



Une méthode simple et efficace pour le dosage enzymatique de l'acide fumarique dans les vins

Daniel Fernández-Vázquez^{1,3}, Nicolas Rozès², Joan M. Canals¹, Albert Bordons³, Cristina Reguant³ and Fernando Zamora¹

¹ Grup de Tecnologia Enològica, Rovira i Virgili University, Faculty of Oenology, Biochemistry and Biotechnology Department, Marcel·lí Domingo 1, 43007 Tarragona, Catalonia, Spain

² Grup de Biotecnologia Microbiana dels Aliments, Rovira i Virgili University, Faculty of Oenology, Biochemistry and Biotechnology Department, Marcel·lí Domingo 1, 43007 Tarragona, Catalonia, Spain

³ Grup de Biotecnologia Enològica, Rovira i Virgili University, Faculty of Oenology, Biochemistry and Biotechnology Department, Marcel·lí Domingo 1, 43007 Tarragona, Catalonia, Spain

Produits chimiques et équipement nécessaire

- Un spectrophotomètre capable de travailler dans l'ultraviolet (365 nm).
- Cuvettes à usage unique de polyméthacrylate de méthyle (PMMA) semi-micro, plage de longueur d'onde applicable de 300 à 900 nm, trajet optique de 10 mm.
- Une centrifugeuse de paillasse et des tubes à centrifuger adaptés.
- Matériel volumétrique usuel et pipettes automatiques de 10-50, 50-200 and 200-1000 µL.
- Un kit enzymatique de dosage de l'acide L-malique commercial (r-Biopharm®, Art. No: 10139068035, Darmstadt, Germany).
- Fumarase de cœur de porc (Ref: F1757, 2500 unités, Sigma-Aldrich).
- Sodium L-glutamate. 1H₂O (99 %) (CAS: 6106-04-3).

Mécanisme d'action de la réaction enzymatique

La méthode enzymatique proposée est basée sur le kit classique de quantification de l'acide L-malique avec l'inclusion d'une nouvelle étape catalysée par l'enzyme fumarase (EC 4.2.1.2). Cette enzyme transforme de manière réversible l'acide fumarique (FA) en acide L-malique, permettant ainsi le dosage de l'acide fumarique en l'utilisant en association avec un kit classique de dosage de l'acide L-malique.

La figure 1 montre son mécanisme d'action.

Brièvement, lorsque la L-malate déshydrogénase est ajoutée au milieu réactionnel contenant l'échantillon de vin, le tampon, le coenzyme nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺), un excès de L-glutamate (L-Glu) et l'enzyme glutamate oxaloacétate transaminase (GOT), l'acide L-malique (MA) est complètement transformé en oxaloacétate (OAA) et en NAD⁺ sous sa forme réduite correspondante (NADH). Cela signifie que la production de NADH sera stoechiométrique avec la concentration initiale en MA, ce qui permettra de la quantifier en mesurant l'augmentation de l'absorbance à 365 nm. Si la fumarase (FUM) est ajoutée une fois cette réaction complètement terminée, le FA est transformé en MA, qui est ensuite transformé, d'abord en OAA puis en acide L-aspartique, conformément à la réaction enzymatique décrite ci-dessus. Ainsi, on provoque une deuxième augmentation de la concentration en NADH, qui est stoechiométrique avec la concentration initiale en FA, permettant de la quantifier en déterminant une deuxième augmentation d'absorbance à 365 nm.

Protocole de quantification de l'acide fumarique à l'aide de la méthode enzymatique proposée

Tous les échantillons ont été centrifugés et dilués au 1:10 avec de l'eau ultra pure de qualité Milli-Q pour ajuster la concentration des

L'utilisation de l'acide fumarique (E297) à une dose maximale de 0,6 g/L pour inhiber la fermentation malolactique des vins a été récemment approuvée par l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV)¹ et par l'Union Européenne (UE)². Cet article décrit une méthode enzymatique récemment publiée pour doser simultanément les acides L-malique et fumarique³. Cette méthode, très simple et efficace, utilise le mode opératoire du dosage de l'acide L-malique à partir d'un kit enzymatique commercial ajoutant une étape supplémentaire dans laquelle l'enzyme fumarase est rajoutée pour transformer l'acide fumarique en acide L-malique.

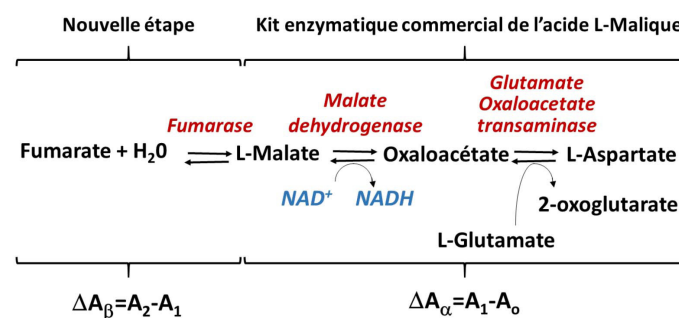


FIGURE 1. Mécanisme d'action du dosage enzymatique de l'acide fumarique.

TABLE 1. Mode opératoire pour les quantifications des acides fumarique et L-malique.

Pipeter dans la cuvette	Volume (µL)		
	Dosage conventionnel	Dosage pour vins avec plus de 4 g/L de MA	
Solution 1	Acide L-glutamique (100 mM) dans tampon glycylglycine, pH 10	400	400
Solution 1*	Acide L-glutamique (300 mM) dans Na ₂ CO ₃ (2%, p/v)	0	200
Solution 2	Solution NAD ⁺ (55 mM)	80	150
Solution 3	GOT (400 U/mL)	4	4
Échantillon/Standard	Vin, Blanc (eau distillée) ou standard (sol. 5)	40	40
Eau	Qualité Ultrapure Milli-Q	360	90
Mélanger, incubé 5 min à 25°C, lire absorbance à 365 nm (A ₀), puis ajouter			
Solution 4	L-MDH (6,000 U/mL)	4	4
Mélanger, incubé 5 min à 25°C, lire absorbance à 365 nm (A ₁), puis ajouter			
Fumarase	FUM (1,125 U/mL)	5	5
Mélanger, lire absorbance à 365 nm après 50 minutes (A ₂)			

deux acides (MA et FA) à la sensibilité du kit commercial L-malique. Toutes les mesures d'absorbance ont été effectuées à 365 nm car à cette longueur d'onde le coefficient d'extinction molaire du NADH est adapté pour travailler avec seulement une dilution de 1:10.



Travailler à 334 ou 340 nm nécessiterait des dilutions inutilement plus importantes. Le tableau 2 montre le protocole final adapté dans lequel il existe deux options en fonction de la concentration en acide L-malique de l'échantillon. La procédure analytique est une adaptation de celle décrite par le fabricant du kit enzymatique commercial de l'acide L-malique.

Les solutions 1 à 4 sont celles correspondant au kit commercial. La solution de fumarase contient 1120 unités enzymatiques/mL. La solution 1* est une solution d'acide L-glutamique (300 mM) qui doit être utilisée uniquement lorsque la concentration en acide L-malique de l'échantillon est supérieure à 4 g/L.

Les concentrations finales de MA et FA peuvent être calculées à l'aide des équations suivantes, qui ont été obtenues en tenant compte du volume de l'échantillon utilisé pour la mesure, du volume final dans la cuvette, du facteur de dilution utilisé dans l'échantillon et du coefficient d'extinction molaire du NADH à 365 nm.

$\Delta A_{\alpha} = (A_1 - A_0)$ $[\text{Acide L-malique}] \text{ (g/L)} = 8.756 \times \Delta A_{\alpha}$	$\Delta A_{\beta} = (A_2 - A_1)$ $[\text{Acide fumarique}] \text{ (g/L)} = 7.622 \times \Delta A_{\beta}$
---	---

Linéarité de la méthode proposée dans différents milieux

La figure 2 présente les résultats obtenus pour les concentrations en MA et FA dans différents milieux : solution synthétique d'un vin modèle sans supplémentation en acide L-malique (figure 2A), solution synthétique d'un vin modèle avec supplémentation en acide L-malique (figure 2B), vin blanc (figure 2C), vin rouge sans supplémentation en acide L-malique (figure 2D), vin rouge avec supplémentation en acide L-malique (figure 2E) et jus de raisin blanc (figure 2F).

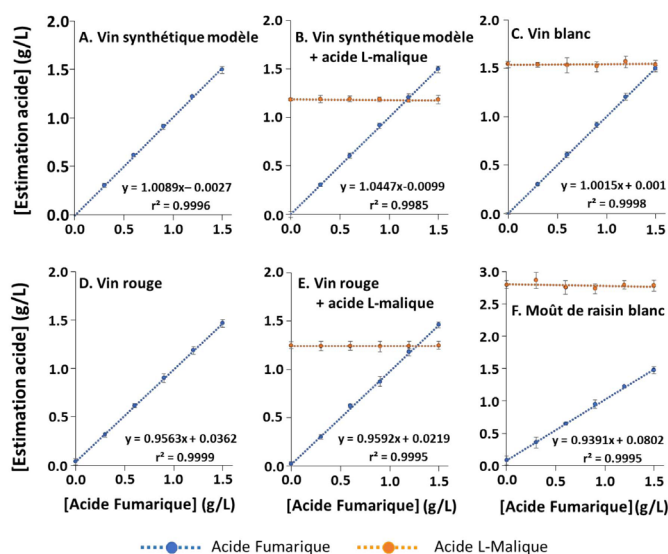


FIGURE 2. Dosages des acides fumarique et L-malique dans différentes solutions.

Ces graphiques montrent que dans tous les milieux étudiés, la concentration en FA présentait des coefficients de régression linéaire satisfaisants (r^2 compris entre 0,9985 et 0,9999). De plus, les pentes des lignes de régression étaient très proches de 1 (entre 0,9391 et 1,0447), ce qui indique que la récupération de FA par ajouts était presque complète par cette méthode. Ces résultats confirment donc que FA peut être analysé avec succès en utilisant la nouvelle méthode enzymatique proposée.

Conclusions

La méthode enzymatique proposée pour l'analyse de l'acide fumarique s'est révélée efficace et suffisamment robuste dans différents milieux (solution synthétique, vin blanc, vin rouge et même jus de raisin blanc). En incluant une seule nouvelle étape (l'ajout de l'enzyme fumarase) au protocole du dosage de l'acide L-malique du kit commercial, il est possible de déterminer efficacement les concentrations en acide fumarique dans une plage comprise entre 0 et 1,5 g/L, ce qui couvre amplement la dose maximale autorisée par l'OIV de cet acide (0,6 g/L). La méthode permet également de doser l'acide L-malique, puisque les premières étapes sont précisément celles utilisées lors de l'analyse de cet acide à l'aide du kit commercial. Cependant, si la concentration en L-malique de l'échantillon est très élevée (≥ 4 g/L), il est nécessaire d'appliquer une modification de cette méthode, qui nécessite d'augmenter les concentrations en L-glutamate et NAD⁺. De plus, cette nouvelle méthode est relativement rapide (1 heure), simple de mise en œuvre et d'utilisation, et peu coûteuse (environ 5 €/échantillon). Pour toutes ces raisons, nous pensons que cette nouvelle méthode enzymatique peut être proposée comme analyse de routine pour le dosage de l'acide fumarique en œnologie. ■

Financement : Ce travail de recherche a été financé par le projet CAVA No-FML (Opération 16.01.01 des Projets des Groupes Opérationnels, Programme de Développement Rural (Régional) – Catalogne).

Article prenant sa source de l'article de recherche "New enzymatic method for estimating fumaric acid in wines" (Oeno One, 2021).

- 1 Resolution OENO-TECHNO 15-581A. OIV, International Organization of Vine and Wine (2021). *Summary of Resolutions Adopted in 2021 by the 19th General Assembly of the OIV – Paris (France)*. <https://www.oiv.int/public/medias/7577/en-resume-resolutions-oiv-paris-2020.pdf>
- 2 Commission Delegated Regulation (EU) 2022/68 of 27 October 2021. *Official Journal of the European Union* 19.1.2022. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32022R0068>
- 3 Fernández-Vázquez, D.; Rozès, N.; Canals, J.M.; Bordons, A.; Reguant, C.; Zamora, F. New enzymatic method for estimating fumaric acid in wines. *Oeno One* 2021, 3, 273–281. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2021.55.3.4825>