

Ćwiczenie nr 7 – Lipidy

I. Izolacja cholesterolu z żółtka jaja

II. Oznaczanie katalitycznej aktywności lipazy trzustkowej

Celem ćwiczenia jest:

- poznanie właściwości fizyko-chemicznych lipidów prostych i złożonych
- izolowanie cholesterolu z materiału biologicznego
- wykonanie reakcji charakterystycznych cholesterolu
- oznaczenie katalitycznej aktywności lipazy oraz stężenia lipazy

Wprowadzenie

Podział lipidów:

A. Lipidy proste – zbudowane z alkoholi i kwasów tłuszczowych

- Tłuszcze właściwe - triacyloglicerole (triglicerydy, TG) - estry glicerolu i nasyconych lub nienasyconych wyższych kwasów tłuszczowych (12-24 C), diacyloglicerol (DAG)
- Woski – estry jednowodorotlenowych wyższych alkoholi i wyższych kwasów tłuszczowych (26-42 C)
- Lipidy izoprenowe
 - Steroidy - cholesterol oraz estry cholesterolu i kwasów tłuszczowych
 - Karotenoidy

B. Lipidy złożone

1. Fosfolipidy

a. fosfatydy – pochodne kwasu fosfatydowego: kwas lizofosfatydowy (LPA), lecytyna (fosfatydylocholina), kefalina (fosfatydyloseryna), fosfatydyloetanoloamina, kardiolipina, fosfatydyloinozytol

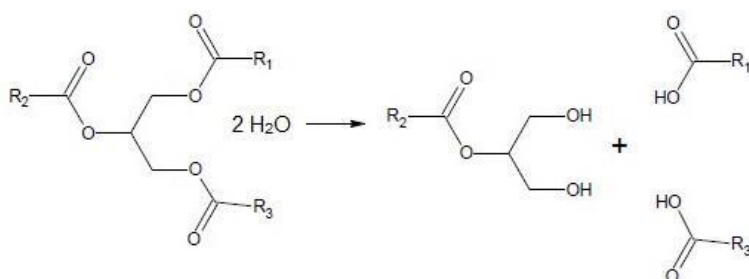
b. sfingofosfolipidy – pochodne sfingozyny: ceramid, sfingomieliny

2. Glikolipidy (glikosfingolipidy) – cerebrozydy, gangliozydy

3. Sulfolipidy (sulfatydy) i aminolipidy

Lipazy należą do klasy hydrolaz (EC 3.1.1.3), grupy esteraz i katalizują hydrolizę wiązania estrowego lipidów. Lipazy katalizują również reakcje estryfikacji, interestryfikacji, transestryfikacji, acydolizy i aminolizy triacylogliceroli. Wiele z **lipaz** wykazuje właściwości enancjoselektywne. **Lipazy** są enzymami rozpuszczalnymi w wodzie i działają na granicy faz: wodnej i organicznej. **Lipazy** pochodzą ze zwierząt, roślin, bakterii i grzybów: *Candida antarctica* (Novozym 435), *Candida Rugosa* (Lipase AY), *Pseudomonas cepacia* (Lipase PS), *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK), *Pseudomonas aeruginosa*, and *Thermomyces lanuginose* (Lipozime TL), *Bacillus*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium* i *Trichoderma*. **Lipazy** mają zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym, tekstylnym, kosmetycznym, garbarskim i papierniczym.

Rodzaje ludzkich lipaz: lipaza językowa (kwasostabilna), lipaza żołądkowa, lipazawątrobowa, lipaza trzustkowa, lipaza jelitowa, lipaza lipoproteinowa, lipaza hormonozależna, esteraza cholesterolowa, fosfolipazy A₁, A₂, C, D, sfingomielinazy. **Lipaza trzustkowa** katalizuje hydrolizę pierwszorzędowych wiązań estrowych triacylogliceroli (triglicerydów; TG), czyli **uwalnia kwasy tłuszczowe znajdujące się w pozycji 1 i 3** triacyloglicerolu.



Triacyloglicerol (TG)

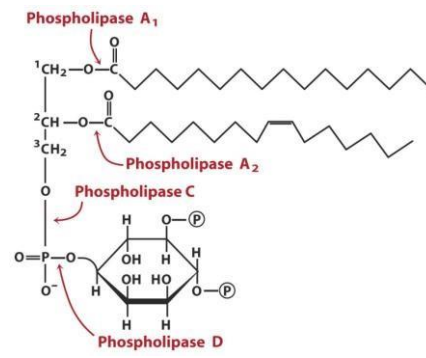
2-monoacyloglicerol + kwasy tłuszczowe

Powstały **2-monoacyloglicerol** może ulec izomeryzacji z wytworzeniem pierwszorzędowego wiązania estrowego i dzięki temu może ulec dalszej hydrolizie katalizowanej działaniem lipazy. Proces izomeryzacji jest jednak powolny i dlatego **2-monoacyloglicerole** są głównymi produktami końcowymi hydrolizy triacylogliceroli (TG) działaniem **lipazy trzustkowej**. W wyniku całkowitej hydrolizy triacylogliceroli (TG) powstaje glicerol i wolne kwasy tłuszczowe. **Lipaza trzustkowa** jest syntetyzowana w trzustce, skąd

wydzielana jest do dwunastnicy w formie nieaktywnego proenzymu, gdzie pod wpływem soli kwasów żółciowych, fosfolipidów i białka kolipazy, przekształca się w formę czynną. **Lipaza trzustkowa** jest białkiem rozpuszczalnym w wodzie.

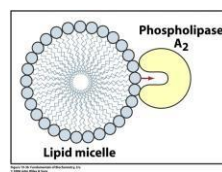
Katalityczną aktywność lipazy trzustkowej oznacza się we krwi. **Prawidłowe stężenie lipazy krwi** nie powinno przekraczać poziomu: 150,0 U/L. **Podniesione stężenie lipazy trzustkowej we krwi** może świadczyć m.in. o niedrożności przewodu trzustkowego, ostrym zapaleniu trzustki (poziom prawidłowy przekroczony jest 5-10 razy), nowotworze tego narządu, perforacji wrzodu dwunastnicy, zapaleniu otrzewnej, pozawątrobowej niedrożności dróg żółciowych, a także niedrożności jelit. **Na podniesienie stężenia katalitycznej aktywności lipazy trzustkowej we krwi** mają wpływ także leki, np. kodeina, heparyna, opioidy.

Fosfolipazy katalizują hydrolizę **wiązań estrowych** (fosfolipaza A₁ i A₂) oraz **wiązań fosfodiesterowych** (fosfolipaza C i D) **fosfolipidu**, z utworzeniem różnych pochodnych.



Przedstawiony powyżej **3,5-bisfosforan fosfatydyloinozytolu** (PIP₂, PtdIns(3,5)P₂, PI(3,5)P₂) błony, hydrolizowany działaniem **fosfolipazy C** (PLC, EC 3.1.4.11), tworzy biologicznie czynne cząsteczki sygnałowe: **1,2-diacyloglicerol (DAG)** oraz **trifosforan inozytolu** (IP₃, 1,4,5-trifosforan inozytolu).

Cytozolowa **fosfolipaza A₂** (EC 3.1.1.4, PLA₂) należy do fosfodiesteraz, które hydrolizując wiązanie estrowe **lecytyny** lub innych glicerolofosfolipidów w pozycji 2 uwalniają wolne **kwasy tłuszczowe**, w tym kwas arachidonowy oraz **lizofosfatydy**.



Liczby tłuszczowe - w celu oceny przydatności tłuszczu jako materiału żywnościowego lub przemysłowego, ustala się analitycznie niektóre z jego cech fizycznych i chemicznych. Należą do nich m.in. temperatura topnienia, gęstość oraz tzw. liczby tłuszczowe. **Liczby tłuszczowe** są miarą zawartości określonych związków w mieszaninie tłuszczu, np. estrów, związków nienasyconych, hydroksykwasów, wolnych kwasów tłuszczowych. Do najczęściej oznaczanych **liczb tłuszczowych** zalicza się: **liczbę jodową (LJ)**, **liczbę kwasową (LK)**, **liczbę estrową (LE)** i **liczbę zmydlania (LZ)**.

Liczba jodowa (LJ) jest to **liczba gramów wolnego jodu (I₂)** związanych przez 100 g **tłuszczu** i służy do określania zawartości kwasów nienasyconych, które wchodzi w skład danego tłuszczu. Kwasy nienasycone przyłączają jod w miejscu podwójnych wiązań. LJ jest miernikiem stopnia nienasylenia tłuszczu, więc może służyć do identyfikacji tłuszczów. Tłuszcze o dużej zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych, np. oleje roślinne, charakteryzują się wysokimi liczbami jodowymi (olej rzepakowy 168-179, olej kokosowy 246-268). Tłuszcze stałe o małej zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych mają niskie liczby jodowe, np. masło 26-38, smalec 46-70.

Tabela 1. Liczba zmydlania i liczba jodowa wybranych tłuszczów.

Rodzaj tłuszczu	Liczba zmydlania	Liczba jodowa
Tłuszcze zwierzęce		
Smalec wieprzowy	194-203	46-70
Masło	209-240	26-38
Tran	175-197	150-180
Oleje		
Oliwa	187-196	80-88
Arachidowy	188-197	83-100
Sojowy	190-194	115-137
Rzepakowy	168-179	94-106
Słonecznikowy	188-194	120-135
Lniany	187-195	170-200

Część doświadczalna

I. Izolacja cholesterolu

Procedura

1. Dokładnie oddziel żółtko od białka. Białko wyrzuć do zlewu, żółtko umieść w zlewce i zalej je 75 ml mieszaniny etanol - eter diizopropylowy (2:1, v/v). Rozmieszaj żółtko szklaną bagietką i pozostaw mieszaninę w temperaturze pokojowej na ok. 10 min, od czasu do czasu mieszając.
2. Mieszaninę przesącz na sączku karbowanym do suchej kolby okrągłodennej. Przesącz oddestyluj do suchej pozostałości na aparacie Claysena:
 - a. do kolby okrągłodennej z przesączem dodaj kamyczek wrzenny,
 - b. złóż aparat, włącz obieg wody w chłodnicy,
 - c. umieść kolbę w gorącej łaźni wodnej,
 - d. podepnij pompę próżniową, doprowadź roztwór do wrzenia i powoli oddestyluj rozpuszczalnik
3. Żółtą pozostałość rozpuść w 10 ml eteru diizopropylowego. Otrzymany roztwór powoli wkropl do zlewki zawierającej 30 ml acetonu jednocześnie mieszając. Wytrącony osad surowych lecytyn odsącz na lejku Buchnera. Zachowaj go do TLC i reakcji probówkowych.
4. Przesącz odparuj. Pozostałość rozpuść w chloroformie i zachowaj do TLC i reakcji probówkowych.
5. Na płytkę chromatograficzną nanieś rozpuszczone w chloroformie: próbki osadu, odparowanego przesączu i wzorca cholesterolu. Rozwiń w układzie heksan-octan etylu (7:3).
6. Wywołaj w parach jodu oraz kwasie siarkowym.

Próby na obecność cholesterolu – przeprowadź na otrzymanych chloroformowych roztworach i wzorcu cholesterolu rozpuszczonym w chloroformie

Próba Salkowskiego: Do 2 ml roztworu cholesterolu dodaj powoli po ściance próbki 1 ml stężonego kwasu siarkowego. Kwas fluoryzuje na zielono, a warstwa organiczna barwi się na czerwono.

Próba Liebermana-Burcharda: Do 1 ml roztworu cholesterolu dodaj 10 kropli bezwodnika octowego i kroplę kwasu siarkowego. Pojawia się czerwone zabarwienie, przechodzące przez niebieskie w zielone.

Próba Windausa: Do 1 ml chloroformowego roztworu cholesterolu dodać kilka kropli wody bromowej. Obserwować zanikanie barwy bromu.

Uwaga: Wszystkie czynności z lotnymi rozpuszczalnikami i stężonym kwasem siarkowym wykonywać pod dygestorium. Eter diizopropylowy jest substancją łatwopalną.

II. Oznaczanie katalitycznej aktywności lipazy metodą miareczkową

Zasada metody

Metoda miareczkowa oznaczania **katalitycznej aktywności lipazy** opiera się na **miareczkowaniu wolnych kwasów tłuszczowych** uwolnionych w wyniku katalizowanej działaniem lipazy hydrolizy tłuszczu za pomocą **wodorotlenku sodu (NaOH)**, z użyciem **fenoloftaleiny** jako wskaźnika kwasowo-zasadowego.

Substratami hydrolizy mogą być triacyloglicerole (TG) zwierzęce lub oleje roślinne. Metodę tę można stosować również do określenia katalitycznej aktywności lipazy w dowolnym preparacie enzymu (np. w leku).

Procedura

1. W zlewce o objętości 50 ml przygotuj roztwór **lipazy trzustkowej** (enzymu) przez rozpuszczenie **4 minitabletek** preparatu enzymatycznego w 15 ml 0,1 M buforu fosforanowego, pH 7.
2. Przygotuj 2 kolbki Erlenmayera (o obj. 100 ml), które opisz jako A i B i sporządź w nich mieszaniny inkubacyjne.

Kolbka A - próba kontrolna

Odmierz pipetą do **kolbki A**:

- 5 ml emulsji oleju
- 5 ml 0.1 M buforu fosforanowego, pH 7

Kolbka B - próba badana

Odmierz pipetą do **kolbki B**:

- 5 ml emulsji oleju
- 5 ml 0.1 M buforu fosforanowego pH, 7
- **4 ml wcześniej przygotowanego roztworu enzymu**
- **po dodaniu enzymu włącz stoper na 30 min**

3. Celem przeprowadzenia **hydrolizy oleju działaniem lipazy trzustkowej, kolbki A i B** z mieszaninami inkubacyjnymi **pozostaw w temperaturze pokojowej przez 30 min.**, mieszając co kilka minut.
4. Po zakończeniu 30 min inkubacji, do próby kontrolnej (A) i do próby badanej (B) dodaj po **8 ml etanolu**, w celu zahamowania reakcji enzymatycznej. Do próby kontrolnej (A) dodaj następnie roztwór enzymu (4 ml).
5. Do każdej z kolbek dodaj po **2 krople fenoloftaleiny**.
6. **Przeplucz biuretę** za pomocą 0,1 M roztworu wodorotlenku sodu NaOH.

7. **Miareczkuj** zawartość **kolbek A i B** używając mianowanego **0,1 M roztworu wodorotlenku sodu NaOH**, aż do pojawienia się trwałego różowego zabarwienia fenoloftaleiny i zapisz wyniki dla **prób A i B**.
8. Po zakończeniu doświadczenia **usuń** roztwór wodorotlenku sodu NaOH z biurety, następnie **przepłucz** dokładnie biuretę przy pomocy ok. 50 ml wody destylowanej.