



Un metodo semplice ed efficace per il dosaggio enzimatico dell'acido fumarico nei vini

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

Prodotti chimici e strumenti necessari

- Uno spettrofotometro in grado di misurare nell'ultravioletto (365 nm).
- Cuvette monouso in polimetilmetacrilato (PMMA), gamma di lunghezze d'onda applicabili 300-900 nm, cammino ottico 10 mm.
- Una centrifuga da banco e tubi da centrifuga adatti.
- Strumenti per la misura dei volumi e pipette automatiche da 10-50, 50-200 e 200-1000 µL.
- Un kit enzimatico commerciale per il dosaggio dell'acido L-malico (r-Biopharm®, Art. No: 10139068035, Darmstadt, Germania).
- Fumarasi da cuore di maiale (Rif: F1757, 2500 unità, Sigma-Aldrich).
- L-glutamato di sodio.1H₂O (99%) (CAS: 6106-04-3).

Meccanismo d'azione della reazione enzimatica

Il metodo enzimatico proposto si basa sulla classica quantificazione dell'acido L-malico mediante kit enzimatico con l'aggiunta di un nuovo step catalizzato dall'enzima fumarasi (EC 4.2.1.2). Questo enzima trasforma in modo reversibile l'acido fumarico (FA) in acido L-malico, consentendo così il dosaggio dell'acido fumarico utilizzando il kit per l'analisi dell'acido L-malico convenzionale.

La figura 1 mostra il suo meccanismo d'azione.

In breve, quando la L-malato deidrogenasi viene aggiunta al mezzo di reazione contenente il campione di vino, il tampone, il coenzima nicotinamide adenin dinucleotide (NAD⁺), un eccesso di L-glutamato (L-Glu) e l'enzima glutammato-ossalacetato transaminasi (GOT), l'acido L-malico (AM) viene completamente trasformato in ossalacetato (OAA) e in NAD⁺ nella sua corrispondente forma ridotta (NADH). Ciò significa che la formazione di NADH sarà stechiometrica rispetto alla concentrazione iniziale di AM, il che consentirà di quantificarla misurando l'aumento dell'assorbanza a 365 nm. Se a reazione completata si aggiunge la fumarasi (FUM), l'AF si trasforma in AM, che viene poi trasformato, prima in OAA e poi in acido L-aspartico, secondo la reazione enzimatica sopra descritta. Si determina così un secondo aumento della concentrazione di NADH, stechiometrico con la concentrazione iniziale di AF, che può essere quantificata determinando un secondo aumento dell'assorbanza a 365 nm.

Protocollo di quantificazione dell'acido fumarico utilizzando il metodo enzimatico proposto

Tutti i campioni sono stati centrifugati e diluiti 1:10 con acqua ultra pura Milli-Q per regolare la concentrazione dei due acidi (AM e

L'uso dell'acido fumarico (E297), alla dose massima di 0,6 g/L, per inibire la fermentazione malolattica nei vini è stato recentemente approvato dall'Organizzazione Internazionale della Vigna e del Vino (OIV)¹ e dall'Unione Europea (UE)². Questo articolo descrive un metodo enzimatico pubblicato di recente per analizzare simultaneamente gli acidi L-malico e fumarico³. Tale metodo, molto semplice ed efficace, utilizza il metodo di dosaggio dell'acido L-malico, mediante un kit enzimatico commerciale, addizionato di un passaggio supplementare in cui viene aggiunto l'enzima fumarasi per trasformare l'acido fumarico in acido L-malico.

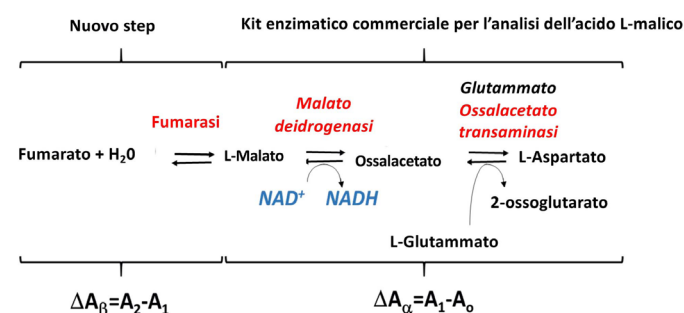


FIGURA 1. Meccanismo d'azione del dosaggio enzimatico dell'acido fumarico.

TABELLA 1. Procedura per la quantificazione degli acidi fumarico e L-malico.

Pipettare nella cuvetta	Volume (µL)		
	Dosaggio convenzionale	Dosaggio per vini con più di 4 g/L di AM	
Soluzione 1	Acido L-Glutammico (100mM) in tampone glicilfina, pH 10	400	400
Soluzione 1*	Acido L-Glutammico (300mM) in Na2CO3 (2%, p/v)	0	200
Soluzione 2	Soluzione NAD+ (55 mM)	80	150
Soluzione 3	GOT (400 U/mL)	4	4
Campione/Standard	Fino, Bianco (acqua distillata) o standard (sol. 5)	40	40
Acqua	Qualità Ultrapura Milli-Q	360	90
Mescolare, incubare 5 min a 25°C. Leggere l'assorbanza a 365 nm (A0), poi aggiungere			
Soluzione 4	L-MDH (6,000 U/mL)	4	4
Mescolare, incubare 5 min a 25°C. Leggere l'assorbanza a 365 nm (A1), poi aggiungere			
Fumarasi	FUM (1,125 U/mL)	5	5
Mescolare, leggere l'assorbanza a 365 nm dopo 50 minuti (A2)			

AF) in base alla sensibilità del kit commerciale per l'acido L-malico. Tutte le misure d'assorbanza sono state effettuate a 365 nm perché a questa lunghezza d'onda il coefficiente di estinzione molare del NADH è adatto per lavorare con una diluizione 1:10. Lavorare a 334 o 340 nm richiederebbe inutilmente delle diluizioni maggiori. La tabella 2 mostra il protocollo finale adattato in cui ci sono due opzioni a seconda della concentrazione di acido L-malico del campione. La procedura analitica è un adattamento di quella descritta dal produttore del kit enzimatico commerciale per l'acido L-malico.

Le soluzioni da 1 a 4 sono quelle corrispondenti al kit commerciale. La soluzione di fumarasi contiene 1120 unità enzimatiche/mL. La soluzione 1* è una soluzione di acido L-glutammico (300 mM) da utilizzare solo quando la concentrazione di acido L-malico nel campione è maggiore di 4 g/L.

Le concentrazioni finali di AM e AF possono essere calcolate utilizzando le seguenti equazioni, ottenute tenendo conto del volume del campione utilizzato per la misura, del volume finale nella cuvetta, del fattore di diluizione utilizzato per il campione e del coefficiente di estinzione molare del NADH a 365 nm.

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

Linearità del metodo proposto per diverse matrici

La Figura 2 presenta i risultati ottenuti per le concentrazioni di AM e AF in diverse matrici: soluzione modello di vino senza aggiunta di acido L-malico (Figura 2A), soluzione modello di vino con aggiunta di acido L-malico (Figura 2B), vino bianco (Figura 2C), vino rosso senza aggiunta di acido L-malico (Figura 2D), vino rosso con aggiunta di

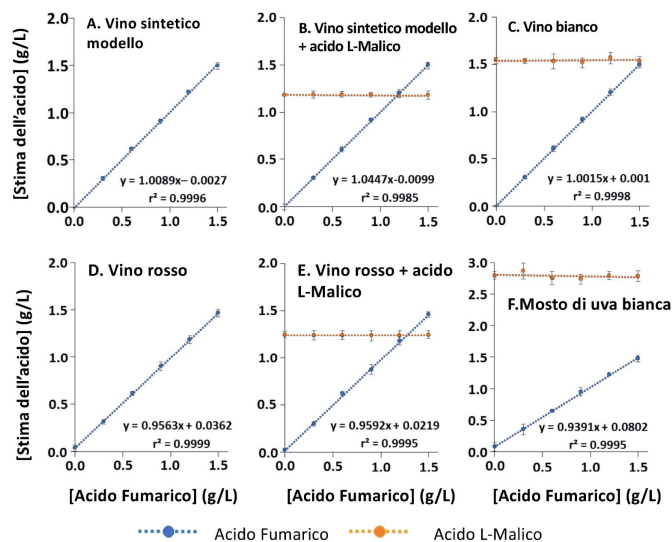


FIGURA 2. Dosaggi di acido fumarico e L-malico in diverse matrici.

acido L-malico (Figura 2E) e mosto d'uva bianca (Figura 2F). Questi grafici mostrano che in tutte le matrici studiate, la concentrazione di AF ha mostrato coefficienti di regressione lineare soddisfacenti (r^2 tra 0,9985 e 0,9999). Inoltre, le pendenze delle rette di regressione sono molto vicine a 1 (tra 0,9391 e 1,0447), indicando che, con questo metodo, il recupero dell'AF aggiunto è stato quasi totale. Questi risultati confermano quindi che l'AF può essere analizzato con successo utilizzando il nuovo metodo enzimatico proposto.

Conclusioni

Il metodo enzimatico proposto per l'analisi dell'acido fumarico si è dimostrato efficace e sufficientemente robusto in diverse matrici (soluzione sintetica, vino bianco, vino rosso e persino mosto d'uva bianca). Includendo un unico nuovo passaggio (l'aggiunta dell'enzima fumarasi) al protocollo di dosaggio dell'acido L-malico mediante kit enzimatico commerciale, è possibile determinare efficacemente le concentrazioni di acido fumarico nell'intervallo tra 0 e 1,5 g/L, che copre ampiamente la dose massima autorizzata dall'OIV per quest'acido (0,6 g/L). Il metodo consente inoltre di dosare l'acido L-malico, poiché i primi passaggi sono proprio quelli utilizzati durante l'analisi di tale acido utilizzando il kit commerciale. Tuttavia, se la concentrazione di acido L-malico del campione è molto elevata (≥ 4 g/L), è necessario applicare una modifica di questo metodo, che richiede l'aumento delle concentrazioni di L-glutammato e NAD^+ .

Inoltre, questo nuovo metodo è relativamente veloce (1 ora), semplice da implementare e utilizzare, oltre che economico (circa 5€/campione). Per tutti questi motivi, riteniamo che questo nuovo metodo enzimatico possa essere proposto come analisi di routine per la determinazione dell'acido fumarico in enologia. ■

Finanziamento: Questo lavoro di ricerca è stato finanziato dal progetto CAVA No-FML (Operazione 16.01.01 dei Progetti dei Gruppi Operativi, Programma di Sviluppo Rurale (Regionale) – Catalogna).

Fonte: articolo scientifico "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>