tehnologiilor alimentare, al științelor medicale și în industria chimică, deoarece:

- 1) au specificitate largă de substrat;
- 2) nu necesită cofactori.
- 3) sunt stabile în solvenți organici;

În ultimii ani lipazele au fost intens folosite ca biocatalizatori pentru o diversitate de reacții ce se desfășoară în sistem folosind solvenți organici cum ar fi de exemplu sinteza esterilor și modificarea lipidelor. Într-un sistem apos acești biocatalizatori sunt capabili să catalizeze hidroliza triacilglicerolilor cu formare de acizi grași și glicerol, compuși foarte importanți în industria chimică. Hidroliza catalizată de lipază a trioleinei a fost deasemeni folosită pentru producerea de mono- și di-gliceride cu utilizare largă în calitate de emulgatori în industria alimentară și biochimică. Aproximativ 75% din enzimele produse în Europa, incluzând și lipazele au acțiune hidrolitică. Rolul biologic al lipazelor pentru organismele vii:

- asigură funcționarea membranelor;
- participă la metabolismul lipidic;
- participă la procesul de depozitare a grăsimilor de rezervă.

Lipazele produse de microorganisme sunt produse de drojdii (*Candida*, *Torulopsis*), mucegaiuri (*Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Mucor*), bacterii (*Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Staphylococcus*). Lipazele din microorganisme diferă între ele prin pH și temperatura optimă de activitate, durata/temperatura de inactivitate, respectiv stabilitatea termică.

Lipazele produse de microorganisme hidrolizează grăsimile și uleiurile naturale ca și gliceridele sintetice. Concentrații scăzute de săruri de Ca, Na, K, Mg activează lipazele, dar metalele grele sunt inhibitori puternici. Având în vedere acțiunea negativă a lipazelor asupra caracteristicilor senzoriale ale produselor alimentare, este necesar să se ia următoarele măsuri:

- să se reducă conținutul în apă liberă al produsul alimentar (acolo unde este posibil), pentru a micșora activitatea apei, deci pentru micșorarea vitezei reacțiilor enzimatice;
- să se păstreze produsele alimentare la temperaturi cât mai scăzute (de refrigerare sau congelare) sau să se inactiveze lipazele prin tratament termic ;
- să se reducă timpul de depozitare al materiilor prime ;
- să se elimine factorii care concură la dezvoltarea microflorei lipolitice.

Grăsimile și uleiurile sunt importante componente ale produselor alimentare. Valorile nutriționale și senzoriale precum și proprietățile fizice ale trigliceridelor sunt mult influențate de factori ca: poziția la care se leagă acizii grași la molecula de glicerol, de lungimea lanțului moleculei de acid gras și gradul de nesaturare. Lipazele permit modificarea proprietăților lipidelor prin modificarea poziției legării acizilor grași în molecula de glicerol și înlocuirea unuia sau mai multor acizi grași cu alții noi. În acest fel lipidele relativ ieftine pot ajunge la valori mai ridicate și cu proprietăți îmbunătățite. **Grăsimile și uleiurile** se deosebesc, în primul rând, prin starea de agregare: solide, semisolide sau lichide, mai mult sau mai puțin vâscoase. Ele au origine vegetală sau animală, fiind constituite în special din triacilgliceroli ai acizilor grași cu număr par de atomi de carbon. Prin grăsimi se înțeleg produsele solide sau semisolide la 20°C, în timp ce uleiurile sunt lichide. Toate sunt nemiscibile cu apa și au o densitate mai mică decât aceasta. Proprietățile fizice ale grăsimilor și uleiurilor sunt determinate de lungimea lanțului acizilor grași constituenți și de numărul dublelor

legături din aceștia. Acizii grași saturați cu lanț lung prezintă un punct de topire mai ridicat decât acizii grași nesaturați, culanț scurt. Lipidele vegetale sunt, de regulă, bogate în acizi grași nesaturați, exclusiv cunumăr par de atomi de carbon, în care dublele legături au configurația cis. Cei mai comuni acizi grași prezenți în gliceride sunt acidul dodecanoic (lauric), acidul tetradecanoic (miristic), acidul octadecanoic (stearic), acidul hexadecanoic (palmitic) și acidul oleic.

Grăsimi/uleieuri	10:0	12:0	14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:1	22:1
Ulei de rapiță	-	-	0,5	4	1	60	20	9	2	2
Ulei de floarea-soarelui	-	-	-	6	4	28	61	-	-	-
Grăsimi de cocos	7	48	17	9	2	7	1	-	-	-
Ulei din semințe de palmier	5	50	15	7	2	15	1	-	-	-
Ulei de palmier	-	-	2	42	5	41	10	-	-	-
Ulei de soia	-	-	-	10	3	41	36	-	1	-

Scop:

Scopul lucrării constă în determinarea vitezei reacției enzimatice de scindare a lipidelor și a influenței unor factori asupra acesteia, respectiv în stabilirea parametrilor ecuației cinetice (ecuația Michaelis-Menten).

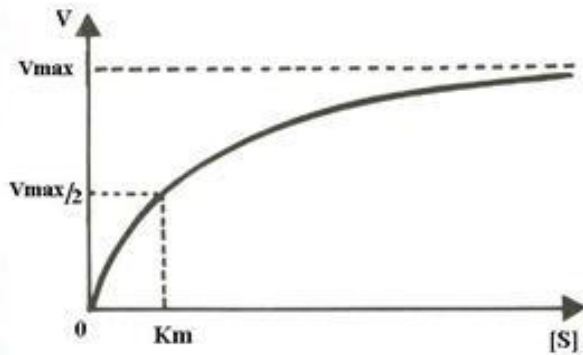
$$v_p = \frac{V \cdot S}{k_M + C_s}$$

unde: v_p – viteza de formare a produsului

V – Viteza maximă a reacției enzimatice care se atinge când întreaga cantitate de enzimă a reactionat cu substratul.

S – concentrația substratului

k_M – constanta Michaelis – Menten, reprezintă acea valoare a concentrației substratului când procesul decurge cu $\frac{1}{2}$ din viteza maximă.

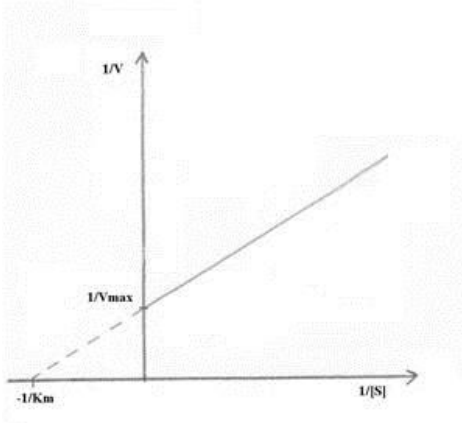


Reprezentarea grafica a ecuatiei Michaelis-Menten

Insa utilizarea acestei reprezentari grafice pentru determinarea vitezei maxime este dificila, din acest motiv se utilizeaza o metoda de liniarizare.

$$v_p = \frac{V \cdot S}{k_M \cdot C_S} \Rightarrow \frac{1}{v_p} = \frac{k_M}{V} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V}$$

Daca se reprezinta $1/v_p=f(1/S)$ se obtine o dreapta a carei panta este k_M/V



Liniarizarea Lineweaver-Burke

Mod de lucru

Se prepara 100 ml emulsie apa-ulei si se determina concentratia initiala ($C_{01}=1$ ml ulei, $C_{02} = 1.5$ ml ulei, $C_{03} = 2$ ml ulei). Densitate ulei floarea soarelui = 0.92

Uleiul din floarea soarelui este un amestec de: 95% trigliceride (formula $C_xH_yO_z$) si 5% acizi grasi liberi. Este un ulei semisicativ caracterizat printr-un indice de iod de 132 si o aciditate de 0,05. El nu contine poluanti periculosi cum sunt: benzen, plumb sau metale grele.

Caracteristicile fizice ale uleiului din floarea soarelui:

- densitatea la 20 grade = 0,92;
- vascozitate (CST) la 20 grade = 55 - 61;
- punctul de fuziune = - 16 grade;
- punctul de rupere = - 5 grade;
- PCI (Kcal/kg) = 9032;

Se adauga enzima si impartita in 3 pentru fiecare grupa – momentul t_0 .

Se prepara **reactivul de culoare**: se amesteca acid fosforic cu solutie de vanilina in proportie 4:1 (4 parti acid fosforic la 1 parte solutie de vanilina)

Se vor prepara 100 de ml: 80 ml de acid fosforic si 20 ml vanilina.

Se prepara **standardul**: intr-un balon cotat de 25 ml se adauga 0.15 ml trioleina si se aduce la semn cu cloroform.

Tehnica de lucru:

Solutii sulfurice

Se pipeteaza in 3 eprubete rezistente termic astfel:

	Proba (ml)	Standard (ml)	Martor (ml)
Sol de analizat	0.1	-	-
Sol. Standard	-	0.1	-
Apa distilata	-	-	0.1
Acid sulfuric conc	4	4	4

Se fierbe pe baia de apa 10 minute, se lasa sa se raceasca. Din solutiile (solutiile sulfurice) de mai sus se pipeteaza in alte 3 eprubete:

	Proba (ml)	Standard (ml)	Martor(ml)
Sol sulfurice	0.2	0.2	0.2
Reactiv de culoare	4	4	4

Se asteapta 30 de minute pentru desfasurarea reactiei.

Se citeste Extinctia probei (E_p) si a standardului (E_s) fata de martor la 530 nm.

$E_p/E_s * N = \text{mg lipide}/100 \text{ ml proba}$

$N = 600$

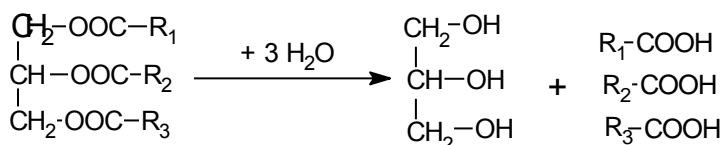
Prelucrarea datelor experimentale.

Timp			
Concentratia lipidelor			
Viteza procesului, v			
1/v			
1/Cs			

Se reprezinta grafic $C_s = f(t_p)$ pentru fiecare grupa. Din panta dreptei / curbei se determina viteza procesului, apoi se reprezinta $1/v = f(1/C_s)$ cu datele obtinute de toate cele 3 grupe si se determina V si K_M .

Determinarea activității lipazei

Lipaza face parte din clasa hidrolazelor, grupa esterazelor; ele catalizează descompunerea legăturilor esterice dintre glicerină și acizii grași din lipide, după schema:



Lipazele sunt foarte răspândite în natură. În organismul animal ele se găsesc în: sucul pancreatic, sânge, stomac, plămâni, rinichi și în toate țesuturile grase. În regnul vegetal ele se localizează mai ales în semințe. Cantități mari de lipaze conțin semințele plantelor oleaginoase (ricin, soia, floarea-soarelui etc.). Lipazele au fost identificate și la microorganisme (*Aspergillus niger*).

Lipazele de diferite proveniențe acționează la pH-uri optime diferite, pH-ul optim al lipazei pancreatice este de 7,5-7,8 al celei stomacale 1,8-2,5, iar la lipazei vegetale este de 4,7-5,0.

Principiul metodei

Activitatea lipazei se determină prin măsurarea creșterii acidității unor lipide ca urmare a acțiunii unui preparat enzimatic obținut din semințe oleaginoase.

Substratul ideal pentru studiul activității lipazei dintr-un material oarecare sunt lipidele provenite din același material. Totuși, în calitate de substrat al activității lipazei se pot folosi și alte lipide de diferite proveniențe.

Reactivi necesari:

- tampon acetat, pH = 4,7;
- ulei rafinat;
- hidroxid de sodiu sau potasiu, soluție 0,01N;

- fenolftaleină, soluție alcoolică 1%;
- alcool etilic 96%;
- eter de petrol.

Obținerea preparatului enzimatic

Într-un vas de sticlă prevăzut cu dop, se amestecă o parte semințe de ricin sau soia fin mărunțite, cu două părți eter. Se lasă pentru extracția uleiului timp de 2-3 ore agitând periodic. Se separă eterul și se introduc din nou 5 părți eter peste produsul parțial degresat. Se mai extrage proba încă o oră, după care se separă eterul și se usucă produsul degresat, într-o etuvă cu ventilator la temperatura de 30°C.

Semințele degresate conțin lipază activă.

Modul de lucru

Într-un mojar se introduc 0,2 g semințe de ricin sau soia degresate care se amestecă cu 3 ml ulei rafinat . Se adaugă 2 ml soluție tampon pH= 4,7 și se introduce mojarul într-un termostat, la 30°C, timp de 30 minute. După aceasta se trece cantitativ conținutul mojarului într-un Erlenmeyer, spălând mojarul cu 15 ml alcool 96% (vol) și 15 ml eter de petrol. Se titrează apoi acizii grași din probă cu KOH sau NaOH 0,01N în prezența fenolftaleinei ca indicator.

În paralel se face și o probă martor care diferă de proba de analizat prin faptul că nu se mai ține la termostat și se titrează imediat cu KOH sau NaOH 0,01N.

Modul de calcul

Activitatea lipazei se exprimă prin numărul de micromoli de acizi grași reprezentați de acid oleic, ce se formează în urma acțiunii unui gram de preparat enzimatic într-un minut.

$$A = \frac{(V - V_m) \cdot 0,00282}{282 \cdot 10^{-6} \cdot G \cdot t}, \text{ în care:}$$

V – volumul de hidroxid de sodiu 0,01N folosit la titrarea probei în care a acționat enzima (corespunzător acizilor grași eliberați de enzimă și celor existenți în substrat), în ml;

V_m – volumul de hidroxid de sodiu 0,01N folosit la titrarea probei martor (corespunzător acizilor grași eliberați de enzimă și a celor existenți în substrat), în ml;

0,00282 – titrul hidroxidului de sodiu în raport cu acidul oleic;

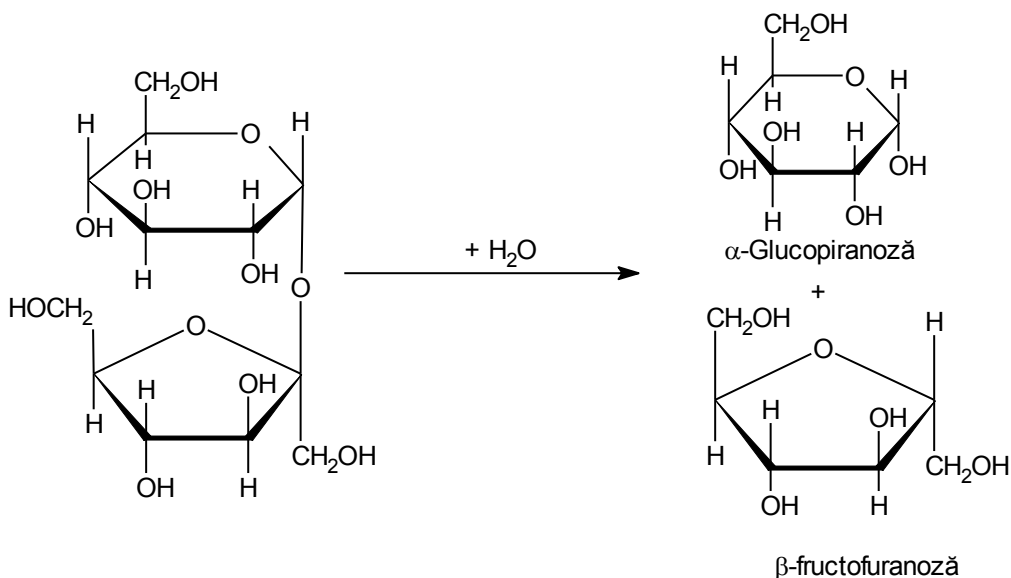
$282 \cdot 10^{-6}$ –1 micromol de acid oleic

G - cantitatea de preparat enzimatic luat în analiză, în g sau ml;

t_{min} – timpul de termostatare în minute.

Determinarea activității invertazei

Invertaza (β -fructozidaza) este o enzimă din clasa hidrolazelor, care catalizează hidroliza zaharozei cu formare de glucoză și fructoză (zahăr invertit), atacând legătura glicozidică din partea moleculei de fructoză.



Invertaza se găsește în special în drojzii. Are temperatura optimă de activitate 52°C iar pH-ul 4,5.

Principiul metodei

Metoda se bazează pe dozarea glucidelor reducătoare care se formează ca urmare a acțiunii invertazei asupra unei soluții de zaharoză cu concentrația cunoscută.

Reactivi

- zaharoză, soluție 2% tamponată la pH 4,5 cu acid acetic;
- acetat de sodiu 0,2 M;
- reactivi pentru determinarea glucidelor reducătoare prin metoda Schoorl;
- toluen.

Obținerea preparatului enzimatic

Sursa clasică de obținere a preparatelor de invertază este drojdia de bere și drojdia de panificație. Deoarece invertaza este o enzimă intracelulară care nu difuzează prin membrană, pentru extracția ei se procedează astfel: 10 g drojdie se mojarază cu nisip timp de 10-15 minute pentru a distruge pereții celulari. Se adaugă 30 ml apă distilată și 0,5 ml toluen în calitate de antiseptic. Amestecul se termostatează timp de 2 ore la 35-37°C în vederea autolizei celulelor care nu s-au distrus prin mojarare. Se mojarază din nou, se aduce la 100 ml cu apă distilată și apoi se centrifughează întreaga probă la 4000 ture/min, timp de 20 minute.

Soluția obținută conține invertază activă care se poate păstra 3-4 zile la frigider.

Modul de lucru

Se pipetează într-un balon Erlenmeyer 1 ml preparat enzimatic de invertază. În alt balon se pipetează 1 ml preparat enzimatic supus în prealabil fierberii pentru inactivarea enzimei (proba martor). Se adaugă în ambele baloane câte 10 ml soluție de zaharoză 2%, se omogenizează după care acestea se termostatează timp de 30 minute la temperatură de 37°C, pentru desfășurarea reacției enzimatice.

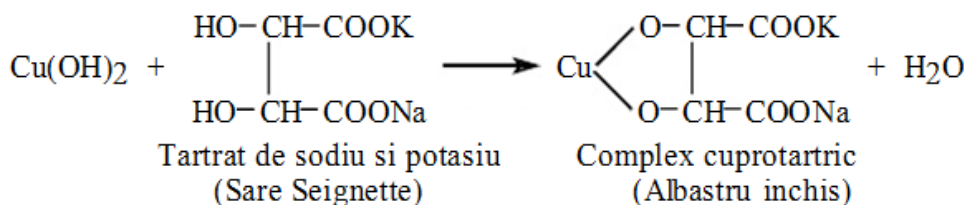
După trecerea acestui timp, se adaugă în ambele baloane câte 9 ml apă (pentru ca volumul final să fie de 20 ml), se omogenizează bine și se determină glucidele reducătoare prin metoda Schoorl folosind în acest scop câte 5 ml din fiecare probă.

În proba cu invertază inactivată se determină glucidele reducătoare preexistente în sistem (proba martor). În proba cu invertază activă se dozează glucidele reducătoare preexistente și glucidele reducătoare formate în urma acțiunii enzimei.

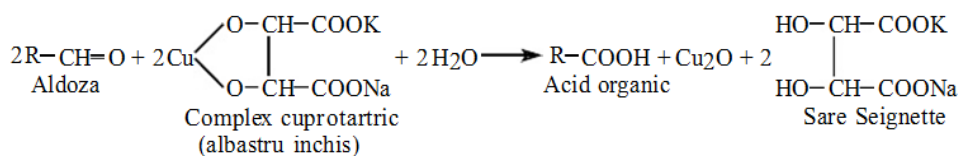
Metoda Schoorl

În mediul alcalin, la cald, glucidele reducătoare reduc complexul cuprotartric, format prin amestecarea soluțiilor Fehling I și Fehling II, până la oxid cupros (Cu_2O), precipitat roșu cărămiziu. Gruparea aldehydică se oxidează la carboxil. Soluția de sulfat de cupru și sarea Seignette, în exces de hidroxid de sodiu, poartă numele de soluție Fehling. De obicei, aceasta se prepară în momentul întrebuirii prin amestecarea a două soluții de bază, în cantități egale:

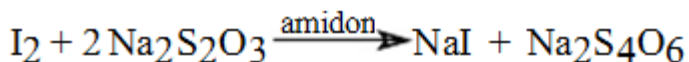
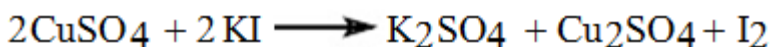
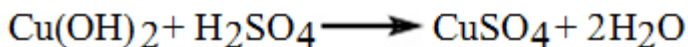
- soluția Fehling I, soluție cuprică: $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$
- soluția Fehling II, soluție bazică: NaOH + tartrat dublu de Na și K (sare Seignette).



Complexul cuprotartric format oxidează funcțiunea aldehydică a glucidului reducător (glucoza), el reducându-se la oxid cupros. Cantitatea de oxid cupros este proporțională cu cantitatea de glucoză din mediul de reacție.



În metoda Schoorl, restul de Cu(OH)_2 care nu a fost redus se acidulează cu H_2SO_4 , transformându-se din nou în CuSO_4 și I_2 care se titrează cu tiosulfat de sodiu.



La titrare, se utilizează ca indicator o soluție de amidon care formează cu iodul un compus colorat în albastru închis. După titrare, soluția devine albă.

Reactivi necesari:

- soluție **Fehling I**: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$69,3 g

H_2SO_45 ml

se aduce la 1.000 ml soluție cu apă distilată

- soluție **Fehling II**: tartrat dublu de Na și K..... 346 g

NaOH 100 g

după dizolvare și răcire se aduce la 1.000 ml cu apă distilată

- soluție **H_2SO_4 25%**: acid sulfuric concentrat.....135 ml

apă distilată.....700 ml

-soluție **KI 20%**: iodură de potasiu.....200 g

apă distilată.....1.000 ml

- soluție **amidon 1%**

Într-un flacon Erlenmeyer de 500 ml, se pipetează 10 ml soluție Fehling I și 10 ml soluție Fehling II, 20 ml apă distilată și 5 ml probă. Se încălzește la flacăra potrivită, pe o sită de azbest, astfel încât soluția să ajungă la fierbere în aproximativ 3 minute, după care se menține la fierbere 2 minute. Deasupra flaconului se așează o pâlnie se sticlă pentru condensarea vaporilor de apă. Se răcește cu apă curentă, după care adaugă 10 ml soluție H_2SO_4 25% și 10 ml KI 20%.Soluția obținută se titrează sub agitare cu soluție de tiosulfat de sodiu 0,1N până când soluția devine gălbuie. Se adaugă câteva picături soluție amidon 1% și se continuă titrarea până ce culoarea soluției devine albă.

În paralel se realizează un martor folosind 5 ml apă distilată, 10 ml soluție Fehling I și 10 ml soluție Fehling II. La martor nu este necesară fierberea. În continuare se lucrează identic ca la probă.

Modul de calcul

Se face diferența între volumul de tiosulfat de sodiu 0,1 N folosit la titrarea probei cu enzimă inactivată (proba martor) și volumul folosit la titrarea probei cu enzimă activă. În funcție de această diferență se ia din tabelul Schoorl cantitatea de zahăr invertit (z_I , în mg) care corespunde zaharozei hidrolizate din 5 ml probă luată în analiză.

Activitatea invertazei se exprimă în:

- 1) Cantitatea de zahăr invertit care rezultă prin hidroliza a 100 g zaharoză de către 1 ml sau 1 g preparat enzimatic, în condițiile de lucru date:

$$A = \frac{100 \cdot z_i}{2 \cdot c \cdot t} \cdot d, \text{ în care:}$$

c- cantitatea de preparat enzimatic, în ml sau g;

z_I – cantitatea de zahăr invertit produs de enzimă, în g;

d – diluția;

t – timpul de termostatare, în minute.

- 2) Micromoli de zaharoză hidrolizată într-un minut de 1 ml preparat enzimatic, sau 1 g drojdie sau altă sursă, în condițiile de lucru date:

$$A = \frac{0,95 \cdot z_i}{342 \cdot 10^{-6} \cdot c \cdot t} \cdot d, \text{ în care:}$$

c- cantitatea de preparat enzimatic, în ml sau g;

z_I – cantitatea de zahăr invertit produs de enzimă, în g;

d – diluția;

t – timpul de termostatare, în minute;

0,95 – factor de transformare a zahărului invertit în zaharoză;

$342 \cdot 10^{-6}$ – 1 micromol zaharoză.

EVIDENȚIEREA MICROORGANISMELOR PRODUCĂTOARE DE ENZIME AMILOLITICE

Principalele enzime microbiene care hidrolizează amidonul sunt α -amilaza, β -amilaza și glucoamilaza, enzime extracelulare produse de bacterii, fungi și de unele levuri. Bacteriile din genul *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. macerans*, *B. stearothermophilus*) sunt producătoare de amilaze active la 50-60°C, termostabile și folosite pentru obținerea amilazelor industriale. Alte specii de *Bacillus* cum sunt: *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. polymixa* sunt producătoare de β -amilază, enzimă zaharogenă, care prin hidroliza legăturilor glucozidice eliberează molecule de maltoză.

Fungii produc mai ales α -amilaza și glucoamilaza (*Aspergillus*, *Mucor* și *Rhizopus*), deosebindu-se prin raportul între aceste două enzime sintetizate. Dintre drojdii, cei mai importanți din acest punct de vedere sunt reprezentanții genurilor *Saccharomyces*, *Tricosporon*, *Candida*.

Principiul metodei: evidențierea enzimelor amilolitice produse de către coloniile microbiene poate fi efectuată utilizând un mediu de cultură solidificat, conținând amidon. Sub acțiunea amilazelor ce difuzează în gelul de agar, amidonul este scindat hidrolitic și, în urma adaosului de soluție Lugol (I_2 / KI), zona din jurul coloniilor producătoare nu se mai colorează în brun. Valoarea raportului între diametrul zonei de hidroliză și diametrul coloniei sau indicele amilolitic, este o măsură a cantității de enzimă produsă de microorganismul testat.

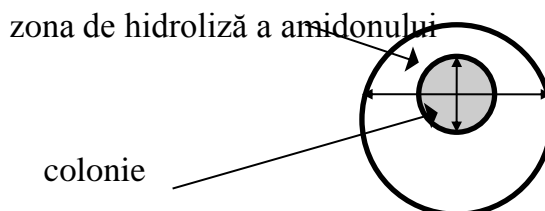
Materiale utilizate:

- cultura microbiană
- plăci Petri
- mediul de cultură: - extract de drojdie 4g
- amidon solubil 10 g
- K_2HPO_4 1g,

- Mg SO₄.7H₂O 0,5 g
- agar-agar 20 g
- apă distilată1000 ml

- I₂
- KI
- ac de inoculare
- termostat
- lampă bactericidă
- bec de gaz
- autoclav

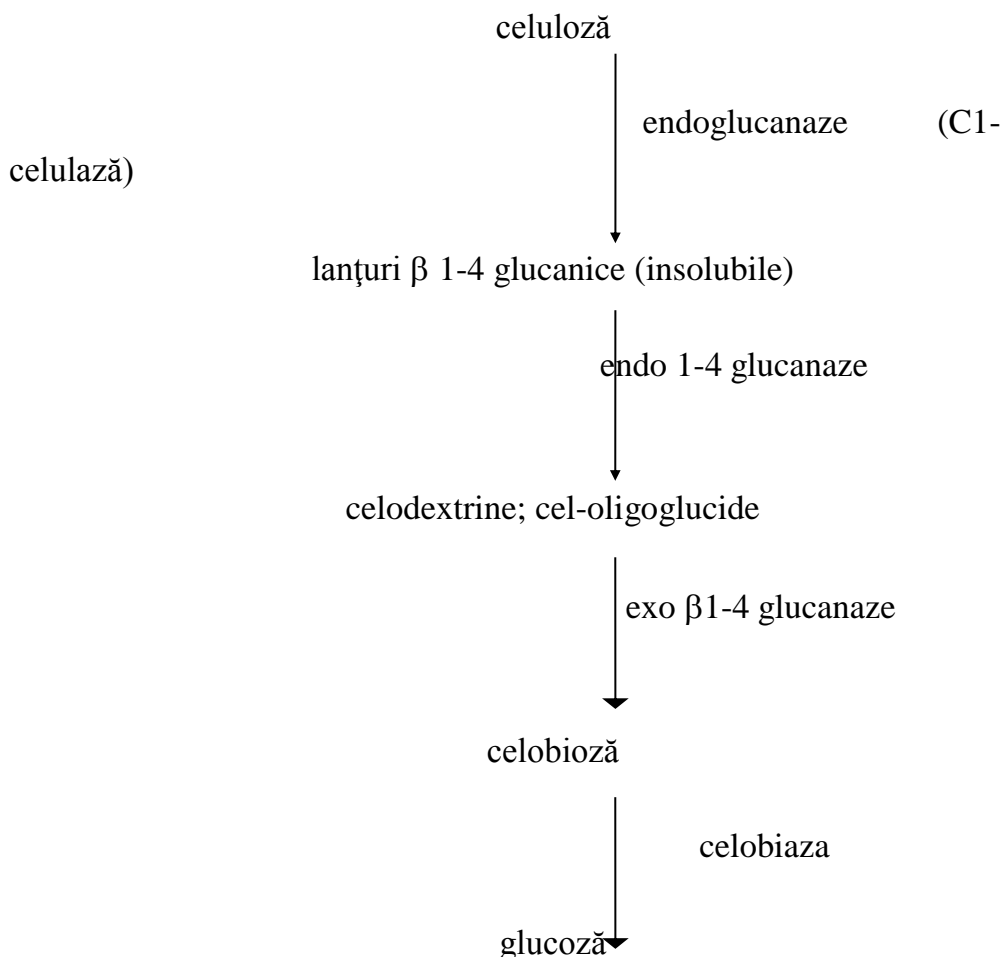
Mod de lucru: Mediul se sterilizează în autoclav timp de 30 minute, la 120°C, după care se toarnă în cutii Petri și se lasă să se solidifice. Plăcile sunt apoi însămânțate prin înțepare centrală sau din diluții decimale ale microorganismului de testat. Termostatarea se face timp de 72 ore pentru bacterii și 5 zile pentru mușegaiuri. Pentru determinarea diametrului zonei de liză a amidonului, peste mediul din plăci se toarnă soluție Lugol și se măsoară diametrul coloniei și cel al zonei rămase necolorate. Se calculează indicele amilolitic astfel:



$I_A = \frac{\text{diametrul zonei de liză a amidonului}}{\text{diametrul coloniei}}$

EVIDENȚIEREA MICROORGANISMELOR PRODUCĂTOARE DE ENZIME CELULOZOLITICE

Celuloza este polizaharidul de structură cu cea mai mare răspândire în lumea vegetală, putând fi hidrolizată de enzimele celulozolitice produse de bacterii și fungi. Hidroliza generală a celulozei are loc după schema:



Dintre bacteriile care produc enzime celulozolitice fac parte bacterii cu forme spiralate aparținând genurilor: *Cytophaga*, *Cellvibrio*,

Cellulomonas. Fungii cu activitate celulozolică superioară sunt : *Fusarium*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Rhizopus*.

Principiul metodei: În cazul în care microorganismul testat produce enzime celulozolitice extracelulare, acestea difuzează în mediul de cultură și produc o clarificare a agarului în jurul coloniilor active.

Materiale utilizate:

- cultura microbiană (*Aspergillus terreus*, *Rhizopus orizae*)
- plăci Petri
- ac de inoculare
- mediul de cultură: - celuloză pudră2,5g
 - peptonă.....0,5g
 - K₂HPO₄.....0,2g
 - MgSO₄.7H₂O.....0,2g
 - K₂CO₃.....0,4g
 - CaCl₂.....0,02g
 - FeSO₄.7H₂O.....0,02g
 - NaCl.....0,02g
 - agar-agar.....15g
 - apă distilată.....1000ml

Autoclavare 20

minute, 121°C

- termostat
- lampă bactericidă
- bec de gaz
- autoclav

Mod de lucru: Mediul de cultură se sterilizează în flacoane Erlenmeyer de 500 ml, la 121°C timp de 20 minute, apoi se repartizează câte 15 - 20ml în cutii Petri și se lasă să se solidifice. Însămânțarea se face fie prin înțeparea centrală a suprafeței mediului ,

fie din diluții decimale ale culturii de analizat. Termostatarea va avea loc la 30°C, timp de 5 - 6 zile pentru tulpina fungică sau o durată corespunzătoare în cazul utilizării altor tulpini.

Dacă microorganismul testat produce enzime cu acțiune celulozolică, acestea determină clarificarea mediului de cultură în jurul coloniei datorită procesului de hidroliză a celulozei încorporate. Se va calcula indicele celulozolic al tulpinii studiate, ca fiind raportul dintre diametrul zonei de liză și diametrul coloniei:

$I_C = \frac{\text{diametrul zonei de hidroliză a celulozei}}{\text{diametrul coloniei}}$

EVIDENȚIEREA MICROORGANISMELOR PRODUCĂTOARE DE ENZIME PROTEOLITICE

Proteinele constituie unul din substratele nutritive pentru microorganisme. Ele nu sunt direct asimilabile, datorită mărimii moleculei lor și, de aceea, trebuie degradate în peptide cu masă mai mică și apoi în aminoacizi, cu ajutorul enzimelor extracelulare. Proteinele conținute în materia organică nevie, care se acumulează în sol și ape, prin moartea plantelor, animalelor, microorganismelor, pot fi hidrolizate sub acțiunea proteazelor extracelulare produse de către bacterii și mucegaiuri -agenți ai putrefacțiilor (degradarea proteinelor de origine animală) și ai putrezirii (degradarea proteinelor de origine vegetală). Spre deosebire de bacterii și mucegaiuri, drojdiile nu pot folosi proteinele din mediu în procesul de nutriție deoarece ele conțin proteaze intracelulare, care nu se pot elibera în mediul extern decât prin dezintegrarea învelișurilor celulare sau moarte prin autoliză.

Proteazele sunt produse de un număr de bacterii ale genului *Bacillus*, *Streptomyces*, *Proteus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* și de mucegaiuri din genul *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*.

A. Hidroliza cazeinei

Principiul metodei: Coloniile producătoare de enzime proteolitice determină în jurul lor o zonă clară de liză a cazeinei din mediul de cultură.

Materiale utilizate:

- cutii Petri
- cultura microbiană (*Aspergillus sp.*, sau *Bacillus subtilis*)
- ac de inoculare
- bec de gaz
- termostat
- autoclav
- mediu de cultură - cazeină2,5g
- Ca(OH)_2 0,15g

- CaCl₂.....0,05g
- agar-agar.....15g
- apă distilată1000ml

Mod de lucru: Mediul de cultură se repartizează câte 200 ml în flacoane Erlenmeyer de 500 ml și se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 20 minute, apoi se toarnă câte 15 - 20 ml în plăcile Petri și se lasă să se solidifice. Însămânțarea plăcilor se efectuează din cultura de lucru prin înțepare centrală sau din diluții decimale și se incubează la 30°C, timp de 48 -72 ore. Se măsoară diametrul zonei în care se observă dispariția turbidității mediului de cultură ca urmare a hidrolizei cazeinei, precum și diametrul coloniei și se face raportul acestora pentru a se determina indicele proteolitic:

$$I_p = \frac{\text{diametrul zonei de hidroliză a cazeinei}}{\text{diametrul coloniei}}$$

B. Hidroliza gelatinei

Principiul metodei: Microorganismele producătoare de proteaze extracelulare pot hidroliza gelatina din mediul de cultură, care își pierde astfel proprietatea de a se solidifica la temperaturi scăzute.

Materiale utilizate:

- cultura microbiană (*Bacillus subtilis*)
- eprubete cu mediul de cultură conținând gelatină
- ac de inoculare
- bec de gaz
- termostat
- frigider
- autoclav
- mediul de cultură: - peptonă de carne.....5g
 - extract de carne.....3g
 - gelatină.....120g
 - apă distilată1000ml

Mod de lucru: Mediul de cultură se repartizează câte 10 mililitri în tuburi prevăzute cu dop de vată și se sterilizează în autoclav, timp de 20 minute la 121°C. După solidificarea mediului nutritiv (păstrat peste noapte în apă rece), tuburile se inoculează prin înțepare centrală cu tulpina bacteriană cercetată, apoi se incubează la 37°C timp de 48 ore. După acest interval, culturile se plasează aproximativ o oră la +4°C, pentru solidificarea gelatinei în cazul în care nu a fost hidrolizată. Dacă tulpina a prezentat activitate proteolitică, mediul de cultură rămâne lichid după păstrarea în frigider.

EVIDENȚIEREA MICROORGANISMELOR PRODUCĂTOARE DE ENZIME LIPOLITICE

Lipidele prezente în materia nevie, de origine vegetală și animală, care ajung în habitaturi naturale, precum și cele conținute în materii prime sau produse alimentare pot suferi transformări sub acțiunea microorganismelor producătoare de lipaze extracelulare. Lipidele nu pot fi asimilate decât după hidroliza lor în prezența enzimelor specifice, numite în general lipaze, dar, grupate totuși în funcție de tipul substratului pe care îl degradează în trei categorii: esteraze, lipaze și lecitinaze.

Lipazele sunt sintetizate de numeroase microorganisme: mucegaiuri (genul *Rhizopus*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Geotrichum* ș.a.) și levurii ale genului *Candida*.

Cu microorganisme selecționate se pot obține preparate enzimatică cu activitate lipazică ce pot fi utilizate la fabricarea brânzeturilor pentru dezvoltarea aromei, în terapeutică împreună cu lipaza pancreatică pentru îmbunătățirea digestiei, precum și în industria detergentilor.

Principiul metodei: Lipazele din grupa esterazelor hidrolizează compușii denumiți "TWEEN", care sunt esteri ai sorbitolului cu acizii grași cu lanț lung. În tehnicile calitative cele mai utilizate, acești esteri solubili în apă sunt încorporați într-o geloză nutritivă conținând CaCl_2 . Acizii grași eliberați sub acțiunea lipazelor reacționează cu CaCl_2 și formează săruri insolubile de calciu care provoacă opacifierea mediului în jurul coloniilor producătoare de esteraze.

Materiale utilizate:

- cultura microbiană cu activitate lipolitică
- cutii Petri
- ac de inoculare
- bec de gaz
- termostat

- mediul de cultură: - agar nutritiv

Mod de lucru: se sterilizează mediul de cultură în flacoane Erlenmeyer de 500 ml și, separat, o soluție 1% de Tween 20, 40, 60 sau 80 și o soluție 1% CaCl₂, în regim de 121°C / 20 minute. În plăcile Petri sterile se introduc câte 2 ml din soluția de Tween și 0,5 ml din soluția de CaCl₂. Peste acestea se toarnă rapid 15 - 20 ml din agarul nutritiv, se omogenizează prin rotirea în ambele sensuri a plăcilor și se lasă să se solidifice. Mediul se însămânțează prin înțepare centrală din cultura de cercetat și se termostatează la temperatura optimă de dezvoltare a microorganismului, timpul necesar. Microorganismele cu activitate tween-esterazică determină apariția în jurul coloniilor a zonelor opace. Se calculează indicele lipolitic după formula:

$I_p = \frac{\text{diametrul zonei de hidroliză a esterului}}{\text{diametrul coloniei}}$

STUDIUL CINETIC AL SCINDARII LACTOZEI SUB ACȚIUNEA β -GALACTOZIDAZEI

Obiectiv:

- Determinarea experimentală a activității β -galactozidazei
- Determinarea parametrilor cinetici K_M și V_m

Introducere

Enzimele sunt un tip specializat de proteine care acționează ca și catalizatori biologici pentru reacțiile chimice din organismele vii. Acțiunea enzimelor este esențială pentru viață, furnizând energie, eliminând deșeurile și permițând organismelor să funcționeze. Înțelegerea enzimelor este, așadar, critică pentru o înțelegere deplină a vieții. Galactozidaza (E.C. 3.2.1.23) sau lactaza este o enzima ce permite descompunerea lactozei. Este un tetramer format din patru lanțuri polipeptidice identice (Fig. 1).

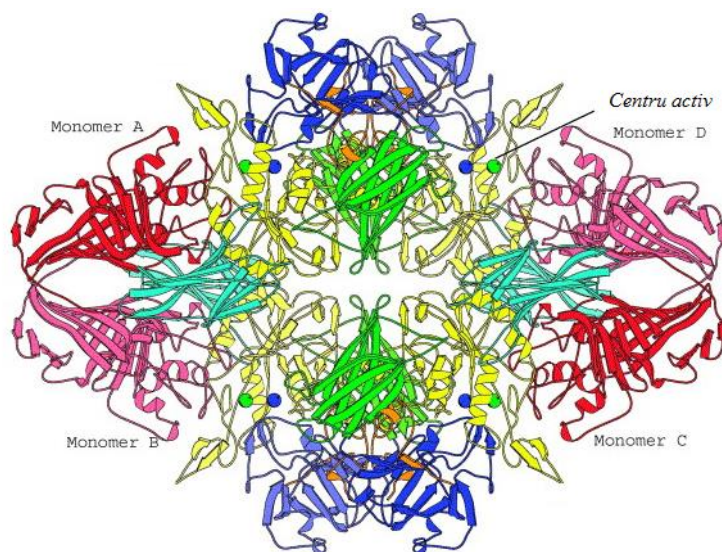


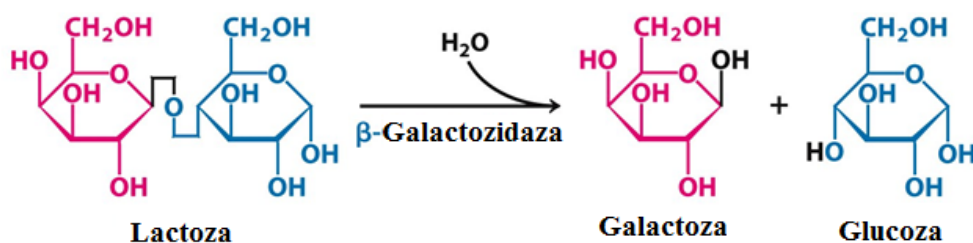
Fig. 1. Structura β -galactozidazei.

Colorarea este pe domenii: complementare peptidă, portocalie; Domeniul 1, albastru; Domeniul 2, verde; Domeniul 3, galben; Domeniul 4, cyan; Domeniul 5, roșu. Nuanțele mai deschise și mai întunecate ale unei culori date sunt folosite pentru a distinge în același domeniu subunități diferite. Cationii metalici din fiecare dintre cele patru centre active sunt prezentate sub formă de sfere: Na^+ , verde; Mg^{2+} , albastru.

Resturile de aminoacizi, care formează centrul activ, se găsesc pe diferite segmente ale lanțului polipeptidic. Cea mai mare parte a centrului activ se observă în domeniul 3, lanțul de aminoacizi fiind completat cu bucle care provin din primul și al cincilea domeniu al aceluiași monomer. Pe lângă aceste componente din același monomer, există o buclă care provine din domeniul 2 al unui monomer diferit și se extinde în centrul activ vecin. Așa cum se observă în Fig. 1, Monomerul A participă cu o buclă din Domeniu 2 pentru a finaliza centrul activ al Monomerului D. La fel, o buclă din Monomerul D completează centrul activ al Monomerului A. În mod identic se formează și centrele active din B și C obținându-se un total de patru centre active funcționale, bine separate și care, probabil, acționează independent. Cu toate acestea, deoarece este nevoie de doi monomeri pentru a finaliza un centru activ, monomerii individuali ai enzimei sunt inactivi.

Lactoza este o glucidă care poate fi întâlnită în lapte. Numele de lactoză provine din latină: lac, lactis – lapte, iar terminația oză se adaugă glucidelor. Laptele sau produsele lactate conțin în procent între 1,5–8 % lactoză. Lactoza face parte din categoria dizaharidelor, ea este alcătuită din o moleculă de D-galactoză și o moleculă de D-glucoză, cele două molecule sunt legate în poziția β -1,4- printr-o legătură glicozidică.

Intoleranță la lactoza reprezintă incapacitatea de a digera cantități semnificative de lactoză și este cauzată de producția redusă sau scăderea activității lactazei, având ca efect împiedicarea descompunerii lactozei. Pentru ca lactoza să fie absorbită de intestin în corp, mai întâi trebuie să fie descompusă în glucoză și galactoză :



Studiul mecanismului reacțiilor enzimatiche, a proceselor metabolice și a vitezei de transformare a substratului în produs se face prin **metoda cinetică**. Acționând în celula vie și fiind proteine, enzimele prezintă unele proprietăți fizico-chimice și funcționale care le diferențiază net de

catalizatorii chimici. Complexitatea structurii biocatalizatorilor precum și complexitatea mecanismului intim de reacție fac ca studiul cineticii reacțiilor enzimatică să fie mult mai dificil comparativ cu cinetica reacțiilor chimice în general.

Studiul cineticii enzimatică, ca și în cinetica chimică, se bazează pe **măsurarea vitezei de reacție** în condiții standard (care se asigură în așa fel încât să fie cât mai apropiate posibil de condițiile existente *in vivo*) și în diferite condiții particulare create într-un anumit scop. Prin studiul cineticii enzimatică este explicat modul în care enzimele acționează, permițând determinarea **vitezei maxime de reacție** a unei enzime și **a afinității sale pentru substrat**.

Viteza de reacție reprezintă variația în timp a concentrației substratului sau produsului sau a oricărei alte mărimi fizice proporționale cu concentrația. Ecuația cinetică pentru o reacție enzimatică $E+S \rightarrow P+E$, este o expresie matematică folosită în cinetica enzimatică, pentru a lega viteza de reacție de concentrația fiecărui reactant. Michaelis și Menten au dezvoltat modelul cinetic al vitezei de formare a produsului în funcție de concentrația substratului și a enzimei. Acești autori consideră că reacția dintre enzimă și substrat se desfășoară în două etape: în prima etapă are loc interacțiunea substratului cu enzima la nivelul centrului activ al acesteia, ca urmare a complementarității stereochemice, iar viteza de reacție este dependentă direct de cantitatea de substrat, în timp ce în a doua etapă are loc formarea produsului și eliberarea enzimei, care este capabilă să reia ciclul descris de sistemul de reacție, viteza depinzând de concentrația complexului enzimă – substrat.

Viteza de formare a produsului în procesul enzimatic este:

$$v_p = \frac{V \cdot C_s}{k_M + C_s}$$

unde: v_p – viteza de formare a produsului

V – Viteza maximă a reacției enzimatică care se atinge când întreaga cantitate de enzimă a reacționat cu substratul.

C_s – concentrația substratului

K_M – constanta Michaelis – Menten, reprezintă acea valoare a concentrației substratului când procesul decurge cu $\frac{1}{2}$ din viteza maximă și

reprezintă o măsură a afinității enzimei pentru substrat (cu cât valoarea lui K_M este mai mică, cu atât este mai mare afinitatea enzimei pentru substrat).

Această relație este denumită ecuația Michaelis – Menten și descrie viteza de formare a produsului într-un proces enzimatic, reprezentând modelul ideal pentru viteza proceselor enzimatică în regim staționar, lipsit de procese secundare de inhibiție. Ecuația Michaelis - Menten a fost stabilită în ipoteza că, în regim staționar, concentrația totală a enzimei este mică în raport cu cea a substratului. Creșterea concentrației enzimei din mediul de reacție peste o anumită limită atrage după sine anularea ipotezei, iar de aceea viteza reacției enzimatică nu va mai fi direct proporțională cu concentrația enzimei. Cinetica M-M poate fi reprezentată în următorul grafic (Fig. 2):

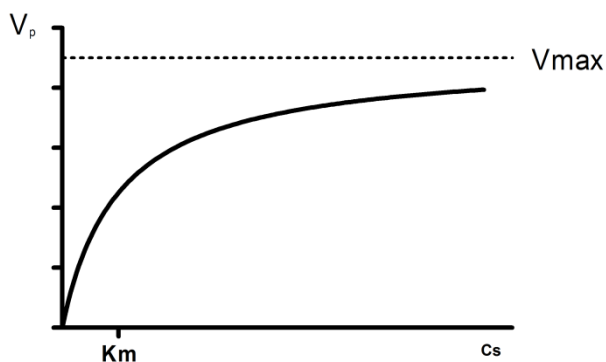


Fig. 2. Reprezentarea grafica a ecuației Michaelis-Menten

Însa utilizarea acestei reprezentări grafice pentru determinarea vitezei maxime este dificilă, din acest motiv se utilizează o metodă de liniarizare (Fig. 3).

$$v_p = \frac{V \cdot C_s}{k_M + C_s} \Leftrightarrow \frac{1}{v_p} = \frac{k_M}{V} \cdot \frac{1}{C_s} + \frac{1}{V}$$

Dacă se reprezintă $1/v_p=f(1/C_s)$ se obține o dreaptă a cărei pantă este k_M/V .

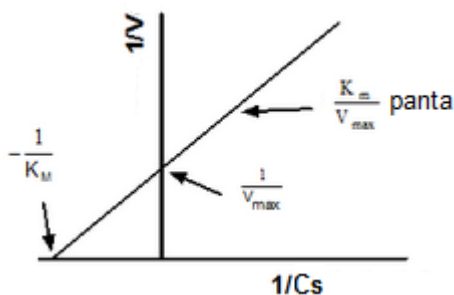
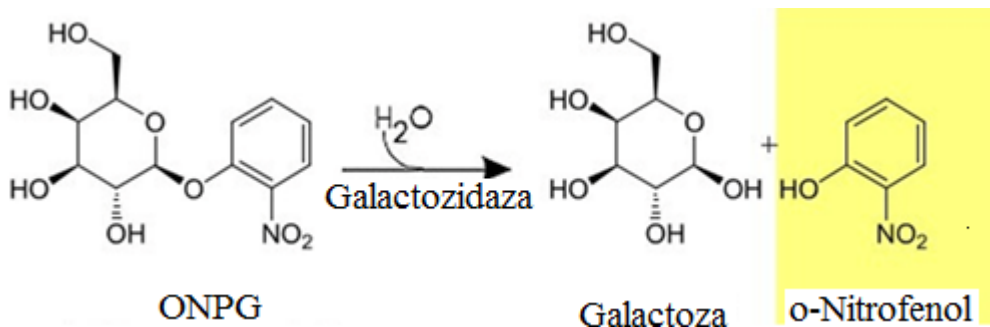
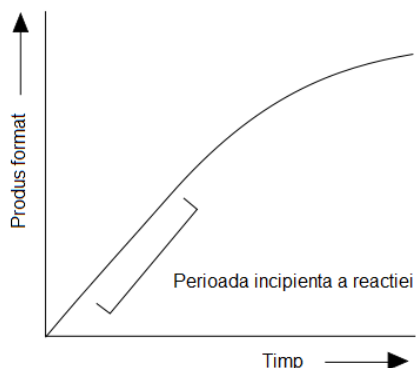


Fig. 3. Liniarizarea Lineweaver-Burke

B-galactozidaza (β -D-galactozid galactohidrolaza, EC 3.2.1.23) din *E. coli* catalizează fiziologic hidroliza lactozei în glucoză și galactoză. Cu toate acestea, această enzimă are o specificitate de substrat suficient de largă pentru hidrolizarea β -D-galactozidelor sintetice, cum ar fi o-nitrotrofenil β -D-galactozidă (ONPG) la β -D-galactoză și o-nitrofenol (ONP), compus de culoare galbena, care poate fi determinat spectrofotometric la 400 nm.



Enzima transformă ONPG-ul în oNP și galactoza, la o viteză inițial liniară la începutul reacției. Mai târziu în această curbă de progres, viteza încetinește pe măsură ce substratul este utilizat sau produsele se acumulează. Lungimea perioadei inițiale a vitezei depinde de condițiile de analiză și poate varia de la milisecunde la ore. Panta dreptei $C_p=f(t)$ reprezintă viteza inițială a procesului (Fig. 4):



Scop:

Scopul lucrării constă în determinarea vitezei reacției enzimatice de scindare a ONPG (substratul substituent al lactozei, care poate fi analizat spectrofotometric) și stabilirea parametrilor ecuației cinetice (constanta Michaelis-Menten și viteza maximă).

Modul de lucru

Reactivi:

Se pregătesc următoarele soluții:

- Tampon acetat de sodiu / acid acetic 20mM pH 4,5: 0.369 g acetat de sodiu + 0.33 g acid acetic în 100 ml apă distilată
- Soluție Na_2CO_3 1M (M 106): 10.6 g carbonat de sodiu + 50 ml apă
- Soluția inițială de ONP (ONP M = 139,11) 280 mg / L – aprox 10 ml
- Soluție ONPG (ONPG M = 301,3), soluție de 30 mM ONPG în tampon acetat: 0.9 g ONPG + 100 ml soluție tampon acetat

Tehnica experimentală:

1. Realizarea curbei etalon:

Din soluția stoc ONP se pregătesc probe pentru un interval de concentrații standard: 0-280mg/l. Se reprezintă grafic variația absorbanței în funcție de concentrație – curba etalon.

Proba	1	2	3	4	5
Solutia initiala (μl)	0	500	1000	1500	2000
Tampon acetat (μl)	2000	1500	1000	500	0
Na_2CO_3 1M (μl)	1000	1000	1000	1000	1000
Concentrație ONP (mg/l)	0	70	139	210	280
Absorbanta la 400 nm					

2. Determinarea activității enzimei

Se pun în contact, la temperatura de 30°C , 100 ml de soluție ONPG în tampon acetat cu 0.01 g enzimă și se prelevează câte 2 ml din 5 în 5 minute din momentul punerii în contact a fazelor. Pentru determinarea concentrației ONP, peste 2 ml probă se adaugă 1 ml Na_2CO_3 1M. Se citește absorbanta la 400 nm și, folosind curba etalon, se determină concentrația produsului (ONP).

Prelucrarea datelor experimentale.

Timp, min	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	...	180
Concentratia ONP, C_p , (mmol/l)														
Concentratia ONPG*, C_s , (mmol/l)														
Viteza) procesului, v_p , mmoli/min														
$1/v_p$														
$1/C_s$														

* Concentrațiile molare ONPG si ONP, ținând cont de faptul că volumul soluției este același și reacția decurge mol la mol, pot fi considerate egale la același moment de timp.

Se reprezintă grafic $C_s = f(t_p)$. Folosind curba obținută, se determină viteza procesului – (panta tangentei la curbă în fiecare punct – metoda oglinzii), apoi se reprezintă $1/v = f(1/C_s)$ și se determină V și K_M .

Utilizați link-ul: <https://www.uniprot.org/uniprot/P00722> pentru a verifica rezultatele.

UTILIZAREA PREPARATELOR ENZIMATICE IN OBTINEREA BRANZETURILOR

Brânza - este produsul proaspăt sau maturat obținut prin scurgerea zerului, după coagularea laptelui, a smântânii, a laptelui smântânit, a zarei sau a amestecului unora sau a tuturor acestor produse.

Valoarea alimentară – branza are valoare nutritivă ridicată (P, L, SM): 100 g brânză cu pasta tare asigură 38 % din necesarul zilnic de proteine

TEHNOLOGIA FABRICĂRII BRÂNZETURILOR

Sunt cunoscute până în prezent peste 1000 de sortimente de brânzeturi.

Fazele principale în obținerea brânzeturilor:

1. controlul și tratarea laptelui – materie primă (curățire mecanică, tratare termică, bactofugare (un procedeu care se bazează pe diferența de greutate specifică dintre microorganisme și lapte. Bactofugarea laptelui se realizează cu ajutorul unui separator special de înaltă precizie, prevăzut cu o toba cu orificii de 0,3 mm, prin care se elimină fracțiunea concentrată de microorganisme. Aceasta poartă denumirea de bactofugat și reprezintă 2-3% din cantitatea totală de lapte, fiind formată din microorganisme, inclusiv spori, precum și din anumite fracțiuni proteice din lapte (în cazul laptelui degresat). Bactofugatul poate fi apoi sterilizat la 130-140°C, timp de 3- 4 sec, iar după răcire este combinat cu laptele bactofugat, fără a fi afectate proprietățile tehnologice ale acestuia.), tratare chimică)

2. pregătirea laptelui pt încheagare și încheagarea lui (însămânțarea cu culturi lactice – streptococi lactici, lactobacili, iar sortim. cu mușcăi : *Penicillium roqueforti* sau *cammemberti* 0,05 – 10 %)

- adaosul de CaCl_2 10-30 % la 100 l. Lapte (prin tratament termic sărurile de calciu trec din formă solubilă în formă insolubilă – cu influențe negative asupra încheagării laptelui)

- adăugarea de decoloranți naturali (Balcol, Blego) – produse naturale de origine vegetală care reduc culoarea galbenă în scopul obținerii unor brânzeturi cu pastă albă

- încheagarea laptelui cu enzime coagulante de origine animală (cheag, pepsină) sau de nat. microbiană (enzime fungice) – sub acțiunea acestora, cheagul elimină ușor zerul (prezintă o sincreză bună)

3. prelucrarea coagulului în scopul eliminării zerului – favorizat de aciditatea coagulului, de mărunțirea lui și de temperatura ridicată . La început coagulul este moale, apoi se contractă concomitent cu eliminarea zerului (sinereză)

- stabilirea consistenței coagulului, modul de prelucrare a coagulului

4. obținerea cașului și prelucrarea lui

5. maturarea brânzeturilor

6. depozitarea și ambalarea brânzeturilor

TEHNICA DE COAGULARE A LAPTELUI

Coagularea laptelui se realizeaza in doua moduri:

- Cu ajutorul enzimelor coagulante de origine animala – cheag, pepsina – sau a unor enzime microbiene (fungice) obtinute din diverse specii de mucegaiuri
- Cu ajutorul acizilor : acidul lactic, in special, rezultat prin fermentarea lactozei de catre bacterii lactice, sau prin adaos de acizi minerali.

Cheagul este o enzima naturala care se obtine din:

- stomac uscat de vitel si miel (nou-nascuti hraniti numai cu lapte), de porc sau de pui (acest fapt implicand sacrificarea animalelor),
- biosinteza din tulpini de microorganisme care se dezvoltă pe tarate de grau si
- produse vegetale (smochin, ananas, papaya, pepene verde).

Cheagul are capacitatea de a coagula (a încheaga) laptele. Proteaza (enzima coagulanta) din cheag se numeste chimozina. Cheagurile microbiene obtinute in laboratoare certificate a caror substanta activa este chimozina sunt cheaguri care confera un grad de siguranta alimentara mai ridicat.

Rolul cheagului nu este numai tehnologic de realizare a coagulării laptelui, ci si nutritional fiind o enzima proteolitica, realizand descompunerea unui compus macromolecular (o proteina) in compusi mai mici, usor digerabili de organismul uman. Avind in vedere regulile stricte de igiena si siguranta alimentara astazi acest cheag care in mod natural este lichid a fost prelucrat extragindu-se substanta asa zisa activa care este denumita pepsina rezultand un produs sub forma de pulbere care se foloseste pe o scara mai restransa si in general la produsele traditionale gen telemea.

Soluțiile de enzime coagulante se introduc în vasele cu laptele pregătit pentru încheagare, turnându-se în jet subțire pe toată suprafața. Laptele se agită lent și continuu; amestecarea se face atât circular, cât și de jos în sus, în vederea repartizării soluției în toată masa laptelui. După adăugarea soluției de enzimă se menține în mișcare întreaga masă de lapte încă 1 – 2 min. În timpul coagulării laptelui, cazanele sau vanele se acoperă cu capace prevenind astfel răcirea la suprafață.

Durata de încheagare depinde de sortimentul de brânză, dar și de gradul de maturare al laptelui. În cazul laptelui proaspăt, este necesară o durată mai

mare la coagulare, pentru a permite și dezvoltarea bacteriilor lactice care să asigure procesul de acidifiere. Dacă laptele este maturat, durata de coagulare este mai redusă. Urmărind procesul de coagulare, se observă următoarele modificări în masa laptelui:

- la început se formează fulgi foarte fini - flocoane; această fază de floclare are loc chiar dacă coagularea nu se face normal;

- a doua fază: aglomerarea flocoanelor într-o masă din ce în ce mai compactă formând un gel;

- are loc fenomenul de contractare a coagulului și eliminarea zerului (sinereză), când coagulul format își micșorează volumul.

Momentul final al coagulării se poate aprecia practic astfel: cu o presiune ușoară a degetului se încearcă separarea coagulului de marginea vanei. În cazul când coagulul se desprinde ușor de pereți (primul semn al coagulării), se introduce degetul arătător în masa de coagul îndoindu-l și apoi scoțându-l afară. Dacă coagulul se rupe în linie dreaptă, pe deget nu aderă flocoane de coagul, iar zerul care se elimină la suprafață este limpede și de culoare galben-verzuie, coagularea laptelui se consideră terminată.

În funcție de consistența coagulului și de zerul eliminat, se pot face aprecieri asupra modulului de comportare a coagulului în fazele următoare de prelucrare și se iau măsurile de ordin tehnologic corespunzătoare. Astfel, dacă la timpul prescris de coagulare, coagulul s-a desprins de marginile vanei și a apărut zerul, înseamnă că procesul de coagulare este depășit și coagulul trebuie prelucrat rapid cu un grad mai redus de deshidratare a bobului. Dacă însă, la sfârșitul duratei de închegare, coagulul este mai moale și nu expulzează zer, prelucrarea ulterioară a coagulului se conduce astfel ca în final, bobul de coagul să aibă consistența dorită și deshidratarea să fie în limitele tehnologice prescrise.

PRELUCRAREA COAGULULUI

După închegarea laptelui, coagulul rezultat se prelucrează în vederea eliminării unei cantități mai mari sau mai mici de zer, asigurând în produsul finit un anumit conținut de apă, specific fiecărui sortiment de brânză.

MATURAREA BRÂNZETURILOR

Maturarea este un proces complex, ca rezultat al acțiunii atât a enzimelor existente în lapte și cheag, cât și a enzimelor secretate de

microorganismele ce se dezvoltă spontan în lapte sau sunt însămânțate prin folosirea de culturi pure și maiele.

În procesul de maturare pasta de brânză la început albă-portelanoasă, sfârâmicioasă și cu gust insipid, devine albă-gălbuie, elastică, onctuoasă, cu gust și aromă specifice fiecărui sortiment. Modificările care au loc în timpul maturării se desfășoară într-o anumită ordine și se fac pe seama principalelor componente din lapte: lactoza, substanțe proteice și grăsimi.

Sub raport tehnologic, în procesul de maturare se deosebesc trei faze:

□ Prematurarea (fermentarea preliminară) caracterizată printr-o acidifiere a pastei de brânză, sub acțiunea în special a streptococilor lactici. În această fază începe și o slabă descompunere a caseinei cu formare de peptone. La brânzeturile semitari începe și acțiunea de formare a găurilor specifice;

□ Maturarea propriu-zisă (fermentarea principală) determinată în principal de lactobacili, care acționează în mai mică măsură ca acidifianți. În această fază are loc o intensă acțiune proteolitică iar substanțele proteice sunt descompuse în polipeptide și aminoacizi, ajungându-se uneori chiar până la formare de amoniac. Începe de asemenea, producerea substanțelor de aromă. La brânzeturile cu pasta tare se formează „ochiurile” care determină desenul caracteristic.

□ Maturarea finală (fermentarea finală), în care se continuă acțiunea microflorei lactice, dar intervin și celelalte microorganisme specifice. În această fază se definitivează în principal gustul și aroma produsului.

Principalele transformări care au loc în timpul maturării brânzeturilor sunt

Descompunerea lactozei printr-o fermentație lactică transformându-se în acid lactic.

Rolul acidului lactic format la începutul maturării este foarte important:

□ acidul lactic reglează dezvoltarea microorganismelor prezente în brânză: inhibă microflora de putrefacție și producătoare de gaze, favorizând dezvoltarea microorganismelor consumatoare de acizi;

□ acidul lactic influențează structura și consistența pastei: rezultă o pastă fină, moale, de culoare gălbuie, corespunzător cu sortimentul de brânză;

□ acidul lactic este un component de aromă, direct sau prin substanțele care pot lua naștere din transformarea lactațiilor.

Descompunerea grăsimii - lipoliza conduce la formarea de glicerină și apariția de acizi grași liberi, care ulterior pot suferi diferite transformări rezultând produși cetonici.

Hidroliza grăsimii poate avea loc sub acțiunea lipazelor prezente în lapte și faptul că aceste enzime sunt distruse prin pasteurizare explică de ce din lapte pasteurizat nu se pot obține brânzeturi cu aromă intensă, ca în cazul folosirii laptelui nepasteurizat. Descompunerea grăsimilor nu este un proces caracteristic pentru toate brânzeturile, la majoritatea având loc într-o măsură neînsemnată. Procesul este însă caracteristic brânzeturilor fermentate cu mușci (interior sau exterior), unde enzimele secretate de culturile folosite determină o descompunere înaintată. Lipoliza nu produce modificări importante în structura pastei, dar are rol însemnat în formarea gustului și aromei.

Mod de lucru

1. Laptele crud, proaspăt, (500 ml) se pune într-un recipient de inox și se încălzește lent până în jur de 80 de grade Celsius, apoi se lasă să se răcească până la o temperatură între 31 și 36 de grade Celsius.

2. Se adaugă cultura de bacterii lactice (se pot pune și 8 ml linguri de acid acetic 6%, important este să se creeze un mediu acid în care cheagul să poată acționa și 10 ml soluție CaCl_2 4%) . Se amestecă bine și se lasă să acționeze timp de 5-10 minute, menținând temperatura laptelui între 31-36 grade Celsius.

3. Se diluează cheagul 6% în 20 de ml. de apă plată și se adaugă peste lapte, amestecând 1 minut.

4. Se menține temperatura laptelui în jur de 31-36 de grade Celsius timp de 45 de minute – 1 ora, până când tăind cu un cutit lung prin lapte, până la fundul vasului, se obține o tăietură curată, fermă (se pot face câteva probe, dacă laptele nu e destul de încheagat se mai lasă cheagul să acționeze). În acest moment, laptele coagulat obținut se taie în fasii de 2-3 cm. lățime, apoi în altele perpendiculare pe primele, obținând o rețea de pătrate la suprafață.

5. Se așază o panză pentru strecurat brânză într-un vas, așezat deasupra unui vas colector. Pentru a grăbi puțin scurgerea zerului, se poate

amesteca cu o lingura in laptele coagulat. Apoi se asteapta scurgerea zerului si se preseaza branza in diverse forme.

DETERMINAREA PUTERII DE COAGULARE A ENZIMELOR COAGULANTE. FACTORI CARE INFLUENTEAZA PROCESUL DE COAGULARE A LAPTELUI

Pentru coagularea laptelui se folosesc diferite preparate ce contin enzime coagulante de origine animala (cheagul si pepsina) sau enzime de natura microbiana (enzime fungice).

Una dintre proprietatile importante ale enzimelor coagulante este capacitatea de coagulare a acestora cuantificata prin asa numita puterea de coagulare.

Puterea de coagulare se exprima prin cantitatea de lapte, luata în volume, ce poate fi coagulata de o cantitate de enzima în solutie, masurata în volume, la temperatura de 35°C, în timp de 40 minute (2400 secunde).

Puterea de coagulare se calculeaza cu formula:

$$P = \frac{2400 \cdot V}{T \cdot E}$$

în care:

P este puterea de coagulare; E – volumul de enzima (în solutie), în litri; V – volumul de lapte coagulat, în litri; T – timpul de coagulare, în secunde.

Timpul de coagulare reprezinta perioada necesara din momentul introducerii enzimei coagulante în lapte pâna la aparitia primelor flocoane de coagul. Actiunea enzimei coagulante asupra laptelui depinde de o serie de factori:

- temperatura laptelui, cantitatea de saruri de calciu din lapte, aciditatea laptelui,
- cantitatea de enzima coagulanta, continutul de substanta uscata a laptelui, tratamentul
- termic aplicat laptelui.

Lucrarea urmareste studiul influentei temperaturii, a adaosului de saruri de calciu si a cantitatii de enzima coagulanta adaugata.

Materiale si aparate

Lapte integral, lapte pasteurizat, enzima coagulanta, solutie CaCl₂ 1%
Pahare Berzeluis, pipete, termometre

Modul de lucru

Se pun câte 50 ml lapte în pahare Berzeluis, se adauga enzima coagulanta (5 ml solutie 4%) si se urmareste aparitia primelor flocoane

determinându-se astfel timpul de coagulare. Se lasa proba de lapte coagulat pâna la întarirea coagulului si se apreciaza aspectul acestuia: coagul tare, ferm, coagul moale, coagul prafos. Determinarea se realizeaza la temperaturile de 20, 30, 40, 50 si 60 °C, folosindu-se lapte integral, lapte pasteurizat fara adaos de CaCl₂ si cu adaos de 1ml solutie 1% CaCl₂. La 30°C se determina timpii de coagulare pentru diferite cantitati de enzima: 0,5 ml, 1 ml , 2ml, 5 ml, 8 ml, 10 ml. Rezultatele determinarilor se trec într-un tabel.Pe baza rezultatelor experimentale se va stabili doza optima de coagulant.

Observatie

Doza de CaCl₂ recomandata în industrie este de 15-20 g /100 l lapte.

Acțiunea enzimei coagulante asupra laptelui depinde de o serie de factori:

Temperatura optimă de acțiune a cheagului este de 40...41°C; peste și sub această temperatură, capacitatea de coagulare a cheagului scade. Astfel, la 65°C, enzima în soluție este complet distrusă, iar la temperaturi sub 10°C este puțin activă și laptele nu mai coagulează.

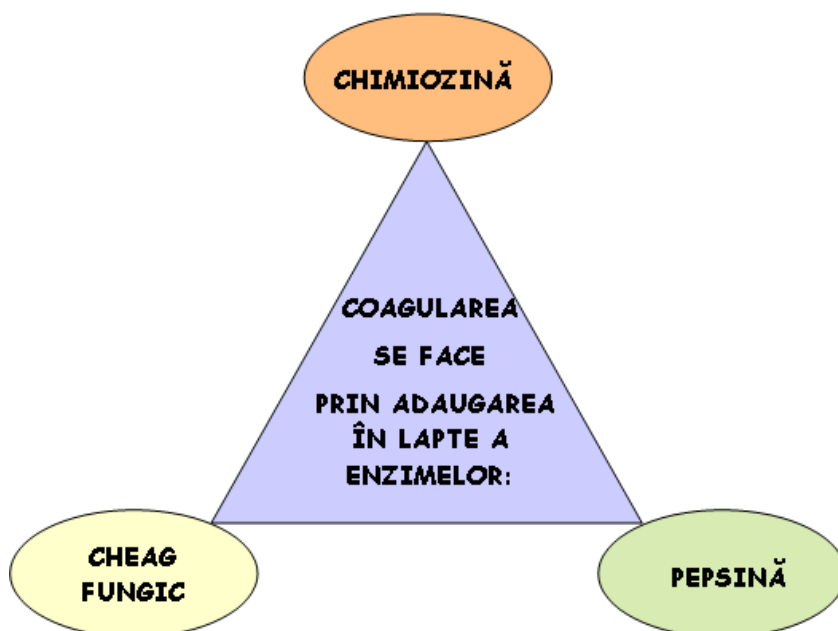
În practică, temperatura de închegare a laptelui variaza între 27 și 36°C. Pentru fiecare sortiment de brânză este indicată o anumită temperatură de coagulare, în funcție de care se stabilește și durata de închegare pentru obținerea unui coagul cu caracteristicile dorite. Pentru obținerea brânzeturilor moi, temperatura de coagulare și păstrare a laptelui este mai joasă, asigurând o deshidratare redusă a coagulului, respectiv un conținut de apă mai ridicat în produsul finit. La fabricarea brânzeturilor tari, temperatura de coagulare fiind mai înaltă, provoacă o deshidratare mai înaintată a coagulului și rezultă brânzeturi cu umiditate redusă. Pentru același sortiment de brânză, închegarea laptelui se poate face la temperatură mai ridicată, dacă laptele a fost insuficient maturat, are o aciditate mai redusă și un conținut de grăsime ridicat.

Creșterea acidității laptelui peste limitele normale determină scăderea temperaturii de închegare cu 0,5 – 1,5°C pentru fiecare grad de aciditate în plus, procedându-se invers în cazul unei acidități mai scăzute. Creșterea acidității mărește viteza de coagulare, deoarece în mediu acid efectul cheagului este mai puternic și cantitatea de săruri de calciu solubile mai mare. O creștere prea mare a acidității laptelui frânează însă activitatea enzimei coagulante, rezultând un coagul cu caracteristici necorespunzătoare.

Cantitatea de săruri de calciu din lapte. Când sărurile de calciu se găsesc în cantități suficiente, coagularea se produce rapid, iar coagulul are consistența și structura corespunzătoare. Dacă aceste săruri se găsesc în cantități reduse, durata de coagulare se prelungește.

Cantitatea de enzimă coagulantă condiționează viteza de coagulare care, între anumite limite, este proporțională cu cantitatea de cheag adăugată. Raportul dintre cantitatea de cheag și timpul de coagulare este un indice fix și pe acesta se bazează determinarea puterii de coagulare a preparatului enzimatic folosit.

Conținutul de substanță uscată al laptelui influențează, de asemenea, necesarul de cheag. În cazul coagulării unui lapte cu un conținut mare de substanță uscată, respectiv de proteine și grăsime, este necesar să se adauge o cantitate mai mare de cheag față de cea folosită în mod obișnuit, pentru a obține coagularea în timpul dorit și o consistență normală coagulului. Tratamentul termic aplicat laptelui are ca urmare o prelungire a duratei de încheagare. Aceasta se datorează, în principal, precipitării sărurilor de calciu, dar și pierderilor de bioxid de carbon care duc la o scădere a acidității.



**PREGĂTIREA
LAPTELUI
PENTRU
COAGULARE**

răcirea laptelui la temperatura de coagulare

însămânțarea cu culturi de bacterii tactice specifice fiecărui sortiment de brânză

maturarea laptelui pasteurizat

adăugarea de clorură de calciu pentru îmbunătățirea capacității de coagulare a laptelui și calității coagulului

adăugarea substanțelor pentru colorarea sau decolorarea laptelui.

PRODUSE LACTATE ACIDE DIETETICE

Produsele lactate acide dietetice sunt acele produse lactate care se obțin prin fermentarea lactozei din lapte cu ajutorul culturilor starter de bacterii lactice.

În realizarea unor produse lactate acide dietetice de calitate se impun următoarele:

- folosirea unor materii prime (lapte de vacă, de oaie, de bivoliță) de înaltă calitate sub aspectul compoziției, caracteristicilor senzoriale și al gradului de contaminare;
- respectarea tehnologiei de obținere atât a culturilor starter de producție cât și a produselor lactate acide dietetice.

Produsele lactate acide dietetice cuprind diferite sortimente de iaurt, lapte bătut, lapte acidofil și chefirul. La obținerea produselor lactate acide dietetice de o egală importanță este atât prepararea culturilor starter de producție, cât și fabricarea propriu-zisă a produselor.

1.2 PREPARAREA CULTURILOR STARTER DE PRODUCȚIE

Prepararea culturilor starter de producție (impropriu denumite maiele) implică transplantări repetate pe lapte, începând cu o cultură pură stoc (inocul) care este preparată de un laborator specializat și care este livrată fabricilor sub formă lichidă sau uscată.

Culturile pure stoc (inocul) lichide. Aceste culturi sunt mai active, dar mai greu de transportat și pot fi păstrate la temperaturi joase (1...2°C), maximum 10 zile. Se livrează în flacoane de 100 ml, închise cu dop de cauciuc sau din material plastic, ambalate în cutii de carton. Se prezintă sub forma unui lichid, puțin consistent, alb-gălbui, până la slab cafeniu. În sezonul cald, pentru a se evita suprafermentarea, se adaugă carbonat de calciu ca neutralizant, care în combinație cu acidul lactic pune în libertate CO₂. Acesta creează în interiorul flacoanelor o ușoară presiune, imprimând culturii pure (inocul) un aspect spumos.

Culturile starter uscate (liofilizate). Se livrează în flacoane ermetic închise, sub vid, sau în atmosferă de CO₂, respectiv de azot și care pot fi păstrate la 4...5°C, timp de 12 luni. În general, cultura liofilizată se reactivează pentru a-i crește vitalitatea. Reactivarea constă în introducerea conținutului fiolei în 200 ml lapte pasteurizat și răcit și termostatare la temperatura indicată.

Culturile pure stoc (inocul) pot fi culturi singulare (formate din una sau mai multe tulpini ale aceleiași specii) și mixte (formate din specii diferite).

Din cultura pură selecționată (inocul) lichidă sau din cea liofilizată, după reactivare, prin pasaje succesive, pot fi obținute:

- cultura primară (maiaua primară sau maiaua-mamă);
- cultura secundară (maiaua secundară);
- cultura terțiară (maiaua terțiară), care poate fi utilizată drept cultură starter de producție (maiaua de producție).

Cultura primară. Se obține prin inocularea laptelui pasteurizat și răcit cu cultura pură (inocul) primită de la laboratorul de specialitate. Felul culturii, proporția de inoculare, temperatura și durata de termostatare diferă în funcție de felul produsului pentru fabricarea căruia se folosește cultura respectivă. Imediat după termostatare, cultura se răcește rapid și se depozitează la 1...2° C până a doua zi.

Cultura secundară. Se obține din cultura primară (a doua zi), dar având în vedere că aceasta cultura secundară reprezintă a doua transplantare (pasaj), ea se constituie ca un stadiu mai avansat de reactivare a culturii pure (inocul) și, de aceea, din cultura primară se inoculează în laptele destinat culturii secundare o cantitate de cultura mai mică, iar durata de termostatare este mai redusă. Aceasta cultura se pastrează la 1...2° C, timp de 1...2 ore.

Cultura terțiară sau de producție. Se prepară din cultura secundară (a treia zi), după aceeași tehnică ca și în cazul culturii primare, însă din punct de vedere cantitativ această cultură trebuie să satisfacă necesarul producției, iar din punct de vedere calitativ trebuie să prezinte caracteristicile produsului respectiv de bună calitate (aspect, consistență, gust, miros ș.a.).

Cultura starter terțiară sau de producție se inoculează zilnic și tot zilnic se controlează chimic, senzorial și microbiologic. La folosirea culturii starter de producție trebuie să se aibă în vedere următoarele:

- cultura să fie pură (să nu conțină decât microorganismele specifice);
- cultura să fie activă (să producă fermentația specifică în timp normal și să asigure o anumită aciditate);
- cultura să-și mențină în timp însușirile inițiale;
- cultura să fie menținută 5-6 ore, înainte de folosire, la 1 ...2°C, pentru a se favoriza acumularea substanțelor aromatizante;
- cultura starter de producție să nu fie mai veche de 48 de ore.

Fermentatia lactica

Definitie: prin fermentatie lactica se intelege procesul biologic din care rezulta ca produs principal acidul lactic.

Fermentatia lactica este foarte frecvent intalnita in numeroase produse si domenii agro-alimentare cu destinatie umana si zootehnica, fiind produsa in cele mai multe cazuri de bacterii, dar si de drojdii si mucegaiuri.

1. 1. Agenti ai fermentatiei lactice

Bacterii lactice sau fermente lactici adevărați – fac parte din două familii diferite: familia *Lactobacillaceae* (specii de in genul *Lactobacillus*) și din familia *Streptococcaceae* (specii din genurile *Streptococcus* și *Leuconostoc*).

În funcție de produșii rezultați în urma fermentării lactozei, bacteriile lactice se împart în homofermentative și heterofermentative.

a. Bacterii lactice homofermentative – produc în urma acțiunii lor asupra lactozei 90 – 95% acid lactic și cantități foarte mici de dioxid de carbon și acid acetic. În funcție de temperatura optimă de multiplicare se împart în termofile și mezofile.

Cele termofile sunt reprezentate de specii din genurile *Lactobacillus* și *Streptococcus* care:

~ au o temperatură optimă de înmulțire între 37 – 45 °C;

~ acidifica puternic laptele, producand cca. 2,7% acid lactic, cand actioneaza asupra laptelui;

~ au activitate cazeolitica pronuntata.

Principalele specii de bacterii din aceasta subgrupa, care au importanta pe tehnologia laptelui si a produselor lactate sunt: *L.lactis*, *L.bulgaricus*, *L.helveti*, *L.acidophilus* si *S.termophilus*.

Bacteriile homofermentative mezofle sunt reprezentate de specii din genurile *Lactobacillus* si *Streptococcus* care:

~ au temperatura optima de inmultire de 20-30°C si nu se dezvoltă la temperaturi mai mari de 40°C;

~ acidifica lent laptele formand cca. 1% acid lactic prin fermentarea lactozei;

~ au o oarecare activitate cazeolitica.

Principalele specii din aceasta subgrupa care au importanta pentru tehnologia laptelui si produselor lactate sunt: *L. casei*, *L. plantarum*, *S.lactis*, *S.lactis subsp. diacetylactis*, *S.cremoris*.

b. Bacteriile lactice heterofermentative produc in urma actiunii asupra lactozei cca. 50% acid lactic, 20-25% dioxid de carbon, 20-25% alcooli (etanol, manitol) si acid acetic.

Bacteriile din aceasta grupa au o importanta mai redusa pentru tehnologia produselor lactate, avand utilizari mai limitate.

Ele fac parte din genurile *Lactobacillus*: *Leuconostoc* si *Bifidobacterium*, sunt mezofle, de regula usor acidifiante, nu actioneaza asupra caseinei sau aceasta actiune este nesemnificativa.

Principalele specii din aceasta grupa care au importanta pentru tehnologia laptelui si produselor lactate sunt: *Bifidobacterium bifidum*, *L. desidiosus* (caucasicus), *L. brevis*, *Leuc. mesenteroides*, *Leuc. cremoris* (citrovorum).

Schema tehnologica de obtinere a culturilor starter de productie pentru iaurt, lapte batut si lapte acidofil este prezentata in fig. 1.

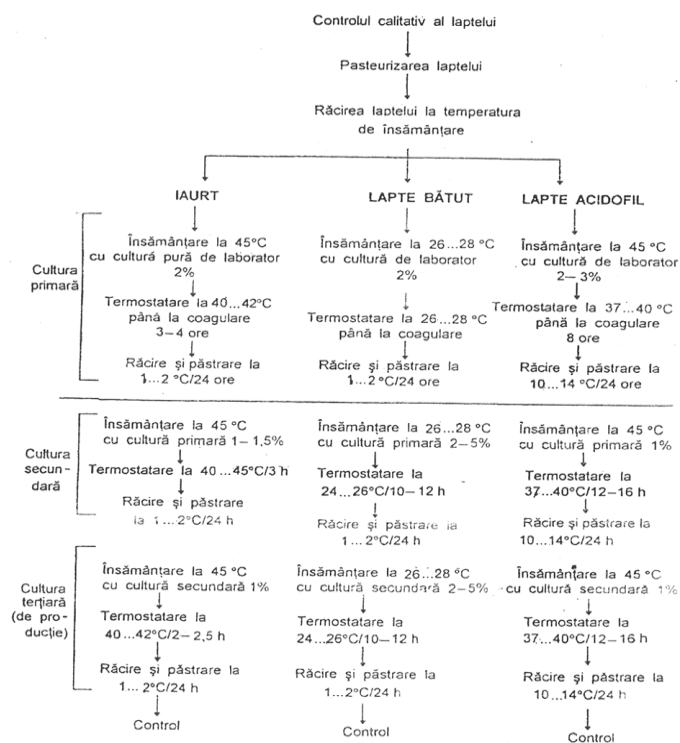


Fig. 1 Schema tehnologica de obtinere a culturii starter de productie pentru iaurt, lapte baut si acidofil.

În legătură cu obținerea culturilor starter de producție se fac următoarele precizări:

- în unele cazuri, impuse de producție sau de calitatea necorespunzătoare a culturii, este necesar să se mărească necesarul de pasaje (culturi) intermediare, în aceleași condiții ca la cultura secundară, în vederea corectării unor defecte. Acest lucru se impune, în principal, la cultura pentru iaurt, în vederea refacerii raporturilor simbiotice dintre microorganisme;

- dacă cultura primară prezintă caracteristici foarte bune, ea poate fi folosită direct la prepararea culturii starter de producție (cazul folosirii culturilor pure-stoc lichide).

Tabelul 1

Compoziția culturilor starter pentru unele produse lactate acide dietetice

Produsul	Cultura de microorganisme
Iaurt	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i>
Lapte acidofil	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Lapte baut si sana	<i>Streptococcus cremoris</i> <i>Streptococcus diacetilactis</i> <i>Streptococcus lactis</i>
Chefir - Varianta I	<i>Streptococcus lactis</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Torula Kefiri</i>
- Varianta II	<i>Streptococcus lactis</i> <i>Betabacterium caucasium</i> <i>Bacterium caucasium</i> <i>Torula Kefiri</i>

1.2 Controlul calității culturilor intermediare și al culturilor starter de producție

Calitatea acestor culturi se stabilește având în vedere următoarele criterii de control:

- *criteriul caracteristicilor senzoriale, care se face după coagulare și păstrare la rece, având în vedere următoarele:*

➤ coagulul să fie compact, cu slabă eliminare de zer, neadmițându-se coagulul neomogen, cu separare mare de zer, prezența de flocoane de cazeină, crăpături, numeroase bule de gaze ș.a.;

➤ consistența trebuie să fie cremoasă;

➤ gustul și mirosul să fie bine evidențiate și să caracterizeze cultura respectivă;

- *criteriul microbiologic, care implică stabilirea proporției dintre microorganismele componente, prezența drojdiilor, mucegaiurilor sau a bacteriilor de contaminare;*

- *criteriul chimic, care implică efectuarea următoarelor determinări: aciditate volatilă, substanțe de aromă (diacetil, acetoină).*

-

1.3 CONDIȚII PE CARE TREBUIE SĂ LE ÎNDEPLINEASCĂ LAPTELE DESTINAT FABRICĂRII PRODUSELOR LACTATE ACIDE DIETETICE

Calitatea laptelui folosit la prepararea produselor lactate acide dietetice determină, în mare măsură, calitatea produselor finite. Rezultă că trebuie recepționat numai laptele de primă prospețime, deci cu un grad de contaminare cât mai redus și cu compoziție normală (se exclude laptele care conține și colostru, laptele falsificat, laptele provenit de la animale tratate cu antibiotice, laptele mamitic ș.a.).

În cazul laptelui de vacă, acesta trebuie să corespundă următoarelor cerințe:

- densitatea, minimum, 1,029;

- aciditatea, maximum, 17 - 19° T, pH-ul, 6,4...6,6;

- titrul proteic, minimum, 3,2;

- proba reductazei (durata de decolorare a albastrului de metilen), minimum, 3 ore.

1.4 IAURTUL

Iaurtul este un produs lactat acid dietetic care se fabrică în numeroase țări, în principal din lapte de vacă, cultura starter de producție având în compoziție două bacterii lactice: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

și *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, între care se creează relații simbiotice, ceea ce conduce la accelerarea procesului de fermentație și de formare a substanțelor de aromă specifice produsului.

Schema tehnologică de fabricare a iaurtului din lapte de vacă este prezentată în fig. 2. Operațiile principale sunt descrise în continuare.

Normalizarea. Pentru iaurtul obișnuit, laptele se normalizează la 2,8% grăsime; pentru iaurtul slab se folosește laptele degresat; pentru iaurtul extra, laptele se normalizează la un conținut de grăsime care să asigure în produsul finit 4% grăsime.

Omogenizarea laptelui. Este foarte importantă din următoarele motive:

- se mărește numărul de globule de grăsime cu diametrul $< 2,0 \mu m$ (se formează noi globule cu noi membrane la care participă o cantitate mai mare de cazeină), ceea ce favorizează digestia în tractusul intestinal;

- se fragmentează micellele de cazeină, obținându-se un coagul mai fin, mai stabil, cu o eliminare mai redusă a zerului;

- se împiedică separarea grăsimii la suprafața produsului finit. Omogenizarea va conduce la obținerea unui coagul (gel) care va avea globulele mici de grăsime, fin dispersate în matricea proteică, eliminându-se în acest fel efectul de „vacuolizare” în matricea proteică, efect care poate avea loc dacă laptele nu este omogenizat și globulele de grăsime au dimensiuni mari;

- se îmbunătățește gustul produsului și conservabilitatea acestuia, deoarece o parte din fosfolipidele membranei globulelor de grăsime inițiale trec în plasmă și contribuie mai bine la gust, la emulsionarea globulelor de grăsime nou formate și la conservabilitatea produsului;

- produsul finit produce o senzație de sațietate la un consum mai mare (300 - 400 g).

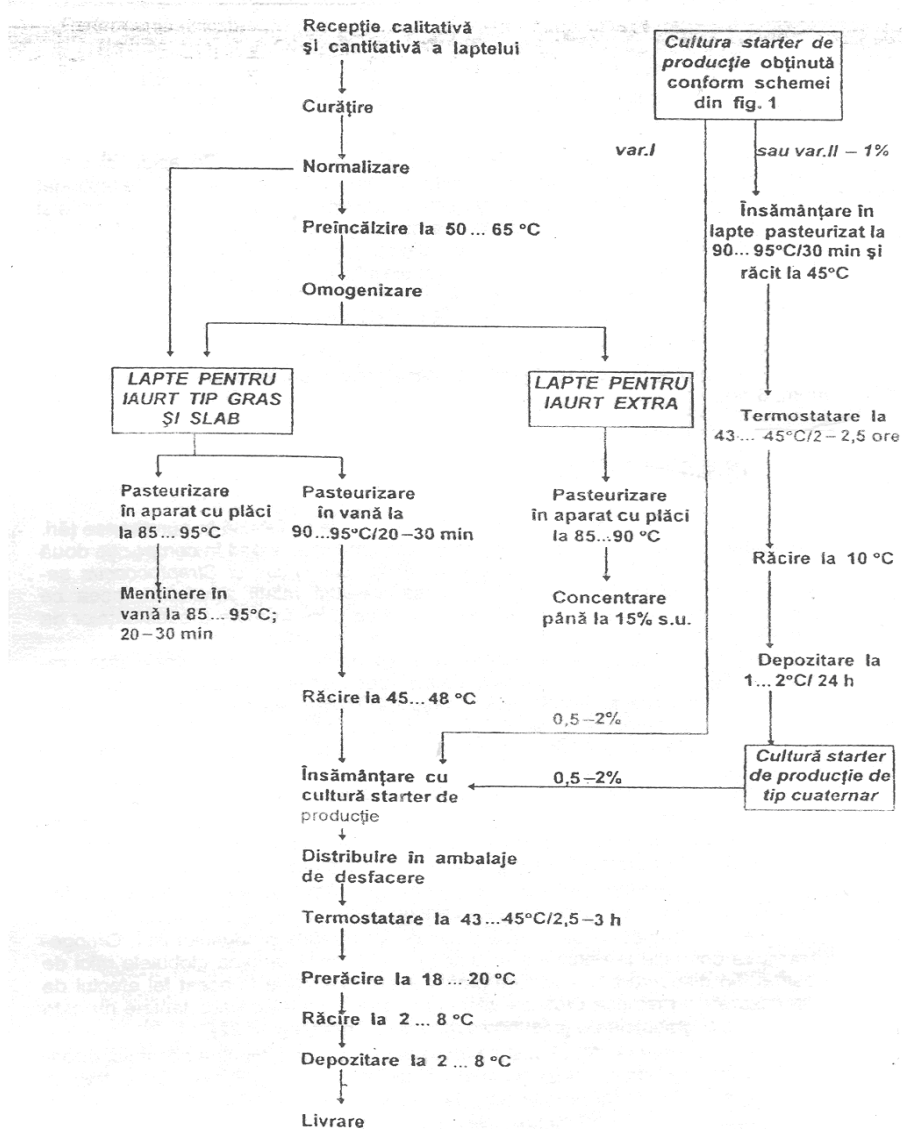


Fig. 2 Schema tehnologica de obtinere a iaurtului.

Pasteurizarea laptelui. Pasteurizarea la temperaturi ridicate ($> 85^{\circ}\text{C}$), cu menținerea laptelui la această temperatură timp de 20 - 30 min, are drept scop:

- îmbunătățirea calității igienice a laptelui prin distrugerea sigură a microorganismelor - forme vegetative;
- îmbunătățirea mediului pentru dezvoltarea bacteriilor lactice (laptele) prin distrugerea sistemului lactoperoxidazic (inactivarea lactat-

peroxidazei), eliminarea oxigenului și formarea unor compuși cu acțiune reducătoare (eliberarea de grupări -SH);

- îmbunătățirea consistenței iaurtului, deoarece prin încălzirea laptelui la temperatura $> 85^{\circ}\text{C}$ și prin menținerea acestuia la $85...95^{\circ}\text{C}$ are loc o denaturare a proteinelor serice și asocierea lor cu k-cazeina micelilor de cazeină, ceea ce favorizează obținerea unui coagul mai fin, care reține mai bine zerul (hidratarea proteinelor este mai bună).

Consistența coagulului se îmbunătățește și prin creșterea gradului de hidratare a cazeinei prin trecerea parțială a fosfaților coloidalii în săruri insolubile. Pasteurizarea și menținerea în vane se face sub agitare continuă.

Concentrarea laptelui. Este practică numai în cazul fabricării iaurtului extra. Concentrarea se face până la 15% substanță uscată (în produsul finit). La concentrare, volumul inițial al laptelui se reduce cu 10-20%. Prin concentrarea laptelui se asigură stabilizarea structurii proteinelor, mărirea conținutului de grăsime raportat la substanța uscată, ceea ce asigură un produs finit cu o consistență mai fermă, dar mai cremoasă, fără separare de zer.

În unele cazuri creșterea conținutului de substanță uscată se face prin adaos de cazeinat/coprecipitat, lapte praf degresat sau lapte concentrat.

Răcirea laptelui. Răcirea laptelui se practică imediat după pasteurizare sau concentrare, urmărindu-se ca temperatura laptelui să fie cu puțin deasupra temperaturii de dezvoltare a culturii starter adăugate. Răcirea se face în aceeași vană în care s-a făcut pasteurizarea sau menținerea laptelui și durează 15-30 min până se atinge temperatura de $45...48^{\circ}\text{C}$.

Insămânțarea (inocularea) laptelui. Se face cu cultura starter de producție menționată anterior. În acest scop, cultura se omogenizează, se diluează cu lapte în raport 1:0,5 și se introduce în laptele destinat producției de iaurt, care trebuie să fie agitat puternic, în vederea repartizării cât mai uniforme a culturii; în caz contrar particulele de cultură starter vor constitui centri de fermentație puternică determinând apariția în coagul a golurilor de fermentare (spații umplute cu zer). Se adaugă 0,5-2% cultură starter de producție (cu un exces de 0,1 - 0,2% față de necesarul stabilit teoretic).

Repartizarea în recipiente de desfacere. Ambalajele folosite (sticlă, plastic, carton parafinat) trebuie să fie bine igienizate. Repartizarea în ambalajele de desfacere se face în instalații automate. În tot timpul turnării, iaurtul din vana din care se preia trebuie să fie sub agitare.

Termostatarea produselor ambalate și introduse în navete se face în camera termostat, la temperatura de 42...45°C, pentru o durată de 2,5-3 ore. Respectarea strictă a temperaturii de termostatare este obligatorie deoarece:

- o temperatură mai mare favorizează dezvoltarea lactobacililor, consecința fiind obținerea unui iaurt cu aciditate ridicată, gust acru și aromă slabă;

- o temperatură mai scăzută favorizează dezvoltarea streptococilor, obți-nându-se un iaurt cu aromă bună, dar cu aciditate redusă și, deci, fără gust specific.

Momentul final al întreruperii fermentării se poate stabili: senzorial, prin aprecierea coagulului. care nu trebuie să aibă zer eliminat, iar la înclinarea recipientului coagulul nu trebuie să se desprindă de pereții ambalajului și să nu elimine zer; chimic, prin determinarea acidității titrabile care la iaurtul de vacă trebuie să fie 80 - 90°T. Mai precis, punctul final al termostatării poate fi determinat potențiomtric prin măsurarea pH-ului (pH final = 4,65 - 4,7).

Răcirea și depozitarea produsului. Răcirea se realizează în două etape:

- *prerăcire* la temperatura de aprox. 20°C, în timp de 2,5-3 ore, cu scopul de a se realiza întărirea coagulului și prevenirea separării zerului (se realizează mai bine stabilitatea gelului proteic);

- *răcirea* propriu-zisă la temperatura de 2...8°C, caz în care coagulul devine mai compact, gustul și mirosul sunt mai bine evidențiate. Răcirea propriu-zisă are loc 10-12 ore.

Depozitarea iaurtului la producător trebuie să se facă la temperatura de 2...4°C și pe o durată cât mai mică, pentru a evita apariția unor defecte.

Operațiile de termostatare, prerăcire, răcire și transport trebuie să se facă fără manipulări brutale care ar putea produce spargerea coagulului și eliminarea zerului.

Caracteristicile produsului finit. Produsul finit trebuie să corespundă unor caracteristici senzoriale, chimice și microbiologice. *Caracteristicile senzoriale:*

- aspect și consistență: coagul compact, omogen, fără bule de gaze și fără zer eliminat, cu aspect de porțelan la rupere (se admite maximum 2% zer eliminat la iaurtul foarte gras și maximum 5 % la cel gras și slab);

- culoare: albă, cu nuanță gălbuie, mai ales când iaurtul este fabricat din lapte de vacă;

- gust și miros: plăcut, acrișor, aromat.

Caracteristicile fizico - chimice

<i>Caracteristici fizico-chimice</i>	<i>Extra</i>	<i>Gras</i>	<i>Slab</i>
Grasime, % minimum	4	2,8	0,1
Substanta uscata, %, minimum	15	11,3	8,5
Aciditate, ° T	75-145	75-140	75-140
Zer expulzat, % maximum (sinereza)	2	5	5

Sinereza, exprimată ca % zer liber, s-a obținut prin cântarirea probei de chefir înainte și după eliminarea zerului prin filtrare în condiții de vacuum.

Caracteristicile microbiologice:

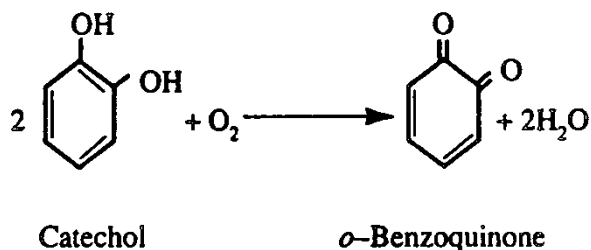
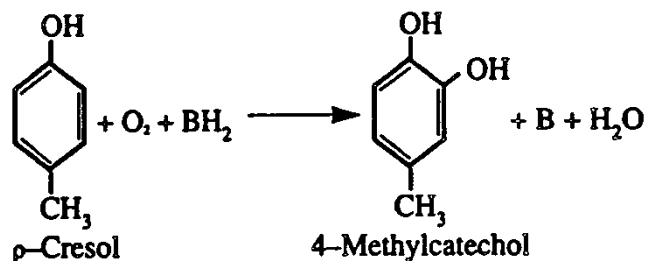
- bacterii patogene - lipsă;
- bacterii coliforme - 5 pentru iaurtul în ambalaje de desfacere și 50 pentru iaurtul în bidoane.

BRUNIFICAREA ENZIMATICĂ

Brunificarea enzimatică este una dintre cele mai importante reacții de culoare care afectează fructele, legumele și alimentele marine, reacție catalizată de polifenoloxidaze. Fenomenul de brunificare enzimatică se poate observa la mere, banane, cartofi, pere, piersici, struguri albi, frunze de ceai, boabe de cafea, fasolea verde, ciuperci, creveti, homari. Conduce la modificări de culoare care au loc în prezența oxigenului și care se datorează acțiunii enzimelor polifenoloxidazice asupra substanțelor fenolice și pigmentilor antocianici, aceasta reprezentând o formă de alterare a fructelor. Brunificarea enzimatică este una dintre cele mai devastatoare reacții pentru multe fructe și legume exotice, în particular pentru varietățile tropicale și subtropicale. S-a estimat că mai mult de 50% din pierderile înregistrate la fructe se datorează brunificării enzimatică (Whitaker and Lee, 1995). Asemenea pierderi au dus la creșterea interesului pentru înțelegerea și controlul enzimelor fenoloxidaze din alimente.

Polifenoloxidaza - PFO

Catalizează oxidarea compușilor fenolici (mono și / sau difenolilor) în prezență de oxigen pentru a da chinone care polimerizează la melanine :



Reamintiti-va:

1. Enzimele sunt proteine globulare
2. Activitatea enzimei este afectată de concentrația substratului, temperatura, pH.

3. Activitatea enzimei pot fi inhibata sau promovata de către alte substanțe.

Metode de control utilizate in brunificarea enzimatica la fructe si legume

1. Eliminarea oxigenului

- cea mai simpla metoda de control a brunificarii enzimatice, prin imersarea produselor in apa inainte de a fi gatite sau prin adaugarea la suprafata lor de acizicare sa intarzie procesul de brunificare.

2. Aplicarea de tratamente termice

pentru a denatura si inactiva enzima. Are ca efect distrugerea microorganismelor si reducerea continutului de zahar oferind produselor o culoarestralucitoare.

3. Controlul pH-ului

pentru a preveni brunificarea enzimatica se face prin adaugare de acizi (citric, malic, ascorbic, fosforic). Valorile scazute de pH (3) reduc brunificarea. Un inhibitor eficient al polifenoxidazei este acidul ascorbic. Pentru majoritatea polifenoxidazelor pH optim este cuprins intre 5-7.

4. Aplicarea de doioxid de sulf si sulfiti - inhibitori puternici ai enzimei .

5. Ultrafiltrarea,

utilizata in industria alimentara pentru eliminarea moleculelor mari de polifenoxidaze din vinul alb si din sucurile de fructe.

6. Tratamentul cu dioxid de carbon supercritic (SC-CO₂)

are ca efect distrugereamicroorganismelor, fiind aplicat si pentru a inactiva polifenoxidaele din homari, creveti si cartofi, inactivare datorata scaderii pH-ului prin producerea de acid carbonic din dioxid decarbon.

7. Deshidratarea:

pentru a fi activa, polifenoxidaza are nevoie de multa apa. Astfel, prindeshidratare se poate obtine doar inactivarea acestei enzime, nu si

distrugerea ei. Metodele comune de deshidratare sunt: deshidratarea prin congelare – apa este eliminata prin sublimare, sub vacuum. O alta metoda se refera la scaderea activitatii apei prin adaugare desubstante chimice de legare a apei, de exemplu: clorura de sodiu, sucroza, glicerol, etc

Scopul lucrarii:

Evidentierea principalilor factori care pot stopa activitatea polifenoloxidazei. Extractia si determinarea polifenoloxidazei.

Materii prime

Măr, cartofi, banane - taiate in felii se pun în fiecare dintre următoarele soluții. Brunificarea se observă la 5, 10, 20 și 40 de minute.

Control (nici o soluție, liber la aer)

Apă

Acid acetic 0,1%

Acid citric 0,1%

Acid ascorbic 0,1%

In tabelul urmatoar se cuantifica brunificarea la momentele de timp mentionate. Justificati rezultatele obtinute (0-deloc, 5-maxim).

Fructe/Legume	0	5	10	20	40

Partea a doua:

Obținerea preparatului brut de **polifenoloxidaza** din struguri

Obținerea sucului de primă presă (P1)

Strugurii se storc într-un storcător casnic. Randamentul în suc este de

aproximativ 53%, 34% reprezinta pulpa epuizată și 13% pierderi. Sucul obținut se filtrează prin vată și apoi se centrifughează la 3000 rot/min, timp de 10 min, pentru îndepărtarea particulelor în suspensie. După centrifugare, se efectuează o diluție de 1:5 a sucului cu apă distilată, iar suc diluat și filtrat prin hârtie de filtru se supune determinărilor propriu-zise.

Obținerea sucului după a doua presare (P2)

100g pulpă de struguri epuizată, rezultată de la obținerea sucului P1, se amestecă cu 200 ml apă potabilă, se omogenizează cu blenderul 2 min și se centrifughează la 3200 rot/min, timp de 20 minute, la temperatura de 4°C. Acest suc, numit P2, se diluază 1:5 cu apă distilată și se filtrează prin hârtie de filtru.

Determinarea activității **polifenoloxidazei**

Determinarea activității PFO se efectuează prin urmărirea colorației dezvoltată în urma acțiunii enzimei asupra substratului, în decurs de 30 de minute, la temperatura camerei, ca extincție la 470 nm. Pentru a observa și interferența altor oxidaze, se efectuează, în paralel, citirea extincției amestecului de reacție la 410 nm.

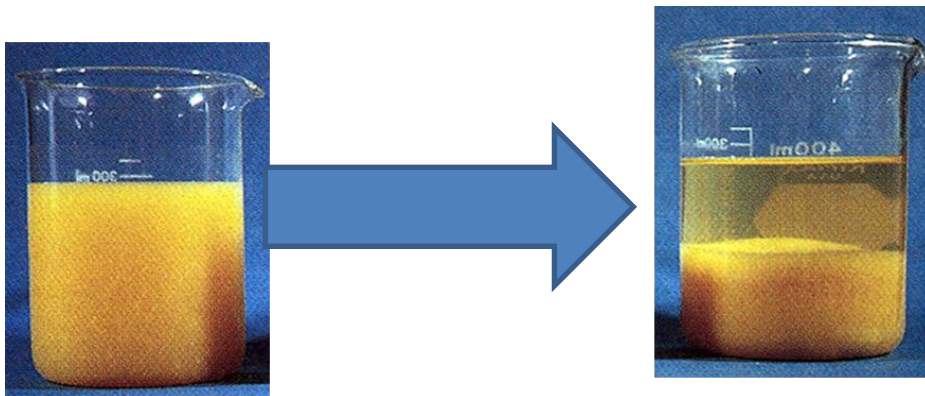
Activitatea PPO poate fi determinată și utilizând o metodă spectrofotometrică bazată pe o viteză inițială de creștere a absorbanței la 410 nm (Soliva colab., 2001).

Soluție tampon fosfat pH = 7 (0,1 M, 1,95 ml), 1 ml de 0,1 M catecol ca substrat și 50 μL din extractul enzimei se pipetează într-un tub de testare și se omogenizează. Apoi amestecul este transferat rapid în cuva de spectrofotometru și se citește absorbanta la 410 nm înregistrată în mod constant la 25 ° C timp de 5 min cu ajutorul spectrofotometru UV-vizibil.

EVIDENȚIEREA ENZIMELE PECTOLITICE

Din vremurile străvechi, enzimele naturale, produse de către microorganisme, au fost folosite la fabricarea brânzeturilor, pâinii, vinului, berii etc.

Actualmente, enzimele sunt utilizate într-o gamă largă în diferite procese industriale. Pectinazele sunt utilizate în procesele de fabricare a sucului de fructe, legume, cafelei, ceaiului, berii, în industria vinicolă, la tratarea apelor uzate, extragerea uleiului vegetal, albirea hârtiei, ca adaos la hrana animalelor și păsărilor etc. Extracția sucurilor din fructe se realizează prin presare sau difuzie. Randamentul sucului este mai mare la extracția prin difuzie, decât la cea prin presare. Sucurile obținute prin difuzie, însă, au o aromă mai atenuată și un conținut mai ridicat de pectine.



Tratarea enzimatică cu pectinaze exogene în îmbinare cu celuloze asigură majorarea eficacității preselor, reducerea considerabilă a timpului necesar extracției și conferă sucului aromă și proprietăți senzoriale plăcute. Enzimele pectinolitice sunt absolut necesare în extracția, clarificarea și depectinizarea sucurilor de fructe. Clarificarea acestora decurge și sub acțiunea enzimelor pectinolitice din fructe, dar procesul de autoclarificare este prea lent pentru a fi utilizat la scară industrială. În procesele industriale sunt utilizate preparate concentrate de enzime pectinolitice produse de microorganisme, preparate care realizează o degradare rapidă a polimerilor pectici.

Enzimele pectolitice sunt enzime care degradează zonele liniare și zonele cu catene laterale (zonele ramificate).

Degradarea zonelor liniare este realizată de trei tipuri de enzime:

- pectinesterase, care catalizează dezesterificarea grupărilor metilice ale pectinelor cu formare de acizi pectinici și alcool metilic;
- poligalacturonase (endopoligalacturonase și exopoligalacturonase), enzime ce hidrolizează legăturile între două resturi de acid galacturonic;
- liaze, care catalizează depolimerizarea unui substrat prin reacția de β -eliminare (în absența apei).

Ruperea sau degradarea zonelor ramificate a pectinelor este realizată de următoarele enzime: endo-poligalacturonase, pectin metilesteraze, pectinase, arabinaze etc.

Tehnologia de obținere a sucurilor de fructe și legume implică utilizarea enzimelor. Prin adaosul de enzime pectolitice în pulpă, se realizează: creșterea randamentul în suc la presare; se favorizează extracția pigmentilor și aromelor, iar prin adaosul la suc – se favorizează limpezirea și claritatea lui. Eficacitatea diferitelor preparate comerciale pectolitice poate fi abordată în conformitate cu: timpul necesar de formare al flocoanelor; viteza de filtrare a sucului, după aplicarea tratamentului enzimatic pentru o anumită perioadă de timp; transparența sucului. Acțiunea enzimelor pectolitice asupra celor două componente ale pulpei este diferită. Acțiunea asupra fazei lichide (sucului) - se manifestă prin reducerea vâscozității, prin solubilizarea pectinelor din suc. Iar, acțiunea asupra fazei solide - se manifestă prin scăderea cantității de pectină insolubile, prin distrugerea structurii de gel, se ajunge la creșterea permeabilității acestui strat, care eliberează suc. Tot din partea solidă, nehidratabilă, se eliberează componentele de aromă și culoare.

Scop:

În lucrarea de laborator este vizat studiul enzimelor pectice prin fermentare în medii solide. *Bacillus pumillus*. Drept unitate de activitate PL (UE) a fost definită cantitatea de enzimă care produce 1 mMol de galacturonid/ min.

Materiale

Materiale

Pectină (ED% 9,4) din citrice, fenol, ditotreitrol (DTT), acid tiobarbituric (TBA).

O cantitate de 250 μ l de soluție enzimatică diluată corespunzător se incubează în prezența a 250 μ l de substrat: pectină/0,05 M fosfat, pH: 8) pe durata a 10 minute.

Se adăuga NaOH (1 N, 0,05 ml) la 0,5 ml de probă. Amestecul se agita scurt. Soluția se încălzește la 80°C într-o baie de apă timp de 5 minute și apoi se răcește. După adăugarea a 0,6 ml de HCl (1 N) pentru acidularea mediului, soluția se agită și se adăuga 0,5 ml de soluție poasa de TBA 0,04 M. Flaconul va fi apoi încălzit la 80°C timp de 5 min într-o baie de apă, apoi soluția se racește într-o baie cu gheață-apă înainte de măsurarea absorbanta la 550 nm. Proba control se prepara prin adăugare de NaCl 1% în loc de enzimă soluție în amestecul de reacție. O unitate de activitate enzimatica (UE) a fost definită ca acea cantitate de enzimă care produce 1 μmol de galacturonid nesaturat pe minut.

Modul de lucru:

1. **Efectul temperaturii** va fi investigat în intervalul de temperaturi 0 - 90°C, înregistrând valorile activității enzimatice la fiecare 10 grade. Rezultatele obtinute sunt prezentate in tabelul urmator:

Temp, °C	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Activitate enzimatica, UE	0	0	0	0.08	0.2	0.5	1.2	0.6	0.15	0	0

Realizati graficul si mentionati care este temperatura optima a acestei enzime.

2. **Influența pH-ului** asupra activității pectinliazei, se va studia în limitele valorilor pH 4 – 11. Rezultatele obtinute sunt prezentate in tabelul:

pH	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Activitate enzimatica, UE	0	0	0.2	0.3	0.27	0.18	0.05	0.02	0

Realizati graficul si mentionati care este pH-ul optim al acestei enzime.

3. Influenta efectorilor

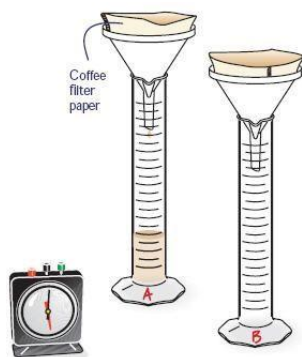
In mediul de reactie s-au adaugat urmatoorii compusi si s-a determinat activitatea enzimatica. Rezultatele sunt prezentate in tabelul urimator.

Control		100
CaCl ₂	10 mM	132.1
MgCl ₂	10 mM	119.2
Hg(NO ₃) ₂	10 mM	0
MnCl ₂	10 mM	0
ZnSO ₄	10 mM	87.9
Cu(NO ₃) ₂	10 mM	11.1
FeSO ₄	10 mM	67.3

Mentionati care sunt activatorii si care sunt inhibitorii din reactie.

Parte experimentală:

Fructele (măr, portocală, morcov și banană) trebuie curățate, desămânțate și amestecate timp de 2-3 minute, până când se obține o pulpă omogenă de fructe. Apoi se amesteca 20 g (5 linguri) de material cu 5 ml de preparat enzimatic (obținut prin dizolvarea a 2 comprimate/plicuri de DIGEX sau ALINAN Digestie usoara in 20 ml de apa) timp de 30 de minute. Pentru comparatie se va pregati si un control in care se va adauga doar 5 ml de apa. După aceea, sucul va fi filtrat pe un filtru de hârtie și se va măsura volumul de suc obținut si se va compara proba control cu cele in care s-a adaugat enzima.



IMOBILIZAREA ENZIMELOR

Enzimele sunt catalizatori biologici care sunt sintetizați în celulele organismelor vegetale și animale. Datorită lor, se poate realiza un număr mare de procese chimice metabolice în toate organismele vii. Astfel, arderea glucozei cu obținerea apei, a bioxidului de carbon și a energiei, se realizează prin intermediul enzimelor în condiții specifice vieții celulare. În absența acestora, procesul necesită temperaturi de 180 – 200⁰C.

De asemenea, hidroliza proteinelor sub acțiunea enzimelor specifice din organism are loc în mediu slab acid și foarte rapid, pe când, același proces pe cale chimică, se realizează la 37⁰C, timp de 3 luni și numai într-un mediu puternic acid.

Substanța asupra căreia enzima acționează se numește substrat. În cele mai multe cazuri legătura dintre substrat și enzimă se face prin intermediul „centrelor active”. Activitatea enzimelor se determină prin măsurarea gradului de transformare a substratului, măsurarea concentrației produsului de reacție etc.

Termenul „enzime immobilizate” se referă la enzime fizic limitate sau localizate într-o anumită regiune definită de spațiu cu retenție a activităților lor catalitice și care pot fi utilizate în mod repetat și continuu. Pe lângă aplicarea în procesele industriale, tehnicile de immobilizare sunt baza pentru a face o serie de produse biotehnologice cu aplicații în diagnosticare, bioafinitate în cromatografie și biosenzori. Inițial au fost utilizate doar enzimele immobilizate singure, dar în anii 1970 s-au dezvoltat mai multe sisteme complexe, inclusiv reacții a două enzime cu co-factor de regenerare și celule vii. Componentele majore ale unui sistem enzimatic immobilizat sunt enzima, matricea și modul de fixare. Enzimele pot fi fixate pe suportul de interacțiuni variind de la adsorbției reversibilă fizic și legături ionice la legături covalente stabile. Reacțiile covalente angajate de obicei dau naștere la legarea prin amidă, eter, sau legături amidice. Ca o consecință a imobilizării enzimelor, unele proprietăți cum ar fi activitatea catalitică sau stabilitatea termică se modifică. Aceste efecte au fost demonstrate și exploatate. Conceptul de stabilizare a fost o importantă forță de conducere pentru immobilizarea enzimelor. Adevărata stabilizare la nivel molecular a fost

demonstrată (ex. Proteinele imobilizate prin legarea covalenta în mai multe puncte).

Utilizarea preparatelor enzimaticice imobilizate la transformarea, prin cataliză eterogenă, a diferitelor substraturi, este o practică curentă datorită avantajelor pe care le prezintă:

- a) Permite utilizarea repetată a enzimei (cu aceeași cantitate de enzimă se poate prelucra o cantitate mai mare de substrat);
- b) Permite lucrul în instalații semicontinui și continui, micșorând volumul instalației, permițând automatizarea proceselor;
- c) Enzima nu se regăsește în produs (se elimină faza de inactivare termică a enzimei);
- d) Transformarea substratului se poate opri la momentul dorit printr-o operație mecanică;
- e) Se pot trata în condiții economice soluții diluate de substrat (ape reziduale, subproduse etc.);
- f) Se pot deplasa în mod controlat spre anumite valori pH-ul optim și temperatura optimă de acțiune a enzimei;
- g) La utilizarea procedeelor continui scade timpul de contact între enzimă, substrat, produse (față de procedeele discontinui); scade în acest mod posibilitatea formării de produse secundare nedorite.

Cele mai eficiente metode de imobilizare a preparatelor enzimaticice sunt: includerea prin adsorbție (pe geluri sau pe schimbători de ioni), includerea simplă (în geluri), insolubilizarea prin reticularea lanțului proteic sau cuplarea covalentă (pe polimeri naturali sau sintetici).

Componentele de bază ale unui sistem de imobilizare enzimatic sunt enzima, suportul și modul de interacțiune al enzimei cu acesta. Suportul este de regulă un polimer hidrofil cu greutate moleculară mare. Aceasta are o importantă contribuție la performanța enzimei imobilizate. Suporturile folosite pentru fixare, pot fi materiale organice (celuloză, agar-agar, amidon, polimeri ai aminoacizilor sau derivaților acestora, rășini-fenolformaldehydice etc.), anorganice (sticlă poroasă, silice, alumină etc.), sau organominerale (silicea sau sticla poroasă modificate cu polimeri organici).

Proprietățile unui suport ideal includ rezistența fizică la comprimare, caracter hidrofил, rezistență la atacul microbial, inerție spre enzime, biocompatibilitate, disponibilitate la costuri reduse.

Caracteristicile fizice ale suporturilor (cum ar fi diametrul mediu al particulei, rezistența mecanică și comportamentul la comprimare) va fi de o importanță majoră pentru performanța sistemelor imobilizate și va determina tipul de reactor utilizat în condiții tehnice (rezervor agitat, fluidizat). În special, parametri porilor și dimensiunea particulelor determină suprafața totală, afectând astfel capacitatea de legare a enzimelor. Suporturile neporoase prezintă câteva limitări de difuzie, dar au o capacitate de încărcare scăzută.

Nanoparticulele magnetice (MNPs) au câștigat popularitate ca suporturi de imobilizare pentru bio-macromolecule datorită unicei lor responsabilități magnetice, toxicitate scăzută și suprafeței modificabilă chimic, capacitatea mare de încărcare cu enzime, regenerabilitate bună. Diverse enzime au fost imobilizate pe suprafețe de nanoparticule magnetice prin intermediul unei varietăți de grupări funcționale, inclusiv amine, aldehide, carboxilice, epoxidice, mercaptanice și capete maleimidice, îmbunătățindu-se semnificativ atât activitatea enzimatică cât și stabilitatea.

Tehnici de imobilizare a enzimelor

A. Procedee fizice de imobilizare

1. Adsorbția pe suporturi solide

Adsorbția fizică a enzimei pe un polimer fără a se forma legături covalente cu acesta este cea mai veche metodă de imobilizare. Este o metodă extrem de ușoară: adsorbantul și enzima sunt amestecate un timp, dar randamentul (enzima legată pe unitatea de adsorbant) este mică, iar enzima este parțial sau total inactivată .

Adsorbția se realizează în principal prin două tipuri de mecanisme: în cel dintâi rolul de liant între suport și enzimă aparține forțelor Van der Waals; în cel de-al doilea unor forțe electrostatice coulombiene. Distincția dintre cele două mecanisme nu este netă, dar o primă indicație o pot furniza timpul necesar atingerii stării de echilibru și natura adsorbantului.

Legătura suport insolubil- enzimă este relativ slabă. Desorbția enzimei de pe suport este determinată de o serie de factori cum ar fi

fluctuațiile de pH, temperatura sau tărie ionică. Substratul enzimei adesea duce la desorbția enzimei de pe suportul adsorbant.

Adsorbția se produce doar superficial, zona interioară a suportului nefiind utilizată. Preparatele enzimice imobilizate în acest mod au o activitate specifică redusă. Mărirea suprafeței specifice prin mărunțirea foarte fină a suporturilor duce la obținerea de preparate enzimice cu proprietăți hidrodinamice slabe, care se colmatează rapid și nu permit prelucrarea soluțiilor concentrate de substrat, cu vâscozitate ridicată.

Dacă materialul suport este încărcat electrostatic, vecinătatea electrică a enzimei se modifică, ducând la modificarea pH-ului optim de acțiune. De cele mai multe ori duce la sporirea stabilității termice, a stabilității la depozitare și la acțiunea enzimelor proteolitice.

Capacitatea ridicată de adsorbție nespecifică a proteinelor de către celuloză, o problemă în cazul folosirii ca suport a acesteia la imobilizarea enzimelor prin legare covalentă, aici devine un mare avantaj. Astfel s-au folosit la adsorbția enzimelor rășini celulozice schimbatoare de ioni (carboximetilceluloza, DEAE celuloza), cu capacitati mari de adsorbție (până la 15%).

Majoritatea enzimelor având punctul izoelectric în domeniul de pH acid indică o preponderență în structura lor a grupurilor încărcate negativ; se utilizează deci de preferință anioniții, de cele mai multe ori în forma R-Cl sau mediu tamponat pentru prevenirea denaturării enzimelor.

Pentru a favoriza procesul de cuplare a enzimei de schimbătorul de ioni se utilizează un copolimer de etilenă și anhidridă maleică a cărui soluție în acetonă se adaugă treptat peste preparatul enzimatic brut, la rece, în mediu tamponat.

2. Includerea în structuri macromoleculare

Enzima poate fi inclusă în rețeaua formată de legăturile covalente ale unui polimer reticulat. Dacă gradul de reticulare este mic, atunci ochiurile rețelei sunt mari, iar enzima poate evada din gel fiind antrenată de soluția de substrat. Dacă gradul de reticulare este mare, evaziunea enzimei este împiedicată, dar accesul substratului la centrii activi este la rândul sau îngreunat. Trebuie găsit deci raportul între monomer și agentul de reticulare care să nu permită pierderea enzimei în mediul de reacție, dar care să nu limiteze accesibilitatea la centrii activi ai enzimei. Practic procesul este

utilizabil doar dacă masa moleculară a enzimei este mult mai mare decât a substratului.

Rețeaua tridimensională a polimerilor reticulați se poate înlocui cu structuri mai simple de geluri insolubile. Pentru aceasta se utilizează frecvent gelurile de acrilamidă reticulate cu N,N'-metilenbisacrilamidă. Solubilitatea în apă a comonomerilor înlătură dezavantajul utilizării solvenților organici, permite lucrul la pH-ul la care enzima are stabilitate maximă, precum și dispersarea uniformă a moleculelor de enzima în structura gelului, ceea ce determină mărirea accesibilității la centrii activi și sporirea vitezei de reacție. Acrilamida se utilizează ca soluție în apă sau tamponul potrivit de concentrație 40-50%, iar N,N'-metilenbisacrilamida ca soluție 3%. Oxigenul fiind inhibitor de polimerizare se îndepărtează din sistem fie prin barbotare de gaz inert fie prin efectuarea polimerizării în vid. Catalizatori de polimerizare sunt de obicei polisulfatii și β -dimetilaminopropionitrilul pentru gelurile cu grad de reticulare scăzut, și riboflavina pentru fotopolimerizarea amestecurilor cu conținut ridicat de N,N'-metilenbisacrilamidă. Se utilizează și radiopolimerizarea prin iradiere cu radiații γ . Reacția de polimerizare fiind exotermă, temperatura mediului de reacție se menține la valori care să nu ducă la denaturarea termică a enzimei.

Folosirea amidonului ca suport pentru entrapare se bazează pe proprietatea acestuia de a gelifica și a reține la solidificare enzime solubile. Preparatele obținute astfel au proprietăți mecanice slabe, pierd cu ușurință enzima prin eluare cu soluția de substrat și nu pot fi utilizate la rece. O oarecare îmbunătățire a proprietăților mecanice se obține prin turnarea gelului de amidon încă fluid pe o spumă poliuretanică.

O metodă mai rudimentară implică folosirea triacetatului de celuloză, în matricea neordonată a careia se poate îngloba enzima, obținându-se preparate enzimatiche imobilizate cu activitate relativ scăzută. În acest scop triacetatul de celuloză se dizolvă într-un solvent potrivit (dicloretan, cloroform etc.), imiscibil cu apa. În această soluție se adaugă soluția apoasă de enzimă și glicerină ca plastifiant. Prin coagularea emulsiei obținute pe o baie de toluen se obțin fire sau granule de preparat imobilizat. Un avantaj al acestei metode este posibilitatea reutilizării triacetatului de celuloză, prin redizolvare, la atingerea unui anumit grad de inactivare în lucru a enzimei înglobate. Înlocuirea triacetatului de celuloză cu acetati primari și secundari

nu determină sporiri semnificative ale activității specifice. Metode mai noi de entrapare folosesc geluri pe baza de substanțe anorganice, ex. Silice.

3. Microencapsularea preparatelor enzimatică

Microencapsularea preparatelor enzimatică presupune includerea enzimelor în microsfele cu pereți permeabili pentru moleculele de substrat și produs, cu masa moleculară mică și impermeabili pentru macromoleculele de enzimă.

Microcapsulele se prepară prin:

- a) Coacervare: - separarea fazelor în soluția de polimer și formarea unei membrane semipermeabile datorită solubilității mai mici a polimerului la suprafața picăturii.
- b) Polimerizare interfacială: - sinteza unui copolimer insolubil în apă la suprafața picăturii. Un comonomer este parțial solubil atât în faza apoasă cât și în faza organică, iar al doilea comonomer este solubil numai în faza organică. Proprietățile membranei semipermeabile obținute depind de coeficientul de partiție al monomerului solubil între cele două faze.

Polimeri utilizați în fabricarea microcapsulelor prin coacervare:

- nitratul de celuloză
- polistirenul
- etilceluloză
- butiro-acetil-celuloză

Microencapsularea se utilizează astăzi pentru protejarea suplimentară a enzimelor cuplate la un suport. În acest mod se utilizează celuloza aminoetilată, poli-p-aminostirenul diazotat, poliacrilamida. Enzima reacționează cu suportul activat chimic, iar produsul obținut se acoperă cu o pelicula de alginat de calciu, etil celuloza, carboximetil celuloza, colodiu, poliacetat de vinil, polivilpirolidona, poliacrilamida, nylon, etc.

B. Procedee chimice de imobilizare

1. Legarea covalentă

Această metodă este una dintre cele mai folosite metode de imobilizare. Se obține o enzimă imobilizată legată puternic de suportul polimeric. Legarea covalentă a unei enzime la un suport insolubil presupune

obținerea suportului într-o formă activă, urmată de reacția între această formă și enzimă.

Popularitatea celulozei ca suport este dată de avantajele pe care le prezintă aceasta: este puternic hidrofilă, disponibilitate mare, potențial ridicat pentru varii derivări, și ușurința cu care se pot produce polimeri pe baza de celuloză atât sub formă de pulberi cât și sub formă de membrane.

Pentru legarea enzimei la suport este indicat ca în loc să construim un grup reactiv în celuloză (p-aminobenzoil celuloza), să folosim un ligant chimic între celuloză și enzimă. Un astfel de ligant trebuie să fie mic și, o dată ce a reacționat cu celuloza, să conțină o grupare activă care să lege enzima. O astfel de moleculă ligant este triclortriazina care prezintă trei legături active C-Cl care reacționează una cu celuloza, una cu enzima, iar cea de a treia se poate lega de orice alt compus. Convenientul la triclortriazina este că natura ionică a complexului suport-enzimă depinde de încărcarea ionică a moleculei ligant, care poate fi anionică, cationică, sau neutră în funcție de compusul legat la cea de a treia legătură C-Cl activă.

Cea mai comună metodă de activare a celulozei astăzi este cea cu bromcian. Încă nu se cunoaște cu exactitate cum reacționează cu celuloza, dar se pare că la valori mari ale pH-ului reacționează ușor cu grupările hidroxi ale polizaharidului, iar derivatul va reacționa apoi cu grupările amino libere de pe enzima în soluții ușor alcaline.

Polizaharidele nu sunt suporturi ideale pentru enzime, acestea prezintă două inconveniente importante:

- sunt susceptibile la atacul bacterian
- celuloza prezintă un grad ridicat de absorbție nespecifică de proteine

În consecință după procesul de preparare enzima imobilizată trebuie spălată în substanțe tampon de țării ionice mari, acest proces putând inactiva enzimele, mai ales dacă forma lor activă este dimerică sau polimerică.

Pentru a depăși acest inconvenient s-a căutat un suport polimeric pentru imobilizarea enzimelor care să fie hidrofil și rezistent la atacul microbial. Astfel au apărut rapoarte în care, pentru imobilizarea enzimelor, s-au folosit ca suport sticla, nailon, variați derivați ai poliacrilamidei. Numeroși copolimeri acrilici se găsesc astăzi sub formă comercială, care includ grupări active ca: diazo, aldehide, carboximetil sau hidrocianat.

Reactivitatea suportului este importantă la obținerea preparatelor enzimatiche immobilizate prin faptul că grupările cu reactivitate ridicată reacționează neselectiv și rapid, putând modifica ireversibil structura centrului activ al enzimei.

O densitate mare în grupări reactive a suportului determină uneori pierderi de activitate fie prin limitarea accesului substratului la centrul activ, fie prin deformarea mecanică a moleculelor proteice. De asemenea, o distanță geometrică redusă între suport și enzimă poate determina pierderi de activitate, de aceea se folosește frecvent ca reactiv bifuncțional glutaraldehida și nu glioxalul.

Suporturile folosite în prepararea enzimelor immobilizate prin legare covalentă se pot clasifica astfel:

1. suporturi anorganice
2. suporturi macromoleculare de sinteză
3. suporturi macromoleculare de origine naturală

III. Alegerea metodei de imobilizare

Alegerea metodei de imobilizare este condiționată de o serie de factori care pot limita variantele de procedee aplicabile. Astfel la alegerea unei tehnici de imobilizare ar trebui, pe cât posibil, să se ia în considerare următorii factori:

1. enzima trebuie să fie stabilă în condițiile de reacție;
2. dacă este posibil grupările reactive ale suportului sau ale intermediarilor reactivi să reacționeze preferențial cu grupări reactive ale enzimei altele decât cele din situsul activ;
3. dacă condiția de mai sus nu poate fi satisfăcută atunci reactantul de legare al enzimei trebuie să fie cât mai mare pentru a nu penetra situsul activ al enzimei. În aceste condiții un polimer activat cum ar fi celuloza este de preferat unui reactiv bifuncțional cu molecula mică cum este glutaraldehida.
4. Unde este fezabil, situsul activ al enzimei trebuie protejat. Acest lucru se poate obține, pentru unele enzime, prin incorporarea în amestecul de reacție a unei concentrații de saturație de substrat, sau cuplând la suportul reactiv complexul reversibil enzima-inhibitor. Unele enzime, de exemplu

papaina, se pot imobiliza în stare inactivă. O altă posibilitate de protejare a situsului activ presupune modificarea enzimei înainte de cuplare prin introducerea de grupuri reactive departate de centrul activ.

5. Procesul de spălare folosit pentru a îndepărta moleculele enzimice libere, nelegate de suport, nu trebuie să afecteze enzima. Polimerii celulozici vor adsorbi puternic enzimele, astfel încât va fi necesară folosirea unor soluții de săruri ionice mari la spălare, astfel că folosirea celulozei ca suport pentru enzime polimerice nu este indicată deoarece procesul de spălare poate provoca disocierea acestor enzime.
6. Pentru enzimele imobilizate ce vor fi folosite la catalizarea unor reacții chimice în sistem extensiv se va lua în considerare natura reacției pe care o vor cataliza înainte de a alege o metodă de imobilizare. Astfel pentru o reacție de hidroliză a unui polimer cu greutate moleculară mare, cum ar fi un polizaharid, nu vom alege o entrapare fizică într-o matrice de gel. De asemenea nu vom folosi un polianion drept suport pentru o enzima ce va cataliza conversia unui substrat anionic într-un produs cationic, mai ales dacă enzima este sensibilă la inhibiția prin produs de reacție.
7. Proprietățile mecanice, în special stabilitatea mecanică și forma fizică, a suportului trebuie luate în calcul. Astfel dacă preparatul enzimatic imobilizat trebuie să apară sub formă de membrană, este de la sine înțeles că trebuie să alegem un suport care să poată fi, la rândul lui, format sub formă de membrană.

Găsirea unei metode de imobilizare care să satisfacă toate aceste condiții este foarte rară, astfel că trebuie ajuns la un compromis care să satisfacă majoritatea acestor factori limitativi.

IV. Imobilizarea enzimelor pe particule magnetice

Microparticulele magnetice sunt, în general, microparticule alcătuite din substanțe cu un caracter magnetic foarte pronunțat (fier, oxizi de fier - magnetita, diverse ferite), microparticule ce prezintă, în consecință, un

moment magnetic mare și cu ajutorul cărora se pot transporta în câmpuri magnetice diverse entități nemagnetice, cum ar fi celule, substanțe biologice active (anticorpi, antigene, enzime, acizi nucleici, medicamente), agenți patogeni, xenobiotice etc.

1. Clasificarea particulelor magnetice

Din punct de vedere al dimensiunilor, acestea se clasifică în:

- Nanosfere magnetice în cadrul cărora dimensiunile particulelor se încadrează în intervalul 5nm-30nm-100nm. În această clasă se pot include: magnetolipozomii, ferri și ferrofluidele magnetice.
- Microsfere magnetice a căror dimensiuni variază larg între 1μm și 300μm.

Din punctul de vedere al structurii peretelui purtătorilor:

- Purtători magnetici fără înveliș în care particulele magnetice se află în suspensie într-un mediu de transport. Aici se încadrează ferrofluidele magnetice de Fe_3O_4 , $CoFe_2O_4$ și FeC. Aceste ferrofluide la rândul lor pot fi în funcție de tipul mediului de transport: hidrofile, hidrofobe.
- Purtători magnetici cu înveliș, aceștia la rândul lor pot fi:

a) În funcție de numărul de straturi ale peretelui:

- cu perete simplu în care numărul straturilor se reduce la unul singur
- cu perete dublu în care peretele are în componența sa doar două straturi
- cu perete mai complex în care numărul straturilor este mai mare

b) În funcție de comportamentul în mediul biologic:

- cu înveliș resorbabil sau biodegradabil, care poate fi în consecință digerat de sistemul enzimatic al celulelor vii. În această categorie se încadrează polimerii biocompatibili: proteine, lipide, dextran, gelatina, PEG, PEO-PE, PLA, PAA, PVA, acid aspartic, acid glutamic etc.

- cu înveliș neresorbabil sau nebiodegradabil, în această clasă intrând polimerii nedegradabili in vivo: stire, PE, PET, PS.

c) În funcție de natura lor purtătorii magnetici pot fi:

- sintetici, rezultând în urma aplicării unor tehnici de sinteză asupra particulelor magnetice active, aici se încadrează majoritatea purtătorilor magnetici.
- naturale, fiind produși sub formă de magnetozomi în citosolul unei bacterii magnetotactice arhaice de pe fundul oceanelor, *Magnetospirillum magnetotacticum*. Aceștia sunt eliberați din celulă doar prin efracția membranei celulare.

d) O clasă particulară de purtători magnetici sunt **magnetolipozomii** care având dimensiuni care variază în limite relativ largi în funcție de tehnica abordată pentru sinteza lor dar și în funcție de mărimea particulelor de la care se pleacă pot fi încadrați fie în clasa lichidelor feromagnetice fie în clasa microparticulelor. De asemenea ei pot fi ușor încadrați în clasa purtătorilor sintetici cu perete biodegradabil.

2. Aplicații în biotehnologie a purtătorilor magnetici

Dacă luăm în discuție posibilitățile de aplicare a purtătorilor magnetici în biotehnologii atunci trebuie să precizăm că poate cel mai complex și mai semnificativ domeniu este cel al tehnologiilor de separare. Tehnicile de separare magnetică își pot găsi în acest sens un loc important în cadrul noilor tehnici de separare de sensibilitate crescută. Vom aminti pe scurt principalele aplicații în acest domeniu.

Imobilizarea de amestecuri biologice active și de celule. Amestecurile biologice active și celulele imobilizate pe purtători magnetici pot fi înlăturate din sistem prin simpla aplicare a unui câmp magnetic, sau ele pot fi astfel țintite spre o anumită destinație. Amestecurile utilizate în practică sunt: enzime, anticorpi, receptori, avidina sau streptavidina, lectina, proteina A și proteina G, inhibitori enzimatici, ADN, ARN, fosfolipide, polizaharide și celule.

Izolarea amestecurilor biologice active. Izolarea și separarea de molecule specifice, organite și celule este una din problemele majore din cercetarea medicală. Se utilizează două tipuri de strategii:

- una directă în care purtătorii magnetici cu liganzii specifici legați la suprafață sunt incubăți cu soluția ce conține amestecurile urmarite. Separarea complexului se face magnetic
- și una indirectă în care amestecul urmărit sau celulele interacționează mai întâi cu un ligand specific, de regulă un anticorp primar, apoi adaugându-se în sistem purtătorul magnetic ce are imobilizat la suprafață un anticorp secundar.

Modificarea amestecurilor biologice active. Enzimele pot fi făcute solubile și active în solvenți organici prin modificarea chimică cu macromolecule amfipatice (ex: polietilenglicol-PEG). Se prepară fie mai întâi conjugatul PEG-enzimă și apoi se conjugă cu magnetita fie alternativ, se prepară mai întâi complexul magnetita-PEG care apoi, într-o etapă ulterioară, se conjugă cu enzima. Enzima stabilizată magnetic dispersează atât în solvenți organici cât și în soluții apoase. În același mod se modifică și unii anticorpi precum și unele proteine sangvine.

Detecția și determinarea amestecurilor biologice active, xenobioticelor și celulelor. Modificarea magnetică a procedurilor standard de analiză imunologică poate fi cu succes utilizată pentru determinarea unor amestecuri biologice active, xenobioticelor și celulelor. În aceste tehnici anticorpi sau antigene specifice sunt imobilizate covalent la suprafața purtătorilor magnetici de dimensiuni reduse. Sistemul de detecție poate utiliza fie enzime, radioizotopi, substanțe fluorescente sau chemiluminescența.

Înlăturarea unor xenobiotice sau celule. Mediul și protejarea acestuia este un domeniu promițător pentru aplicarea principiilor de separare magnetică. Astfel dezvoltarea de noi metode de purificare a apei și a apelor reziduale, înlăturarea diverselor xenobiotice organice a caror potențial carcinogenic și mutagenic le-a fost demonstrat precum și a diverse bacterii și viruși cu potențial infectogen din apa râurilor sunt importante aplicații ale purtătorilor magnetici în acest domeniu.

Penicilin – amidaza este o enzimă produsă de diverse microorganisme (*Escherichia coli*, *Bacillus megatherium*, *Arthrobacter viscosus*, *Streptomyces sp.*), producătorul industrial al acesteia fiind

reprezentat de *E. coli*. În scopul creșterii stabilității acesteia, precum și pentru facilitarea recuperării și reutilizării în cicluri hidrolitice successive, pentru imobilizarea *penicilin – amidazei* au fost dezvoltate o serie de suporturi organice și anorganice (poliacrilamidă, agaroză, chitosan, suporturi epoxi - activate), folosindu-se tehnici de imobilizare precum reticularea, adsorbția, entraparea fizică sau legarea covalentă. Dintre acestea, metoda utilizată pe scară largă pentru imobilizarea *penicilin – amidazei* o constituie legarea covalentă de suportul epoxi – activat Eupergit C.

Tehnica experimentală

Experimentele se vor realiza într-un bioreactor cu volumul util de 4 l, computerizat și prevăzut cu sistem de monitorizare a parametrilor de funcționare (Biostat A, B. Braun Biotech International). Sistemul de amestecare consta dintr-un agitator dublu tip elice cu patru palete înclinate cu diametrul de 64 mm și trei șicane. Agitatorul inferior este amplasat la o distanță de 64 mm de baza bioreactorului, iar agitatorul superior a fost montat la o distanță de 32 mm de cel inferior. Viteza de rotație va fi menținută la 250 rpm, evitându-se formarea unor “cavități” la suprafața lichidelor de fermentație, depunerea fazei solide la baza bioreactorului și liza mecanică a biocatalizatorilor imobilizați.

Penicilin-amidaza din *E. Coli* (Fluka) de 180 UI, imobilizată în Eupergit C, conform metodei de legare covalentă descrisă de Torres-Bacete și colaboratorii lor va fi utilizată.

Soluția de substrat este o soluție Penicilină G sare de K (Merck) cu concentrația de 80-300 mol/m³. pH-ul soluției analizate este menținut între 7 și 9, fiind menținut la valorile prestabilite cu ajutorul unor soluții tampon, iar temperatura la care s-a desfășurat procesul enzimatic a variat între 20 și 40 °C.

Viteza și eficiența procesului enzimatic va fi cuantificată prin intermediul variației concentrațiilor Penicilinei G și a acidului 6-aminopenicilanic din masa de lichid în timpul conversiei enzimatice. Concentrația acestor componente va fi determinată cu ajutorul cromatografiei de lichide de înaltă performanță (HPLC), prin utilizarea unui sistem Ultimate 3000 Dionex echipat cu o coloană C18 Acclaim 120 (cu lungimea de 150 mm și diametrul de 4,6 mm) și un detector care operează la lungimea de

undă de 220 nm. Faza mobilă a fost reprezentată de un amestec constituit din 28% acetonitril și 72% soluție de 0,64 g/L KH_2PO_4 , cu o variație a debitului de 0,7 ml/min, iar temperatura de lucru a fost de 30 °C.

Sfârșitul procesului enzimatic a fost considerat în momentul în care gradul de conversie enzimatică a Penicilinei G a atins proporția minimă de 90 - 95%.

Se va reprezenta grafic

Influența pH-ului mediului asupra vitezei de conversie enzimatică a Penicilinei G

Variația randamentului hidrolizei Penicilinei G cu temperatura

Aplicații numerice

Aționând în celula vie și fiind proteine, enzimele prezintă unele proprietăți fizico-chimice și funcționale care le delimitează net de catalizatorii chimici. Studiul cineticii enzimatică, ca și în cinetica chimică, se bazează pe măsurarea vitezei de reacție în condiții standard (care se asigură în așa fel încât să fie cât mai apropiate posibil de condițiile existente *in vivo*) și în diferite condiții particulare create într-un anumit scop.

Influența concentrației substratului asupra vitezei reacțiilor enzimatică

Acest aspect al cineticii reacțiilor enzimatică a fost studiat de către *L. Michaelis*, *M.L. Menten* și *J.B.S. Haldane*. Plecând de la premiza existenței complexului intermediar enzimă-substrat (ES) s-a studiat cinetica pentru reacțiile enzimatică cu un singur substrat:



în care:

E – enzima;

S – substratul reacției;

ES – complexul enzimă-substrat;

P – produsul de reacție.

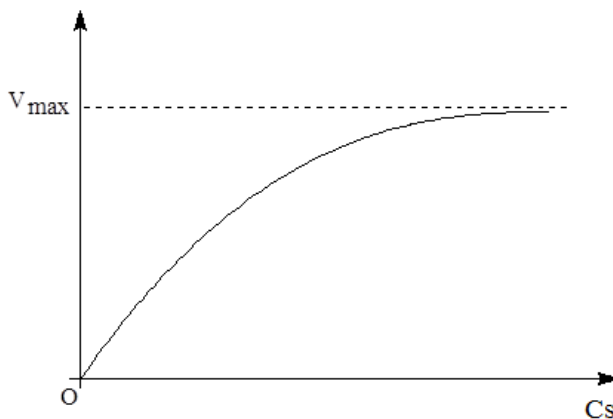
Reacțiile enzimatică decurg în două faze:

- în prima etapă are loc interacțiunea substratului cu enzima la nivelul situsului catalitic al acesteia ca urmare a complementarității stereochemice a acestora. În această fază se formează complexul intermediar *enzimă-substrat* (*ES-complex Michaelis*).
- în a doua etapă, acest complex bogat în energie se poate scinda pe calea inversă (regenerând substratul și enzima) sau poate realiza transformarea propriu-zisă a substratului când se formează produsul de reacție și se regenerează catalizatorul.

Ecuția cinetică pentru aceasta reacție enzimatică, este o expresie matematică folosită în cinetica enzimatică, pentru a lega viteza de reacție de concentrația fiecărui reactant. Deși cazul enzimelor monomerice cu un singur substrat este relativ rar, **cinetica clasică** a enzimelor monomerice în faza staționară cu un singur substrat **este modul cel mai simplu** de a trata și a înțelege cinetica enzimatică. Cele mai multe enzime au însă mai multe substraturi dând naștere la produși diferiți nerespectând comportamentul clasic.

Ecuția care reflectă dependența vitezei reacțiilor enzimaticice de concentrația substratului poartă numele de **ecuația Michaelis-Menten**, reprezentând modelul ideal pentru viteza proceselor enzimaticice în regim staționar, lipsit de procese secundare de inhibiție. Ecuția Michaelis - Menten a fost stabilită în ipoteza că $C_S \gg C_E$. Creșterea concentrației enzimei din mediul de fermentație peste o anumită limită atrage după sine anularea ipotezei, iar de aceea viteza reacției enzimaticice nu va mai fi direct proporțională cu concentrația enzimei.

Reprezentarea grafică a acestei ecuații în sistemul de axe rectangulare, în care concentrația substratului se trece pe abscisă, iar viteza de reacție pe axa ordonatelor, se prezintă sub formă de arc de hiperbolă:



Caracteristicile ecuației:

K_M este acea valoare a concentrației substratului C_S pentru care reacția pornește de la jumătate din viteza maximă, V . Constanta K_M este o măsură a afinității dintre substrat și centrul activ al enzimei și este întotdeauna aceeași pentru fiecare pereche enzimă-substrat, în condiții standard de reacție. Pe de

altă parte, aceeași enzimă izolată din surse biologice diferite, prezintă valori diferite ale constantei Michaelis. Unitățile de măsură pentru constanta Michaelis sunt unități de concentrație, utilizându-se în special molaritatea. În cazul în care substratul are o masă moleculară variabilă (de exemplu amidonul pentru amilaze, diferite proteine pentru proteinaze etc.) se poate exprima valoarea constantei K_M și prin unități de concentrație procentuală.

Cu cât valoarea constantei K_M este mai mică cu atât afinitatea dintre enzimă și substrat este mai mare. și invers. Caracterizarea oricărei enzime din punct de vedere structural și funcțional este incompletă fără determinarea constantei K_M față de substratul său natural, în condiții standard de reacție.

V_{max} – viteza maximă de formare a produsului ce corespunde stadiului în care întreaga cantitate de enzimă formează complexul enzimă – substratul;

Constanta vitezei catalitice – k_{cat} – numărul de transformări substrat-produs pe care fiecare centrul activ le catalizează în unitatea de timp.

Influența efectorilor asupra vitezei reacțiilor enzimatice

Se numesc **efectori** sau **modulatori**, compușii chimici care, adăugați în mediul de incubare, modifică viteza reacțiilor enzimatice. Efectorii care accelerează reacțiile enzimatice se numesc **modulatori pozitivi** sau **activatori**, iar cei care diminuează viteza reacției în mediul căreia sunt adăugați se numesc **modulatori negativi** sau **inhibitori**.

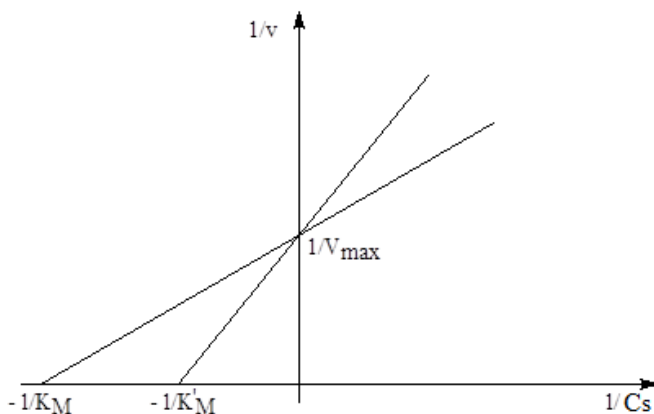
În funcție de modul lor de acțiune, inhibitorii enzimatici se clasifică în două grupe principale:

a) **inhibitori ireversibili** cunoscuți și sub denumirea de **otrăvuri catalitice**, au o importanță mai mică pentru cinetica enzimatică. Aceștia se leagă preponderent prin legături puternice, covalente, de anumite resturi de aminoacizi esențiale pentru activitatea catalitică. În urma interacțiunii acestor inhibitori cu enzimele se formează complecși stabili, inactivi din punct de vedere catalitic, inhibitorul neputând fi îndepărtat prin metode fizico-chimice obișnuite.

b) **inhibitorii reversibili** sau inhibitorii propriu-ziși **diminuează viteza reacțiilor enzimatice, dar aceasta revine la valoarea ei normală după înlăturarea inhibitorului**. Adăugarea în mediul de incubare a unui inhibitor

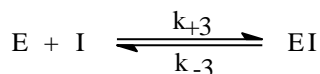
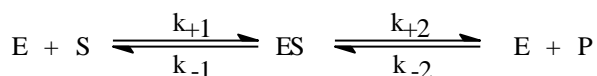
reversibil are repercusiuni asupra valorilor constantelor cinetice K_M și V_{max} . În funcție de modificarea acestor parametri, inhibiția reversibilă este de mai multe tipuri:

- **inhibiția competitivă** când inhibitorul determină o creștere a valorii constantei K_M (deci o diminuare a afinității dintre enzimă și substrat), parametrul V_{max} rămânând constant:



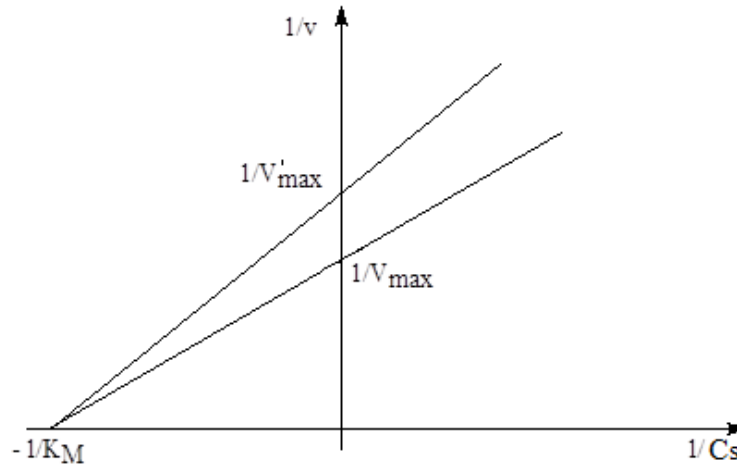
Reprezentarea grafică a funcției Lineweaver-Burk pentru o enzimă inhibată competitiv

Atunci când în mediul de reacție există substanțe înrudite structural cu substratul natural al enzimei respective, acestea se pot lega la centrul activ al enzimei, având loc următoarele reacții:



Complexul EI nu se scindează cu formarea vreunui produs de reacție, fiind un **complex nereproductiv**.

- **inhibiția necompetitivă** când are loc o diminuare a valorii lui V_{\max} (K_M rămâne constant):

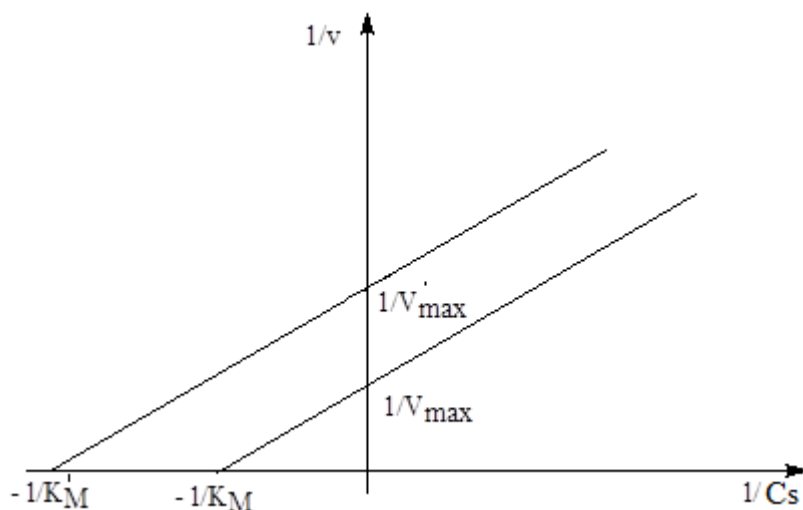


Reprezentarea grafică a funcției Lineweaver-Burk pentru o enzimă inhibată necompetitiv

Acest tip de inhibiție are loc atunci când între inhibitor și substrat nu există nici o analogie structurală, inhibitorul legându-se la situsuri specifice, altele decât situsul catalitic. Deoarece inhibitorul nu concurează cu substratul pentru centrul activ al enzimei, K_M rămâne nemodificat, ceea ce înseamnă că afinitatea enzimei pentru substratul său nu se schimbă.

- **inhibiția incompetitivă** sau **anticompetitivă** în care ambii parametri cinetici își micșorează valoarea într-un raport constant;

În inhibiția incompetitivă, inhibitorul nu se fixează pe enzima liberă ci interacționează cu complexul Michaelis, din care cauză are efecte similare atât asupra lui V_{\max} cât și a lui K_M :



- **inhibiția mixtă** care este o combinație a două sau a tuturor celor trei efecte anterioare.

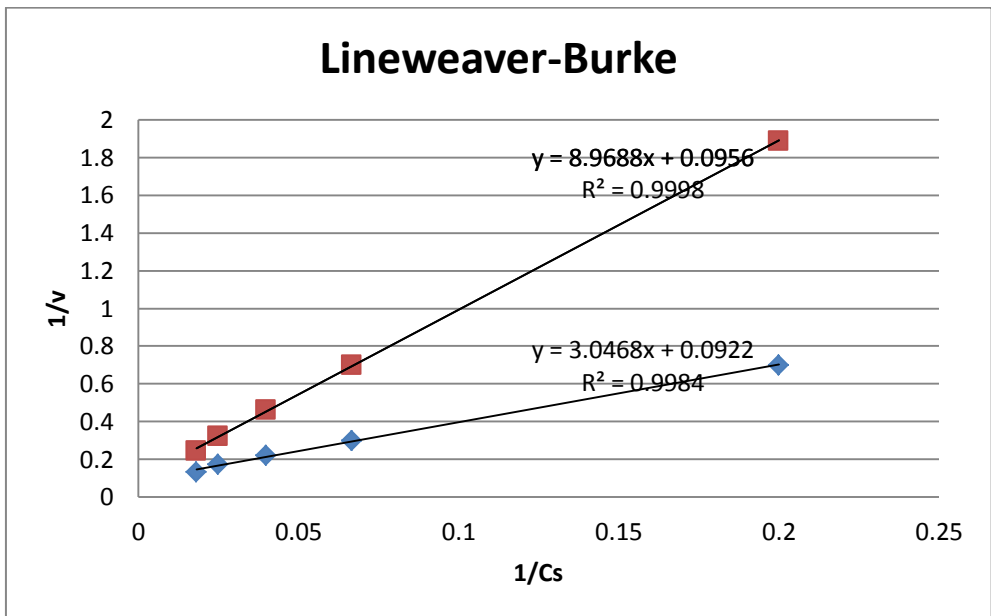
1. Pentru fiecare set de date reprezentați grafic ecuația Lineweaver-Burke și răspundeți la următoarele întrebări:

- a. Care este tipul de inhibiție?
- b. Care sunt valorile pentru V_{\max} și K_M pentru enzima în lipsa inhibitorului?
- c. Care este valoarea pentru K_{cat} în cazul acestei enzime?
- d. Care este valoarea K_I pentru acest inhibitor?
- e. Reprezentați ecuația Michaelis-Menten pentru enzima în prezența și în absența inhibitorului.

I. Model

	Viteza de reacție, v , ($\mu\text{M/s}$ pentru $0.001 \mu\text{M}$ de Enzima)	
C_s , mM	$C_I = 0 \text{ mM}$	$C_I = 2 \text{ mM}$
5	1.43	0.53
15	3.33	1.43
25	4.55	2.17

40	5.71	3.08
55	7.55	4.1



a.

Inhibiție competitivă

b.

$$1/V_{\max} = 0.1, V_{\max} = 10 \mu\text{M/s}$$

$$-1/K_M = -0.033, K_M = 30 \text{ mM}$$

c.

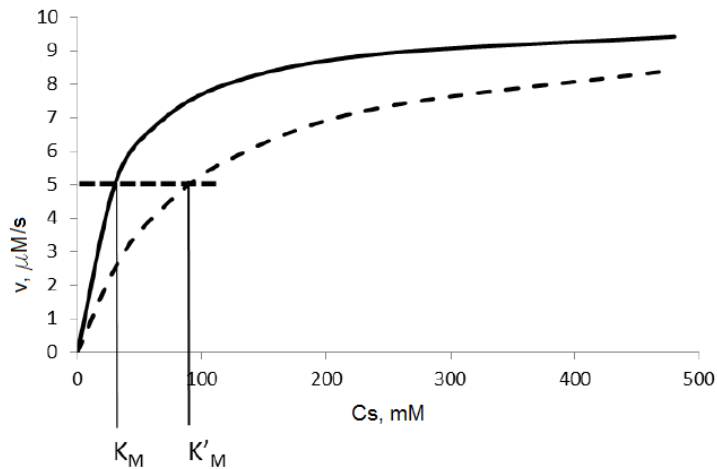
$$K_{\text{cat}} = 10 \mu\text{M/s} / 0.001 \mu\text{M} = 1 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$$

$$\text{Eficientă: } 1 \cdot 10^4 / 0.03 \text{M} = 3.33 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

d.

$$K_I = 1 \text{ mM}$$

e.



II.

Viteza de reacție, v , ($\mu\text{M/s}$ pentru $0.0015 \mu\text{M}$ de Enzima)		
C_s , mM	$C_i = 0 \text{ mM}$	$C_i = 10 \text{ mM}$
5	2.73	1.82
10	5	3.33
15	6.78	4.52
20	8.57	5.71
50	15	10

III.

Viteza de reacție, v , ($\mu\text{M/s}$ pentru $0.4 \mu\text{M}$ de Enzima)		
C_s , mM	$C_i = 0 \text{ mM}$	$C_i = 10 \text{ mM}$
5	0.12	0.10
10	0.17	0.13
20	0.29	0.18
30	0.38	0.21
40	0.44	0.24

IV.

	Viteza de reacție, v , ($\mu\text{M/s}$ pentru $0.003 \mu\text{M}$ de Enzima)	
C_s , mM	$C_I = 0 \text{ mM}$	$C_I = 2 \text{ mM}$
25	1	0.25
50	1.5	0.33
75	1.8	0.38
100	2	0.4

V.

	Viteza de reacție, v , ($\mu\text{M/s}$ pentru $0.01 \mu\text{M}$ de Enzima)	
C_s , mM	$C_I = 0 \text{ mM}$	$C_I = 40 \text{ mM}$
1.5	0.21	0.08
2.0	0.25	0.1
3.0	0.28	0.12
4.0	0.33	0.13
8.0	0.44	0.16
16.0	0.40	0.18

VI.

	Viteza de reacție, v , ($\mu\text{M/s}$ pentru $0.05 \mu\text{M}$ de Enzima)	
C_s , mM	$C_I = 0 \text{ mM}$	$C_I = 25 \text{ mM}$
3	10.4	4.1
5	14.5	6.4
10	22.5	11.3
30	33.8	22.6
90	40.5	33.8