

Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène
Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit
Band: 56 (1965)
Heft: 5

Artikel: Eine enzymatische Citronensäure-Bestimmung
Autor: Mayer, K. / Pause, G.
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-982205>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 09.01.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Eine enzymatische Citronensäure-Bestimmung

(Vorläufige Mitteilung)

K. Mayer und G. Pause, Eidg. Versuchsanstalt Wädenswil

Enzymatische Verfahren besitzen den Vorzug, eine rasche und sichere Bestimmung gelegentlich auch von solchen Substanzen zu ermöglichen, welche sich mit Hilfe konventionell-chemischer Methoden nur unsicher oder unter größerem Arbeitsaufwand erfassen lassen. Eine Vorbehandlung der Proben ist im Falle von eiweißarmem Untersuchungsmaterial — z. B. der hier besonders interessierenden Weine und Fruchtsäfte — nicht notwendig; die Analysen lassen sich ferner ohne weiteres an größeren Serien, z. B. 10 Proben, durchführen, wodurch der Arbeitsaufwand je Probe klein bleibt. So haben wir in den letzten Jahren bei Getränke- und Gärsubstratuntersuchungen mit enzymatischen L-Äpfelsäure- und Glycerin- (vgl. [1] und [2]), des öfteren auch mit Restglucose- und L-Milchsäurebestimmungen vorzügliche Erfahrungen gemacht.

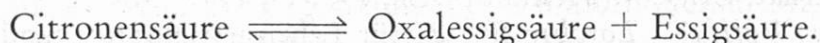
Eine weitere in Weinen und Fruchtsäften vorkommende, nur mit verhältnismäßig aufwendiger Methodik quantitativ nachzuweisende Verbindung ist die Citronensäure. Die genaue Erfassung der Citronensäure ist bei Fruchtsäften und Weinen — bei letzteren in Zusammenhang mit dem biologischen Säureabbau — hin und wieder erwünscht, ebenso im Falle von Gärversuchen, wo beispielsweise das gebräuchliche, an sich bequeme papierchromatographische Verfahren zu wenig genaue Werte ergibt.

Vor kurzem erhielten wir von einem deutschen Unternehmen*, welches in den letzten Jahren bereits zahlreiche für analytische Zwecke geeignete Fermentpräparate auf den Markt brachte, ein Muster des neuen Enzyms Citrat-Lyase. Die damit anhand verschiedener Messungen erhaltenen Resultate befriedigten auf Anhieb, so daß das Verfahren nachstehend kurz besprochen werden soll.

Prinzip

(nach Gruber und Moellering [3])

Das Enzym Citrat-Lyase, gewonnen aus Bakterien der Gattung *Aerobacter aerogenes*, katalysiert die Reaktion



Das Reaktionsprodukt Oxalessigsäure wird mittels Malat-Dehydrogenase durch DPNH (reduziertes Diphosphopyridinnucleotid) hydriert, eine Reaktion,

* Herrn Dr. H. U. Bergmeyer, Firma C. F. Boehringer & Söhne GmbH, Biochemische Abteilung, Tutzing (Obb., Deutschland) danken wir für das uns überlassene Citrat-Lyase-Muster auch an dieser Stelle bestens.

die sich nach dem klassischen Prinzip des «optischen Tests» nach *Warburg* im Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von z. B. 340 m μ quantitativ erfassen läßt. Die durch DPNH-Oxydation bewirkte Extinktionsabnahme ist somit ein Maß für die in der Probe vorliegende Citratmenge. Enthält die Citrat-Lyase Oxalacetat-Decarboxylase, entsteht neben Oxalacetat auch Pyruvat. Sicherheits- halber setzt man daher als Indikatorenzym neben Malatdehydrogenase (MDH) auch Lactat-Dehydrogenase (LDH) ein. Für die Wirkung der Citrat-Lyase sind Zink-Ionen notwendig.

Reagenzien und Lösungen

Alle Lösungen mit Glas-destilliertem Wasser herstellen.

Triaethanolamin-Puffer (0,1 M, pH = 7,6):

4,65 g Triaethanolamin-HCl werden in ca. 200 ml Wasser gelöst, mit 4,5 ml 2N NaOH auf pH 7,6 eingestellt und mit Wasser ad 250 ml aufgefüllt.

DPNH (ca. 0,01 M):

10 mg DPNH-Na₂ in 1 ml Wasser lösen.

Zinkchlorid (ca. 0,03 M):

40 mg Zinkchlorid (trocken) mit 10 ml Wasser und 0,1 ml 2 N HCl lösen.

Lactat-Dehydrogenase (LDH) *.

Malat-Dehydrogenase (MDH) *.

Citrat-Lyase: 10 mg Protein/ml 0,01 M Triäthanolamin-Puffer, enthaltend 4 mg ZnCl₂/ml.

Haltbarkeit der Lösungen:

Die DPNH-Lösung kann 3 Wochen bei 0 ° C (nicht unterhalb 0 ° C) aufbewahrt werden; die Enzym-Suspensionen sind bei 0 ° C mehrere Monate haltbar.

Citronensäure läßt sich in Wein und Fruchtsäften ohne Vorbehandlung (Enteweißung) des Untersuchungsmaterials nachweisen. Gemäß den Firma-Angaben verläuft die Reaktion spezifisch; sie wird vor allem durch folgende Verbindungen nicht gestört: Isocitronen-, Cis-Aconit-, Bernstein-, Fumar-, α -Ketoglutar-, L-Glutamin-, Wein-, Äpfel-, Essig- und Ascorbinsäure, Glucose, Fructose, Aethanol, Salizyl- und Benzoesäure.

Bestimmungsansatz:

Meßwellenlänge: 340 m μ , Schichtdicke: 1 cm, Meßvolumen: 3,0 ml.

Die Bestimmung erfolgt in Raumtemperatur.

Die optische Dichte der Flüssigkeit in der Bezugsküvette wird durch DPNH-Zusatz der jeweiligen Probe angepaßt, so daß die Messung im optimalen, d. h. möglichst auseinandergezogenen Bereich der Spektrophotometer-Skala erfolgt.

* Die Enzyme Lactat-Dehydrogenase und Malat-Dehydrogenase — beides Produkte der Firma Boehringer & Söhne GmbH, Mannheim — sind in der Schweiz erhältlich bei Firma Laevosan AG, Postfach, 8034 Zürich.

Nacheinander werden in die Küvette pipettiert:

2,70 ml Puffer, 0,06 ml DPNH-Lösung, 0,01 ml Zinkchlorid-Lösung, 0,02 bis 0,2 ml Probe, dest. Wasser ad 2,97 ml.

Mit unten abgeflachtem Kunststoffstab mischen, Extinktion E_1 ablesen, weiter einmischen:

0,01 ml LDH-Suspension.

0,01 ml MDH-Suspension.

In der Probe vorhandenes Pyruvat und Oxalacetat reagiert innerhalb ca. 3 Min. und kann gegebenenfalls getrennt bestimmt werden (E_2). Hierauf weiter einmischen:

0,01 ml CL-Suspension.

Citronensäure reagiert innerhalb von 3—5 Min. zum Endwert E_3 .

Es ergibt sich: $E_3 - E_2 = \Delta E_{\text{Citr.}}$

Als notwendig erwiesen sich in unserem Fall Blindwert-Bestimmungen mit 0,2 dest. Wasser anstelle von Probe; der ΔE -Wert für Citronensäure wird um den erhaltenen Blindwert korrigiert.

Berechnung

Allgemein ist $\frac{\Delta E \cdot V}{\epsilon \cdot d \cdot v} = \mu\text{mole/ml Probe}$,

wobei: ϵ = Extinktionskoeffizient von DPNH = $6,22 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$ für $\lambda = 340 \text{ m}\mu$

d = Küvettschichtdicke, hier 1 cm

V = Testvolumen, hier 3 ml

v = Volumen der eingesetzten Probe, hier 0,2 ml

Unter Voraussetzung eines bereits um den Blindwert korrigierten ΔE -Wertes für Citrat ergibt sich somit (Molekulargewicht von Citronensäure: 192,1):

$$\text{mg Citronensäure/ml Probe} = \frac{\Delta E_{\text{Citr.}} \cdot 3 \cdot 192,1}{6,22 \cdot 10^3 \cdot v}$$

$$= \Delta E_{\text{Citr.}} \cdot \frac{0,092}{v}$$

Eine Überprüfung der Methode an wässrigen Citronensäurelösungen ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Merck, 1 Stunde bei 105°C getrocknet), zwei säureabgebauten Weinen und einem Traubensaft ergab nachstehende Ergebnisse.

Tabelle 1
Enzymatische Citronensäurebestimmung an wässrigen Citratlösungen

mg Citronensäure/l H ₂ O				
	50	100	250	400
E ₂	0,473	0,330	0,536	0,893
E ₃	0,383	0,145	0,014	0,030
Δ E _C	0,090	0,185	0,522	0,863
+ Bl. w.	0,108 ¹	0,217 ²	0,540 ¹	0,881 ¹
mg/l	50,0	100,5	250,2	408,1

Tabelle 2
Enzymatische Citronensäurebestimmungen an zwei säureabgebauten Weinen und einem Traubensaft, je ohne und mit zugesetzter Citronensäure

	Weißwein (Räuschling 1965)		Rotwein (Clevner 1965)		Traubensaft (weiß)	
		+ 100 mg Citronen- säure/l		+ 100 mg Citronen- säure/l		+ 100 mg Citronen- säure/l
E ₂	0,392	0,408	0,760	0,740	0,434	0,601*
E ₃	0,385	0,187	0,282	0,045	0,111	0,068
Δ E _C	0,007	0,221	0,478	0,695	0,323	0,533
+ Bl. w.	0,039 ²	0,253 ²	0,510 ²	0,727 ²	0,355 ²	0,565 ²
mg/l	18,1	117,2	236,3	336,8	164,5	261,7
Diff. (mg/l)	—	99,1	—	100,5	—	97,2

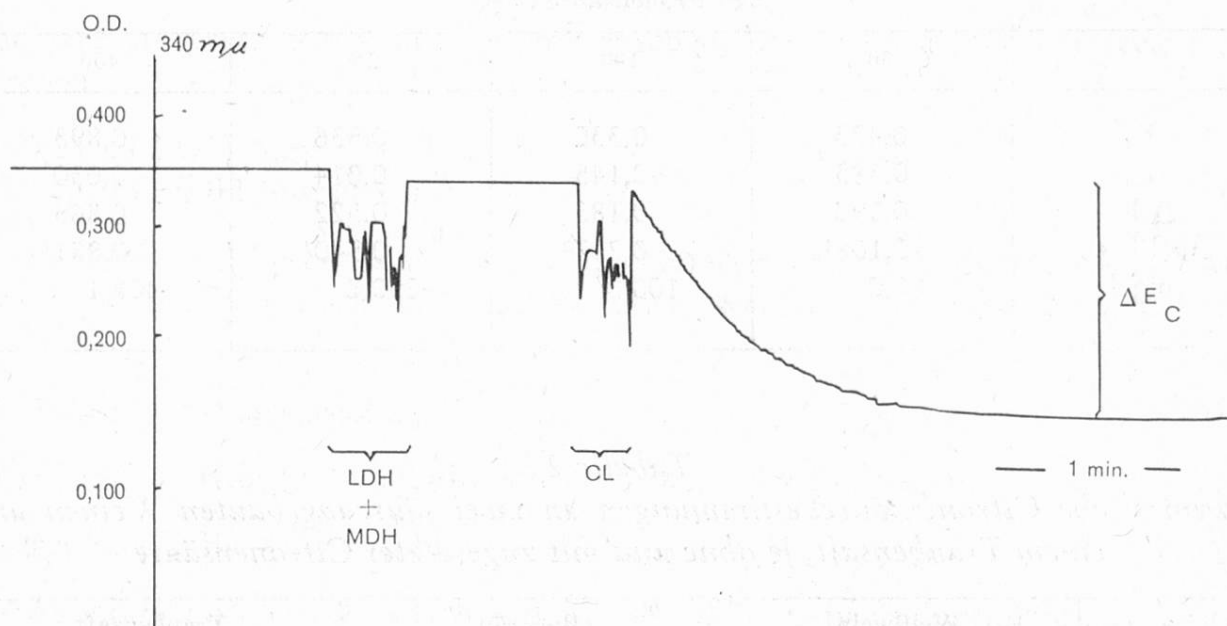
(Blindwerte: ¹ = 0,018, ² = 0,032)

(* = O.D.₃₄₀ mμ-Startwert durch DPNH-Zugabe höhergestellt)

Zur Veranschaulichung des Reaktionsablaufs wurde die Extinktionsabnahme im Falle der Konzentration 100 mg Citrat/l Wasser mit Schreibgerät (Beckman recorder) aufgezeichnet. In der nachstehend wiedergegebenen Abbildung bezeichnen LDH + MDH und CL die Zeitpunkte der betreffenden Enzym-Zugaben.

Wie obige Angaben zeigen, ließen sich die in Wasser, Wein und Traubensaft vorgelegten Citratmengen sehr genau wiederfinden. Der günstige Bereich liegt dabei zwischen 50 und 300 mg Citronensäure/l; höhere Konzentrationen werden zweckmäßig entsprechend verdünnt. Gemäß unseren bis jetzt gemachten, allerdings noch beschränkten Erfahrungen scheint sich die beschriebene Methode zu bewähren. Über weitere bei der Anwendung dieser enzymatischen Citronensäurebestimmung an Weinen und Fruchtsäften erhaltene Ergebnisse werden wir in Kürze berichten.

Abbildung 1
Verlauf der enzymatischen DPNH-Oxydation mit 100 mg Citronensäurell
(0,2 ml Probenmenge)



Zusammenfassung

Eine einfache, nur kleine Probenmengen benötigende enzymatisch-photometrische Citronensäurebestimmung wird anhand wässriger Citronensäurelösungen sowie in Wein und Traubensaft überprüft. Die sehr spezifische Methode gestattet, an 0,2 ml Analysenflüssigkeit Konzentrationen von 50—300 mg Citronensäure/l genau zu erfassen; bei höheren Konzentrationen werden entsprechend verdünnte bzw. kleinere Probevolumen eingesetzt.

Résumé

Description d'une méthode de dosage enzymatique-spectrométrique de l'acide citrique. Cette méthode est simple, très spécifique, exacte et ne requiert que de petites quantités (0,2 ml) de substance; elle a été essayée avec succès sur des solutions aqueuses d'acide citrique ainsi que sur deux vins et un jus de raisin, avec et sans addition d'acide citrique.

Summary

Description of a method for the determination of citric acid in wine and grape juice, based on the use of an enzyme and of spectrophotometry. This method is simple, specific, accurate and requires only small quantities (0,2 ml) of wine or juice.

Literatur

1. K. Mayer und Ingrid Busch: Über eine enzymatische Äpfelsäurebestimmung in Wein und Traubensaft. *Diese Mitt.* **54**, 60 (1963).
2. K. Mayer und Ingrid Busch: Über eine enzymatische Glycerinbestimmung in Traubensaft und Wein. *Diese Mitt.* **54**, 297 (1963).
3. W. Gruber und H. Möllering: *Analytical Biochemistry* (in Druck).