



Immobilisera laktas

Bakgrund: Laktas eller beta-galaktosidas som är ett annat namn på enzymet, bryter ner laktos, till D-glukos och D-galaktos. Laktos kallas även mjölksocker. Alla nyfödda barn har ett aktivt laktasenzym. Med åldern kan vissa människor få minskad mängd av laktas och man inte kan bryta med laktosen. De får äta mat med låg eller inget innehåll av laktos tex. laktosfri mjölk, yoghurt eller ost som har lagrats i minst 3 månader (där har laktosen redan brutits ner). Men laktosintoleranta kan även ta en tablett som innehåller laktas. Detta för att slippa få magknip och diarré.

Uppgift: Du ska immobilisera (baka in) laktas i alginat, låta enzymet bryta ner laktos i mjölk. Du ska sen analysera om disackariden har brutits ner till två monosackarider.

Material: Laktasenzym, 2% natriumalginatlösning, 1,5% kalciumkloridlösning, mjölk, testremsor för glukos eller Barfoed's reagens (kopparacetat och ättiksyra), 20-30cm³ spruta, utrustning för kolonnkörning, sil/kaffefilter, bägare, provrör, vattenbad, bordcentrifug.

Risker vid experimentet: Kopparacetat är irriterande. Använd skyddsglasögon och personlig skyddsutrustning. *En riskbedömning ges av undervisande lärare.*

Utförande: Din lärare har redan löst upp 2% alginatlösning och laktasenzymlösning.

1. **Preparation av immobiliserad enzym.** Använd en 20-30 cm³ spruta och sug upp 8cm³ 2% alginatlösning och 2 cm³ enzymlösning. Sug in luft och blanda lösningarna noggrant i sprutan.
2. Låt alginat-enzymlösningen droppa långsamt och **droppvis** från sprutan ner till en bägare med ca 100cm³ 1,5% kalciumkloridlösning. När alginatlösningen kommer ner i lösningen polymeriseras den genast till små kulor. Doppa **inte** ner sprutan i kalciumkloridlösningen då alginat-enzymlösningen stelnar och täpper igen spetsen!
3. **Kolonnen:** Sprutan ska nu användas till kolonn. Tag bort pistongen. Stoppa lite glasull som blockering i sprutans botten. Sätt på en slang på sprutan och en slangklämma för reglering av dropphastighet. Montera kolonnsprutan i ett stativ.
4. Filtrera alginat-enzym-kalciumkloridkulorna genom en tesil eller ett kaffefilter.
5. För ner det immobiliserade enzymet i kolonnen.
6. Hämta 15 cm³ mjölk. Sätt på 10 cm³ av mjölken på kolonnen. Spara resten för senare testning. Reglera dropphastigheten. Låt mjölken passera långsamt genom kolonnen.
7. **Test av mjölken:** Testa den obehandlade, behandlade mjölken och referenser (glukos, galaktos och laktos) med Clinistix (remsa för glukos) eller med Barfoed's reagens. Se nedan! Om mjölksockret inte har brutits ner (positivt resultat), låt mjölken passera ytterligare en gång genom kolonnen.

8. **Barfoed's reagens.** Blanda 1 cm³ reagens (kopparacetat och ättiksyra) med 5 droppar mjölkprov i ett centrifugrör. Mjölksproteinerna kommer att koagulera. Centrifugera ner utfällda proteiner i en bordcentrifug. Dekantera eller sug upp överlösningen till ett provrör och ställ det i kokande vattenbad i ca 5 minuter. Röd fällning indikerar på monosackarid (reagerar för både glukos och galaktos). Disackarider ger inte någon reaktion men efter 10-15 minuter kan en svag fällning synas pga av sur hydrolys av disackariden.

Tips: För snabb dropphastighet gör att mjölksöcket inte hinner att hydrolyseras av enzymet. Om dropphastigheten däremot är **för låg**, fastnar galaktosen på enzymet. Galaktos är en stark inhibitor till laktas. Lagom hastighet är bäst! Prova dig fram.

Riskbedömningsunderlag:

Laktas: ej märkespliktigt

Natriumalginat: livsmedelstillsats E 401 ej märkespliktigt. Immobiliseringsmedel vid cellodling, förtjockningsmedel i livsmedel och bindemedel i kosmetika.

Kalciumklorid: Saknar märkning Livsmedelstillsats E 509

Kopparacetat Utropstecken, Miljöfarligt, Varning, H302, H315, H319, H335, H400 och P261, P273, P305+P351+ P338

Ättiksyra 10-25%: Frätande, Brännbart, Fara, H226, H315, H319 och P210, P233, P240, P241, P242, P243, P260, P264, P280, P301+P330+P331, (ej kräkning), P405

Mjölken ska inte drickas

"Risker vid experimentet" gäller endast de kemikalier som nämnts, under förutsättning att beskrivna koncentrationer, mängder och metod används.

Som lärare förväntas du göra en fullständig riskbedömning för dig själv och din elevgrupp.

Material:

Alginatlösningen bör göras i förväg då det tar tid att lösa upp den. Lös upp natriumalginatet genom att långsamt tillsätta vatten. Låt stå under omrörning.

Laktas köps på apoteket tex. Laktasin, Laktrase, Laktos APL, Prolaktas. Om eleverna ska analysera med Barfoed's reagens bör varje grupp ha en hel eller möjligen en halv laktoskapsel. Detta för att få tillräcklig mängd enzym. Om de däremot ska analysera med Clinistix kan en kapsel delas på 4 grupper. Se metodernas analyskänslighet nedan.

Analysmetoder:

Clinistix Glukosremсор kan köpas receptfritt på apoteket. (Ca 1 kr/st).

Känslighet: Clinistix reagerar för halter mindre än 1 g glukos dvs. <1%.

Barfoed's reagens: 70 g kopparacetat monohydrat löses i 9 cm³ konc ättiksyra och späds till 1000cm³ med vatten. Lösligheten för kopparacetat är 72g/dm³. Lösningen är nära mättad och faller lätt ut. Värm lösningen något.

Kopparacetat kan syntetiseras genom att ekvivalenta mängder kopparoxid och konc ättiksyra återloppskokas. Varmfiltrera av oreagerad kopparoxid och låt kristallisera.



Testen: Proteinerna i mjölken stör avläsningen. Gör därför en utfällning och centrifugering innan testet. Blanda 1 cm³ reagens med 5 droppar prov och sätt i vattenbad i ca 5 minuter. Positivt test för monosackarider är en röd fällning medan disackarider inte reagerar ens efter tio minuter.

Känslighet : Tydlig kraftig fällning ner till 2,5 %, synligt ner till 1,5%. Analysmetoden kräver högre hydrolysgrad av mjölk än med Clinistix.

Mjölk innehåller 5 g kolhydrater (laktos) på 100g vara dvs 5%

Spjälkad mjölk kan alltså maximalt innehålla 2,5% (=2,5 g) glukos och 2,5 g galaktos.

Problemlösning: Använd inte mjölk med lång hållbarhet då den kan innehålla monosackarider pga. hydrolys vid upphettning. Galaktos är en stark inhibitor till enzymet laktas. Prova fram lämplig genomrinningshastigheten eller kör igenom mjölken flera gånger.

Om laktos:

Ca 3-9 % av vuxna svenskarna är laktosintoleranta medan 96% thailändare är det. För laktosintoleranta passerar laktosen onedbrutet ner till tarmarna. Tarmbakterierna bildar gaser och orsakar magspänningar och diarréer: De får även dåligt näringsupptag genom att tarmluddet påverkas.

Arla säljer mjölk med låg laktoshalt. Valio tillverkar helt laktosfri mjölk och för smakens skull även sänks glukoshalten. För smakens skull har halten monosackarider sänkts då glukos smakar sötare än laktosen. Katter eller igelkottar tål inte mjölk då de inte har laktas.

Övrigt:

Idén kommer från Science in School, Issue 10 sid. 51 år 2008