



Eine einfache und effektive Methode zur enzymatischen Bestimmung von Fumarsäure in Weinen

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

Chemikalien und notwendiges Equipment

- ➔ ein UV/Vis Spektralphotometer.
- ➔ semi-mikro-Einwegküvetten aus Polymethylmethacrylat (PMMA) mit 10 mm Weglänge, die für einen Wellenlängenbereich von 300-900 nm geeignet sind.
- ➔ eine Tischzentrifuge und geeignete Zentrifugenröhrchen.
- ➔ übliche volumetrische Geräte und automatische Pipetten von 10-50, 50-200 und 200-1000 µL.
- ➔ einen handelsüblichen Enzymkit zur Bestimmung von L-Äpfelsäure (r-Biopharm®, Art. Nr.: 10139068035, Darmstadt, Deutschland).
- ➔ Fumarase aus Schweineherzen isoliert (Ref: F1757, 2500 Einheiten, Sigma-Aldrich).
- ➔ Natrium-L-Glutamat Monohydrat (99 %) (CAS: 6106-04-3).

Die Methode und Reaktionschritte

Das Verfahren basiert auf der Verwendung eines handelsüblichen Kits zur Bestimmung der Konzentration an L-Äpfelsäure. Dem Protokoll wird einfach ein weiterer Schritt hinzugefügt. Dieser besteht in der reversiblen Umwandlung von Fumarsäure (fumaric acid, FA) in L-Äpfelsäure durch das Enzym Fumarase (EC 4.2.1.2).

Abbildung 1 zeigt die stattfindenden enzymatischen Reaktionen. Zuerst wird der Probe (z. B. Wein) L-Malat-Dehydrogenase, Puffer, das Coenzym Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺), ein Überschuss an L-Glutamat (L-Glu), und das Enzym Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) zugesetzt. In den folgenden Reaktionen wird dann L-Äpfelsäure (malic acid, MA) vollständig in Oxalacetat (oxaloacetic acid, OAA) und in NADH (die reduzierte Form von NAD⁺) umgewandelt. Die Produktion von NADH steht mit der Anfangskonzentration von MA in einem stöchiometrischen Verhältnis. Die Quantifizierung der MA ist deshalb mithilfe der Messung der Extinktion bei 365 nm durch NADH ermöglicht. Ist die Reaktion vollständig abgeschlossen, wird die Fumarase (FUM) hinzugefügt. Damit ist es im nächsten Schritt möglich, die Konzentration an FA indirekt über die Menge an gebildeter MA, und die gerade beschriebenen Reaktionen, zu bestimmen. D. h. durch die Messung der Extinktion bei 365 nm kann die Ausgangskonzentration an MA mithilfe von NADH stöchiometrisch ermittelt werden.

Das Protokoll zur Quantifizierung von Fumarsäure mithilfe der vorgestellten enzymatischen Methode

Die Proben werden zentrifugiert und 1:10 mit ultrareinem Milli-Q-Wasser verdünnt, um die Konzentration der beiden Säuren (MA

und FA) an die Empfindlichkeit des kommerziellen L-Äpfelsäure-Kits anzupassen. In den meisten Protokollen wird die Absorption von NADH bei 334 oder 340 nm gemessen. Um jedoch unnötig hohe

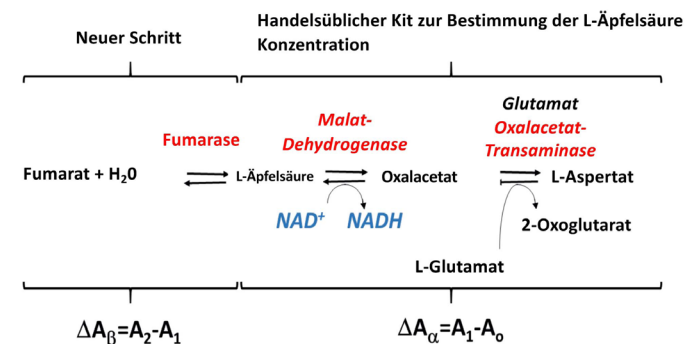


ABBILDUNG 1. Die enzymatischen Reaktionen zur Bestimmung der Fumarsäurekonzentration sind dargestellt.

TABELLE 1. Methode zur Quantifizierung von Fumar- und L-Äpfelsäure.

Zu pipettierende Komponente	Volumen (µL)		
	Normale Analyse	Analyse für Weine mit mehr als 4 g/L MA	
Lösung 1	L-Glutaminsäure (100 mM) in Glycylglycinpuffer, pH 10	400	400
Lösung 1*	L-Glutaminsäure (300 mM) in Na ₂ CO ₃ (2% w/v)	0	200
Lösung 2	NAD ⁺ Lösung (55 mM)	80	150
Lösung 3	GOT (400 U/mL)	4	4
Probe/Kontrolle	Wein, Kontrolle (Aqua dest.) oder Standard (Lsg. 5)	40	40
Wasser	Ultrapure Milli-Q Qualität	360	90
Mischen, bei 25°C 5 min inkubieren, Absorption bei 365 nm (A ₀) bestimmen, danach Zugabe von:			
Lösung 4	L-Malat-Dehydrogenase (6000 U/mL)	4	4
Mischen, bei 25°C 5 min inkubieren, Absorption bei 365 nm (A ₁) bestimmen, danach Zugabe von:			
Fumarase	FUM (1125 U/mL)	5	5
Mischen, 50 min inkubieren, Absorption bei 365 nm (A ₂) bestimmen.			

und FA) an die Empfindlichkeit des kommerziellen L-Äpfelsäure-Kits anzupassen. In den meisten Protokollen wird die Absorption von NADH bei 334 oder 340 nm gemessen. Um jedoch unnötig hohe

Probenverdünnung zu vermeiden, bestimmen wir in diesem Protokoll die Extinktion bei einer Wellenlänge von 365 nm. Das endgültige Protokoll ist in Tabelle 2 dargestellt, bei dem es je nach Konzentration an L-Äpfelsäure in der Probe zwei Optionen gibt. Die Methode ist an die des Kit-Herstellers angelehnt.

Die Lösungen 1 bis 4 entsprechen denen des kommerziellen Kits. Die Fumaraselösung enthält 1120 Enzymeinheiten/mL. Bei der 1*-Lösung handelt es sich um L-Glutaminsäure (300 mM), die nur verwendet wird, wenn die Konzentration an L-Äpfelsäure in der Probe höher als 4 g/L ist.

Unter Berücksichtigung des Probenvolumens, des Endvolumens in der Küvette, des Verdünnungsfaktors und des molaren Extinktionskoeffizienten von NADH bei 365 nm, können die Endkonzentrationen an MA und FA anhand der folgenden Gleichungen berechnet werden:

$\Delta A_{\alpha} = (A_1 - A_0)$ $[\text{L-Äpfelsäure}](\text{g/L}) = 8,756 \times \Delta A_{\alpha}$	$\Delta A_{\beta} = (A_2 - A_1)$ $[\text{L-Fumarsäure}](\text{g/L}) = 7,622 \times \Delta A_{\beta}$
--	--

Linearität der vorgestellten Methode in verschiedenen Medien

Abbildung 2 zeigt die Ergebnisse für die Konzentrationen an MA und FA in verschiedenen Medien: Modellwein ohne Zugabe von L-Äpfelsäure (Abb. 2A), Modellwein mit Zugabe von L-Äpfelsäure (Abb. 2B), Weißwein (Abb. 2C), Rotwein ohne Zugabe von L-Äpfelsäure (Abb. 2D), Rotwein mit Zugabe von L-Äpfelsäure (Abb. 2E), und weißer Traubensaft (Abb. 2F).

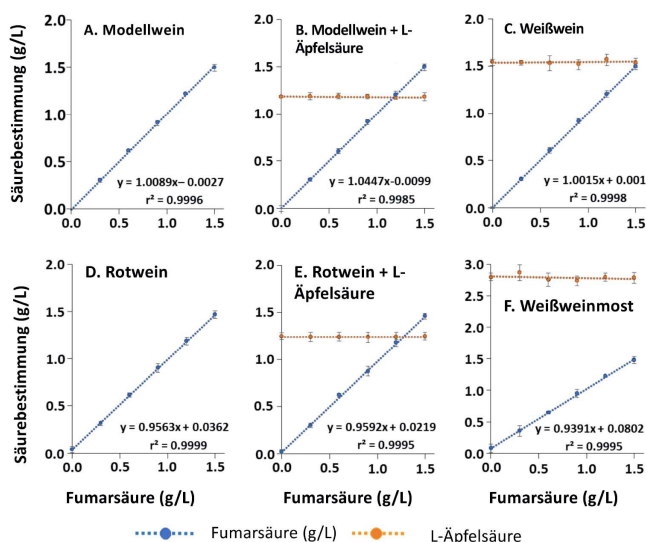


ABBILDUNG 2. Die Messung von Fumarsäure und L-Äpfelsäure in verschiedenen Lösungen.

Diese Diagramme zeigen, dass die FA-Konzentration in allen untersuchten Medien zufriedenstellende lineare Regressionskoeffizienten aufwies (r^2 zwischen 0,9985 und 0,9999). Darüber hinaus lagen die Steigungen der Regressionsgeraden nahezu bei 1 (zwischen 0,9391 und 1,0447), was darauf hinweist, dass die zugegebene Fumarsäure fast vollständig umgesetzt wurde. Dies bestätigt, dass die hier vorgestellte Methode zur robusten Bestimmung der FA-Konzentration eingesetzt werden kann.

Fazit

Die vorgestellte enzymatische Methode zur Messung der Fumarsäurekonzentration hat sich in verschiedenen Medien (synthetische Lösung, Weißwein, Rotwein, und sogar weißer Traubensaft) als effektiv und robust erwiesen. Durch das Hinzufügen eines einzigen Schrittes (die Zugabe des Enzyms Fumarase) ist es möglich, mithilfe eines handelsüblichen L-Äpfelsäure-Kits Fumarsäurekonzentrationen im Bereich zwischen 0 und 1,5 g/L effizient zu bestimmen. Dies schließt die von der OIV zugelassene Höchstdosis für diese Säure (0,6 g/L) ein. Das Verfahren erlaubt zudem die gleichzeitige Bestimmung von L-Äpfelsäure im ersten Schritt des Protokolls, vor der Zugabe der Fumarase. Für Weine mit sehr hohem MA-Gehalt (≥ 4 g/L) ist es notwendig, die modifizierte Form der Methode anzuwenden, die größere Mengen an L-Glutamat und NAD^+ erfordert.

Das vorgestellte Verfahren ist zudem schnell (1 Stunde) und einfach durchzuführen, sowie relativ kostengünstig (ca. 5 €/Probe). Aus all diesen Gründen sind wir überzeugt, dass sich diese Methode als Routineanalyse für die Bestimmung von Fumarsäure in der Önologie durchsetzen kann. ■

Förderung: Diese Studie wurde durch das Projekt CAVA No-FML (Operation 16.01.01 der Projekte der Operationellen Gruppen, Programm zur Entwicklung des ländlichen Raums (Regional) – Katalonien) finanziert.

Basiert auf dem wissenschaftlichen Artikel "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>