

32. Estudio cinético de la actividad invertasa de levadura de panadería.

Manuel Tena Aldave, Jesús V. Jorrín Novo

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales,
Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba*

RESUMEN

En la presente práctica se plantea realizar un estudio cinético de la actividad invertasa, que comprenderá la determinación de velocidades iniciales así como estudios del efecto de los siguientes factores en la actividad enzimática: 1) concentración del enzima; 2) pH, con establecimiento del rango de valores de pH en el que el enzima es activo y determinación del pH óptimo; 3) temperatura, con establecimiento del rango de valores de temperatura en el que el enzima es activo y determinación de la temperatura óptima, energía de activación y valor del coeficiente de temperatura Q_{10} ; y 4) concentración de sustrato, con establecimiento del modelo cinético (Michaeliano o cooperativo) y determinación de los parámetros cinéticos del enzima.

Palabras clave: ecuación de Eadie-Hofstee, ecuación de Hill, ecuación de Lineweaver-Burk, representación de Arrhenius.

Abreviaturas empleadas (por orden alfabético de abreviatura). A.O.= abscisa en el origen; DNS: dinitrosalicílico; Int= intersección con el eje =0Y; K_m : constante de Michaelis; Pte= pendiente; V_{max} : velocidad máxima.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Determinación de velocidades iniciales

La actividad catalítica de un enzima se determina midiendo la velocidad inicial de reacción, que es la pendiente de la curva de progreso (curva de producto formado ó sustrato transformado frente al tiempo) en el tiempo cero (Fig. 1). Inicialmente, las reacciones transcurren linealmente, pudiéndose tomar la pendiente de esta recta como velocidad inicial. A tiempos más largos, el progreso de la reacción se aparta de la linealidad. Esta caída de la velocidad de reacción se debe a la disminución significativa de la concentración de sustrato, aunque también pueden influir otros factores como el aumento de la concentración de producto, cambios de pH, inactivación del enzima, etc. La máxima fiabilidad en la determinación de la actividad de un enzima la suministra el valor de velocidad inicial o velocidad durante el tramo inicial de progreso lineal de la reacción.

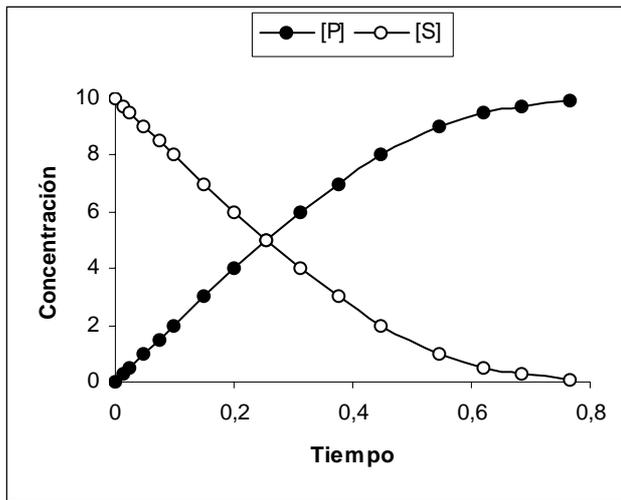


Figura 1. Curva de progreso de una reacción enzimática. Obsérvese cómo, inicialmente, se produce una disminución de sustrato, o aparición de producto, que es lineal con el tiempo

1.2. Efecto de la concentración de enzima sobre la actividad enzimática

De forma general, la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente es proporcional a la cantidad de enzima en la mezcla de ensayo, según:

$$v = V_{\max}[S]/(K_m + [S]) = k'[E_0] \quad V_{\max} = k_{\text{cat}} [E_0]$$

1.3. Efecto del pH sobre la actividad enzimática

La actividad de un enzima se ve afectada por el pH al cual se lleva a cabo la reacción. La curva actividad-pH puede ser diferente para cada tipo de enzima (Fig. 2). En el caso más general la curva tiene forma de campana. El valor de pH al cual la actividad es máxima se denomina pH óptimo; dicho pH no tiene porqué coincidir con el pH intracelular. La relación entre el pH y la actividad depende del comportamiento ácido-base del enzima y del propio sustrato. Sustrato y enzima (centro activo) pueden contener grupos funcionales ácidos y básicos, siendo su grado de disociación dependiente del pH, lo que determinará, entre otros aspectos, la conformación de la proteína, la capacidad de unión del sustrato al centro activo del enzima (K_m) y la capacidad de transformación del sustrato (k_{cat}). Los estudios cinéticos a diferentes valores de pH nos proporcionan información sobre el mecanismo catalítico de los enzimas y la naturaleza de los aminoácidos más directamente implicados en la catálisis.

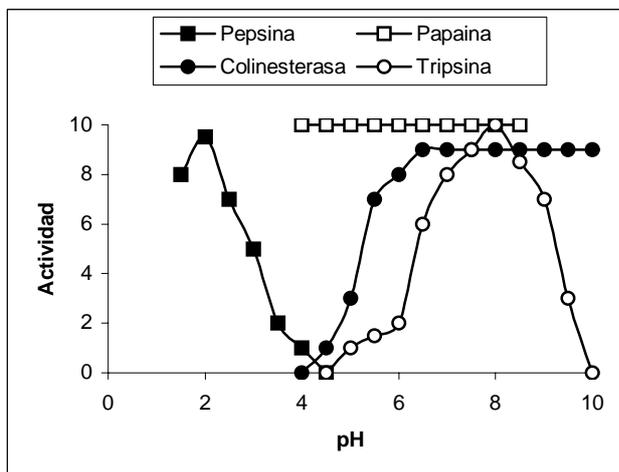


Figura 2. Efecto del pH sobre la actividad de diversos enzimas.

1.4. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

La velocidad de una reacción enzimática varía al aumentar la temperatura de acuerdo a lo indicado en la Fig. 3, donde se representa una típica curva de actividad enzimática/temperatura. Tal dependencia refleja un doble efecto de la temperatura: positivo a bajos valores, debido al incremento general que experimenta la velocidad de cualquier reacción química al hacerlo la temperatura, y negativo a valores altos, debido a la desnaturalización térmica del enzima. Esto es, la velocidad de una reacción enzimática se incrementa al aumentar la temperatura dentro de un determinado rango, alcanzando un valor máximo a la denominada temperatura óptima. A valores superiores la actividad disminuye debido a que el enzima, como cualquier otra proteína, sufre procesos de desnaturalización y, por lo tanto, de inactivación. Durante la fase de incremento de la velocidad, la relación entre ésta y la temperatura viene determinada por la ecuación de Arrhenius:

$$v = k e^{-E_a/RT} \quad \ln v = \ln k - E_a/RT$$

E_a es la energía de activación, R la constante de los gases ($1,9872 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$; $8,3145 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) y T la temperatura absoluta (K). El valor de E_a se puede calcular a partir de la representación de Arrhenius (Fig. 4).

Otro parámetro que se utiliza para cuantificar el efecto de la temperatura es el coeficiente de temperatura (Q_{10}), que se define, para una temperatura dada (p. ej. $25 \text{ }^\circ\text{C}$), como el factor de incremento de la velocidad de reacción cuando la temperatura se incrementa $10 \text{ }^\circ\text{C}$.

$$(Q_{10})_t = v_{t+10}/v_t$$

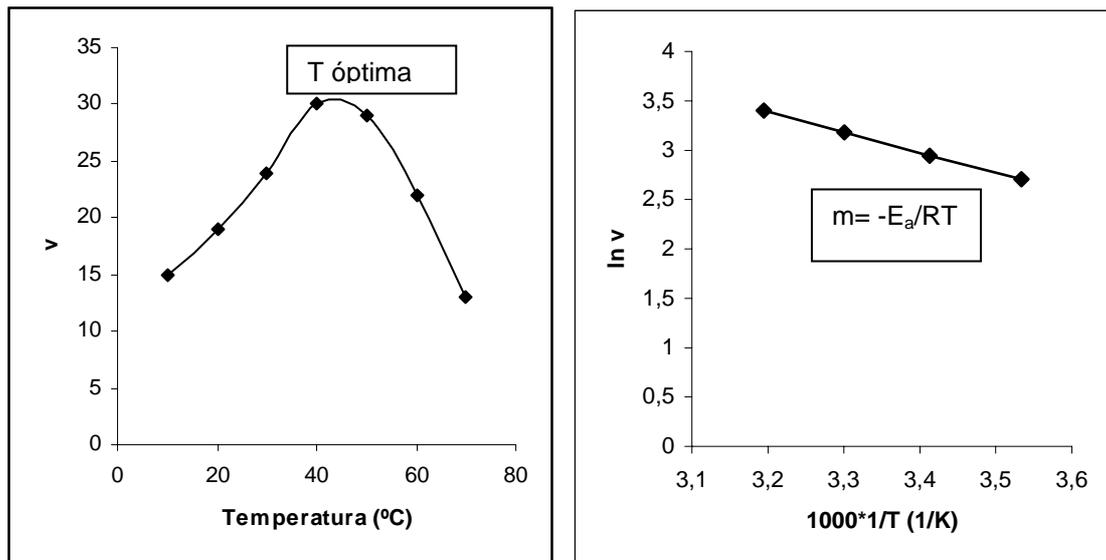


Figura 3. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática. El panel izquierdo muestra la respuesta de la actividad enzimática (velocidad de reacción) a la temperatura y el derecho la representación de Arrhenius para el cálculo de la energía de activación (E_a).

1.5. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática

En la Fig. 4 se representa el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente. Este comportamiento cinético, conocido como curva de saturación hiperbólica por el sustrato, constituye la norma seguida por la mayoría de los enzimas, los denominados enzimas michaelianos. Como principal desviación, algunos enzimas muestran curvas sigmoideas, en vez de hiperbólicas, de saturación por el sustrato (caso de algunos enzimas cooperativos o alostéricos).

El anterior modelo cinético se ajusta a la ecuación:

$$v = V_{\max} [S] / (K_m + [S])$$

donde K_m es la constante de Michaelis e indica la afinidad del enzima por su sustrato, y V_{\max} es la velocidad máxima e indica la capacidad catalítica.

La determinación de los anteriores parámetros cinéticos (V_{\max} y K_m) se puede realizar utilizando las representaciones de Lineweaver-Burk ($1/v : 1/[S]$) y de Eadie-Hofstee ($v : v/[S]$), (Fig. 5).

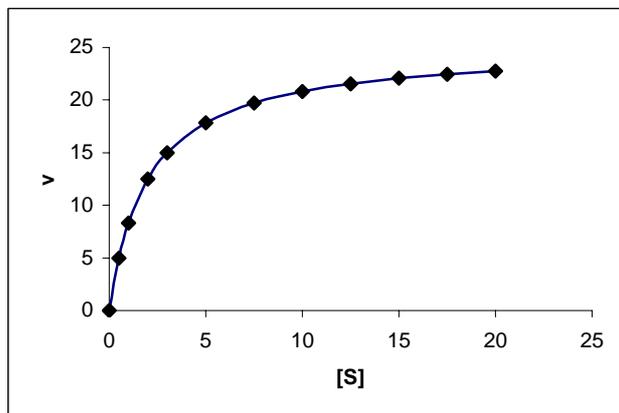


Figura 4. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática. Curva de saturación hiperbólica por el sustrato.

Ecuación de Lineweaver-Burk: $1/v = 1/V_{\max} + K_m/V_{\max} 1/[S]$

Ecuación de Eadie-Hofstee: $v = V_{\max} - K_m v/[S]$

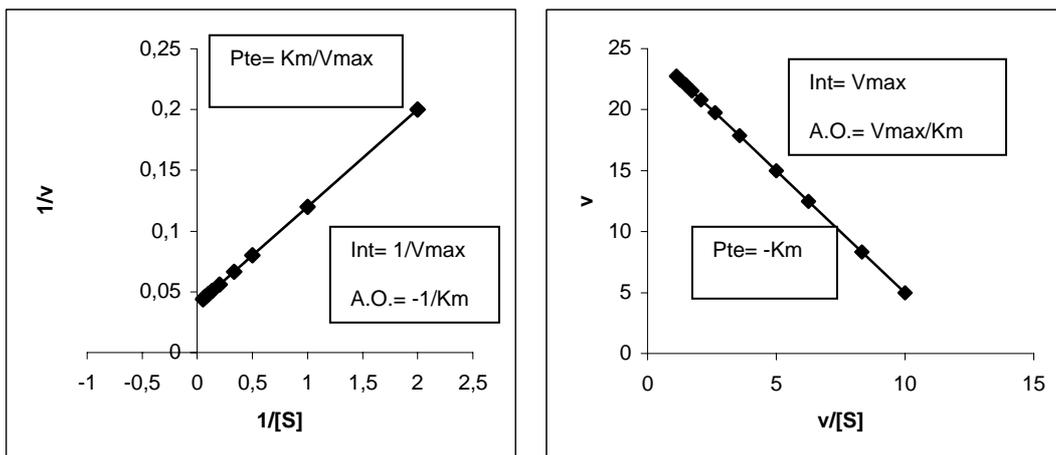


Figure 5. Representaciones de Lineweaver-Burk (panel izquierdo) y de Eadie-Hofstee (panel derecho).

De acuerdo con lo anterior, los objetivos de la práctica son los siguientes:

- Determinación de velocidades iniciales de reacción.
- Determinación del efecto de la concentración del enzima sobre la actividad enzimática.
- Estudio del pH sobre la actividad invertasa. Cálculo del rango de pH en el que el enzima es activo y de su valor de pH óptimo.
- Estudio del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática. Cálculo del rango de temperatura en el que el enzima es activo y de sus valores de T óptima, energía de activación y coeficiente Q_{10} .
- Estudio del efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad invertasa. Establecer el modelo cinético (michaeliano o cooperativo) y determinar los parámetros cinéticos V_{max} y K_m .

2. MATERIAL Y REACTIVOS

2.1 Material

2.1.1 Material de uso general

- Balanza (sensibilidad de 1 mg)
- Baños termostáticos (5)
- Bloque seco o baño de agua hirviendo
- Centrífuga preparativa
- Espectrofotómetro/Colorímetro
- Homogeneizador
- pH-metro

2.1.2 Material para cada grupo

- Botes de plástico para muestras biológicas
- Cubetas de plástico para el espectrofotómetro (6)
- Frasco lavador para agua desionizada
- Gradilla con tubos de ensayo de 15x1,5 cm
- Gradilla con tubos de ensayo de tapón de rosca 9,5x1 cm
- Guantes de látex
- Juego de pipetas automáticas (0,01, 0,1 y 1,0 ml)
- Juego de pipetas de vidrio (0,1, 0,5, 1,0 y 5,0 ml)
- Papel de filtro
- Pipetas Pasteur de plástico
- Probetas de 10, 100 y 250 ml
- Rotulador de vidrio
- Vasos de precipitado de 50, 100 y 250 ml
- Tijeras

2.2 Reactivos

- Acetato sódico
- Ácido acético
- Ácido clorhídrico
- Nescofilm
- Preparado liofilizado de invertasa de levadura
- Reactivo de Bradford
- Reactivo de DNS
- Ácido 2,3-dinitrosalicílico
- Tartrato sódico potásico
- Hidróxido sódico
- Sacarosa
- Tris

3. PROCEDIMIENTO

3.1 Determinación de velocidades iniciales.

Preparar 5 series de tubos (1 blanco y 2 problemas para cada serie o tiempo de incubación) con las mezclas de ensayo indicadas en la Tabla 1. Las mezclas de ensayo se incuban a 55 °C durante 5, 10, 15, 20 y 30 minutos.

Tabla 1. Mezcla de ensayo estándar para la determinación de la actividad invertasa.

Componentes	Blanco (blanco de sustrato)	Problema (x2)
Sacarosa 0,2 M (ml)	0,0	1,0
Tampón acetato 0,1 M, pH 5 (ml)	2,0	2,0
Agua destilada (ml)	2,0	1,0
Extracto enzimático (μ l)	100,0	100,0

Pasado el periodo de incubación se toma 0,1 ml de cada tubo y se le añade 1 ml del reactivo DNS, incubándose posteriormente a 100 °C durante 10 minutos. Enfriar y determinar la absorbancia a 570 nm de la mezcla problema utilizando como blanco la mezcla de ensayo del blanco de sustrato. A partir de los valores de absorbancia y tiempo de incubación se pueden determinar los valores de actividad enzimática. Alternativamente, se puede preparar una única serie de tubos, tomándose a los intervalos de tiempo indicados alícuotas de 0,1 ml que se verterán sobre 1 ml de reactivo DNS, previamente dispensado en un tubo de ensayo de tapón de rosca, mezclándose inmediatamente para detener la reacción enzimática.

3.2. Efecto de la concentración de enzima sobre la actividad invertasa

Preparar 5 series de tubos (1 blanco y 2 problemas para cada serie o concentración de enzima), conteniendo diferentes volúmenes de extracto enzimático, tal como se indica en la Tabla 2. Las mezclas de ensayo se incuban a 55 °C durante 15 minutos. Pasado el periodo de incubación se toman 0,1 ml de cada tubo y se le añade 1 ml del reactivo DNS, incubándose posteriormente a 100 °C durante 10 minutos. Enfriar y determinar la absorbancia a 570 nm de la mezcla problema utilizando como blanco la mezcla de ensayo del blanco de sustrato. A partir de los valores de absorbancia y tiempo de incubación se pueden determinar los valores de actividad enzimática.

Tabla 2. Volúmenes de extracto y agua destilada a añadir a las diferentes mezclas de ensayo para la determinación del efecto de la concentración de enzima sobre la actividad invertasa.

Mezcla de ensayo	1 B/P	2 B/P	3 B/P	4 B/P	5 B/P
Agua destilada (ml)	2,0/1,0	1,9/0,9	1,8/0,8	1,7/0,7	1,6/0,6
Extracto enzimático diluido 1:4 (ml)	0,1/0,1	0,2/0,2	0,3/0,3	0,4/0,4	0,5/0,5

Nota: En todos los casos los blancos (B) recibirán 2,0 ml de tampón acetato y los problemas (P) 2,0 ml de tampón y 1,0 ml de sacarosa 0,2 M .

3.3. Efecto del pH sobre la actividad invertasa

Preparar 5 series de tubos (un blanco y dos problemas para cada serie o valor de pH). En cada serie de tubos se utilizarán las mezclas de ensayo

indicadas en la Tabla 1, añadiendo a cada serie tampón de diferentes valores de pH (4,0- 4,5- 5,0- 5,5 y 7,0). Las mezclas de ensayo se incuban a 55 °C durante 15 minutos. Pasado el periodo de incubación, se toman 0,1 ml de cada tubo y se le añade 1 ml del reactivo DNS, incubándose posteriormente a 100 °C durante 10 minutos. Enfriar y determinar la absorbancia a 570 nm de la mezcla problema utilizando como blanco la mezcla de ensayo del blanco de sustrato. A partir de los valores de absorbancia y tiempo de incubación se pueden determinar los valores de actividad enzimática.

3.4. Efecto de la temperatura sobre la actividad invertasa

Preparar 5 series de tubos (un blanco y tres problemas para cada serie o valor de temperatura). En cada serie de tubos se utilizarán las mezclas de ensayo indicadas en la Tabla 1. Incubar las mezclas de ensayo a temperatura ambiente (25 °C), 35, 45, 55, y 65 °C durante 15 min. Pasado el periodo de incubación se toman 0,1 ml de cada tubo y se le añade 1 ml del reactivo DNS, incubándose posteriormente a 100 °C durante 10 minutos. Enfriar y determinar la absorbancia a 570 nm de la mezcla problema utilizando como blanco la mezcla de ensayo del blanco de sustrato. A partir de los valores de absorbancia y tiempo de incubación se pueden determinar los valores de actividad enzimática.

3.5. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad invertasa

Preparar 6 series de tubos (un blanco y dos problemas para cada serie), en cada serie de tubos se añadirá sacarosa a una concentración diferente. La preparación de una gama de soluciones de sacarosa 2-100 mM se realizará siguiendo las indicaciones de la Tabla 3.

Preparar las mezclas de ensayo que se indican en la tabla 1 (un ensayo para cada una de las concentraciones de sustrato). La mezcla de ensayo se incuba a 55 °C durante 15 minutos. Pasado el periodo de incubación se toman 0,1 ml de cada tubo y se le añade 1 ml del reactivo DNS, incubándose posteriormente a 100 °C durante 10 minutos. Enfriar y determinar la absorbancia a 570 nm de la mezcla problema utilizando como blanco la mezcla de ensayo del blanco de sustrato. A partir de los valores de absorbancia y tiempo de incubación se pueden determinar los valores de actividad enzimática. Cuando en el ensayo se utilicen concentraciones altas de sacarosa es fundamental que la mezcla de ensayo se agite periódicamente durante el tiempo de incubación.

Tabla 3. Preparación de soluciones de sacarosa de diferente concentración.

[Sacarosa] en la mezcla de ensayo (mM)	[Sacarosa] añadida a la mezcla de ensayo (mM) ¹	Solución stock de sacarosa (mM)	Dilución
2,5	10	20	1:2
5,0	20	200	1:10
10,0	40	200	1:5
20,0	80	200	1:2,5
50,0	200	200	Ninguna
100,0 ²	200	200	Ninguna

¹Las diferentes concentraciones se prepararán por dilución con agua destilada de soluciones stock de sacarosa 200 mM y 20 mM (esta última preparada por dilución 1:10 de la primera).

²Para esta concentración, la mezcla de ensayo problema contendrá, en vez de lo indicado en la Tabla 1, 2 ml de sacarosa y 1 ml de tampón.

4. RESULTADOS ESPERADOS

Los resultados de progreso de la reacción durante 30 min (Fig. 6) y con adición de hasta 0,5 ml de extracto enzimático diluido 1:4 (Fig. 7) muestran respuestas lineales en los rangos estudiados.

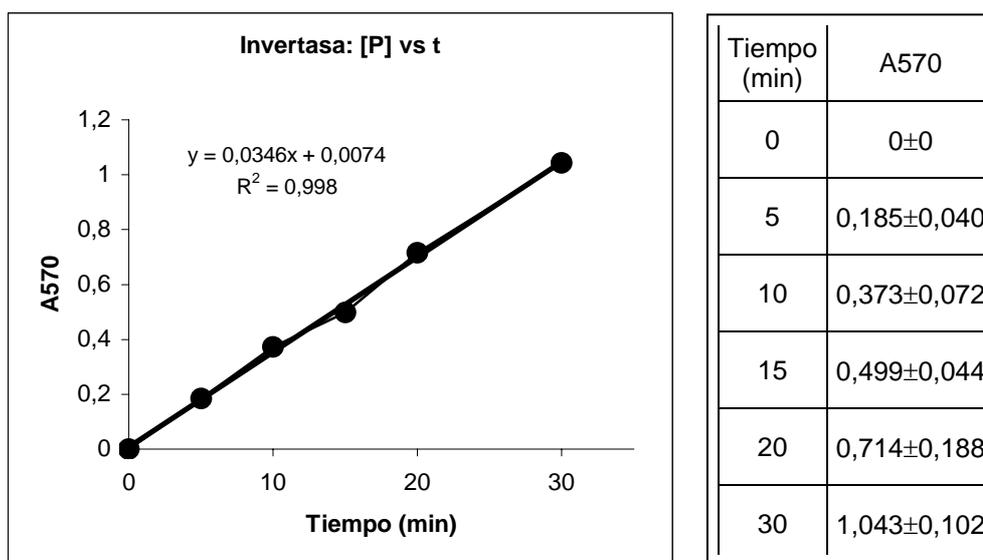


Figura 6. Curva de progreso de la reacción de la invertasa. Muestras (0,1 ml) de extracto enzimático se incubaron en las condiciones estándar de ensayo de actividad (Tabla 1) durante distintos tiempos (entre 0 y 30 min), tras lo cual se tomaron 0,1 ml que se añadieron a 1 ml de reactivo DNS, incubándose posteriormente a 100 °C durante 10 minutos. Tras enfriar se determinó la absorbancia a 570 nm. Los valores representados son medias ± DE de muestras por duplicado de nueve experiencias independientes.

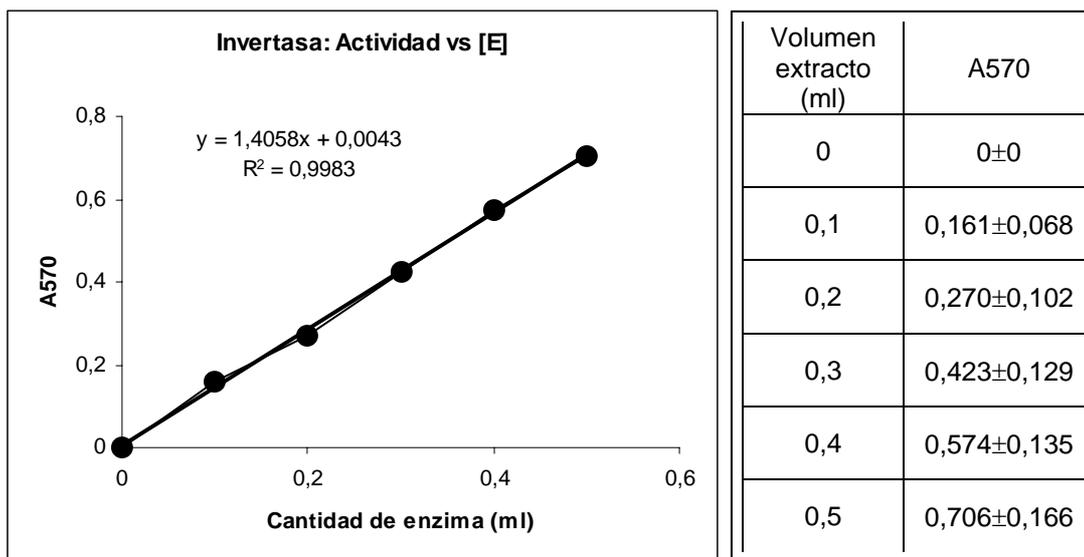


Figura 7. Efecto de la concentración de enzima y actividad invertasa . Se prepararon muestras de ensayo conteniendo distintos volúmenes (entre 0 y 0,5 ml) de extracto enzimático diluido 1:4 (Tabla 2), que se incubaron a 55 °C durante 15 min, tras lo cual se tomaron 0,1 ml que se añadieron a 1 ml de reactivo DNS, calentándose posteriormente a 100 °C durante 10 minutos. Tras enfriar se determinó la absorbancia a 570 nm. Los valores representados son medias ± DE de muestras por duplicado de seis experiencias independientes.

Las respuestas de la actividad invertasa al pH (Fig. 8) y temperatura de incubación (Fig. 9), indican valores óptimos para 4,5-5,0 y 45-55°C, respectivamente.

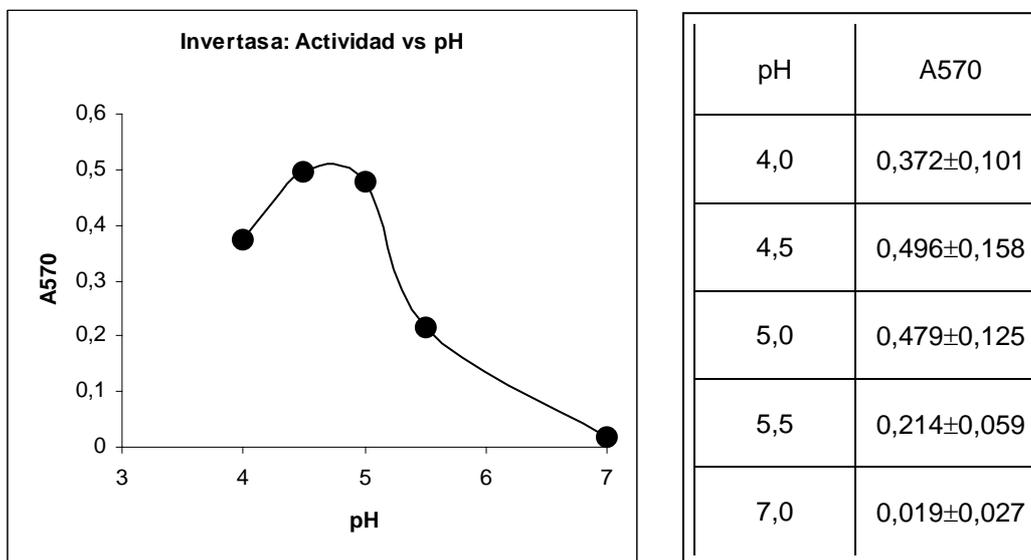


Figura 8. Efecto del pH en la actividad invertasa . Se prepararon muestras de ensayo estándar pero con diferentes valores de pH (entre 4,0 y 7,0), que se incubaron a 55 °C durante 15 min, tras lo cual se tomaron 0,1 ml que se añadieron a 1 ml de reactivo DNS, calentándose posteriormente a 100 °C durante 10 minutos. Tras enfriar se determinó la absorbancia a 570 nm. Los valores representados son medias ± DE de muestras por duplicado de seis experiencias independientes.

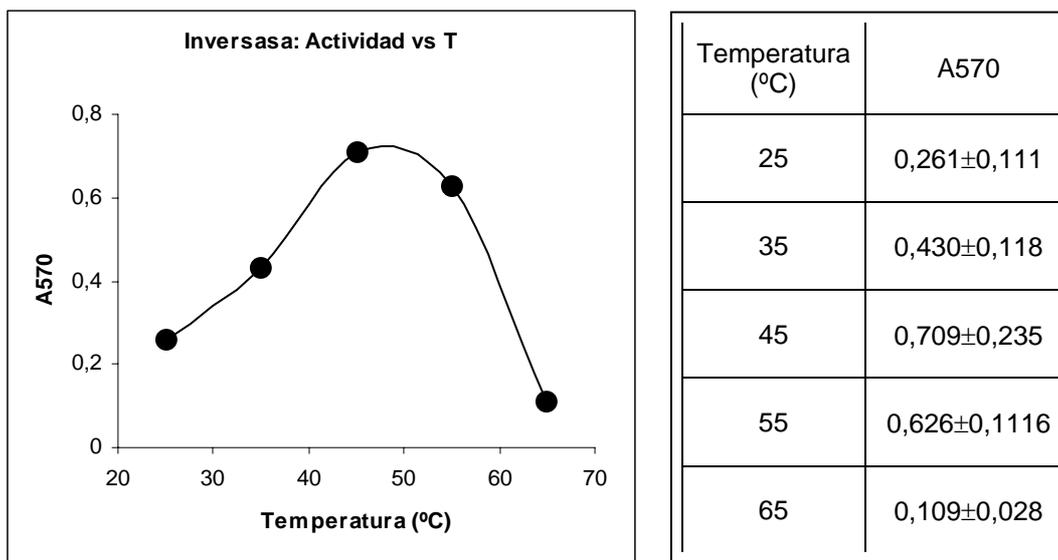


Figura 9. Efecto de la temperatura en la actividad invertasa . Se prepararon muestras de ensayo estándar (Tabla 1) que se incubaron a diferentes temperaturas (entre 25 y 65 °C) durante 15 min, tras lo cual se tomaron 0,1 ml que se añadieron a 1 ml de reactivo DNS, calentándose posteriormente a 100 °C durante 10 minutos. Tras enfriar se determinó la absorbancia a 570 nm. Los valores representados son medias \pm DE de muestras por duplicado de seis experiencias independientes.

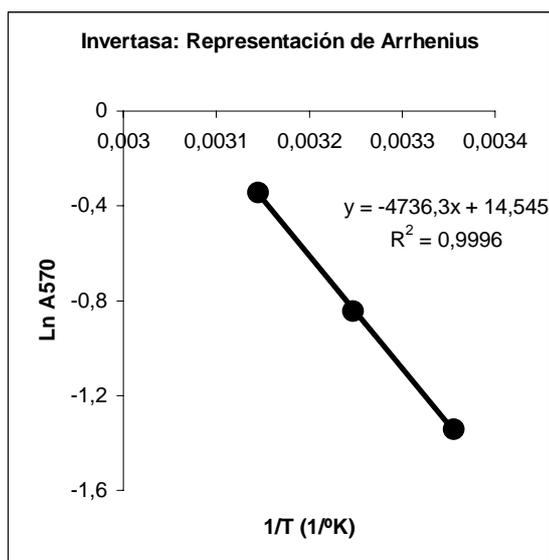


Figura 10. Representación de Arrhenius. Se muestra la representación del Ln A_{570} frente a $1/T$ para el tramo ascendente de la curva de respuesta de la actividad invertasa frente a la temperatura.

La pendiente de la representación de Arrhenius (Fig. 10), permite determinar un valor de energía de activación de la reacción de la invertasa de 39,38 kJ mol⁻¹ (9,41 Kcal mol⁻¹), mientras que de los valores de actividad a 25 y 35 °C (Fig. 9) puede deducirse un valor del coeficiente Q_{10} de 1,65.

Finalmente, los estudios de respuesta de la actividad invertasa reflejan un comportamiento michaeliano, el cual queda patente más que de la forma de la curva de saturación (Fig. 11), del buen ajuste de los valores experimentales a las transformadas lineales de Lineweaver-Burk y de Eadie-Hofstee (Fig. 12). A partir de la pendiente e intersección de estas representaciones, pueden deducirse valores de V_{max} y de K_m de aproximadamente 0,9 A_{570} y 50 mM, respectivamente.

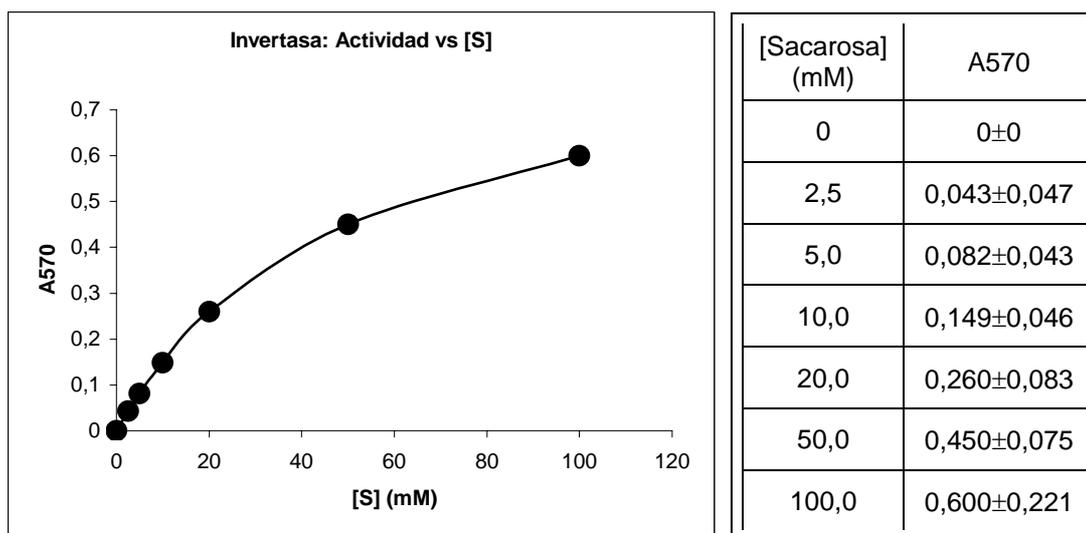


Figura 11. Efecto de la concentración de sustrato en la actividad invertasa . Se prepararon muestras de ensayo estándar (Tabla 1) con distintas concentraciones de sustrato (entre 0 y 100 mM) que se incubaron a 55 °C durante 15 min, tras lo cual se tomaron 0,1 ml que se añadieron a 1 ml de reactivo DNS, calentándose posteriormente a 100 °C durante 10 minutos. Tras enfriar se determinó la absorbancia a 570 nm. Los valores representados son medias \pm DE de muestras por duplicado de seis experiencias independientes.

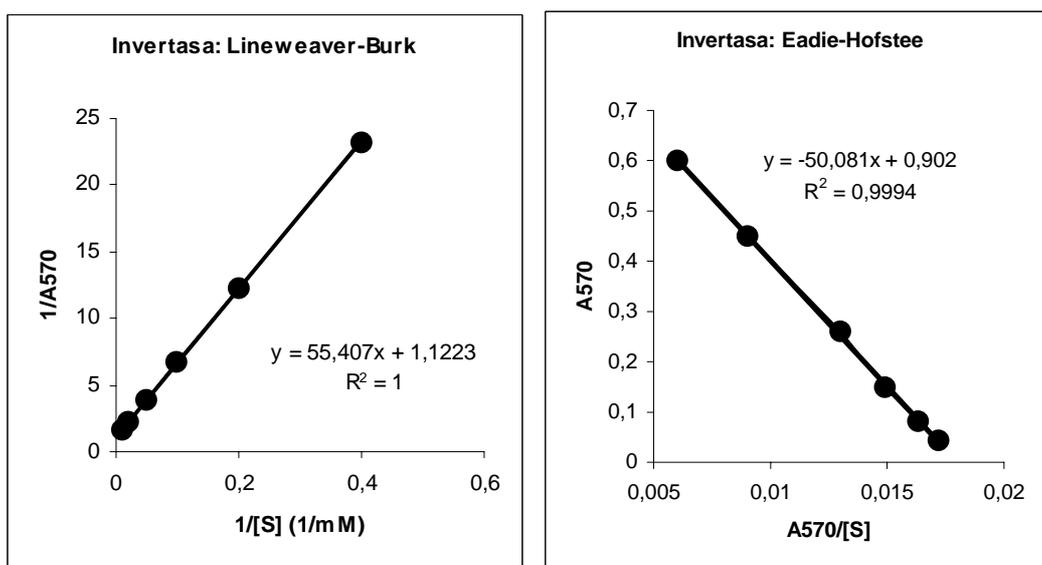


Figura 12. Representaciones de Lineweaver-Burk y de Eadie-Hofstee de la actividad invertasa. Los valores de actividad para distintas concentraciones de sustrato (**Fig. 11**) se ajustaron a las transformadas lineales de Lineweaver-Burk (panel izquierdo) y de Eadie-Hofstee (panel derecho).

5. DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

La práctica tiene como finalidad realizar estudios clásicos de cinética enzimática, considerando una serie de factores típicos que condicionan claramente la actividad de los enzimas.

Como aspectos teórico-prácticos a ser desarrollados por los alumnos, como complemento de la práctica, se podrían apuntar los siguientes:

1. A partir de los resultados de A_{570} obtenidos obtener los valores de actividad enzimática expresados tanto en Unidades Internacionales como en un submúltiplo apropiado del katal.
2. Comentar sobre los intervalos de respuesta lineal obtenidos en los estudios de $[P]$ vs tiempo y actividad vs concentración de enzima.
3. Comparar los resultados experimentales obtenidos en los estudios de respuesta al pH y temperatura con los publicados para la invertasa de levadura.
4. Comentar sobre los métodos gráficos de obtención de parámetros cinéticos y comparar los resultados obtenidos en la práctica con datos de la bibliografía.
5. Ajustar los datos de actividad vs $[S]$ a la ecuación de Hill, con deducción del correspondiente coeficiente de Hill, como un método adicional para discriminar entre cinética michaeliana y cooperativa.

Como aspectos prácticos complementarios, a considerar como puntos de estudio adicionales en el desarrollo de la práctica, se podría considerar la inclusión de la respuesta a la presencia de inhibidores reversibles con deducción del tipo de inhibición ejercido.

Referencias clásicas relativas a trabajos sobre propiedades y ensayo de la invertasa de levadura son las publicaciones de Hestrin et al. (1955) y de Lampen (1971).

6. BIBLIOGRAFÍA COMENTADA

Hestrin S, Feingold DS, Schramm M (1955): β -Fructofuranosidase (invertase) from yeast. *Methods in Enzymology* 1: 251-257.

Lampen JO (1971): Yeast and Neurospora invertases. En: Boyer PD (ed): "The Enzymes", 3ª ed. Vol V. Academic Press (New York, USA), pp 291-305.

ANEXO 1: MEDIOS, SOLUCIONES Y MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO

Extracto de invertasa de levadura: Suspender 1 g de preparado liofilizado de levadura en 200 ml de tampón de extracción (tampón acetato 0,1 M, pH 5,0, 0,5 M en NaCl). Agitar la mezcla durante 15 min (puede ayudarse la extracción mediante sonicación de la suspensión u homogeneización de la misma), centrifugar y tomar el sobrenadante como extracto enzimático.

Reactivo de DNS: Reactivo de DNS. Acido 3,5-dinitrosalicílico ($C_7H_4N_2O_7$; PM 228,1) al 0,1 % (p/v), tartrato sódico potásico [$NaK(COO)_2(CHOH)_2 \cdot 4H_2O$; PM 282,23] al 30 % (p/v) en NaOH (PM 40) 0,4 M. Disolver 1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico y 300 g de tartrato sódico potásico en 200 ml de hidróxido sódico 2 M (16 g de NaOH en 200 ml de agua destilada) y diluir hasta 1000 ml con agua destilada. El reactivo debe guardarse en bote oscuro (color topacio), siendo estable durante varias semanas.

Tampón acetato 0,1 M, pH 4,0 (82,0 ml de A y 18,0 ml de B se diluyen a un volumen total de 200 ml); pH 4,5 (56,0 ml de A y 44,0 ml de B se diluyen a un volumen final de 200 ml); pH 5,0 (29,6 ml de A y 70,4 ml de B se diluyen a un volumen final de 200 ml); y pH 5,5 (17,2 ml de A y 82,8 ml de B se diluyen a un volumen final de 200

ml). A: Solución de ácido acético 0,2 M (11,55 ml en 1000 ml). B: Solución de acetato sódico 0,2 M (16,4 de sal anhidra ó 27,2 g de sal trihidratada en 1000 ml).

Tampón Tris-HCl ($\text{NH}_2[\text{CH}_2\text{OH}]_3$; PM 121,14) 0,1 M, pH 7,0: pesar 12,1 g de Tris y disolver en 500 ml. Tomar 100 ml, ajustar el pH al valor requerido (7,0) con HCl y completar el volumen a 200 ml.