

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 błon biologicznych 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 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. Ilość kwasów tłuszczowych oznacza się poprzez miareczkowanie mianowanym roztworem wodorotlenku potasu wobec fenoloftaleiny. 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. Zestaw do miareczkowania
9. 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 (np. mleka, śmietany), a następnie kolbę umieścić w temperaturze 38°C (łaznia wodna lub suszarka laboratoryjna). Przygotować sześć ponumerowanych kolb stożkowych o pojemności 100 mL i do każdej z nich odmierzyć po 20 mL metanolu oraz po 3 mL wody. Po upływie 15 minut od rozpoczęcia ogrzewania kolby z badanym produktem, dodać do niej 30 mL wyciągu enzymatycznego z trzustki i dokładnie wymieszać. Kolbę dalej ogrzewać i co kilka minut zamieszać. Po upływie 5 minut od dodania wyciągu enzymatycznego pobrać 10 mL mieszaniny do kolby stożkowej nr 1. W analogiczny sposób pobierać kolejne próby w odstępach czasowych podanych w tabeli. Poszczególne próbki miareczkować 0,1 M roztworem KOH wobec fenoloftaleiny (kilka kropli), do momentu pojawienia się lekko różowego zabarwienia (UWAGA - intensywność zabarwienia w każdym przypadku musi być taka sama).

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 20 mL metanolu. Próbę miareczkować 0,1 M roztworem 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]
Próba zerowa	-	
1	5	
2	15	
3	30	
4	45	
5	60	
6	75	

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 badanego produktu w próbce poddanej miareczkowaniu (7,7 mL)

i umieścić w tabeli:

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

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

