

Über eine enzymatische Äpfelsäurebestimmung in Wein und Traubensaft

Autor(en): **Mayer, K. / Busch, Ingrid**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und
Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **54 (1963)**

Heft 1

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982725>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Über eine enzymatische Äpfelsäurebestimmung in Wein und Traubensaft

Von K. Mayer und Ingrid Busch, Eidg. Versuchsanstalt Wädenswil

Das vergangene Jahrzehnt brachte die Aufklärung zahlreicher Mechanismen enzymkatalysierter Reaktionen. Die Voraussetzung zu der noch anhaltend sprunghaften Entwicklung auf diesem Gebiet der Biochemie bildet eine zunehmend verfeinerte Technik bei der Enzymgewinnung. Es gelingt heute, eine ganze Anzahl Fermente in hochgereinigter Form herzustellen. Bereits seit einiger Zeit finden sich verschiedene standardisierte Enzympräparate im Handel; damit eröffnet sich die Möglichkeit, diese biochemischen Reagentien vermehrt als analytische Hilfsmittel einzusetzen. Eine seit kurzem erhältliche, aus tierischem Gewebe (Schweineherz) gewonnene L(-)-Malatdehydrogenase* war für uns wegen der von diesem Ferment katalysierten Reaktion

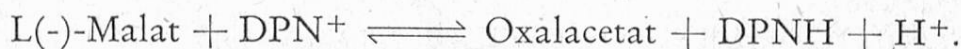


im Zusammenhang mit Äpfelsäurebestimmungen in Getränken von besonderem Interesse. Bekanntlich stehen einer raschen, rein chemischen Äpfelsäurebestimmung in natürlichen Substraten in Gegenwart weiterer Säuren (z. B. Wein-, Milch-, Zitronen- und Bernsteinsäure in Weinen) verschiedene Hindernisse entgegen. Der Umstand, daß es sich bei der natürlich vorkommenden Äpfelsäure ausschließlich um die L(-)-Form handelt, eröffnete die prinzipielle Möglichkeit, das erwähnte Enzym auch für Äpfelsäurebestimmungen in Getränken einzusetzen.

Bereits vor einiger Zeit beschrieb A. Montag¹ eine enzymatische Malatbestimmung in Wein. Eine wiederholte Überprüfung der von diesem Autor vorgeschlagenen, ebenfalls auf der Dehydrierung von L-Äpfelsäure mit Malatdehydrogenase basierenden Methode ergab bei uns nur wenig befriedigende Ergebnisse; das in wässrigen Lösungen und Wein vorgelegte L-Malat ließ sich durchwegs nur zu etwa 80 % wieder nachweisen. H. J. Hohorst² verwendet zur Malatbestimmung in Blut und Geweben einen Hydrazin/Glyzin/EDTA-Puffer von pH 9,5. Die entstehende Oxallessigsäure wird durch Hydrazinsulfat abgefangen. Unsere Versuche betrafen die Anwendung der von Hohorst vorgeschlagenen Methode bei Malatbestimmungen in Wein und Traubensaft. Es zeigte sich dabei, daß dieses Verfahren, in geringer Weise modifiziert, mit beiden Substraten annehmbare Werte liefert.

Prinzip

Malatdehydrogenase (MDH) katalysiert die Dehydrierung von L(-)-Äpfelsäure durch Diphosphopyridinnucleotid (DPN) gemäß folgender Reaktionsgleichung:



* Herstellerfirma: Böhringer & Söhne G.m.b.H., Mannheim
Schweizer Vertreter: Laevosan AG, Zürich 34

Durch Entfernung der Reaktionsprodukte wird eine extreme Verschiebung des Gleichgewichtes nach der rechten Seite erreicht. Als Fänger für die entstehende Oxalessigsäure dient Hydrazin; die Protonen werden durch das basische Reaktionsmedium (pH 9,5) gebunden. DPN wird im Überschuß vorgelegt.

Nach dem Prinzip des «optischen Tests» von Warburg³ wird die Reaktion $\text{DPN}^+ + \text{H}^+ \longrightarrow \text{DPNH} + \text{H}^+$ spektrophotometrisch gemessen. Der Extinktionskoeffizient (ϵ) für DPNH beträgt für $\lambda = 334 \text{ m}\mu$ $6 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 / \text{Mol}$ ⁽⁴⁾. Vorausgesetzt, die Reaktion sei vollständig abgelaufen, läßt sich somit über die durch das entstandene DPNH bewirkte Extinktionsänderung (ΔE) die pro Küvette vorliegende L-Malatmenge berechnen; es ergibt sich:

$$\mu. \text{ mole L-Malat/Küvette} = \frac{E \cdot \text{Verdünnung}}{\epsilon \cdot d}$$

(d = Küvetten-Schichtdicke in cm)

Experimentelles

Nachdem sich bei verschiedenen Messungen gezeigt hatte, daß das von Hohorst vorgeschlagene Flüssigkeitsvolumen pro Küvette vorteilhaft durch Zusatz von 1 ml dest. H_2O auf total 3,01 ml ergänzt wird, wurde — wenn nicht anders erwähnt — für die Versuche folgende Küvettenbeschickung (Glasküvetten mit 1 cm Schichtdicke) angewendet:

- 0,9 ml Hydrazin/Glycin-Puffer
(7,5 g Glycin, 5,2 g Hydrazinsulfat, 0,2 g Komplexon III,
51 ml NaOH 2N, H_2O ad 100 ml)
- 0,1 ml DPN-Lösung* (40 mg DPN, dest. H_2O ad 1 ml)
- 1,0 ml Probelösung
- 0,02 ml MDH-Suspension
- 1,0 ml dest. H_2O

Die Messungen wurden mit einem Beckmann-Spektrophotometer, Typ D. B., durchgeführt. Die erste Messung erfolgte jeweils unmittelbar vor dem Enzymzusatz. Nach dem Beimischen der MDH-Suspension wurden die Röhrchen während der angegebenen Zeitspanne in einem Wasserbad mit entsprechender Temperatur inkubiert, worauf nach Abkühlen auf 25°C ein zweites Mal gemessen wurde. Zur Herstellung der Testlösungen wurde L(-)-Äpfelsäure, zweimal umkristallisiert, verwendet. Eine Enteiweißung des Untersuchungsmaterials, wie sie Hohorst² bei Blutuntersuchungen vornimmt, erübrigte sich bei unseren Substraten.

A. Äpfelsäurebestimmungen in wässrigen Lösungen

Ein Versuch mit 30 μg L-Malat/Küvette zeigte, daß die Verdoppelung der Enzym- oder DPN-Menge die «Ausbeute» nach 20minütiger Inkubation bei 37°C

* DPN (freie Säure) von Firma Böhringer & Söhne G.m.b.H., Mannheim

nicht mehr zu steigern vermochte. In Anbetracht der bereits zufriedenstellend knappen Reaktionsdauer verzichteten wir darauf, eine weitere Verkürzung der Inkubationszeit anzustreben. Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1

Reaktionsablauf bei verschiedenen DPN- und MDH-Mengen bzw. Inkubationszeiten

Vorgelegtes L-Malat: 30 µg/Küvette
 Flüssigkeitsvolumen/Küvette: 2,02 bzw. 2,12 bzw. 2,04 ml
 $\lambda = 334 \text{ m}\mu$ $t = 37^\circ \text{C}$

DPN- und MDH- Beschickung/Küvette	ΔE 15 min.	ΔE 20 min.	ΔE 30 min.	L-Malat wiedergefunden nach 20 min. (%)
0,1 ml DPN, 0,02 ml MDH	0,634	0,654	0,654	98,4
0,2 ml DPN, 0,02 ml MDH	0,648	0,658	0,658	103,9
0,1 ml DPN, 0,04 ml MDH	0,630	0,635	0,635	96,5

Bei einem weiteren Experiment wirkte sich die Erhöhung der Inkubations-temperatur von 25°C auf 37°C vorteilhaft aus: Nach 20 min. Inkubationsdauer wurden von 20 µg vorgelegtem Malat/Küvette bei 25°C 91,25 %, bei 37°C hin-gegen 98,75 % (Durchschnitt von je 2 Parallelen) wiedergefunden.

B. Äpfelsäurebestimmungen in Wein

Als Versuchswein diente ein «Räuschling Auslese» 1961, der nach 15stündiger Behandlung bei 30°C mit einer Schizosaccharomyces pombe-Hefe (einem Orga-nismus, welcher Äpfelsäure, nicht aber Milch-, Wein- und Zitronensäure ab-baut⁽⁴⁾) keine Äpfelsäure mehr enthielt. Einige Analysendaten dieses Weines: 4,7 ‰ titrierbare Säure (berechnet als Weinsäure), 0,37 ‰ flüchtige Säure, 138 mg Gesamt-SO₂/l, 8 mg freie SO₂/l, Alkohol 11,0 Vol. ‰, Weinsäure 0,8 ‰, Milch-säure 2,22 ‰, Zucker 3,5 g/l. Dem erwähnten Wein wurde L-Äpfelsäure so zu-dosiert, daß in den 200fachen wässrigen Weinverdünnungen 1 — 40 µg Äpfel-säure/ml vorlagen. In Tabelle 2 sind die gefundenen Daten wiedergegeben.

Tabelle 2

Nachweis verschiedener L-Äpfelsäuremengen in Wein

Vorgelegtes Malat/Küvette µg	ΔE 20 min.	entspricht wiedergefundenem Malat µg	%
3	0,043	2,90	96,7
5	0,075	5,06	101,2
10	0,147	9,92	99,2
20	0,297	20,05	100,2
30	0,440	29,67	99,0
40	0,575	38,81	97,0

Küvetten-Flüssigkeitsvolumen: 3,02 ml

Aus den Zahlen in Tabelle 2 geht hervor, daß bei einigen Messungen im Bereich von 3 — 40 µg Malat je Küvette die mittlere Abweichung zum tatsächlich vorgelegten L-Malat 1,6 % betrug. Störungen der Bestimmung durch andere in Weinen normalerweise vorkommende Verbindungen schienen auf Grund dieser und ähnlicher Versuche wenig wahrscheinlich. Es lag uns indessen daran, allfällige Störmöglichkeiten rechtzeitig zu erfassen; insbesondere interessierte der Einfluß größerer Begleitmengen an Zitronen-, Bernstein-, Essig- und Ascorbinsäure, freier SO₂, Aethanol und Glucose. Die Ergebnisse eines entsprechenden Versuches finden sich in Tabelle 3.

Tabelle 3

Nachweis von L-Äpfelsäure in Wein in Gegenwart einiger normalerweise in Wein vorkommenden, hier erhöht dosierter Begleitsubstanzen

Weinverdünnung: 1 : 200
Küvetten-Flüssigkeitsvolumen: 2,02 ml⁽¹⁾ bzw. 3,02 ml⁽²⁾

	ΔE 20 min.	L-Äpfelsäure nachgewiesen µg	%
20 µg L-Äpfelsäure	0,430	19,4	97,1 ⁽¹⁾
20 µg L-Äpfelsäure + 100 mg SO ₂ frei/l	0,442	19,96	99,8 ⁽¹⁾
20 µg L-Äpfelsäure + 100 g Glucose/l	0,438	19,8	99,0 ⁽¹⁾
20 µg L-Äpfelsäure + 120 ml Aethanol/l*	0,453	20,5	102,3 ⁽¹⁾
20 µg L-Äpfelsäure + 2 g Zitronensäure/l	0,299	20,2	100,9 ⁽²⁾
20 µg L-Äpfelsäure + 2 g Bernsteinsäure/l	0,301	20,3	101,5 ⁽²⁾
20 µg L-Äpfelsäure + 2 g Ascorbinsäure/l	0,296	20,0	100,0 ⁽²⁾
20 µg L-Äpfelsäure + 2 g Essigsäure	0,299	20,2	100,9 ⁽²⁾

Es zeigte sich, daß weder die natürlicherweise in Wein vorkommenden, hier «überdosierte» beigegebenen Begleitstoffe, noch die gelegentlich als Enzymgift wirkende schweflige Säure die Bestimmung stören. Neben den in obiger Tabelle aufgeführten Verbindungen wurden ferner K-Ferrocyanid (10 mg/l) und Actidion (2 mg/l) auf eine allfällige Beeinflussung der Reaktion hin geprüft; in beiden Fällen war das Resultat negativ.

Die Stereospezifität der verwendeten L-Malatdehydrogenase wurde ferner durch Bestimmungen an 10, 20, 30 und 40 µg DL-Äpfelsäure (umkristallisiert, Exsikkator-getrocknet) in 1 ml 200facher Weinverdünnung bestätigt: es ließen sich dabei 4,99, 10,06, 14,99 und 19,65 µg L-Äpfelsäure wiederfinden, was ziemlich genau der Hälfte des vorgelegten Äpfelsäure-Razemats entspricht.

C. Äpfelsäurebestimmungen in Traubensaft

Gelegentlich kann der Fall eintreten, daß bei Traubensaftuntersuchungen neben dem Wein- und Gesamtsäuregehalt auch die quantitative Erfassung der Äpfelsäure erwünscht ist. Wir überprüften deshalb die bei Wein angewendete

* Total 23,0 Vol.% Aethanol

Methode auch an einem solchen Getränk. Verwendet wurde ein weißer Saft (Gemisch aus Riesling $\times$ Sylvaner, Elbling und Räuschling), dessen ursprünglich vorhandene Äpfelsäure mit Hilfe von Milchsäurebakterien (Stamm «Pf₁») nahezu vollständig abgebaut, d. h. zu Milchsäure dekarboxyliert worden war. Nachfolgend einige Analysendaten dieses Traubensaftes (Mengen pro l): 3,30 g Weinsäure, 2,58 g Milchsäure, 6,00 g flüchtige Säure*, 11,55 g titrierbare Säure (berechnet als Weinsäure), 102 g Zucker. Dem Traubensaft wurde wiederum L(-)-Äpfelsäure so zugegeben, daß die 200fache Verdünnung mit dest. H₂O 1—40 µg/ml enthielt. In Tabelle 4 sind die erhaltenen Werte aufgeführt.

Tabelle 4

Nachweis von L-Äpfelsäure im Traubensaft
Flüssigkeitsvolumen/Küvette: 3,02 ml

Vorgelegtes Malat/Küvette µg	ΔE 20 min.	entspricht wiedergefundener Äpfelsäure µg	%
3	0,046	3,10	103,4
5	0,075	5,06	101,2
10	0,145	9,80	97,9
20	0,293	19,78	98,9
30	0,438	29,56	98,5
40	0,557	37,59	94,0

Es ergibt sich somit, daß die angewendete Methode auch mit Traubensaft akzeptable Werte liefert. Die mittlere Abweichung im Bereich von 3 — 40 µg Malat/Küvette lag bei 2,5 %, was besagt, daß mit einer 200fachen Verdünnung der Proben ~~in~~ 0,6 — 8,0 g L-Äpfelsäure pro 1000 ml Originalgetränk hinreichend genau erfassen lassen. Die Möglichkeit, bei Bedarf den Bereich nach oben oder unten auszudehnen, ist durch entsprechend anders gewählte Verdünnungen weitgehend vorhanden. Beispielsweise konnten mit den 50 und 100fachen Verdünnungen in einem nahezu äpfelsäurefreien Traubensaft noch 20 mg L-Äpfelsäure/l nachgewiesen werden.

Störmöglichkeiten

Der DPNH-Extinktionskoeffizient für 334 mµ ist temperaturabhängig. Ein genaues Einhalten der gewählten Meßtemperatur ist somit wichtig. Lange Reaktionszeiten, z. B. über 30 min., ergeben häufig zu kleine Werte. Diese Erscheinung ist vermutlich auf eine gewisse Autoxydation von DPNH zurückzuführen⁽²⁾.

Schließlich sei noch festgehalten, daß Malatbestimmungen nach der vorliegenden Methode einen verhältnismäßig geringen Aufwand für die benötigten

* Bei den zugesetzten Bakterien handelte es sich um heterofermentative Lactobacillen, welche auf Glucose-haltigen Substraten neben Milchsäure auch Essigsäure bilden.

Chemikalien erfordern: Die Fermentkosten (MDH, DPN) betragen für 10 Bestimmungen ca. Fr. 2.20.

Zusammenfassung

Es wird eine einfache, nur kleine Probemengen benötigende enzymatische L-Äpfelsäurebestimmung beschrieben, welche auf der Dehydrierung von Äpfelsäure und einer entsprechenden Reduktion von DPN beruht. Die sehr spezifische Methode gestattet 3 — 40 µg L-Äpfelsäure/Küvette hinreichend genau zu erfassen; dies entspricht bei einer beispielsweise 200fachen Substratverdünnung und 1 ml Probelösung/Küvette einer Äpfelsäuremenge von 0,6 — 8,0 g/l ursprünglichem (unverdünntem) Probematerial.

Résumé

Description d'une méthode de dosage enzymatique, simple, de l'acide l-malique basée sur la déshydrogénation de cet acide et la réduction correspondante du DPN. Cette méthode est spécifique et permet de doser de manière suffisamment exacte de 3 à 40 µg d'acide l-malique/cuvette; ceci correspond — pour une dilution du substrat de, par exemple, 200 fois et pour 1 ml de solution à examiner/cuvette — à une quantité d'acide malique de 0,6 à 8,0 g/l de la substance initiale (non diluée) examinée.

Summary

Description of a simple and specific enzymatic method for the determination of l-malic acid, the principle of which is the dehydrogenation of l-malic acid and the corresponding reduction of DPN.

Literatur

- 1 A. Montag: 1959. Beiträge zur enzymatischen und chemischen Bestimmung von Milchsäure und Äpfelsäure in Wein. Diss. T. H. Aachen.
- 2 H.-J. Hohorst: 1962. L-(-)Malat-Bestimmung mit Malatdehydrogenase und DPN. In: H. U. Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, 1962, p. 328, Verlag Chemie G.m.b.H., Weinheim.
- 3 O. Warburg und W. Christian: 1936. Pyridin, der wasserstoffübertragende Bestandteil von Gärungsfermenten (Pyridinnukleotide). Biochem. Z., **287**, 291.
- 4 K. Mayer und A. Temperli: 1963. The metabolism of L-malate and other compounds by *Schizosaccharomyces pombe* (in Druck).