



Dean Madden *

National Centre for Biotechnology Education, University of Reading
Science and Technology Centre, Earley Gate, Reading RG6 6BZ UK | E: D.R.Madden@reading.ac.uk

Bedre mælk til katte

Immobiliseret laktase kan bruges til at lave mælk med reduceret laktoseindhold

Formål

I dette forsøg immobiliseres enzymet laktase i calciumalginatkugler. Kuglerne pakkes i en lille søjle og mælken hældes igennem, mens enzymet omdanner mælkesukkeret til bl.a. glukose (druesukker). Mælken testes før og efter enzymbehandlingen for glukose.

Introduktion

Laktase (β -galaktosidase) er et enzym der katalyserer spaltning af laktose til glukose og galaktose (hydrolyse). Begge disse sukkerarter smager sødere end laktose og fordøjes lettere. På trods af kattes kendte forkærlighed for mælk, så kan de ikke fordøje store mængder af laktose. Mælken kan behandles med enzymet, hvorved der laves laktosereduceret mælk, som er velegnet til katte – eller til mennesker der ikke kan tåle laktose (laktose-intolerante).

Selvom fremstilling af en speciel 'kattemælk' kan synes som en lille ting, så er anslået 75 % af verdens befolkning laktoseintolerante som voksne – at kunne tåle laktose som voksen er noget specielt.

Til kommercielt brug sprøjtes enzymet ned i kartonen under fremstillingen af UHT-mælk, eller ved at bruge et immobiliseret enzym, dvs et enzym der er bundet til et inaktivt materiale, så det kan bruges flere gange. Laktoseintolerante mennesker kan også købe laktase-enzymet på apoteket og selv tilsætte det til mælkeprodukter.



Laktosereduceret mælk til katte



Denne italienske mælk med lavt laktoseindhold produceres ved at behandle letmælk med immobiliseret β -galaktosidase



Hvis denne mælk til katten ikke er laktosereduceret så giver den diarré.

* Oversættelse og bearbejdning af Lars Maarup og pædagogiske tips af Claudia Girth-Diamba

Sikkerhedsanvisninger



Drik ikke mælken.

Det enzym der bruges til dette forsøg, er sikkert at bruge, forudsat det behandles korrekt. Selvom Novozymes Lactozym® er godkendt til fødevarer, bør man ikke drikke den mælk der er brugt til forsøget. Det skyldes at der ikke har været arbejdet sterilt, så enzymet og den producerede mælk kan være forurenset. Man skal i øvrigt altid følge skolens praksis og lovgivningen på området.

Generelle sikkerhedsanvisninger ved arbejde med enzymer
Da enzymer er vandopløselige, fjernes spildte enzymer med vand.



Undgå dannelse af aerosol

Hvis der dannes aerosoler (væskesprøjt i luften) der indeholder enzymer, er der risiko for at man kan indånde enzymet. Ved at indånde sådanne aerosoler kan særligt følsomme personer udvikle astma eller andre symptomer der ligner høfeber. Af denne grund bør man aldrig spraye enzymopløsninger.

Lad ikke enzymer i opløsning tørre ud

Hvis opløsninger får lov til at tørre ud, er der risiko for støvdannelse. Ved at indånde sådant støv kan særligt følsomme personer udvikle astma eller andre symptomer der ligner høfeber. Spildt væske – på udstyret, bordet eller gulvet – fjernes straks med vand.



Undgå direkte hud- og øjenkontakt

Hvis du ved et uheld får enzymopløsningen på huden eller i øjnene, så skyl med masser af vand. Hvis du får noget på tøjet, så skyl med vand og vask tøjet som normalt. Den behandling vil som regel være tilstrækkelig, men hvis der viser sig symptomer i luftvejene, så søg straks læge.

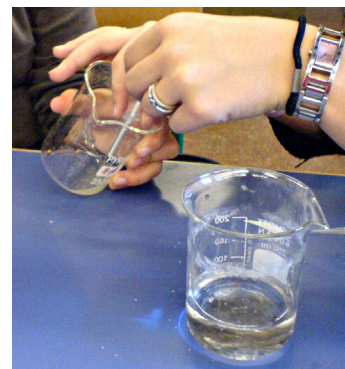
Materialer per gruppe

- Et lille stykke (ca 1 cm x 1 cm) nylongaze
- En 1 mL injektionssprøjte (uden nål)
- En 10 mL injektionssprøjte (uden nål)
- Et stykke plasticslange, ca 7 cm langt, ca 4 mm tykt (passende til injektionssprøjten)
- En slangeklemme ('Hoffman clip')
- To små glas- eller plastbægre
- En tesi
- En rørepind af glas

Se i øvrigt figur 2 + 3 med mikropipettespids og plasticslange (2 cm langt og 4 mm tykt)

Kemikalier og opløsninger per gruppe

- Laktaseenzym, Novozymes Lactozym®, 2 mL
- 2% natriumalginat-opløsning, 8 mL
- 1,5 % calciumklorid-opløsning, 100 mL
- Mælk, 50 mL, bedst ved stuetemperatur (ikke UHT-mælk)
- Semikvantitative glukose test-strips (spørg på apoteket)



Fotografi af Claudia Girth-Diamba

Figur 1

En elev opsuger ca. 1 mL natriumalginat tilsat enzymet. I forgrunden ses opløsningen med calciumchlorid



Fotografi af Claudia Girth-Diamba

Figur 2

Laktase-alginatblandingen kan formes til bittesmå kugler ved at bruge en mikropipettespids. Et 2 cm langt stykke plasticslange bruges som forbindelse mellem injektionssprøjten og pipettespids.

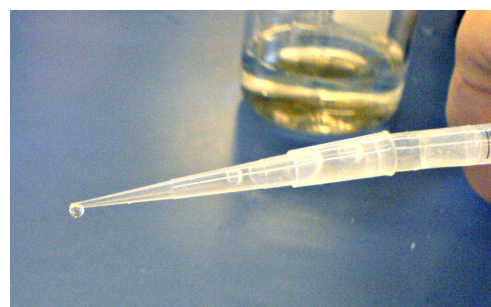


Foto af Claudia Girth-Diamba

Figur 3

Her ses anordningen med mikropipettespidsen.

Bemærk

Alle opløsninger SKAL laves med destilleret eller deioniseret vand. Opløsning af natriumalginat kræver både varmt vand og lang tids omrøring.

Fremgangsmåde

- 1 Bland enzymet med natriumalginat-opløsningen. Træk blandingen op i injektionssprøjten.
- 2 Dryp alginat-enzym-blanding – en dråbe ad gangen – ned i calciumklorid-opløsningen. Sprøjten må ikke komme i kontakt med calciumklorid-opløsningen, da det vil få alginaten til at størkne i sprøjten og stoppe udgangen. Lad perlerne, som indeholder enzymet der er immobiliseret i en matrix af calciumalginat, hærde i et par minutter.
- 3 Sæt et stykke plasticslange på injektionssprøjten. Anbring det lille stykke nylongaze i bunden af sprøjten, så perlerne ikke kommer til at blokere udgangen.

Fig. 1

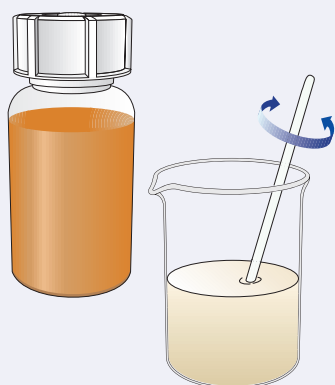


Fig. 2

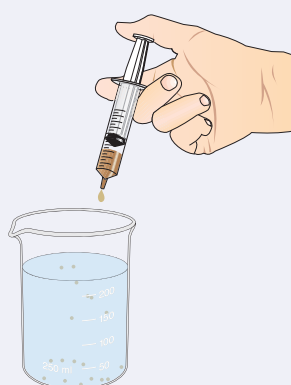
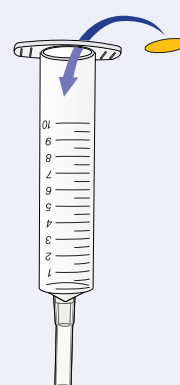


Fig. 3



- 4 Hæld væsken fra enzymperlerne ved hjælp af tesien.
- 5 Hæld forsigtigt perlerne i injektionssprøjten.
- 6 Klem plasticslangen sammen med slangeklemmen.

Fig. 4

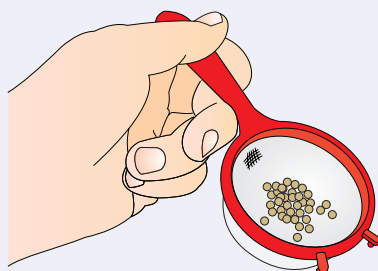


Fig. 5

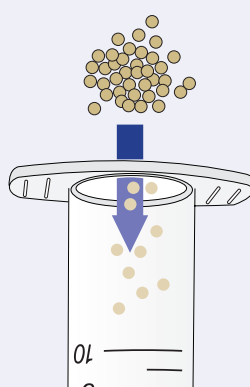
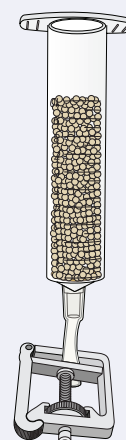


Fig. 6



- 7 Før mælken hældes i sprøjten, sikres det – ved at teste med glukosestrips – at den ikke indeholder glukose.
- 8 Hæld en smule mælk over enzymperlerne, luk derefter op for klemmen og lad mælken løbe ned i et lille bæger.
- 9 Mælken i bægeret testes for glukose med glukosestrips. Hvis koncentrationen ikke er stor nok, kan mælken hældes gennem søjlen igen.

Fig. 7

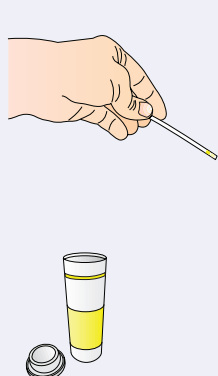


Fig. 8

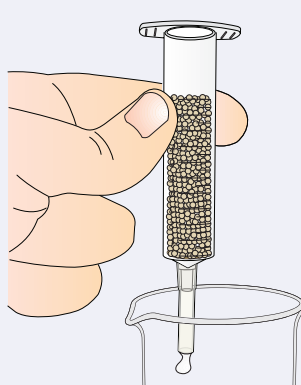
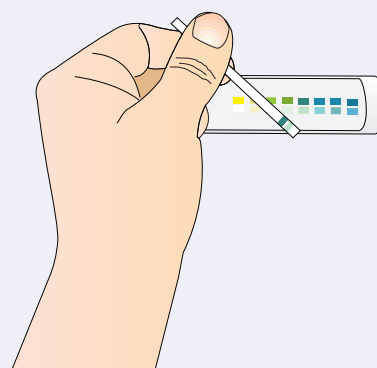


Fig. 9



Fotografi af Claudia Girth-Diamba

Figur 6

Teststrips til diabetikere til påvisning af "sukker" i urin kan bruges til at påvise om enzymet har omdannet mælkesukker (laktose) til druesukker (glukose). Mælkesukker (laktose) tester negativ - her pink til venstre. Druesukker (glukose) tester positiv - her mørkeblå til højre.



Fotografi af Claudia Girth-Diamba

Figur 4

Laktase-alginat perler i tes - færdig til brug.

Resultater og konklusion

- Overvej i hvor høj grad resultaterne giver kvalitative og/eller kvantitative informationer om enzymvirkningen.
- Overvej hvilken rolle laktoseintolerance spiller for menneskers ernæring og sundhedstilstand.
- Hvorfor kan laktoselignende stoffer bruges som afføringsmidler?
- Du kan finde en stor mængde oplysninger ved at "google" begreber som laktose, laktase osv.



Fotografi af Claudia Girth-Diamba

Figur 5

Laktase-alginat perler i en 10 mL sprøjte bliver til en "bio-reaktor".

Forberedelse og tidsforbrug

Denne øvelse tager ca. 40 minutter. Det tager lidt tid at opløse natriumalginaten, så det er bedst at lave opløsningen i god tid før timen begynder. Den kan holde sig i køleskab i mindst 1 måned. Det immobiliserede enzym kan forberedes på forhånd, hvis det ønskes: Perlerne skal i så fald opbevares i køleskab, og holder ikke mere end et par dage.

Ideer til yderligere undersøgelser

Det er måske en god idé at lave et indledende eksperiment. Man laver en opløsning af laktose og glukose (f.eks. 0,1 gram per 100 mL vand) og tester teststrimlerne.

Søjlen med immobiliseret enzym kan også bruges til at behandle valle, til at lave en sød vallesirup, som ofte bruges til slik. Man kan købe valle i helsekostforretninger. Men et spændende projekt kunne også være at lave ost og udvinde vallen, som så kan bearbejdes yderligere. Dette viser, at også affaldsprodukter fra én produktion (ost) kan blive til værdifulde produkter, som bruges i en anden produktion (slik). Det er et godt eksempel på bioteknologi.

Laktase hæmmes kraftigt af galaktose (som er et af produkterne der dannes ved enzymspaltning af laktose). Derfor er strømningshastigheden af substratet gennem søjlen kritisk i forhold til hastigheden af den enzymkatalyserede reaktion: hvis det går for hurtigt, er der ikke tid til at reaktionen sker; hvis det går for langsomt, vil der ophobes galaktose som hæmmer reaktionen. Eleverne kan derfor undersøge sammenhængen mellem gennemstrømningshastighed og dannelse af glukose og galaktose.

Efter forsøget kan teststrimlerne også bruges til at finde glukose i forskellige mejeriprodukter, herunder kattemælk og laktosefri mælk.

Man kan endvidere samarbejde med kemi om at bestemme laktoseindholdet - det er dog en lidt mere krævende procedure.

Praktiske tips og mulige fejlkilder

Sommetider vil en test af UHT-mælk vise indhold af glukose, sandsynligvis fordi varmebehandlingen hydrolyserer noget af laktosen. Man bør derfor undgå at bruge UHT-mælk. Hverken soyamælk ("Oatly") eller kakaomælk indeholder ikke mælk.

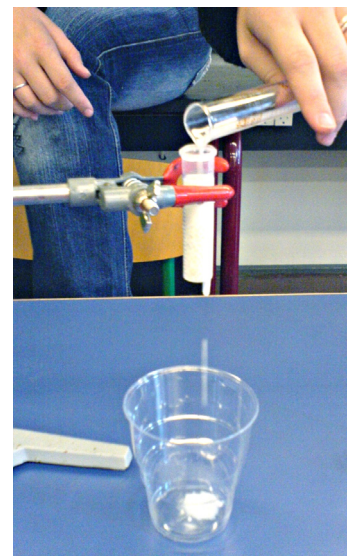
Glukosestrips viser kun koncentrationer, som er mulige i urin. Derfor er kvantificering ud over maximalværdien ikke muligt.

Indkøb og leverandører

Materialer kan købes hos forhandlere af materialer til skolerne. Enzymer fra Novozymes forhandles af Roskilde Slagteriskole. Man kan også købe enzymet på apoteket - det er bare meget dyrere, da det er et lægemiddel.

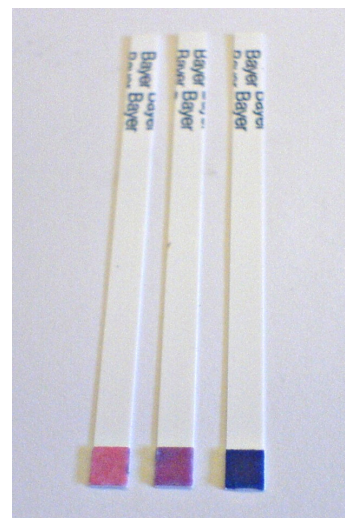
Opbevaring af materialer

Det ufertyndede enzym opbevares ved 3-4 °C og kan holde i årevis.



Fotografi af Claudia Girth-Diamba

Figur 7
Hvis mælken løber for hurtigt igennem søjlen som vist på billedet bliver kun en del af laktosen spaltet. Det kan faktisk også måles med glukosetesten - se næste foto.



Fotografi af Claudia Girth-Diamba

Figur 8
Glukose - teststrips kan faktisk bruges til semikvantitativ bestemmelse af glukoseindholdet. I denne test skifter farven fra pink (uden glukose) gennem forskellige lila varianter til mørkeblåt (maximalt glukoseindhold).

Andre kilder til information

Publikationer

Immobilised enzymes and cells: a practical approach by Jonathan Woodward [Ed] (1985) Oxford University Press, Oxford. ISBN 0 947946 217. An academic laboratory manual describing methods of immobilising enzymes and cells.

Richmond, M.L., J.I. Gray and C.M. Stine (1981) Beta-galaktosidase: Review of recent research related to technological application, nutritional concerns and immobilisation. *Journal of Dairy Science* 64 (9) 1759-1771.

Bayless, T.M., D.M. Paige and G.D. Ferry (1971) Lactose intolerance and milk drinking habits *Gastroenterology* 60 (4) 605-608.

KVL - temahæfte, 2004, Den første føde - tidlig ernæring hos dyr og mennesker (OBS: KVL er nu KU, Det Biovidenskabelige Fakultet)

Websites / netsider

Novozymes A/S Denmark
<http://www.novozymes.com>

Wikipedia: Lactose intolerance
http://en.wikipedia.org/wiki/Lactose_intolerance

Tak til



Denne praktiske øvelse er bearbejdet til Volvox-projektet, som støttes økonomisk af EU under 'The Sixth Framework Programme'.
 Tak til Lars Maarup for kvalificeret oversættelse og kommentarer, samt til Claudia Girnth-Diamba for billederne og pædagogiske tips.

Frequency and Distribution of Lactose Intolerance

Bilag	Human Group	Individuals Examined	Percent Intolerant	Allele Frequency
	Swedish		2%	0.14
	Europeans in Australia	160	4%	0.20
	Swiss		10%	0.316
	American Caucasians	245	12%	0.346
	Finns	134	18%	0.424
	African Tussi		20%	0.447
	African Fulani		23%	0.48
	American Blacks	20	75%	0.87
	Australian Aborigines	44	85%	0.922
	African Bantu	59	89%	0.943
	Chinese	71	93%	0.964
	Thais	134	98%	0.99
	American Indians	24	100%	1.00

Data obtained (in part) from "Lactose and Lactase", Scientific American, October, 1972, by Norman Kretchmer

The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK) of the NIH [estimates](#) that between 30 and 50 million Americans are lactose intolerant. This includes an estimate of lactose intolerance affecting 75% of African-Americans and 90% of Asian and Native Americans. By the way, the [US Census](#) estimates the US population at 261,638,000 as of January 1, 1996 and is made up of 72% white; 13% African-American; 11% Hispanic; 4% Asian and Pacific Island; and 1% Native American, Eskimo, and Aleutian.

Pædagogiske tips

- særligt til den danske gymnasieskole

Generelt

Eleverne lærer at immobilisere enzymer i calciumalginat og bruge dette til at fremstille mælk med reduceret mælkesukkerindhold. Eleverne får et indblik i bioteknologi / enzymteknologi, samt lærer om fordøjelse og problematikken omkring laktoseintolerance.

Basal viden om enzymer samt molekyllære strukturer af sukkermolekyler vil være en fordel, men er ikke absolut nødvendig.

I dette enkle forsøg præsenteres eleverne for principper vedrørende fordøjelse og immobilisering af enzymer. Det kan bruges som udgangspunkt for adskillige mere avancerede aktiviteter, såsom regulering af laktaseproduktionen hos *Escherichia coli* (lac-operon), udviklingen og den sociale betydning af laktosetolerance hos mennesker, og brugen af enzymer i fødevareproduktion. Særligt spændende er her i Skandinavien diskussionen om laktoseintolerance, som ofte opfattes som sygdom, da kun få procent af befolkningen har problemer med mælk. Det giver anledning til diskussion om hvordan andre etniske grupper end skandinaver har det med vores mælketraditioner (brug bilaget på side 6).

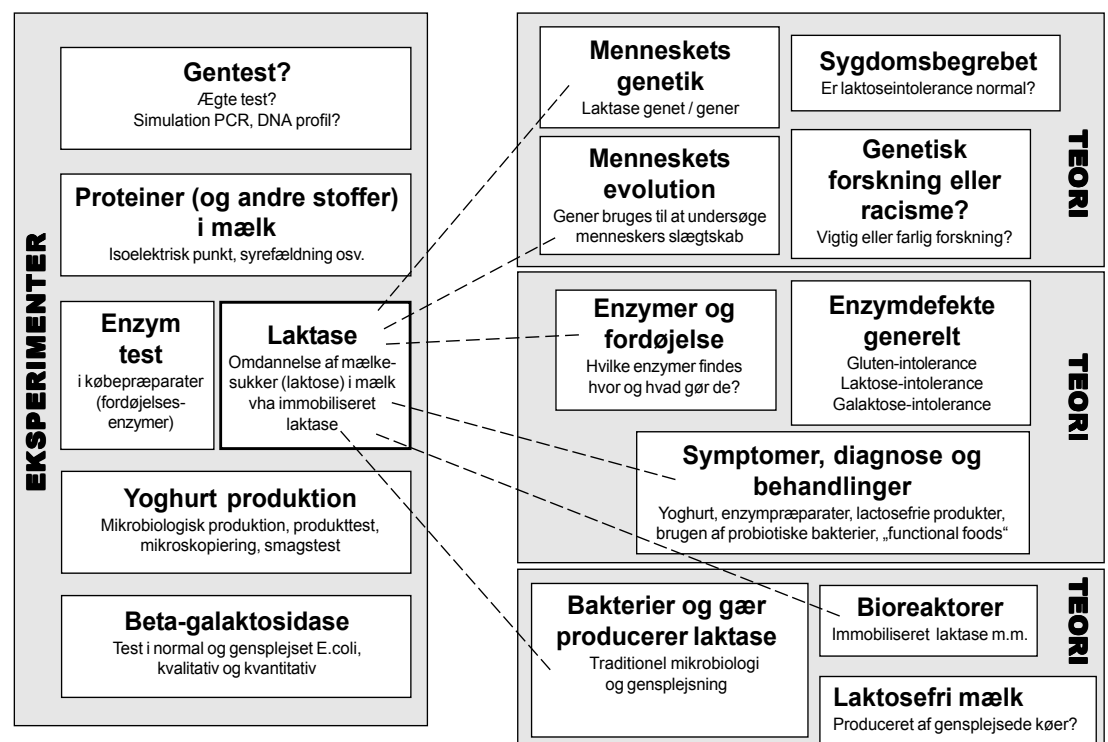


Fotografi af Claudia Girth-Diamba

Figur 9
Her ses en gruppe hf-elever, der blev meget fascineret af de små enzymkugler.

Projektarbejde

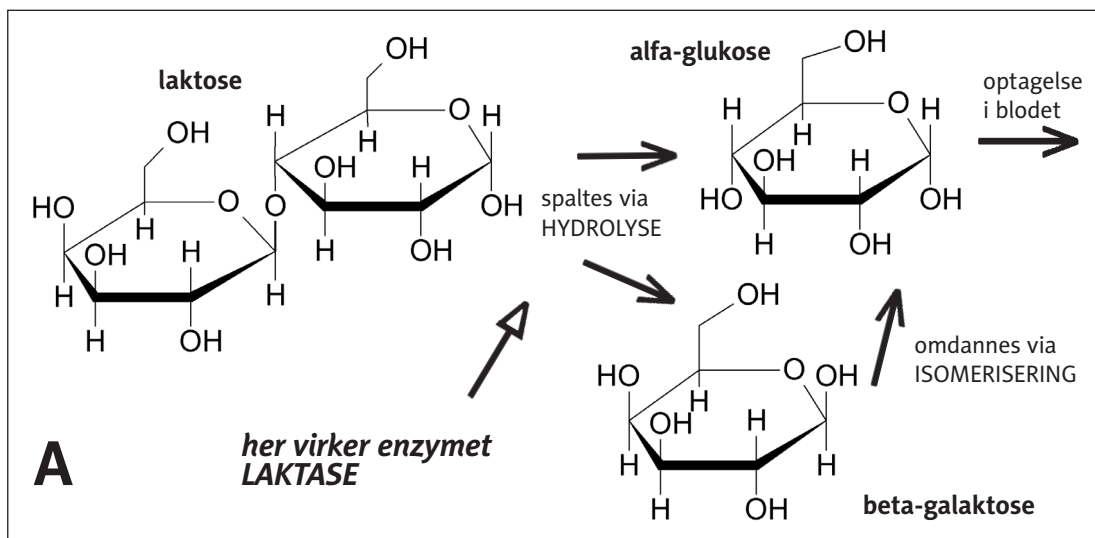
Figuren nedenunder viser hvordan man ved at tage udgangspunkt i kattenmælksforsøget kan opbygge projektarbejde om mange forskellige emner. Det kan også bruges til SSO, SRP og AT-forløb.



Arbejde med papirmodeller

Det kan være svært at forstå molekyletegnninger såsom nedenstående figur A, der viser hvordan laktose spaltes af enzymet til glukose og galaktose. Denne opgave kan hjælpe med forståelsen.

Opgaven går ud på at bygge papirmodeller af beta-galaktose og alfa-glukose og dermed lære lidt om stereokemi.



A. Figur A viser orienteringen af H- og OH-grupper ved C-atomerne i ringen. Analyser forskelle mellem beta-galaktose og alfa-glukose.

B. Figuren bruges som skabelon til at klippe papirmodellen.

C. Modellen lægges på bordet og CH₂OH gruppen bøjes opad. 4 tændstikker repræsenterer H- hhv. OH-grupper ved C-atomerne, dvs. tændstikhovedet er OH-gruppen. De lægges på C'erne så de passer til molekyletegningerne i figur A.

D. Der laves huller ved C'erne i papiret og tændstikkerne stikkes igennem så de giver en rumlig opfattelse af molekylerne. (Bemærk at eleverne har tegnet det manglende H ved C₅).

