

Laktoseanalyse: Entwicklung enzymatischer Methoden und Optimierung der analytischen Leistungsfähigkeit in komplexen und laktosefreien Matrices

Dr. Simone Pucci - Leiter des CDR Chemielabors „Francesco Bonicolini“

P2621

Abstrakt

Ziel dieses Dokuments ist es zu zeigen, wie CDR FoodLab® eine praxisorientierte Weiterentwicklung traditioneller enzymatischer UV-Methoden zur Laktoseanalyse darstellt und dabei einige operative Grenzen überwindet, die mit der Probenvorbereitung, dem Reagenzienmanagement, den Reaktionszeiten und der Anfälligkeit gegenüber Interferenzen verbunden sind. Die Methode wird nicht als vollständiger Ersatz für HPLC in offiziellen Validierungskontexten dargestellt, sondern als schnelles Analysesystem mit einer Zuverlässigkeit, die mit dem chromatographischen Referenzverfahren vergleichbar ist, insbesondere für die operative Kontrolle von laktosefreien Prozessen.

1. Einführung: Analytischer Kontext und strategische Bedeutung der Laktosekontrolle

Die Bestimmung von Laktose in laktosefreien Produkten gehört heute zu den anspruchsvollsten analytischen Herausforderungen der Molkereindustrie. In einem Markt, in dem die Reinheit des Produkts eine unverzichtbare Voraussetzung darstellt, muss das Qualitätsmanagement eine zentrale technische Fragestellung adressieren: die Vermeidung falsch negativer Ergebnisse bei der Bestimmung von Restlaktose. Laktoseintoleranz, die auf einen Mangel des Enzyms Laktase zurückzuführen ist, erfordert, dass Hersteller äußerst niedrige Laktosekonzentrationen gewährleisten. Dadurch wird analytische Unsicherheit zu einem wirtschaftlichen und rechtlichen Risikofaktor. Bei der **Kontrolle von Restlaktose** bestimmt die gewählte analytische Methode nicht nur das Laborergebnis, sondern auch die Fähigkeit des Herstellers, den Prozess anhand zuverlässiger und operativ nutzbarer Daten zu überwachen. Schnelle und sichere Ergebnisse sind entscheidend, um Delaktosierungsprozesse zu validieren, den Einsatz industrieller Enzyme zu optimieren und die Blockierung versandfertiger Chargen zu vermeiden. Das Verständnis des chemischen Messprinzips wird daher zu einer grundlegenden Voraussetzung, um die analytischen Daten korrekt zu interpretieren und die Lebensmittelsicherheit zu gewährleisten.

2. Vergleich chemischer Prinzipien: Reaktivität und Spezifität

Die enzymatische Bestimmung von Laktose kann mit unterschiedlichen Ansätzen durchgeführt werden, die sich hinsichtlich Reaktionsprinzip, Detektionssystem und Umgang mit möglichen Matrixinterferenzen unterscheiden.

- **Traditionelle UV-Methode:** Diese Methode basiert auf einer zweistufigen Reaktion. Laktose wird durch β -Galaktosidase in D-Glucose und D-Galaktose hydrolysiert. Anschließend wird D-Galaktose durch β -Galactose-Dehydrogenase (β -Gal-DH) in Gegenwart von NAD^+ zu D-Galakturonsäure oxidiert. Das analytische Signal entsteht durch die Bildung von NADH, das bei 340 nm gemessen wird. Dieser Ansatz erfordert häufig eine Differenzberechnung, um den tatsächlichen Laktosegehalt zu bestimmen.
- **CDR FoodLab® System:** Obwohl auch hier der initiale Hydrolyseschritt beibehalten wird, entsteht das analytische Signal aus der verbleibenden Glucose. Über eine peroxidasevermittelte Reaktion reagiert Glucose mit einer phenolischen Verbindung und bildet einen rosafarbenen Chinonimin-Komplex. Die Absorption wird bei 505 nm gemessen.

| Parameter | Traditionelle Methode (UV) | CDR FoodLab® System |
|--------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Reaktionsprinzip | Oxidation von D-Galactose (NADH) | Chromogene Reaktion der Glucose |
| Wellenlänge | 340 nm (UV) | 505 nm (sichtbarer Bereich) |
| Probenvorbereitung | Klärung nach Carrez der Deproteinisierung | Einfache Verdünnung |
| Dosierschritte | 4 separate Reagenzien + bidestilliertes Wasser | Vorgefüllte Küvette + Zugabe von R1a und R2 |
| Analysezeit | > 60 Minuten (30+30 Min Inkubation) | 10 Minuten |

Tabelle 1: Vergleich zwischen traditioneller enzymatischer Methode und CDR FoodLab®

3. Über die enzymatische Methode hinaus: Die Rolle des HPLC

Zur vollständigen Einordnung der analytischen Techniken, die bei der Kontrolle von Laktose eingesetzt werden, ist auch die HPLC, High Performance Liquid Chromatography, zu berücksichtigen. Dieses Verfahren wird in der Norm

ISO 22662 für die Bestimmung von Laktose mittels chromatographischer Trennung beschrieben. Die HPLC ermöglicht die Trennung und Quantifizierung einzelner Zucker und stellt daher einen Referenzansatz dar, wenn eine vertiefte analytische Charakterisierung des Zuckerprofils erforderlich ist. Ihr Einsatz verlangt jedoch strukturiertere Arbeitsbedingungen als enzymatische Routinemethoden.

Insbesondere umfasst die chromatographische Analyse:

- **Spezifische technische Kompetenzen:** Diese sind erforderlich für die Bedienung des Instruments, die Vorbereitung der mobilen Phasen, die Kontrolle der Säule und die Interpretation der Chromatogramme.
- **Längere Analysezeiten:** Diese ergeben sich aus der Vorbereitung des Systems, der Konditionierung der Säule und der chromatographischen Sequenz.
- **Höhere Betriebskosten:** Diese stehen im Zusammenhang mit der Verwendung von Lösungsmitteln in HPLC-Reinheit, chromatographischen Säulen, instrumenteller Wartung und dem Management der entstehenden Abfälle.

In diesem Kontext behält die HPLC ihre zentrale Rolle bei der Endkonformitätsprüfung und Validierung. Gleichzeitig kann ein schnelles enzymatisches System im täglichen Produktionsmonitoring eine vollständig komplementäre Funktion übernehmen.

4. Optimierung für den laktosefreien Bereich und Robustheit der Methode

Bei der Bestimmung von Restlaktose, insbesondere im kritischen Bereich delaktosierter Produkte von 0,01 bis 0,1 g/100 g, ist die Genauigkeit eng mit der Kontrolle von Matrixeffekten verbunden.

Klassische enzymatische UV-Methoden geben eine theoretisch geeignete Nachweisgrenze, LOD, von etwa 7 mg/L an. In der Praxis erfordert dies jedoch häufig die Zugabe eines hohen Probenvolumens in die Küvette, bis zu 0,50 mL. Diese Notwendigkeit verstärkt Probleme durch Trübung, die durch suspendierte Proteine und Fette verursacht wird. Dadurch wird die Messung im UV-Bereich bei 340 nm instabil, was komplexe Vorbehandlungen wie Klärungsschritte erforderlich macht.

Das **CDR FoodLab® System** überwindet diese Einschränkung, indem die Messung in den sichtbaren Bereich bei **505 nm** verlagert wird. Diese Konfiguration reduziert den optischen Einfluss von Proteinrückständen und Fetten erheblich, auch in Matrices, die intensiven Wärmebehandlungen wie UHT unterzogen wurden. Das System ermöglicht es,

den gesamten Entlaktosierungszyklus direkt im Produktionsbetrieb zu verfolgen und den Zeitpunkt, an dem der Laktosegehalt unter den gewünschten Grenzwert von 0,1 g/100 g sinkt, schnell zu erkennen. Dieser auf der Glucosekinetik basierende Ansatz trägt außerdem dazu bei, das **Risiko** einer Kreuzreaktivität mit L-Arabinose zu **verringern**. Diese stellt eine bekannte Einschränkung von UV-Systemen dar, die β -Galactose-Dehydrogenase verwenden. Arabinose kommt in reiner Milch nicht vor, kann jedoch in Formulierungen wie Fruchtojoghurt, durch Pektinabbau, in pflanzlichen Getränken oder in Matrices mit Verdickungsmitteln und Ballaststoffen, beispielsweise Gummi arabicum, vorhanden sein. Da klassische β -Gal-DH auch eine Affinität zu diesem Pentosezucker aufweist, besteht bei traditionellen Methoden das Risiko einer Überschätzung der Restlaktose. Durch die Änderung des analytischen Zielparameters minimiert das CDR FoodLab® System den potenziellen Einfluss von Arabinose und unterstützt eine höhere Selektivität der Ergebnisse auch in Mehrkomponentenformulierungen.

5. Operative Effizienz und Reduzierung des analytischen Risikos

In der prozessbegleitenden Qualitätskontrolle ist die analytische Effizienz eng mit der Standardisierung des Arbeitsablaufs und der Minimierung manueller Variablen verbunden. Diese Faktoren beeinflussen direkt die Wiederholbarkeit der Ergebnisse.

- **Kritische Punkte der traditionellen Methode:** Die Probenvorbereitung erfordert den Einsatz von Carrez-Reagenzien oder Perchlorsäure zur Klärung. Dabei handelt es sich um aufwendige Verfahren, die zusätzliche Variabilität einführen können. Auch das Reagenzienmanagement ist komplex. Die NAD/Citrat-Lösung ist nach der Herstellung nur **drei Monate** stabil, wodurch das Risiko besteht, teilweise degradierte Reagenzien zu verwenden. Darüber hinaus erhöht das manuelle Pipettieren von vier verschiedenen Reagenzien plus bidestilliertem Wasser den Variationskoeffizienten, CV %, erheblich.
- **Vorteile des optimierten CDR FoodLab® Systems:**
 - **Vereinfachter Workflow:** Milch erfordert lediglich eine einfache Verdünnung im Verhältnis 1:10. Feste Matrices wie Käse oder Butter werden durch eine schnelle dreiminütige Wasserextraktion mit dem Stomacher und anschließende Filtration vorbereitet.

- **Gebrauchsfertige Reagenzien und Stabilität:** Im Unterschied zu traditionellen Methoden, die eine frische Herstellung von Lösungen mit relativ kurzer Haltbarkeit erfordern, sind die CDR-Reagenzien vorgefüllt und gebrauchsfertig. Sie verfügen über eine Haltbarkeit von 12 Monaten.
- **Echtzeit-Ergebnis:** Mit einer Analysezeit von nur 10 Minuten, gegenüber mehr als 60 Minuten bei der UV-Methode, ermöglicht CDR FoodLab® Anpassungen der Produktionslinie während des laufenden Prozesses. Dadurch wird die Qualitätskontrolle von einem potenziellen Engpass zu einem Faktor produktiver Agilität.

6. Experimentelle Validierung: Korrelation mit HPLC und Anwendbarkeit bei der Kontrolle laktosefreier Produkte

Die analytische Solidität des CDR FoodLab® Systems wird durch experimentelle Daten gestützt, die eine hohe Korrelation mit chromatographischen Methoden, insbesondere HPLC, zeigen. Diese gelten historisch als Referenzstandard für die Quantifizierung von Zuckern. Die Zuverlässigkeit der Methode wurde auf zwei unterschiedlichen Bewertungsebenen bestätigt:

- **Validierung durch ACTALIA Cecalait:** Diese wurde an delactosierter Milch durchgeführt und zeigte eine ausgezeichnete Präzision im Vergleich zur HPLC, mit $R^2 = 0,9882$ und einer niedrigen Wiederholstandardabweichung von 0,017 g/100 g.
- **Überprüfung unter Routinebedingungen, IZS-Labor:** Eine vergleichende Studie an kommerziellen Proben, durchgeführt von unterschiedlichen Anwendern mit verschiedenen Instrumenten, bestätigte die Robustheit des Systems im praktischen Einsatz. Dabei wurde eine Korrelation von $R^2 = 0,9903$ gegenüber der offiziellen HPLC-Methode festgestellt.

Diese Daten bestätigen die Positionierung des CDR FoodLab® Systems: Es ersetzt die HPLC nicht in Laboren, in denen verbindliche Konformitätsprüfungen durchgeführt werden, sondern ergänzt sie durch eine schnelle, wieder-holbare und prozess-nahe Bestimmung, die mit den operativen Grenzwerten des laktosefreien Marktes übereinstimmt.

| Evidenz | Quelle/Kontext | Schlüssel-daten | Operative Bedeutung |
|----------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Wiederholbarkeit | ACTALIA | $S_r = 0.017$ g/100 g | Geeignet für die operative Kontrolle |
| Korrelation mit HPLC | ACTALIA | $R^2 = 0.9882$ | Hohe Übereinstimmung mit chromatographischen Referenzverfahren |
| Standardfehler | ACTALIA | ± 0.09 g/100 g | Kompatibel mit dem Grenzwert für laktosefreie Produkte von 0.1 g/100 g |
| IZS-Korrelation | Handelsübliche Proben | $R^2 = 0.9903$ | Bestätigung an realen Proben und in einem externen Labor |

7. Schlussfolgerungen

Die Entwicklung des laktosefreien Marktes erfordert eine dynamische Qualitätskontrolle, die sich in den Produktionsfluss integrieren lässt, ohne diesen zu verlangsamen. Während die HPLC weiterhin als Referenzverfahren für rechtliche Konformität gilt und die klassische UV-Methode unter operativer Komplexität sowie dem Risiko einer Überschätzung, beispielsweise durch L-Arabinose, leidet, bietet das **CDR FoodLab®** System eine ideale Verbindung aus wissenschaftlicher Strenge und praktischer Einsetzbarkeit im Produktionsbetrieb.:

- **Spezifität und Kontrolle von Interferenzen:** Die Messung bei 505 nm und die auf Glucose ausgerichtete Kinetik schützen die Ergebnisse vor Trübung, Proteinrückständen und falsch positiven Signalen, die durch fremde Zucker in komplexen Matrices verursacht werden können.
- **Prozessnahe Schnelligkeit:** Die Analyse in nur 10 Minuten, kombiniert mit minimaler Proben-vorbereitung, ermöglicht die Echtzeitüber-wachung des Entlaktosierungsverlaufs und schnelle Entscheidungen direkt an der Produktionslinie.
- **Validierte Solidität:** Die hohe Korrelation mit dem HPLC-Standard, $R^2 > 0,9882$, bestätigt durch unabhängige Einrichtungen wie ACTALIA und IZS, gewährleistet eine hohe Zuverlässigkeit der Daten auch unter Routinebedingungen mit mehreren Anwendern.

Zusammenfassend optimiert die Integration von CDR FoodLab® die Laborabläufe und reduziert Wartezeiten erheblich. Dadurch wird die Kontrolle der Restlaktose von einem potenziellen Engpass zu einem strategischen Faktor für Effizienz und Lebensmittelsicherheit.

Nützliche Links

- [Validation of Enzytec™ Liquid Combi Lactose/D-Galactose for Enzymatic Determination of Lactose and D-Galactose in Selected Foods: Official Method 2024.10 First Action](#)
- [Analytical validation of an advanced U-HPLC-MS/MS method for lactose detection in food supplements and pharmaceuticals](#)
- [Bestimmung von Laktose in Milch und Milchprodukten](#)
- [Bewertungsbericht CDR FoodLab® Analyse von Milch = ACTALIA](#)
- [Korrelationsstudie zur Laktoseanalyse mit Referenzmethode](#)
- [Analysen von Milch und Milchprodukten mit CDR FoodLab®](#)