



## Øvelse: Lactose i mælk

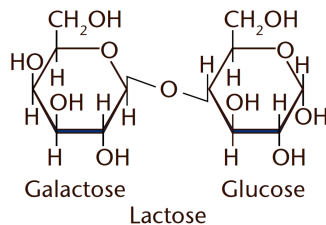
Baseret på siderne 71-88

### Formål

At undersøge nedbrydning af lactose i mælk ved hjælp af enzymet  $\beta$ -galactosidase (Lactozyme).

### Teori

Lactose er et disaccharid som er opbygget af glucose og galactose, der er bundet sammen. Glucose er bundet med sin OH-gruppe nr. 4 til OH-gruppe nr. 1 på galactose hvilket danner en såkaldt  $\beta$ -1,4-binding, se figur 1.



Figur 1. Lactose

Lactose nedbrydes af enzymet  $\beta$ -galactosidase til glucose og galactose. Reaktionen er specifik for  $\beta$ -galactosidase. Enzymet der er en hydrolase, kaldes også lactase, og handelsnavnet på det enzym der anvendes, er 'Lactozyme'.

Hvis en person ikke udtrykker genet for  $\beta$ -galactosidase og dermed ikke danner enzymet, er man lactoseintolerant og tåler ikke mælkeprodukter. Livslang  $\beta$ -galactosidase-ekspression er knyttet til de områder der fra oldtiden har holdt mælkeproducerende husdyr. Uden for Europa, Vestasien, Indien og dele af Østafrika producerer man ikke  $\beta$ -galactosidase som voksen.

Man kan følge  $\beta$ -galactosidasens evne til at nedbryde lactose ved at måle på dannelsen af glucose (produkt). I dette forsøg vil vi måle mængden af glucose i mælk før og efter tilsætning af enzym.

Mængden af glucose kan måles semi-kvantitativt med reagensstrimler til urinanalyser for diabetikere. De fås blandt andet på apoteket under navnet 'Diastix' fra firmaet BAYER eller 'Medi-test glucose' fra Macherey-Nagel. De kan måle glucose i væsker og er specifikke for dette carbohydrat. Det vil sige at man kan måle mængden af glucose i en væske med andre carbohydrater til stede. Måleområdet er fra 5,5 mmol/L – 111 mmol/L.

Diastix har et felt der indeholder glucoseoxidase og peroxidase, samt et peroxidasesubstrat der omdannes til et brunt stof ved peroxidaseraktionen, se figur 2.



Figur 2. Skalaen på Diastixpakken, Lactozym og mælk. Figur 101, side 88 Bioteknologi A bind 1.

Glucoseoxidase oxiderer specifikt glucose til glucuronsyre og producerer hydrogenperoxid som starter peroxidase reaktionen. Derfor er målingen med Diastix specifik for glucose. Andre carbohydrater (lactose, galactose m.fl.) giver ikke farvning af Diastix'en.

Det kommercielle enzym 'Lactozym' er en  $\beta$ -galactosidase fra en gær celle. Det er et stort molekyle med en molarmasse på 464.000 g/mol, da det består af fire ens peptidkæder på hver 1024 aminosyrer. Det anvendes som markørenzym i bioteknologi, da der findes en række kunstige substrater der omdannes til farvede forbindelser.



Figur 3.  $\beta$ -galactosidase.

### Materialer

- Lactozym fra Novozymes.
- Diastix fra BAYER
- Mælk
- 50 mL bægerglas
- 25 mL cylinderglas
- Engangspipetter



## Fremgangsmåde

1. Hæld 15 mL mælk i cylinderglas.
2. Overfør de 15 mL til et bægerglas.
3. Fugt en Diastix i mælken i ca. 2 sekunder.
4. Aflæs mængden af dannet glucose efter præcis 30 sekunder ved at sammenligne farven på Diastix'en med skalaen på beholderen. Notér værdien.
5. Tilsæt 3 dråber enzym til mælken med engangspipette og bland med det samme.
6. Glucosekoncentrationen i mælken aflæses nu som i punkt 2-3 efter 1,2,5,10 og 20 minutter.
7. Hvis koncentrationen stiger til MERE end 111 mmol/L, udtages 1 mL af mælken og blandes med 2 mL demineraliseret vand. Det blandes omhyggeligt, før glucoseindholdet måles. Gør evt. denne fortynding klar hvis du kan se at dine målinger nærmer sig denne værdi.
8. Gentag forsøget hvor der varieres på enten temperaturen eller pH-værdien.

## Resultater

Tid efter enzymtilsætning (minutter)	Glucosekoncentration (mmol/L)
0 (Før enzymtilsætning)	
1	
2	
5	
10	
20	

## Databehandling

Afbild glucosekoncentrationen som funktion af tiden. Beregn lactoseindholdet i mælken. Angiv resultatet i g/L.

## Diskussion

1. Sammenlign indholdet med tabelværdien fra DTU fødevarerinstitutionen: <http://frida.fooddata.dk/ShowFood.php?foodid=1066&342>
2. Kommentér resultaterne. Diskutér den anvendte metode og inddrag fejkilder. Hvad vil det sige at metoden er semi-kvantitativ, og hvad betyder det for dens nøjagtighed?

## Konklusion

Blev formålet opfyldt?