

Analisi del Lattosio: Evoluzione dei Metodi Enzimatici e Ottimizzazione delle Performance Analitiche in Matrici Complesse e Delattosate

Dr. Simone Pucci - Responsabile del CDR Chemical Lab "Francesco Bonicolini"

P2621

Abstract

L'obiettivo di questo documento è dimostrare come CDR FoodLab® rappresenti un'evoluzione pratica dei metodi enzimatici UV tradizionali per l'analisi del lattosio, superandone alcuni limiti operativi legati a preparazione del campione, gestione dei reagenti, tempi di risposta e suscettibilità alle interferenze. Il metodo non viene presentato come sostituto assoluto dell'HPLC nei contesti di validazione ufficiale, ma come sistema rapido con affidabilità comparabile al riferimento cromatografico per il controllo operativo del processo lactose-free.

1. Introduzione: Lo Scenario Analitico e la Rilevanza Strategica del Controllo del Lattosio

La determinazione del lattosio nei prodotti "lactose-free" rappresenta oggi una delle sfide analitiche più ardue per il settore lattiero-caseario. In un mercato dove la purezza del prodotto è un requisito imprescindibile, la gestione dell'integrità qualitativa deve affrontare un nodo tecnico cruciale: l'eliminazione del rischio di falsi negativi nella certificazione del lattosio residuo. L'intolleranza al lattosio, legata al deficit di enzima lattasi, richiede che il produttore garantisca concentrazioni estremamente basse, rendendo l'incertezza analitica un fattore di rischio economico e legale.

Nel **controllo del lattosio residuo**, il metodo analitico adottato non determina solo il risultato di laboratorio, ma anche la capacità del produttore di monitorare il processo con dati affidabili e utilizzabili nelle decisioni operative. Disporre di dati certi in tempi rapidi è essenziale per validare i processi di delattosazione, ottimizzare l'uso degli enzimi industriali ed evitare il blocco dei lotti in spedizione. La comprensione del principio chimico alla base della misura diventa quindi il prerequisite fondamentale per interpretare correttamente il dato e garantire la sicurezza alimentare.

2. Principi Chimici a Confronto: Reattività e Specificità del Segnale

La determinazione enzimatica del lattosio può essere condotta attraverso approcci differenti, che si distinguono per il principio di reazione, il sistema di rivelazione e la gestione delle possibili interferenze di matrice.

- **Metodo Tradizionale UV:** Sfrutta una reazione a due stadi. Il lattosio è idrolizzato dalla β -galattosidasi in D-glucosio e D-galattosio.

Quest'ultimo viene ossidato a acido D-galattosico dalla β -galattosio deidrogenasi (β -Gal-DH) in presenza di NAD⁺. Il segnale è generato dalla produzione di NADH, misurato a 340 nm. Questo approccio richiede spesso un calcolo differenziale per determinare il lattosio effettivo.

- **Sistema CDR FoodLab®:** Pur mantenendo lo step di idrolisi iniziale, il segnale analitico viene generato dal glucosio residuo. Attraverso una reazione mediata dalla perossidasi, il glucosio reagisce con un composto fenolico formando un complesso chinonimminico di colore rosa. L'assorbanza viene misurata a 505 nm.

| Parametro | Metodo Tradizionale (UV) | Sistema CDR FoodLab® |
|-----------------------|---|---|
| Principio di reazione | Ossidazione D-galattosio (NADH) | Reazione cromogenica del glucosio |
| Lunghezza d'onda | 340 nm (UV) | 505 nm (Visibile) |
| Preparazione Campione | Chiarificazione (Carrez) o Deproteinizzazione | Semplice diluizione |
| Punti di dosaggio | 4 Reagenti separati + acqua ridistillata | Reagente pre-infiato + aggiunta di R1a e R2 |
| Tempo di analisi | > 60 minuti (30+30 min incubazione) | 10 minuti |

Tabella 1: Confronto metodo enzimatico tradizionale vs CDR FoodLab®

3. Oltre il metodo enzimatico: Il ruolo dell'HPLC

Per completare il quadro delle tecniche analitiche impiegate nel controllo del lattosio, è opportuno considerare anche l'HPLC, High Performance Liquid Chromatography, metodo descritto dalla norma ISO 22662 per la determinazione del lattosio mediante separazione cromatografica.

L'HPLC consente la separazione e la quantificazione dei singoli zuccheri, rappresentando quindi un approccio di riferimento quando è richiesta una caratterizzazione analitica approfondita del profilo glucidico. Tuttavia, il suo impiego richiede condizioni operative più strutturate rispetto ai metodi enzimatici di routine.

In particolare, l'analisi cromatografica comporta:

- **Competenze tecniche specifiche**, necessarie per la gestione dello strumento, la preparazione delle fasi mobili, il controllo della colonna e l'interpretazione dei cromatogrammi.

- **Tempi analitici più estesi**, legati alla preparazione del sistema, al condizionamento della colonna e alla sequenza cromatografica.
- **Costi operativi più elevati**, associati all'utilizzo di solventi con grado di purezza HPLC, colonne cromatografiche, manutenzione strumentale e gestione dei reflui.

In questo contesto, se l'HPLC mantiene un ruolo centrale nelle analisi di conformità finale e di validazione, un sistema enzimatico rapido può operare in perfetta complementarità per il monitoraggio quotidiano della produzione.

4. Ottimizzazione per il Range "Lactose-Free" e Robustezza del Metodo

Nella determinazione del lattosio residuo, particolarmente nel range critico dei prodotti delattosati (0.01 – 0.1 g/100 g), l'accuratezza è strettamente legata alla gestione degli effetti matrice.

I metodi enzimatici UV classici dichiarano un limite di rilevabilità (LOD) teorico idoneo (circa 7 mg/L), che tuttavia richiede spesso l'introduzione di un volume elevato di campione in cuvetta (fino a 0.50 mL). Questa necessità amplifica i problemi di torbidità dovuti a proteine e grassi sospesi, rendendo instabile la lettura nel range dell'ultravioletto (340 nm) e rendendo indispensabili complessi pre-trattamenti (come chiarificazioni).

Il sistema **CDR FoodLab®** risponde a questo limite trasferendo la lettura nel campo del visibile a **505 nm**. Questa configurazione riduce significativamente l'impatto ottico dei residui proteici e dei grassi, anche in matrici sottoposte a trattamenti termici spinti (UHT). Il sistema permette di seguire l'intero ciclo di delattosazione direttamente in stabilimento, individuando tempestivamente il momento in cui il lattosio scende sotto la soglia desiderata (0.1 g/100 g).

Questo approccio basato sulla cinetica del glucosio permette inoltre di **mitigare il rischio** di reattività incrociata con l'L-arabinosio, un limite presente nei sistemi UV che impiegano la β -galattosio deidrogenasi. L'arabinosio, assente nel latte puro, può riscontrarsi in formulati come yogurt con frutta (per degradazione delle pectine), bevande vegetali o matrici contenenti addensanti e fibre (come la gomma arabica). Poiché la β -Gal-DH classica mostra affinità anche per questo pentoso, nei metodi tradizionali sussiste il rischio di una sovrastima del lattosio residuo. Modificando il target analitico, il sistema CDR FoodLab® minimizza il potenziale impatto dell'arabinosio, favorendo una maggiore selettività del dato anche nelle formulazioni multi-ingredienti.

5. Efficienza Operativa e Riduzione del Rischio Analitico

Nel controllo qualità di processo, l'efficienza analitica è strettamente legata alla standardizzazione del flusso di lavoro e alla minimizzazione delle variabili manuali, fattori che incidono direttamente sulla ripetibilità del dato.

- **Criticità del Metodo Tradizionale:** La preparazione del campione richiede l'uso di reagenti di Carrez o acido perclorico per la chiarificazione, procedure laboriose che introducono variabilità. La gestione dei reagenti è complessa: la soluzione a base di NAD/Citrato ha una stabilità di soli **3 mesi** dopo la preparazione, con il rischio di uso di reattivi parzialmente degradati. Inoltre, il pipettamento manuale di 4 diversi reagenti più l'acqua ridistillata aumenta significativamente il coefficiente di variazione (CV%).
- **Vantaggi del Sistema Ottimizzato CDR FoodLab®:**
 - **Workflow Semplificato:** Il latte richiede una semplice diluizione 1:10, mentre i solidi (formaggi/burro) vengono gestiti con una rapida estrazione in acqua di 3 minuti tramite Stomacher e successiva filtrazione.
 - **Reagenti pronti all'uso e Stabilità:** A differenza dei metodi tradizionali che richiedono la preparazione estemporanea di soluzioni con una shelf-life piuttosto ridotta, i reagenti CDR sono pre-infiati e pronti all'uso, con una scadenza di 12 mesi.
 - **Risposta Real-Time:** Con un tempo di analisi di soli 10 minuti (contro i 60+ minuti del metodo UV), il CDR FoodLab® consente aggiustamenti di linea durante la produzione, trasformando il controllo qualità da un collo di bottiglia a un fattore di agilità produttiva.

6. Validazione sperimentale: correlazione con HPLC e applicabilità al controllo lactose-free

La solidità analitica del sistema CDR FoodLab® è supportata da evidenze sperimentali che mostrano un'elevata correlazione con i metodi cromatografici (HPLC), storicamente considerati lo standard di riferimento per la quantificazione degli zuccheri. L'affidabilità del metodo è stata confermata attraverso due diversi livelli di valutazione:

- **Validazione di ACTALIA Cecalait:** condotta su latte delattosato, ha mostrato un'eccellente precisione confrontato all'HPLC ($R^2 = 0.9882$) con una deviazione standard di ripetibilità contenuta (0.017 g/100 g)

- **Verifica in condizioni di routine (Laboratorio IZS):** uno studio comparativo su campioni commerciali, gestito da operatori diversi con differenti strumenti, ha confermato la robustezza del sistema sul campo, registrando una correlazione pari a $R^2 = 0.9903$ rispetto al metodo HPLC ufficiale.

Questi dati confermano il posizionamento di CDR FoodLab®: uno strumento progettato non per sostituire l'HPLC nei laboratori di conformità assoluta, ma per trasferire direttamente nel controllo di processo una determinazione rapida, ripetibile e perfettamente coerente con le soglie operative del mercato lactose-free.

| Evidenza | Fonte/contesto | Dato chiave | Significato operativo |
|-----------------------|----------------------|--------------------------|---|
| Ripetibilità | ACTALIA | $S_r = 0.017$ g/100 g | Adeguate per controllo operativo |
| Correlazione con HPLC | ACTALIA | $R^2 = 0.9882$ | Elevato allineamento con riferimento cromatografico |
| Errore standard | ACTALIA | ± 0.09 g/100 g | Compatibile con soglia lactose-free 0.1 g/100 g |
| Correlazione IZS | Campioni commerciali | $R^2 = 0.9903$ | Conferma su campioni reali e laboratorio esterno |

7. Conclusioni

L'evoluzione del mercato *lactose-free* richiede un controllo qualità dinamico, capace di integrarsi nel flusso produttivo senza rallentarlo. Se l'HPLC resta il riferimento per la conformità legale e il metodo UV classico sconta complessità operative e rischi di sovrastima (come nel caso dell'L-arabinosio), il

sistema **CDR FoodLab®** offre una sintesi ideale tra rigore scientifico e operatività di stabilimento:

- **Specificità e controllo delle interferenze:** La lettura a 505 nm e la cinetica incentrata sul glucosio proteggono il dato da torbidità, residui proteici e falsi positivi causati da zuccheri estranei nelle matrici complesse.
- **Tempestività di processo:** L'analisi in soli 10 minuti, combinata a una preparazione del campione minima, permette di monitorare l'andamento della delattosazione in tempo reale per decisioni rapide in linea.
- **Solidità validata:** L'elevata correlazione con lo standard HPLC ($R^2 > 0.9882$), certificata da enti indipendenti come ACTALIA e IZS, garantisce la massima affidabilità del dato anche in condizioni di routine multi-operatore.

In sintesi, l'integrazione di CDR FoodLab® ottimizza i flussi di laboratorio e azzeri i tempi d'attesa, trasformando il controllo del lattosio residuo da potenziale collo di bottiglia a fattore strategico di efficienza e sicurezza alimentare.

Link utili

- [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](#)
- [Determinazione del lattosio nel latte e nei prodotti caseari](#)
- [Rapporto valutazione di CDR FoodLab® analisi su latte - ACTALIA](#)
- [Studio di correlazione analisi del lattosio con metodo di riferimento](#)