

Enzymatik im neuen Format

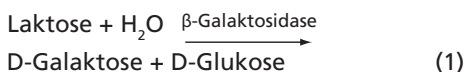
Laktose- und Galaktose-Bestimmung

Andrea Klink und Wolfgang Weber

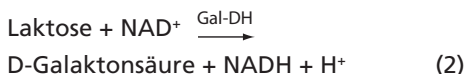
Laktose und mit ihr die Galaktose sind Kohlenhydrate, die vor allem in der Süßwarenindustrie von Relevanz sind: zum einen als wertgebende Bestandteile bei Schokoladen und Butterkeksen, zum anderen, wenn der Nachweis erbracht werden soll, dass das Produkt mit der Auslobung „laktosefrei“ auf den Markt gebracht werden kann.

Ebenso spielt der Nachweis in der Qualitätskontrolle bei der Herstellung von Milch und Milchprodukten sowie bei Fleisch- und Wurstwaren eine Rolle.

Die bewährte Basis für den quantitativen enzymatischen Mikrotiterplatten-test namens EnzymeFast® wurde übernommen: Laktose wird in Gegenwart des Enzyms β -Galaktosidase und Wasser bei einem pH-Wert von 6,6 in D-Galaktose und D-Glukose gespalten (Gleichung 1).



D-Galaktose wird durch Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) von β -Galaktose-Dehydrogenase (Gal-DH) bei einem pH-Wert von 8,6 zu D-Galaktonsäure oxidiert (Gleichung 2).



Das nach Gleichung 2 gebildete NADH ist der D-Galaktose-Menge äquivalent und wird auf den Laktosegehalt zurückgerechnet. Kalibriert wird das Testsystem mit D-Galaktose – und das bei jedem Ansatz auf der Mikrotiterplatte, die mehrfach verwendbar ist. Die Absorption des gebildeten NADH wird bei 340 nm fotometrisch gemessen.

Damit entspricht die Methode den Bestimmungen der vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) veröffentlichten Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren (ASU) nach § 64 Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB).

Aufbau des Testkits

Alle benötigten Reagenzien sowie eine Mikrotiterplatte sind Bestandteil des In-vitro-Testkits EnzymeFast®:

1. Citratpuffer (pH-Wert ca. 6,6) mit ca. 15 mg NAD (Lyophilisat),
2. β -Galaktosidase, als Suspension, ca. 550 U,
3. Kaliumdiphosphat-Puffer, pH-Wert ca. 8,6,
4. β -Galaktose-Dehydrogenase als Suspension, ca. 5 U,
5. D-Galaktose-Standardlösung für die Kalibrierung und
6. Laktose-Monohydrat-Kontrolllösung.

Mit dem Test können insgesamt 140 Bestimmungen (z. B. 120 Proben und 4 Standardreihen mit jeweils 4 Kalibrierpunkten plus Nullwert) durchgeführt werden. Für die Auswertung ist neben einer Laborgrundausrüstung ein Mikrotiterplattenfotometer (340 nm) notwendig.

Die Probenaufarbeitung unterscheidet sich nicht von den herkömmlichen Verfah-



Dr. Andrea Klink

» Zur Person

Dipl.-Biologin, Mitarbeiterin für Forschung und Entwicklung, ifp Institut für Produktqualität GmbH, Berlin «

Tab. 1 Präzisionsdaten der Standards

Standard	Standardreihe ^{a)} [g/100 g (mL)]	Mittelwert ΔE (n = 6)	Wiederholpräzision (n = 6) Variationskoeffizient V_k [%]
Standard A	5,000	0,877	0,66
Standard B	2,500	0,442	1,31
Standard C	0,625	0,114	3,56
Standard D	0,156	0,031	5,95

^{a)} Die Standardreihe enthält bereits den Extraktionsverdünnungsfaktor von 1:100 bei einer Probeneinwaage von 1 g

» Einsatzgebiet des Testkits sind vor allem Lebensmittel. «

ren: Flüssige, klare Proben können direkt bzw. verdünnt eingesetzt werden. Feste Proben müssen zuvor homogenisiert und die Analyten müssen extrahiert werden. Eine Klärung mit Carrez I und II schließt sich an sowie ein Verdünnungsschritt.

Der gesamte Zeitbedarf für fünf Proben beträgt für die Aufarbeitung rund 30 Minuten, die Testdurchführung beinhaltet vier Pipettierschritte und drei Inkubationszeiten von 20, 3 und 30 Minuten. Für die Auswertung sollten 5 Minuten einkalkuliert werden.

Das vorrangige Einsatzgebiet des Testkits sind Lebensmittel. Es kann ebenso in der pharmazeutischen Produktion und klinischen Chemie eingesetzt werden.

Reduzierter Materialaufwand

Von besonderem Vorteil ist der Fakt, dass die Bestimmung nicht wie bei anderen enzymatischen Methoden über den aus der Literatur übernommenen Absorptionskoeffizienten erfolgt, sondern unter realen Reaktionsbedingungen über eine jeweils parallel erstellte Kalibriergerade. Das Mitführen eines Positivtests (Laktose-Kontrolllösung mit definierter Konzentration) sorgt dafür, dass der korrekte Ablauf der enzymatischen Reaktion überwacht werden kann. Zusätzlich wird ein Nullwert, der

Laktose/Laktoseintoleranz

Laktose, Trivialname Milchzucker, ist ein natürlicher Bestandteil der Milch und ein Disaccharid aus Glukose und Galaktose, dessen korrekter Name 4-(β -D-Galaktopyranosyl)-D-glukopyranose lautet. Damit der Milchzucker im Dünndarm aufgenommen werden kann, muss er zuerst in diese beiden Monosaccharide gespalten werden. Normalerweise ist das Enzym Laktase (β -Galaktosidase), das sich in der Dünndarmschleimhaut befindet, für diese Spaltung zuständig.

Menschen mit einer Laktoseintoleranz sind nicht in der Lage, Milchzucker in seine Einzelbestandteile zu zerlegen: Ein Laktasemangel verringert die Fähigkeit zur Spaltung des Zuckers. Der Milchzucker bleibt im Darm, bindet Wasser, und es kommt zu Durchfall. Zusätzlich verwerten Darmbakterien den ungespaltenen Zucker, wodurch Blähungen entstehen.

nicht Bestandteil der Kalibriergeraden ist, ermittelt. Durch die Nutzung einer Mikrotiterplatte erfolgt die Messung aller Werte (Probe, Nullwert, Kalibrierwerte und Kontrolle) parallel und nicht hintereinander wie bei den herkömmlichen enzymatischen Bestimmungen.

Dadurch wird nicht nur der Arbeits- und Zeitaufwand stark reduziert, sondern auch der Materialverbrauch. In einer Platte können bis zu 90 Proben zzgl. Nullwert, Standards und Testkontrolle bestimmt werden. Die herkömmliche Methode geht im Vergleich bei einem

Tab. 2 Wiederholpräzision (n = 6) für Referenzmaterial bzw. Lebensmittelmatrix mit deklariertem Sollgehalt

Bezeichnung	Probe Sollgehalt/Deklariert [g/100 g]	Küvettestest			EnzymeFast®		
		Mittelwert [g/100 g]	V_k [%]	Wiederfindung [%]	Mittelwert [g/100 g]	V_k [%]	Wiederfindung [%]
Referenzmaterial Milkschokolade	9,14 \pm 0,11 (Laktose-Monohydrat)	9,40 \pm 0,10	1,04	102,9	9,38 \pm 0,14	1,50	102,7
Diät-Vollmilchschokolade	12 (Laktose)	11,27 \pm 0,22	1,76	93,9	11,18 \pm 0,12	1,05	93,2

solchem Probendurchsatz mit einem enormen Küvettenverbrauch einher.

Testcharakteristika

Die Nachweisgrenze beträgt bei einer Probeneinwaage von 5 g (mL) und einem Einsatz von 100 µL Probenvolumen 0,005 g/100 g (mL) Laktose bzw. Laktose-Monohydrat. Die Bestimmungsgrenze beträgt bei einer Probeneinwaage von 1 g (mL) und einem Probenvolumen von 20 µL 0,30 g/100 g (mL) Laktose bzw. 0,31 g/100 g (mL) Laktose-Monohydrat; bei einer Probeneinwaage von 5 g (mL) und einem Probenvolumen von 100 µL 0,012 g/100 g (mL) Laktose bzw. Laktose-Monohydrat. Die Wiederfindungsraten des Testkits liegen zwischen 95–102 %.

In der Abbildung 1 und Tabelle 1 sind die Präzisionsdaten der Standards wiedergegeben; ein Bestimmtheitsmaß R^2 von 1,000 ist möglich. Des Weiteren zeigt die Tabelle 2, dass die Wiederholpräzision für ein Referenzmaterial bzw. für eine Lebensmittelmatrix mit deklariertem Sollgehalt auf das Beste mit dem klassischen materialintensiven Küvettest vergleichbar und daher ideal für die Routineanalytik im Produktionsprozess geeignet ist.

Mit dem Galaktose-Testkit ist die Entwicklung längst nicht beendet. Ein analoger Test für die Bestimmung von

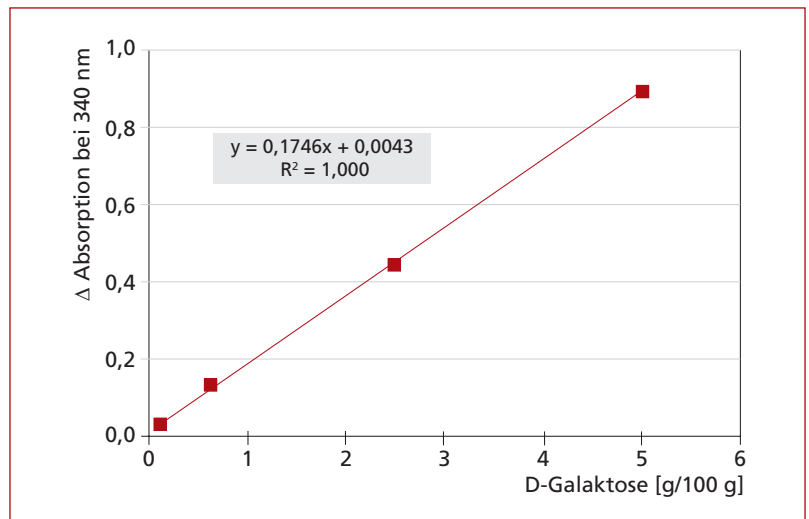


Abb. 1
Kalibrierung mit
D-Galaktose

Saccharose, Glukose und Fruktose ist abgeschlossen und weitere enzymatische Tests der EnzymeFast®-Reihe werden folgen. ■

Anschrift der Autoren

Dr. Andrea Klink

Dr. Wolfgang Weber

ifp Institut für Produktqualität GmbH

Teltowkanalstr. 2

12247 Berlin

info@produktqualitaet.com

www.produktqualitaet.com

**Wein ist mehr als
Rebensaft – ein Mysterium,
ein Medikament, eine Gabe
Gottes.**

*Wie wird er angebaut? Woraus
setzt er sich zusammen? Und
welchen medizinischen Nutzen
kann der Genuss von Wein
haben? Diese und viele andere
Fragen beantwortet der mehrfach
ausgezeichnete Band.*

Preise jeweils inklusive MwSt. [D], sofern nicht anders angegeben.
Lieferung innerhalb Deutschlands versandkostenfrei. Lieferung ins
Ausland zuzüglich Versandkosten.



HIRZEL

Karl-Gustav Bergner und Edmund Lemperle
Weinkompodium

Botanik – Sorten – Anbau – Bereitung –

Chemische Zusammensetzung –

Weiterverarbeitung – Wein in der Medizin

4., aktualisierte Auflage 2011.

394 Seiten, 12 Farbtafeln, 81 Abb., 33 Tab.

Gebunden.

ISBN 978-3-7776-2098-5

€ 49,- [D]

www.hirzel.de

S. Hirzel Verlag • Birkenwaldstr. 44 • 70191 Stuttgart
Tel. 0711 2582 341 • Fax 0711 2582 390 • service@hirzel.de