



Zachodniopomorski
Uniwersytet Technologiczny



ENZYMOLOGIA

Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa

**Centrum Bioimmobilizacji
i Innowacyjnych Materiałów**

Opakowaniowych

ul. Klemensa Janickiego 35
71-270 Szczecin

WNoŻiR



CBiMO



Ćwiczenie 3

Lipaza.

**Oznaczanie aktywności enzymu
metodą miareczkową**

Ćwiczenie 3

Lipaza. Oznaczanie aktywności enzymu metodą miareczkową

Lipazy to grupa enzymów o stosunkowo niskiej swoistości działania. Lipazy triacygliceroli spełniają w organizmie dwie podstawowe funkcje:

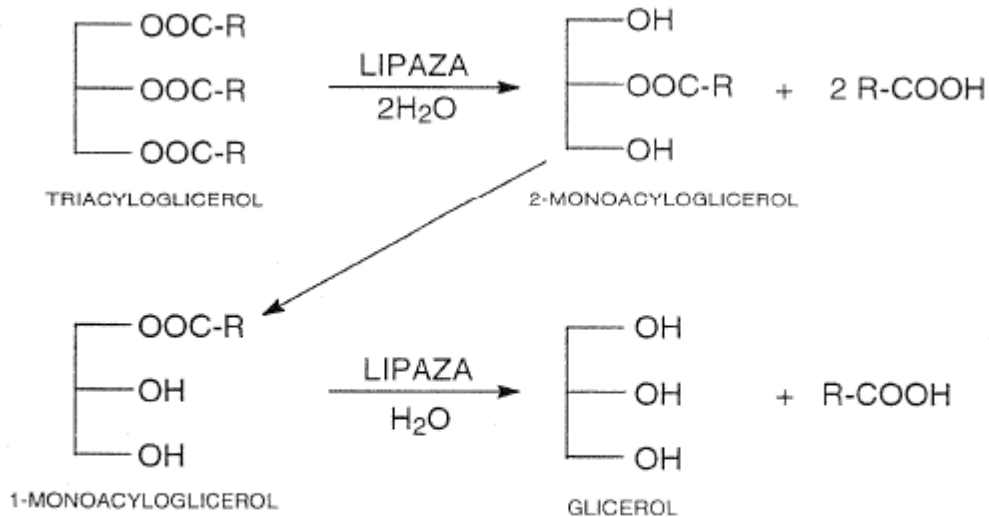
- są enzymami trawiennymi hydrolizującymi lipidy do związków, które mogą być wchłaniane w przewodzie pokarmowym,
- lipazy występujące w tkance tłuszczowej umożliwiają wykorzystywanie zgromadzonych tam lipidów jako źródło energii. Aktywność lipaz znajdujących się w komórkach tłuszczowych jest regulowana hormonalnie: adrenalina, noradrenalina, glukagon i ACTH poprzez aktywację cyklicznej adenylanowej i wzrost stężenia cAMP w komórce aktywuje kinazę białkową A, która fosforyluje a przez to aktywuje lipazę. Insulina prowadzi do obniżenia poziomu cAMP w komórkach tłuszczowych i hamuje lipolizę.

Lipazy są jedną z głównych grup enzymów trawiennych. Choć istnieje lipaza „językowa” – wydzielana przez gruczoły języka oraz lipaza żołądkowa, to jednak główny ciężar spada na hydrolizę lipidów przypada na lipazę trzustkową. Aktywność tego enzymu nie jest regulowana hormonalnie; natomiast wzrasta ona w obecności soli kwasów żółciowych, fosfolipidów i białka – kolipazy. W wyniku całkowitej hydrolizy triacygliceroli powstają glicerol i kwasy tłuszczowe. Jednak lipaza trzustkowa jest enzymem działającym specyficznie na pierwszorzędowe wiązania estrowe – to znaczy, że w pierwszym rzędzie odszczepia kwasy tłuszczowe znajdujące się w pozycji 1 i 3 triacygliceroli. Powstały 2-monoglicerol może ulec izomeryzacji z wytworzeniem pierwszorzędowego wiązania estrowego i dzięki temu ulec dalszej hydrolizie pod wpływem lipazy. Proces izomeryzacji jest jednak powolny i dlatego też 2-monoglicerole są głównymi produktami końcowymi trawienia triacygliceroli.

Żółć to wydzielina produkowana w wątrobie odgrywająca istotną rolę w procesie trawienia. W skład żółci, oprócz wody, wchodzi: kwasy żółciowe, mucyna, barwniki żółciowe, cholesterol, kwasy tłuszczowe i sole nieorganiczne. Sole kwasów żółciowych są polarnymi pochodnymi cholesterolu. Dzięki obecności zarówno grup polarnych jak i niepolarnych są znakomitymi detergentami. Działają emulgująco na tłuszcze, dzięki czemu zwiększają dostępność cząsteczek lipidów na działanie lipazy. Sole kwasów żółciowych ułatwiają więc hydrolizę lipidów.

W przypadku szeregu schorzeń jak np. w przewlekłym zapaleniu trzustki i innych, dochodzi do niedoboru enzymów trawiennych. Istnieje szereg leków, zawierających skoncentrowane

wyciągi z trzustki zwierzęcej, lub zestaw oczyszczonych z różnych enzymów hydrolitycznych, które mają pomóc pacjentom w trawieniu i przyswajaniu pokarmów. Jednym z takich leków jest Kreon. Jedna kapsułka Kreonu zawiera (oprócz innych hydrolaz) lipazę o aktywności 10 000 U.



R – reszta dowolnego kwasu tłuszczowego

Zastosowanie lipaz w technologii żywności

W żywności i produktach spożywczych występować mogą lipazy rodzime, jak również pochodzenia mikrobiologicznego. W produktach zawierających tłuszcz działalność lipaz jest oceniana na ogół jako szkodliwa ze względu na hydrolizę tłuszczu, np. w maśle, margarynie, mleku, śmietanie, smalcu, majonezie, mące, kaszy itd. Są jednak wyjątki od tej reguły. I tak np. procesy hydrolizy tłuszczu zachodzą w czasie dojrzewania serów, np. w serach pleśniowych i przyczyniają się do wytworzenia odpowiedniego smaku i zapachu tych serów. Preparaty zawierające lipazy są stosowane w mleczarstwie w celu przyspieszenia dojrzewania serów, znajdują także zastosowanie przy odtwarzaniu zapachu mlecznego w niektórych preparatach spożywczych, jak mleko kakaowe lub w produktach o osnowie czekoladowej.

Część doświadczalna

Ćwiczenie 3

Lipaza. Oznaczanie aktywności enzymu metodą miareczkową

Cel ćwiczenia

Poznanie alkacymetrycznej metody oznaczania aktywności lipazy z użyciem oleju jako substratu oraz fenoloftaleiny jako wskaźnika. Ponadto zadaniem będzie porównanie aktywności lipazy działającej bez żółci i w obecności żółci.

Zasada metody:

Aktywność lipazy oznaczyć można przez zmiareczkowanie ilości uwolnionych kwasów tłuszczowych. Metodę tę można stosować do określenia aktywności lipazy w dowolnym preparacie enzymu (np. leku); pozwala ona również na zbadanie wpływu dodatkowych czynników (np. żółci) na aktywność lipazy. Aby oznaczyć aktywność enzymatyczną dowolnego enzymu należy określić szybkość początkową reakcji. W tym celu dokonuje się pomiaru przyrostu produktu (lub ubytku substratu) w zależności od czasu reakcji. Lipaza nie charakteryzuje się wysoką aktywnością molekularną i można na podstawie wstępnych doświadczeń tak dobrać ilość substratu i czas trwania reakcji, aby uprościć kolejne doświadczenia i prawidłowo wyznaczyć szybkość początkową reakcji w oparciu o jeden punkt doświadczalny (jeden okres czasu inkubacji enzymu z substratem). Wstępne doświadczenia pozwoliły ustalić takie warunki, przy których możemy mieć pewność, że po upływie wybranego przez nas czasu inkubacji enzymu z substratem, szybkość reakcji jest wciąż równa szybkości początkowej czyli zależność przyrostu produktu od czasu jest wciąż prostoliniowa czyli enzym jest wciąż w pełni wysycony substratem.

Schemat doświadczenia:

1. Przygotowanie dwóch mieszanin reakcyjnych:

- enzym - preparat leku Kreon: bufor – 0.1 M bufor fosforanowy pH 7.4 (optimum działania lipazy przypada na pH 7.0-8.5); substrat –olej rzepakowy,
- enzym – preparat leku Kreon; czynnik wpływający na aktywność enzymatyczną – żółć; substrat –olej rzepakowy.

2. Reakcja rozpoczyna się w momencie dodania do mieszaniny reakcyjnej ostatniego składnika. Reakcję prowadzimy przez 40 min. W łaźni wodnej (40°C) przy silnym wstrząsaniu. Reakcję zatrzymuje dodanie etanolu.
3. Oznaczanie ilości produktu w próbkach – oznaczanie ilości uwolnionych kwasów tłuszczowych przez miareczkowanie mianowanym roztworem NaOH.

Wykonanie:

Przygotować łaźnię wodną o temperaturze 40°C oraz 4 kolbki Ehrlenmayera (o obj. 50 cm³) i sporządzić w nich mieszaniny kontrolne z przygotowanego rozcieńczenia leku Kreon w 0.1 M buforze fosforanowym pH 7.4 (enzym w buforze). W dwóch kolbach przygotować mieszaniny kontrolne:

I - 5 ml oleju oraz 5 ml buforu fosforanowego pH 7.4,

II - 5 ml oleju, 4 ml buforu fosforanowego pH 7.4 oraz 1 ml żółci.

W kolejnych dwóch kolbkach przygotować mieszaniny reakcyjne:

I' - 5 ml oleju 1 ml buforu fosforanowego pH 7.4, 4 ml preparatu enzymu,

II' - 5 ml oleju, 1 ml żółci, 4 ml preparatu enzymu.

Następnie wstawić kolbki do łaźni wodnej i prowadzić reakcję przez 40 min. Przy jednoczesnym mieszaniu. Po zakończeniu inkubacji do każdej z kolb dodać po 8 ml etanolu, aby zatrzymać reakcję enzymatyczną. Zawartość kolbek miareczkować w obecności fenoloftaleiny (10 kropli) używając mianowanego 0.05 M NaOH, aż do pojawienia się utrzymującego się wyraźnego różowego zabarwienia.

Opracowanie wyników:

1. Od średniej wartości uzyskanej w wyniku miareczkowania prób pełnych po 40 minutach inkubacji odjąć wartość próby kontrolnej (I' - I, II' - II) i różnicę w ml wodorotlenku sodowego podać prowadzącemu ćwiczenia.
2. Aktywność lipazy wyrazić w μmolach kwasów tłuszczowych uwolnionych w ciągu 1 min. przez 1 ml enzymu (1 ml 0,05-molowego wodorotlenku sodowego = 50 μmoli kwasu tłuszczowego). Należy pamiętać, iż w doświadczeniu użyto po 4 ml enzymu w każdej z prób pełnych a czas inkubacji trwał 40 minut.
3. Na podstawie uzyskanych wyników porównać aktywność lipazy działającej bez żółci i w obecności żółci.

Literatura:

- 1) Praktikum z biochemii. Praca zbiorowa pod red. A. Dubina i B. Turyny. Instytut Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 1999.
- 2) Materiały do ćwiczeń laboratoryjnych dla studentów Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie (http://e.sggw.waw.pl/file.php/384/instrukcje/cw_4_e_rol.pdf)
- 3) Ogólna technologia żywności. Pijanowski E., Dłużewski M., Dłużewska A., Jarczyk A. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2004.