

## LABORATORIO DI SCIENZE NATURALI

### ESPERIENZA: LA LIPASI E L'IDROLISI DEI TRIGLICERIDI

#### Indice dei contenuti

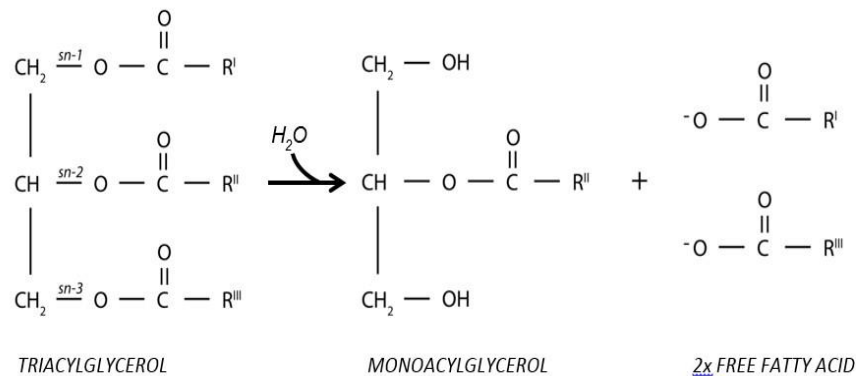
- Obiettivo
- Introduzione
  - L'enzima
  - Il substrato
  - L'idea portante dell'esperimento
- Lista dei reagenti e degli strumenti
- Procedure
  - Scheda per lo studente
- Note
  - Calcoli in appendice all'introduzione
- Come elaborare i dati
- Domande
- Commenti e proposte
- Bibliografia/ sitografia



OBIETTIVO: LO STUDIO SPERIMENTALE DI ALCUNI ASPETTI DELLA CINETICA ENZIMATICA

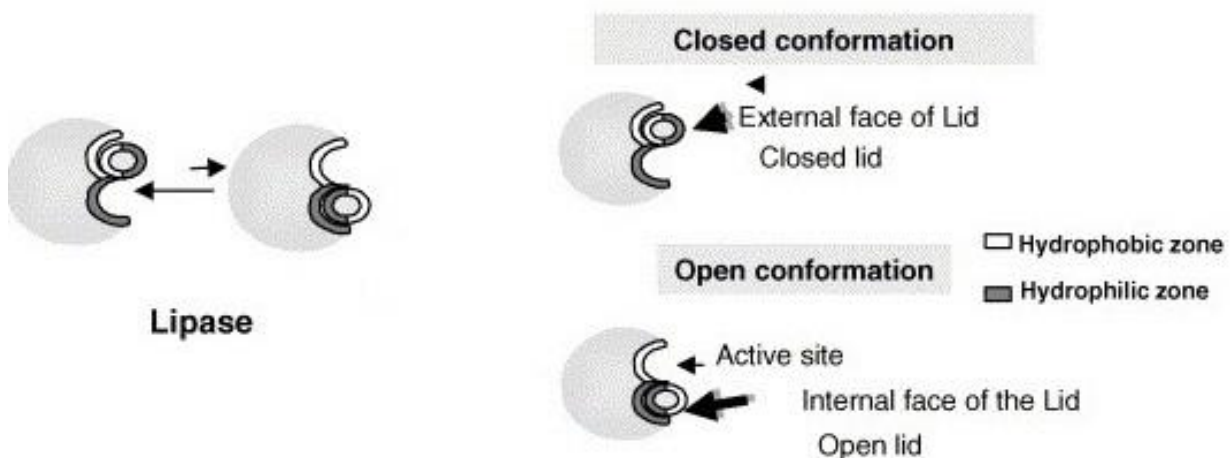
## INTRODUZIONE

**L'enzima**, la cui attività è oggetto di questo esperimento, è la triacilglicerol-lipasi, un enzima lipolitico che idrolizza il legame esterico dei trigliceridi in C1 e C3. La reazione che la lipasi catalizza è la seguente:



Le lipasi catalizzano l'idrolisi dei trigliceridi all'interfaccia tra i substrati lipidici e la fase acquosa: in assenza infatti dell'interfaccia lipide-fase acquosa il sito attivo dell'enzima è coperto da una struttura secondaria che lo rende inaccessibile al substrato. Tale struttura mobile è chiamata Lid o Flap. Il Lid è una struttura anfipatica:

- nella conformazione chiusa dell'enzima, la sua faccia idrofila è rivolta verso il solvente, mentre quella idrofobica è diretta verso il core dell'enzima
- quando l'enzima passa alla configurazione aperta, il LID si sposta e prende contatto con una parte idrofila dell'enzima mentre la parte idrofobica del LID viene esposta e lega il substrato. Il sito attivo è nel frattempo esposto anch'esso.



Il sito attivo è formato da una triade catalitica che comprende un

- nucleofilo ( Ser )
- un residuo acido (Asp/Glu )
- una istidina

Un potente inibitore delle lipasi pancreatiche è stato isolato dal batterio *Streptomyces toxytricini*: si tratta di un inibitore irreversibile in quanto si lega in modo covalente con la Ser espressa nel dominio attivo della lipasi ( è commercializzato come farmaco da banco – Alli , o come farmaco con ricetta Xenical ).

### Il substrato

Il substrato scelto per gli esperimenti è il latte: i grassi in esso contenuti sono in gran parte trigliceridi: più in particolare abbiamo le seguenti percentuali per il latte intero

Trigliceridi	98% ( di cui 65-68% saturi, lineari o ramificati)
Steroli	0,3%
Digliceridi	0,3%
Acidi grassi liberi	0,1%
Monogliceridi	0,03%
Carotenoidi/vitamine	0,2%

Le diverse catene di acidi grassi identificate nel latte sono circa 400, ne consegue che potenzialmente abbiamo  $400^3$  tipi diversi di trigliceridi possibili.

### L'idea portante dell'esperimento

Durante l'attività enzimatica la  $[H^+]$  quindi aumenta, come conseguenza della formazione di acidi grassi. Misurare le variazioni di pH potrebbe essere un metodo semplice ma efficace per rendere visibile il lavoro degli enzimi.

Si può progettare uno studio semiquantitativo dell'attività enzimatica in varie condizioni sperimentali adoperando la fenolftaleina come indicatore.

Il pH del latte fresco deve essere contenuto tra i valori 6.5-6.8.

Per permettere alla fenolftaleina di agire come indicatore si deve rendere basico l'ambiente di reazione. Si adopera per questo una soluzione  $Na_2CO_3$  0,005M ( tenendo conto che la  $K_{2a}$  per l'acido carbonico è  $4.4 \cdot 10^{-11}$  , si può calcolare il pH della soluzione basica, che è attorno a 11 ), che aggiunta al campione di latte permette appunto alla fenolftaleina di presentarsi nella forma dissociata ( colore fucsia ).

A mano a mano che la reazione di idrolisi dei trigliceridi procede, il pH si abbassa e a un valore di pH attorno a 8 si ha viraggio dell'indicatore, con scolorimento del campione.

Con un pHmetro si può inoltre seguire meglio l'andamento della reazione, registrando i valori di pH a intervalli fissi.

Tenendo conto della particolare natura della lipasi ( il suo essere un enzima che lavora all'interfaccia lipide/fase acquosa ) si possono provare ad aggiungere alcune gocce di una soluzione molto diluita di detergente/ lecitina di soia, per verificare un eventuale aumento della velocità di reazione dovuta all'azione emulsionante del detergente.

Si può progettare una esperienza in cui


- la variabile indipendente è la temperatura di reazione e la variabile dipendente è la velocità della reazione ( si misura il tempo necessario per lo scolorimento del campione nella provetta ). La serie di T potrebbe essere 5°C, 25°C ( T ambiente ) ,35°C, 45°C, 55°C.
- La variabile indipendente è il volume di lipasi utilizzato e la variabile dipendente è la velocità della reazione ( si misura il tempo necessario per lo scolorimento del campione nella provetta).
- Si confronta l'entità della reazione su campioni di latte diversi per contenuto in grassi, a parità T e concentrazione dell'enzima

---

## LISTA DEI REAGENTI E DEGLI STRUMENTI

---

### Reagenti

- Soluzione alcolica di fenolftaleina 1%
- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,05 M ( soluzione ottenuta sciogliendo 5,4 g in 1 L )
- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anidro  H319; P 305+351+338
- Lipasi : soluzione ottenuta sciogliendo 1 capsula di CREON ( 10000 U ) in 20 ml di acqua distillata ( 1 mL di soluzione è capace di agire su 0,005 mol di substrato in 1 minuto )
- Soluzione diluita lecitina di soia 1%
- Latte fresco ( intero/scremato/bovino/caprino...)

### Strumentazione e vetreria

- Set di provette
- Portaprovette
- Becher da 100 mL ( 2: per soluzione  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e per il campione di latte ), 400 mL
- Becher da 50 mL per soluzione Lipasi
- Bacchettina di vetro
- Pipetta tarata da 10 mL ( 2: per soluzione  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e per il campione di latte )
- Pipetta Pasteur ( per la soluzione di Lipasi )
- Cronometro
- Bagno maria
- Termometro
- pHmetro
- Piastra riscaldante

SCHEDA PER LO  
STUDENTE**La lipasi e l'idrolisi dei  
trigliceridi****MATERIALE****STRUMENTAZIONE E  
VETRERIA****PROCEDIMENTO**

**Per ogni temperatura,  
ripetere tre volte la prova**

**Le T potrebbero essere:**

**5°C bagno di ghiaccio**

**Temperatura ambiente**

**35°C,45°C,55°C in bagno  
termostatico**

- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,005 M
  - Soluzione alcolica fenolftaleina 1%
  - Soluzione Lipasi / Pastiglie contenenti lipasi
  - Soluzione lecitina soia 1%
  - Latte
- 
- Set di provette ( 8 ) e portaprovette
  - Becher da 100 mL ( per il latte e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ), 400mL
  - 1 becher da 50 per la soluzione di Lipasi
  - Pipetta tarata da 10 mL ( per il latte e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )
  - Pipetta tarata da 1 ml per la soluzione di Lipasi
  - Bacchetta di vetro
  - Cronometro
  - Bagno termico
  - Termometro
  - pHmetro
  - Piastra riscaldante
- 
- In un mortaio ridurre in polvere il contenuto della capsula contenente la lipasi. Portare in soluzione con 20 mL di acqua distillata
  - Prendere 3 provette e versare in ciascuna 5 mL di latte e 7 mL di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Agitare, capovolgendo la provetta tappata
  - Aggiungere 2 gocce di fenolftaleina, agitare come prima.
  - Se si lavora a T ambiente, aggiungere a ciascuna delle tre provette 1 mL di lipasi, agitando e facendo immediatamente partire il cronometro.
  - Se la prova viene condotta a T superiore rispetto a quella ambiente mettere in una provetta 5 mL di lipasi e riporre tutte le provette nel bagno maria sino a raggiungere la temperatura voluta
  - A questo punto versare 1 mL di soluzione di Lipasi in ciascuna delle provette contenenti il latte, agitando e facendo partire il cronometro.
  - Fermare il cronometro quando la provetta si scolorisce ( da fucsia a bianco ). Segnare il tempo e la temperatura.
  - Ripetere le operazioni a T diverse e riportare sempre i tempi.
  - Se si vuole provare l'effetto emulsionante della soluzione di lecitina di soia, preparare ad ogni prova una terza provetta contenente oltre alla fenolftaleina e la soluzione di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anche 5 gocce di soluzione di lecitina e, seguendo la stessa procedura, condurre la prova in parallelo
  - Usando il pHmetro si ripete la stessa procedura, prendendo i valori di pH a 1 min , per 10 minuti circa alle varie T.

**Soluzione di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,005 M – Calcolo pH**

Equilibrio predominante:  $\text{CO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{OH}^-$

$K_{a2}$  per  $\text{H}_2\text{CO}_3 = 4.4 \cdot 10^{-11}$  da cui  $K_{b1} = \frac{K_w}{K_{a2}} = 2.27 \cdot 10^{-4}$  per l'equilibrio di cui sopra.

Si ricava dall'espressione della  $K_{b1}$  un valore di  $[\text{OH}^-]$  dato da

$$[\text{OH}^-] = \sqrt{K_{b1} C_b} = \sqrt{2.27 \cdot 10^{-4} \times 0.005} = 1.065 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

$$[\text{H}^+] = 9.389 \cdot 10^{-12} \quad \text{da cui } \text{pH} = 11.02$$

**Soluzione di fenolftaleina – Calcolo del punto di viraggio e dell'intervallo di viraggio**

Per un qualsiasi indicatore

$$K_{\text{Hin}} = \frac{[\text{H}^+][\text{In}^-]}{[\text{HIn}]} \quad \text{p}K_{\text{Hin}} = \text{pH}$$

$K_{\text{Hin}}$  per la fenolftaleina è  $7,9 \cdot 10^{-11}$ , quindi il pH di viraggio è 9.10.

Per giustificare l'intervallo di viraggio che è di circa di due unità di pH dobbiamo considerare che l'occhio può percepire la prevalenza di un colore sull'altro se il rapporto di concentrazione delle due specie è all'incirca 10:1.

Se prevale la forma acida avremo

$$\frac{[\text{HIn}]}{[\text{In}^-]} \geq 10 \quad \text{o} \quad \frac{[\text{In}^-]}{[\text{HIn}]} = \frac{1}{10} \quad \text{e quindi } K_{\text{Hin}} = \frac{[\text{H}^+]}{10}$$

$\text{p}K_{\text{Hin}} = \text{pH} + 1 \quad \text{pH} = 8.10$  : a questo pH la fenolftaleina appare incolore.

Se prevale la forma basica avremo

$$\frac{[\text{In}^-]}{[\text{HIn}]} \geq 10 \quad \text{e quindi } K_{\text{Hin}} = 10 [\text{H}^+]$$

$\text{p}K_{\text{Hin}} = -1 + \text{pH} \quad \text{pH} = 10.10$  : a questo pH la fenolftaleina appare fucsia.

---

## COME ELABORARE I DATI

---

I dati raccolti vanno organizzati in tabelle da cui estrarre i valori per costruire dei grafici.

In particolare per lo studio della dipendenza dell'attività enzimatica dalla temperatura, la tabella presenterà la seguente struttura:

Temperatura	Prova1	Prova2	Prova3	Media

Se invece a variare sarà la concentrazione dell'enzima lipasi, allora la tabella sarà

Volume lipasi	Prova1	Prova2	Prova3	Media

Altre tabelle, simili nell'impostazione, saranno da realizzare per altri esperimenti....

Registrando i valori di pH, invece, si potranno, oltre che costruire tabelle, elaborare grafici ( ascisse T, ordinate pH).

---

## DOMANDE – SPUNTI PER L'APPROFONDIMENTO

---

1. Quando i grassi vengono demoliti, quali prodotti si formano?
2. Per quale motivo la fenolftaleina, nel corso della prova, cambia colore?
3. Quale è l'effetto della temperatura sul tempo impiegato dalla lipasi per demolire i grassi del latte?
4. Perché la temperatura ha questo effetto sul comportamento dell'enzima?
5. Per quale motivo i trigliceridi vengono sottoposti all'azione della lipasi all'interno del nostro sistema digerente?
6. Cerca informazioni riguardo
  - a. alla composizione dei sali biliari e al loro effetto sulla digestione dei lipidi
  - b. a cosa accade agli acidi grassi e al glicerolo una volta che sono stati assorbiti nel tratto intestinale



---

## COMMENTO E PROPOSTE

---

Nel corso delle prove che abbiamo fatto per testare la procedura ci siamo imbattuti in alcuni passaggi non facili da risolvere in modo soddisfacente dal punto di vista tecnico.

Il mantenere ad una temperatura costante le provette non è stato agevole: il nostro vecchio bagno maria è proprio vecchio e bisogna sempre controllare la reale temperatura all'interno delle provette perchè il termostato non è particolarmente sensibile.

Un altro problema è stato quello di definire, basandosi sulla decolorazione, il momento del superamento di quel valore di pH che permette alla fenolftaleina di passare nella forma incolore. Abbiamo deciso di considerare finita la prova quando la provetta ritornava ad avere il classico colore bianco latte, ma spesso abbiamo avuto una incertezza nello spegnere il cronometro ( " ma è proprio bianco o c'è ancora una sfumatura di rosa? " )

Nonostante tutto, i valori ottenuti sono stati in linea, grosso modo, con le nostre aspettative: la massima efficienza dell'enzima è stata rilevata ad un T molto simile alla temperatura corporea. Avremmo potuto però compiere una elaborazione più soddisfacente dei dati se avessimo avuto a disposizione i valori di pH nel corso dell'esperimento, per poter calcolare la variazione di pH in funzione del tempo. Definendo infatti un intervallo di tempo opportuno, tra gli 8 e i 10 minuti, avremmo calcolato un rapporto  $\Delta\text{pH} / t (s)$  più indicativo di quello ora calcolato per quantificare la velocità di reazione.

---

**BIBLIOGRAFIA / LINK DI RIFERIMENTO**

---

G.Saini, A.Liberti, *Chimica Analitica*, UTET

David L.Nelson, Michael M.Cox, *Introduzione alla biochimica del Lehninger*, Zanichelli

Per la procedura

[www.Nuffieldfoundation.org](http://www.Nuffieldfoundation.org)

[http://www.ucl.ac.uk/~zcapf71/lipase\\_littlelaptop%5B1%5D.pdf](http://www.ucl.ac.uk/~zcapf71/lipase_littlelaptop%5B1%5D.pdf)

<http://www.nuffieldfoundation.org/practical-biology/investigating-effect-temperature-activity-lipase>