

2. Hydroliza lipidów mleka za pomocą lipazy trzustkowej

Lipazy są to enzymy z grupy hydrolaz, które powodują hydrolizę estrów kwasów tłuszczowych. W odróżnieniu od esteraz wykazują aktywność na granicy dwóch faz: wodnej, w której są bardzo dobrze rozpuszczalne i lipidowej. Enzymy te odpowiedzialne są za metabolizm lipidów - fosfolipidów i glikolipidów, będących głównymi składnikami biologicznych membran oraz triacylogliceroli, stanowiących rezerwuar energii. Z uwagi na znaczny udział lipidów w biomasie serca, lipazy odgrywają też ważną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu tego organu. W ostatnich latach wraz z rozwojem biotechnologii wzrasta też zainteresowanie powyższymi enzymami w takich dziedzinach jak: medycyna kliniczna, farmakologia, technologia żywienia, przemysł spożywczy oraz przeróbka olejów.

Aktywność lipazy określa się na podstawie ilości uwolnionych kwasów tłuszczowych, w czasie działania enzymu w optymalnych warunkach w substracie zawierającym tłuszcz. Ilość uwolnionych kwasów tłuszczowych w próbkach badanego substratu, pobieranych w kolejnych odstępach czasu, oznacza się przez miareczkowanie mianowanym roztworem wodorotlenku potasowego wobec fenoloftaleiny jako wskaźnika. Lipaza trzustkowa (EC 3.1.1.3) jest przykładem lipazy 1,3-regiospecyficznej, czyli takiej, która podczas hydrolizy triacylogliceroli preferencyjnie hydrolizuje wiązania estrowe przy zewnętrznych atomach węgla sn-1 i sn-3 glicerolu.

Odczynniki i sprzęt laboratoryjny:

1. Roztwór wieprzowego ekstraktu trzustkowego 1g/50 mL H₂O
2. Kolba stożkowa (50 i 250 mL)
3. Kolby stożkowe (7 × 100 mL)
4. Cylinder (100 mL)
5. Pipety (5 mL; 10 mL; 25 mL)
6. Lejek zwykły
7. Sączki
8. Łaźnia wodna (38°C)
9. Zestaw do miareczkowania
10. 0,1 M roztwór KOH
10. 1% roztwór fenoloftaleiny
11. Metanol
12. Badany produkt (mleko o różnej zawartości tłuszczu, śmietanka)

Wykonanie doświadczenia:

1. Oznaczenie

Do kolby stożkowej o pojemności 250 mL odmierzyć 100 mL badanego produktu, a następnie kolbę umieścić w łaźni wodnej w temperaturze 38°C. Przygotować sześć ponumerowanych kolb stożkowych o pojemności 100 mL i do każdej z nich odmierzyć po 25 mL metanolu oraz po 3 mL wody. Po upływie 10 minut od momentu wstawienia kolby z mlekiem do łaźni, dodać do mleka 30 mL wyciągu enzymatycznego z trzustki i dokładnie wymieszać. Kolbę pozostawić w łaźni wodnej i co kilka minut zamieszać. Po upływie 15 minut od dodania wyciągu enzymatycznego pobrać z mieszaniny reakcyjnej 10 mL roztworu do kolby stożkowej nr 1. W analogiczny sposób pobrać kolejne próby w ciągu 90 min., w odstępach 15-minutowych (łącznie sześć prób). Poszczególne próbki miareczkować 0,1 M roztworem KOH wobec fenoloftaleiny, do pojawienia się lekko różowego zabarwienia.

2. Próba zerowa

Przenieść 15 mL wyciągu enzymatycznego do kolby stożkowej o pojemności 50 mL i ogrzewać do wrzenia w celu inaktywacji enzymu. Po oziębieniu gotowanego roztworu ewentualny wytrącony osad odsączyć. Następnie do kolby stożkowej o pojemności 100 mL (nr 0) odpipetować 10 mL badanego produktu, 3 mL przesącza z ogrzewanego wyciągu enzymatycznego oraz 25 mL

metanolu. Próbę miareczkować analogicznie jak próby badane przy użyciu 0,1 M roztworu KOH wobec fenoloftaleiny. Wyniki zebrać i przedstawić w sprawozdaniu w postaci tabel i wykresów.

Uzyskane wyniki z miareczkowania zestawić w tabeli:

Nr próby	Czas (min.)	Ilość 0,1 M KOH zużytego do miareczkowania próby [mL]
0	0	
1	15	
2	30	
3	45	
4	60	
5	75	
6	90	

Obliczyć mikroekwiwalenty uwolnionych kwasów tłuszczowych z równania:

$$\text{mikroekwiwalent} = \frac{(A-B) \times C \times 1000}{D}$$

gdzie:

A – ilość mL 0,1 M KOH zużyta do miareczkowania próby właściwej

B – ilość mL 0,1 M KOH zużyta do miareczkowania próby zerowej

C – stężenie molowe użytego do miareczkowania KOH

D – ilość mL mleka w próbce poddanej miareczkowaniu = (7,7 mL)

i umieścić w tabeli:

Nr próby	Czas [min.]	Mikroekwiwalenty kwasów tłuszczowych
0	0	
1	15	
2	30	
3	45	
4	60	
5	75	
6	90	

Sporządzić wykres zależności ilości hydrolizowanych kwasów tłuszczowych (mikroekwiwalenty) w czasie (min.)

