



# Un método simple y eficaz para el análisis enzimático del ácido fumárico en el vino

Daniel Fernández-Vázquez<sup>1,3</sup>, Nicolas Rozès<sup>2</sup>, Joan M. Canals<sup>1</sup>, Albert Bordons<sup>3</sup>, Cristina Reguant<sup>3</sup> and Fernando Zamora<sup>1</sup>

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

## Productos químicos y equipo necesario

- Un espectrofotómetro capaz de trabajar en el ultravioleta (365 nm).
- Cubetas semi-micro de plástico de 10 mm camino óptico.
- Una centrifuga de mesa y tubos de centrifugación adecuados.
- Material volumétrico habitual y pipetas automáticas de 10-50, 50-200 y 200-1000 µL.
- Kit enzimático comercial de ácido L-málico (r-Biopharm® (Art. No: 10139068035, Darmstadt, Germany).
- Fumarasa de corazón porcino (REF: F1757-2.5KU, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain).
- L-glutamato sódico 1-hidrato (99 %) (CAS: 6106-04-3).

## Mecanismo de acción del método enzimático.

El método enzimático propuesto se basa en el kit clásico para la cuantificación de ácido L-málico con la inclusión de una nueva etapa catalizada por la enzima fumarasa (EC 4.2.1.2). Esta enzima transforma de forma reversible el ácido fumárico en ácido L-málico, lo que permite la determinación del ácido fumárico utilizándolo en combinación con un kit clásico de ácido L-málico.

La Figura 1 muestra el mecanismo de acción.

Brevemente, cuando se añade L-malato deshidrogenasa (LMDH) al medio de reacción que contiene la muestra de vino, el tampón, la coenzima Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NAD<sup>+</sup>), un exceso de L-glutamato (L-Glu) y la enzima Glutamato Oxaloacetato Transaminasa (GOT), el ácido L-málico (MA) se transforma completamente primero en oxaloacetato (OAA) y luego en L-Aspartato (L-Asp), y el NAD<sup>+</sup> en su correspondiente forma reducida (NADH). Esta reacción implica que la producción de NADH será estequiométrica con la concentración inicial de MA, lo que permite su cuantificación midiendo el aumento de absorbancia a 365 nm. Si luego se añade fumarasa (FUM), el FA se transforma primero en MA. El cual seguirá las mismas transformaciones previamente descritas lo que generará un segundo incremento de la concentración de NADH que es estequiométrico con la concentración inicial de FA, lo que permite cuantificarlo determinando un segundo aumento de absorbancia a 365 nm.

## Protocolo para la cuantificación de ácido fumárico mediante el método enzimático propuesto.

Todas las muestras han de ser centrifugadas y diluidas 1:10 con agua de calidad ultrapura (Milli-Q) para ajustar la concentración de

El uso de ácido fumárico (E297) a una dosis máxima de 0,6 g/L para inhibir la fermentación maloláctica en vinos ha sido aprobado recientemente por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV)<sup>1</sup> y por la Unión Europea (UE)<sup>2</sup>. Este artículo describe un método enzimático recientemente publicado para determinar simultáneamente ácido L-málico y ácido fumárico<sup>3</sup>. Este método, muy sencillo y eficaz, utiliza un kit enzimático comercial para ácido L-málico y añade una etapa complementaria en la que se añade la enzima fumarasa para transformar el ácido fumárico en ácido L-málico.

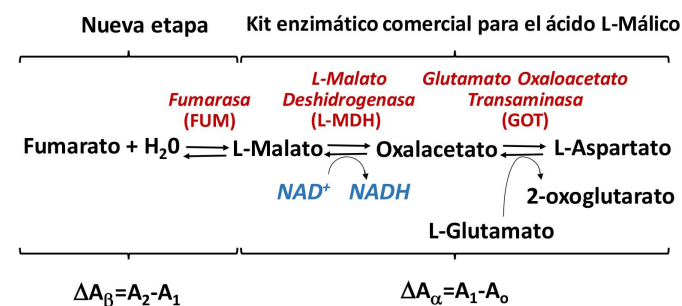


FIGURA 1. Mecanismo de acción del método enzimático para la cuantificación de ácido fumárico.

TABLA 1. Protocolo para las cuantificaciones de ácido fumárico y L-málico.

	Pipetear en la cubeta	Volumen (µL)	
		Ensayo convencional	Ensayo para vinos con más de 4 g/L de MA
Solución 1	Ácido L-Glutámico (100 mM) en tampón glicilglicina, pH 10	400	400
Solución 1*	Acido L-Glutámico(300 mM) en Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> al 2%	0	200
Solución 2	Solución de NAD <sup>+</sup> (55 mM)	80	150
Solución 3	GOT (400 Unidades enzimáticas/mL)	4	4
Muestra	Vino, blanco (agua) o patrón (sol. 5)	40	40
Agua destilada	Agua de calidad ultrapura Milli-Q	360	90
Mezclar y leer la absorbancia a 365 nm después de 5 minutos (A <sub>0</sub> )			
Solución 4	L-MDH (6.000 Unidades enzimáticas/mL)	4	4
Mezclar y leer la absorbancia a 365 nm después de 5 minutos (A <sub>1</sub> )			
Fumarasa	FUM (1.125 Unidades enzimáticas/mL)	5	5
Mezclar y leer la absorbancia a 365 nm después de 50 minutos (A <sub>3</sub> )			

ambos ácidos (MA y FA) a la sensibilidad del kit comercial L-málico. Todas las lecturas de absorbancia se realizaron a 365 nm porque a esta longitud de onda el coeficiente de absorción molar del NADH es adecuado para trabajar solo con una dilución de 1:10. Trabajar a 334 o 340 nm requeriría diluciones innecesariamente mayores. En la tabla 2 se muestra el protocolo final adaptado en el que existen dos



opciones en función de la concentración de L-málico de la muestra. El procedimiento analítico es una adaptación del descrito por el fabricante del kit enzimático L-málico comercial.

Las soluciones 1 a 4 son las correspondientes al kit comercial. La solución de fumarasa contiene 1120 unidades enzimáticas/mL. La solución 1\* es una solución de ácido L-glutámico (300 mM) que debe usarse solo cuando la concentración de ácido L-málico de la muestra es superior a 4 g/L.

Las concentraciones finales de MA y FA se calculan mediante las siguientes ecuaciones que se obtuvieron teniendo en cuenta el volumen de muestra utilizado para la medición, el volumen final en cubeta, el factor de dilución utilizado en la muestra y el coeficiente de absorptividad molar de NADH a 365 nm.

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

## Linealidad del método propuesto en diferentes matrices

La Figura 2 muestra los resultados obtenidos para las concentraciones de MA y FA en los diferentes medios de matriz estudiados: solución sintética de vino modelo sin suplementación con ácido L-málico (Figura 2A), solución sintética de vino modelo con suplementación de ácido L-málico (Figura 2B), vino blanco (Figura 2C), vino tinto sin suplemento de ácido L-málico (Figura 2D), vino tinto con suplemento

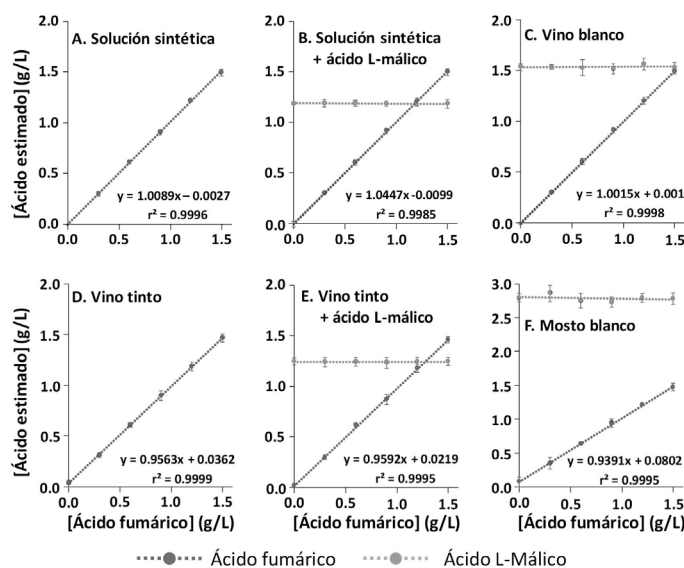


FIGURE 2. Determinación de los ácidos fumárico y L-málico en diferentes matrices.

de ácido L-málico (Figura 2E) y jugo de uva blanca (Figura 2E).

Estos gráficos muestran que, en todas las matrices estudiadas, la concentración de FA presentó coeficientes de regresión lineal satisfactorios (r<sup>2</sup> entre 0,9985 y 0,9999). Además, las pendientes de las líneas de regresión estaban muy cerca de 1 (entre 0,9391 y 1,0447), lo que indica que la recuperación del FA agregado fue casi completa con este método. Por consiguiente, estos resultados confirman que el ácido fumárico puede analizarse eficazmente utilizando el método enzimático propuesto.

## Conclusiones

El método enzimático propuesto para el análisis del ácido fumárico ha demostrado ser eficiente y suficientemente robusto en diferentes matrices (solución sintética, vino blanco, vino tinto e incluso mosto de uva blanca). Incluyendo tan solo una nueva etapa (la adición de la enzima fumarasa) al proceso del kit comercial, es posible determinar de manera eficiente concentraciones de ácido fumárico en un rango entre 0 y 1,5 g/L, lo que cubre ampliamente la dosis máxima autorizada de este ácido (0,6 g/L). El método también permite determinar el ácido L-málico, ya que los primeros pasos son precisamente los que se utilizan cuando se analiza este ácido con el kit comercial. Sin embargo, si la concentración de L-málico de la muestra es muy alta ( $\geq 4$  g/L), es necesario aplicar una sencilla modificación de este método y aumentar las concentraciones de L-glutamato y NAD<sup>+</sup>.

Además, este nuevo método es relativamente rápido (1 hora), fácil de usar y económico (alrededor de 5 €/muestra). Por todo ello creemos que este nuevo método enzimático puede proponerse como análisis de rutina para ácido fumárico en bodegas. ■

**Financiación:** Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto CAVA No-FML (Operación 16.01.01 de Grupos Operativos de Proyectos, Programa de Desarrollo Rural (Regional) – Cataluña).

Información extraída del artículo de investigación "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. doi:10.20870/oeno-one.2021.55.3.4825