

# Megazyme

---

## ÁCIDO L-MÁLICO (L-MALATO)

### PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

K-LMALR (58 Ensayos por Kit)

K-LMALL (116 Ensayos por Kit)

11/05

*Este folleto se puede conseguir en*  
**[www.megazyme.com](http://www.megazyme.com)** en los siguientes idiomas:  
**Inglés-Francés-Alemán-Italiano-Portugués**



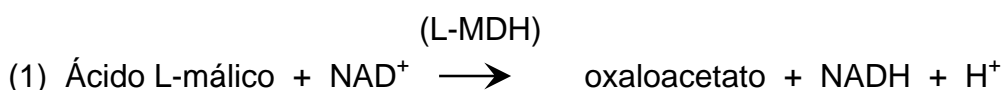
## INTRODUCCIÓN:

Como componente del ciclo del ácido cítrico, el ácido L-málico (L-malato) se encuentra en todos los organismos vivos. Su determinación cuantitativa es especialmente importante en la elaboración del vino, cerveza, pan, fruta y productos vegetales, así como en productos de cosmética y farmacéuticos. Es uno de los ácidos más importantes de la fruta, y tiene la concentración más alta de todos los ácidos en el vino. En la industria vinícola, el nivel de ácido L-málico se supervisa, junto con el ácido L-láctico, durante la fermentación maloláctica. El ácido L-málico tiene muchas aplicaciones como conservante alimentario (E296) compuesto aromatizante, como en la elaboración de bebidas bajas en calorías.

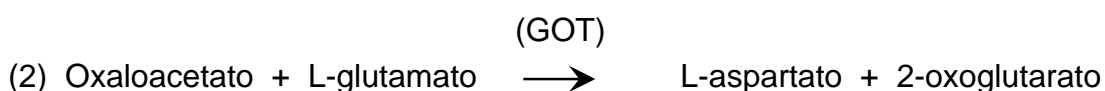
Este folleto describe el método espectrofotométrico para la determinación cuantitativa del ácido L-málico. Sin embargo, Megazyme también dispone de un método alternativo específico para las pequeñas empresas vinícolas, basado en un colorímetro muy barato el MegaQuant<sup>TM</sup> (véase producto G-LMALMQ). También se ha optimizado un tercer kit del ácido L-málico para aplicaciones de auto-análisis (véase producto K-LMALAF). Para más información sobre estos procedimientos alternativos, consulte el folleto pertinente en [www.megazyme.com](http://www.megazyme.com).

## PRINCIPIO:

La detección del ácido L-málico requiere dos reacciones enzimáticas. En la primera reacción catalizada por L-malato deshidrogenasa (L-MDH), el ácido L-málico se oxida en oxaloacetato por la nicotinamida-adenina dinucleotido (NAD<sup>+</sup>) (1).



Sin embargo, dado que el equilibrio de la reacción (1) cae en favor del ácido L-málico y NAD<sup>+</sup>, se requiere una reacción adicional para "atrapar" el NADH, lo cual se consigue convirtiendo el oxaloacetato en L-aspartato y 2-oxoglutarato, en presencia de un exceso de L-glutamato, por glutamato-oxaloacetato transaminasa (GOT) (2).



La cantidad de NADH que se forma en la doble reacción anterior es estequiométrica con la cantidad de ácido L-málico. Lo que se mide es el NADH, por el aumento de la capacidad de absorción a 340 nm.

**Los métodos basados en este principio** son recomendados por IFU, AIJN, MEBAK y OIV y aprobados por AOAC International. El método se incluye en las legislaciones sobre alimentos de muchos países y en la normativa europea.

### **ESPECIFICIDAD, SENSIBILIDAD, LINEALIDAD Y PRECISIÓN:**

El ensayo es específico para el ácido L-málico. Los ácidos D-málico, L-láctico, L-aspártico y fumárico no reaccionan.

El diferencial de absorción menor del ensayo es de 0,005 unidades. Esto corresponde a 0,12 mg/L de la solución de muestra a un volumen máximo de muestra de 2 mL (o a 2,49 mg/L con un volumen de muestra de 0,1 mL). El límite de detección es de 0,25 mg/L, que se deriva de un diferencial de absorción de 0,010 con un volumen máximo de muestra de 2,0 mL.

El ensayo es lineal a lo largo del intervalo de 0,5 a 30 µg de ácido L-málico por ensayo. En determinaciones dobles utilizando una solución de muestra, se puede producir una diferencia de absorción de 0,005 a 0,010. Con un volumen de muestra de 0,10 mL, esto corresponde a una concentración de ácido L-málico de aproximadamente entre 2,49 y 4,98 mg/L de solución de muestra. Si la muestra se diluye durante su preparación, el resultado se multiplica por el factor de dilución, F. Si en la preparación de la muestra, la muestra se pesa, por ejemplo, 10 g/L, cabe esperar una diferencia entre 0,02 a 0,05 g/100 g.

### **INTERFERENCIA:**

Si la conversión de ácido L-málico se ha completado en el tiempo especificado en el ensayo (aprox. 3 min), en general se puede concluir que no se ha producido ninguna interferencia. Sin embargo, se puede hacer otra comprobación añadiendo ácido L-málico (aprox. 15 µg en 0,1 mL) en la cubeta, cuando se complete la reacción. Se debería observar un aumento significativo de la absorción.

Las sustancias que interfieren en la muestra analizadas se pueden identificar incluyendo un estándar interno. Cabe esperar una recuperación cuantitativa de este estándar. Las pérdidas por manipulación y extracción de la muestra se pueden identificar realizando experimentos de recuperación, es decir, añadiendo ácido L-málico a la muestra en las fases iniciales de la extracción. Se ha incluido en el ensayo polivinilpirrolidona para evitar la inhibición de los polifenólicos (taninos) en la muestra.

## SEGURIDAD:

En general, los reagentes utilizados en la determinación del ácido L-málico no son materiales peligrosos según el Reglamento de Sustancias Peligrosas.

Sin embargo, el concentrado tampón contiene azida de sodio 0,02 % (w/v) como conservante. Es necesario observar todas las medidas generales de seguridad que se aplican a todas las sustancias químicas.

## KITS:

Megazyme dispone de kits idóneos para realizar 58 y 116 determinaciones. Los kits contienen el método completo de ensayo además de:

### Kit para 58 determinaciones (cat. no. K-LMALR)

- Botella 1:** Tampón glicilglicina (6 mL, 1 M, pH 10,0) más L-glutamato (1 M) y azida de sodio 0,02 % (w/v) como conservante.  
Estable durante > 2 años a 4°C.
- Botella 2:** NAD<sup>+</sup> (380 mg) más PVP (60 mg) .  
Estable durante > 5 años a -20°C.
- Botella 3:** Suspensión de Glutamato-oxaloacetato transaminasa (1,25 mL, 600 U/mL).  
Estable durante > 2 años a 4°C.
- Botella 4:** Suspensión de L-Malato deshidrogenasa (1,25 mL, 15000 U/mL).  
Estable durante > 2 años a 4°C.
- Botella 5:** Solución de ácido L-málico estándar (5 mL, 0,15 mg/mL).  
Estable durante > 2 años a 4° C.

### Kit para 116 determinaciones (cat. no. K-LMALL)

- Botella 1:** Tampón glicilglicina (12 mL, 1 M, pH 10,0) más L-glutamato (1 M) y azida de sodio 0,02 % (w/v) como conservante.  
Estable durante > 2 años a 4°C.
- Botella 2: (x2)** NAD<sup>+</sup> (380 mg) más PVP (60 mg) .  
Estable durante > 5 años a -20°C.
- Botella 3:** Suspensión de Glutamato-oxaloacetato transaminasa (2,5 mL, 600 U/mL).  
Estable durante > 2 años a 4°C.
- Botella 4:** Suspensión de L-Malato deshidrogenasa (2,5 mL, 15000 U/mL).  
Estable durante > 2 años a 4°C.
- Botella 5:** Solución de ácido L-málico estándar (5 mL, 0,15 mg/mL).  
Estable durante > 2 años a 4° C.

## PREPARACIÓN DE SOLUCIONES/SUSPENSIONES DE REAGENTES:

1. Use el contenido de la botella 1 según se suministra.  
Estable durante > 2 años a 4°C.
2. Diluya el contenido de la botella 2 en 6 mL de agua destilada. Divídala en partes alícuotas del tamaño adecuado y guárdelas en tubos de polipropileno a -20°C entre uso y uso y en hielo mientras lo está utilizando. No disuelva el contenido de la segunda botella (kit de solo 116 determinaciones) hasta que sea necesario. Una vez diluido, el reagente es estable durante > 2 años a -20°C.
- 3 & 4. Use el contenido de la botella 3 y 4 según se suministra. Antes de abrir por primera vez, agite la botella para eliminar cualquier enzima que se haya quedado en el tapón de goma. A continuación, guarde las botellas en posición vertical. **Agite la botella para que se mezcle su contenido antes de utilizarlo.**  
Estable durante > 2 años a 4°C.
5. Use el contenido de la botella 5 según se suministra.  
Estable durante > 2 años a 4°C.

**NOTA:** La solución estándar de ácido L-málico solo se utiliza en el ensayo cuando existe alguna duda sobre la precisión del espectrofotómetro que se está utilizando o cuando se sospecha que las sustancias que intervienen en la muestra están produciendo una inhibición. La concentración de ácido L-málico se determina directamente a partir del coeficiente de extinción de NADH (véase página 6).

## EQUIPO (RECOMENDADO):

1. Tubos de vidrio de prueba (con la base redonda; 16 x 100 mm).
2. Cubetas de plástico desechables (paso de luz de 1 cm, 3 mL).
3. Micropipetas, p. ej. Gilson Pipetman<sup>®</sup> (20 µL y 100 µL).
4. Pipeta de desplazamiento positivo p.ej. Eppendorf Multipette<sup>®</sup>  
- con 5 mL de Combitip<sup>®</sup> (para administrar partes alícuotas de 0,1 mL de tampón de glicilglicina y solución NAD<sup>+</sup>).  
- con 25 mL de Combitip<sup>®</sup> (para administrar partes alícuotas de 2,0 mL de agua destilada).
5. Balanza de precisión.
6. Espectrofotómetro a 340 nm.
7. Agitador vibrador de tubos Vortex (p.ej. Agitarod de tubos de prueba IKA<sup>®</sup> Yellowline TTS2).
8. Cronómetro.
9. Papeles filtro Whatman No.1 (9 cm).

**PROCEDIMIENTO:**

**Longitud de onda:** 340 nm  
**Cubeta:** paso de luz de 1 cm (vidrio o plástico)  
**Temperatura:** ~ 25°C  
**Volumen final:** 2,34 mL  
**Solución de muestra:** 0,5-30 µg de ácido L-málico por cubeta  
(en 0,10-2 mL de volumen de muestra)

**Medir contra corriente de aire** (sin cubeta en el paso de luz) o agua

| Pipeta en cubetas  | Muestra sin tratar | Muestra |
|--|--------------------|---------|
| agua destilada (~ 25°C)  | 2,10 mL            | 2,00 mL |
| muestra  | –                  | 0,10 mL |
| solución 1 (tampón de glicilglicina)   | 0,10 mL            | 0,10 mL |
| solución 2 (NAD <sup>+</sup> /PVP)   | 0,10 mL            | 0,10 mL |
| suspensión 3 (GOT)   | 0,02 mL            | 0,02 mL |
| Mezcle*, lea la absorción de las soluciones (A <sub>1</sub> ) transcurridos aproximadamente 3 min e inicie las reacciones añadiendo: |                    |         |
| suspensión 4 (L-MDH)   | 0,02 mL            | 0,02 mL |
| Mezcle*, lea las absorciones de las soluciones (A <sub>2</sub> ) al final de la reacción (aprox. 3 min).                             |                    |         |

\* por ejemplo con una espátula de plástico o dándole la vuelta con cuidado después de tapan la cubeta con tapa o Parafilm®.

### CALCULO:

Calcule las diferencias de absorción ( $A_2-A_1$ ) de la muestra sin tratar y la muestra. Reste la diferencia de absorción de la muestra sin tratar de la diferencia de absorción de la muestra, obteniendo con ello  $\Delta A_{\text{ácido L-málico}}$ .

El valor de  $\Delta A_{\text{ácido L-málico}}$  por regla general deberá ser de al menos 0,100 unidades de absorción para conseguir resultados suficientemente precisos.

$$c = \frac{V \times MW}{\varepsilon \times d \times v} \times \Delta A_{\text{ácido L-málico}} \quad [\text{g/L}]$$

### Donde:

V = volumen final [mL]

MW = peso molecular del ácido L-málico [g/mol]

$\varepsilon$  = coeficiente de extinción de NADH a 340 nm  
= 6300 [l x mol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>]

d = paso de luz [cm]

v = volumen de muestra [mL]

### Sigue para el ácido L-málico:

$$c = \frac{2,34 \times 134,09}{6300 \times 1,0 \times 0,10} \times \Delta A_{\text{ácido L-málico}} \quad [\text{g/L}]$$

$$= 0,4980 \times \Delta A_{\text{ácido L-málico}} \quad [\text{g/L}]$$

Si la muestra se ha diluido durante la preparación, el resultado se debe multiplicar por el factor de dilución, F.

Cuando se analicen muestras sólidas o semisólidas que se pesan para preparar la muestra, el contenido (g/100 g) se calcula a partir de la cantidad pesada de la siguiente forma:

### Contenido de ácido L-málico

$$= \frac{C_{\text{ácido L-málico}} [\text{g/L solución de muestra}]}{\text{peso}_{\text{muestra}} [\text{g/L solución de muestra}]} \times 100 \quad [\text{g/100 g}]$$

**NOTA:** Estos cálculos se pueden simplificar utilizando la aplicación **Mega-Calc**<sup>TM</sup> de Megazyme, que se puede descargar desde la página web donde aparece el producto ([www.megazyme.com](http://www.megazyme.com)).

## PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

### 1. Dilución de la muestra.

La cantidad de ácido L-málico en la cubeta (es decir, en los 0,1 mL de muestra que se está analizando) deberá situarse entre 0,5 y 30 µg. La solución de muestra por tanto se debe diluir lo suficiente como para conseguir una concentración de ácido L-málico entre 0,005 y 0,30 g/L.

**Tabla de dilución**

| Concentración estimada de ácido L-málico (g/L) | Dilución con agua       | Factor de dilución (F) |
|--|-------------------------|------------------------|
| < 0,3  | No se requiere dilución | 1                      |
| 0,30-3,0                                       | 1 + 9                   | 10                     |
| 3,0-30   | 1 + 99                  | 100                    |
| > 30   | 1 + 999                 | 1000                   |

Si el valor de  $\Delta A_{\text{ácido L-málico}}$  es demasiado bajo (p.ej. < 0,100), pese más muestra o diluya con menos fuerza. Como alternativa, la muestra que se debe verter en la cubeta se puede aumentar a 2,0 mL, asegurándose de que los componentes de la muestra y el agua destilada en la reacción sumen 2,1 mL, utilizando el nuevo volumen de muestra en la ecuación.

### 2. Clarificación de la muestra.

#### a. Soluciones:

**Solución Carrez I.** Disuelva 3,60 g de hexacianoferrato de potasio (II)  $\{K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O\}$  (Sigma cat. no. P-9387) en 100 mL de agua destilada. Guárdelo a temperatura ambiente.

**Solución Carrez II.** Disuelva 7,20 g de sulfato de cinc  $(ZnSO_4 \cdot 7H_2O)$  (Sigma cat. no. Z-4750) en 100 mL de agua destilada. Guárdelo a temperatura ambiente.

**Hidróxido sódico (NaOH, 100 mM).** Disuelva 4 g de NaOH en 1 L de agua destilada. Guárdelo a temperatura ambiente.

#### b. Procedimiento:

Vierta la muestra líquida en un matraz de 100 mL que contenga aproximadamente 60 mL de agua destilada, o pese suficiente cantidad de muestra en un matraz de 100 mL y añada 60 mL de agua destilada. Añada con cuidado 5 mL de solución Carrez I, 5 mL de solución Carrez II y 10 mL de solución de NaOH (100 mM). Mezcle cada vez que añada un componente. Llene el matraz hasta la marca, mezcle y filtre.



### 3. Consideraciones generales.

**(a) Muestras líquidas:** muestras claras, ligeramente coloreadas y aproximadamente neutras se pueden utilizar directamente en el ensayo.

**(b) Muestras ácidas:** Si se va a analizar más de 0,1 mL de muestra ácida sin diluir (como vino o fruta), el pH de la solución se debe aumentar a 9,0 aproximadamente, utilizando 2 M NaOH, y la solución incubada a temperatura ambiente durante 30 min.

**(c) Dióxido de carbono:** las muestras que contengan una cantidad significativa de dióxido de carbono, como la cerveza, se deben desgasificar aumentando el pH a 9,0 aproximadamente con 2 M NaOH y agitando suavemente o removiéndolo con una varilla de vidrio.

**(d) Muestras coloreadas:** puede que sea necesario realizar una muestra adicional sin tratar, es decir, una muestra sin L-MDH, en caso de muestras coloreadas.

**(e) Muestras muy coloreadas:** Si se utilizan sin diluir, las muestras muy coloreadas se deben tratar añadiendo 0,2 g de PVPP/10 mL de muestra. Agite durante 5 minutos y a continuación filtre con papel Whatman No. 1.

**(f) Muestras sólidas:** homogeneizar o triturar muestras sólidas en agua destilada y filtrar si fuera necesario.

**(g) Muestras que contengan grasas:** extraiga dichas muestras con agua caliente a una temperatura por encima del punto en que se derrite la grasa, por ejemplo, en un matraz de 100 mL. Ajuste a temperatura ambiente y llene el matraz hasta la marca con agua destilada. Guárdelo en hielo o en un frigorífico durante 15-30 min y a continuación fíltrelo. Tire los primeros mL de lo que filtre, y utilice el sobrenadante claro (que puede estar ligeramente opalescente) para el ensayo. Otra alternativa es clarificar con reagentes Carrez.

**(h) Muestras que contengan proteína:** desproteíne las muestras que contengan proteína añadiendo un volumen igual de hielo 1 M de ácido perclórico con mezcla. Centrifuge a 1.500 g durante 10 min y neutralice el sobrenadante con 1 M KOH. De forma alternativa puede utilizar reagentes Carrez.

### EJEMPLOS PARA PREPARAR LAS MUESTRAS:

#### **(a) Determinación del ácido L-málico en el vino.**

La concentración de ácido L-málico [F] en el vino tinto y blanco en general se puede determinar sin tratar la muestra (salvo mediante dilución, según la tabla de dilución). Normalmente una dilución de 1:10 y un volumen de muestra de 0,1 mL es adecuado.

### **(b) Determinación del ácido L-málico y sus derivados esterificados en el vino.**

La concentración de ácido L-málico libre y esterificado [F + E] en vino blanco se puede determinar de la siguiente forma: añada 6 mL de 2 M NaOH en 20 mL de vino y caliente bajo reflujo durante 30 min sin remover. Después de enfriar, ajuste con cuidado el pH de la solución a 10,0 con 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y ajuste el volumen a 50 mL con agua destilada. Analice la muestra según el procedimiento general. El concentrado obtenido es la suma del ácido L-málico libre y esterificado [F + E], y por tanto la concentración de ácido L-málico esterificado solo [E] se puede calcular de la siguiente forma:

$$[E] = ([F + E] - [F]) \quad [g/L]$$

### **(c) Determinación del ácido L-málico en el zumo de fruta, concentrados y bebidas similares.**

La concentración de ácido L-málico en soluciones claras y neutrales en general se puede determinar sin tratar la muestra (salvo mediante dilución, según la tabla de dilución). Los líquidos turbios en general solo hay que filtrarlos antes de la fase de dilución. Las soluciones coloreadas en general se pueden utilizar para el análisis después de diluirlas en una concentración adecuada de ácido L-málico. Sin embargo, si dichas soluciones coloreadas requieren un análisis sin diluir, se pueden descolorar de la siguiente forma: añada 0,2 g de PVPP/10 mL de muestra; agite bien el tubo durante 5 minutos y a continuación filtre con papel Whatman No. 1. Utilice la solución que ha filtrado clara o ligeramente coloreada en el ensayo. *Normalmente una dilución de 1:50 y un volumen de muestra de 0,1 mL es adecuado.*

### **(d) Determinación del ácido L-málico en la cerveza.**

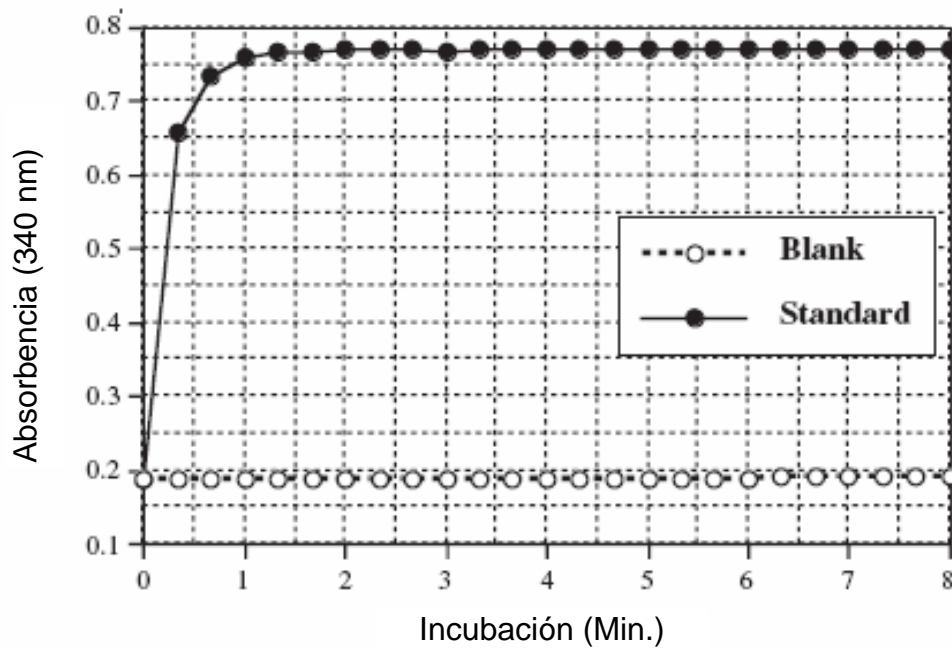
Elimine el dióxido de carbono removiendo con varilla de vidrio suavemente y diluyéndolo si fuera necesario. *Normalmente, no se requiere dilución y un volumen de muestra de 0,1 mL es adecuado.*

### **(e) Determinación del ácido L-málico en alimentos sólidos.**

Homogeneice aproximadamente 10 g de alimento sólido utilizando un mortero o una batidora eléctrica. Extraiga 2 g aproximadamente de material representativo (pesado con precisión) en 40 mL de agua destilada durante 30 min, calentándolo a 60°C donde sea necesario. Traslade cuantitativamente el extracto a un matraz de 50 mL y ajuste el volumen con agua destilada. Filtre la solución turbia y diluya su fiera necesario.

## REFERENCIAS:

1. Mollering, H. (1985). L-Malate. In *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., ed.), 3rd ed., **Vol.VII**, pp. 39-47, VCH Publishers (UK) Ltd., Cambridge, UK.
2. AOAC Official Methods of Analysis (2002). Method 993.05 "L-Malic acid/total malic acid ratio in apple juice". 17th ed., Chapter 37, p. 15.
3. Gorin, N. (1976). Differences in L-malate determined enzymatically or titrimetrically in golden delicious apples. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, **162**, 259-261.
4. Klopper,W. J., Angelino, S. A. G. F.,Tuning, B. & Vermeire, H. A. (1986). Organic acids and glycerol in beer. *J. Inst. Brew.* **92**, 225-228.
5. Elkins, E. R. & Freund,W. (1994). Detection of adulteration in apple juice by L-malic/total malic acid ratio: Collaborative Study. *J. AOAC Int.* **77**, 411-415.



**Figura 1.** Aumento en la absorción a 340 nm en la incubación de 30 µg de ácido L-málico con L-malato deshidrogenasa en presencia de NAD<sup>+</sup>.

**NOTA:**

El procedimiento de ensayo descrito anteriormente requiere la utilización de un espectrofotómetro UV/Visible para poder medir la absorción a 340 nm. Dado que es posible que las pequeñas empresas vinícolas no dispongan de dicho equipo, hemos modificado el procedimiento de ensayo para incluir una reacción adicional en la que se emplea diaforasa para catalizar la formación de un INT-formazan (un compuesto de color rojo) del NADH e INT (cromuro de idonitrotetrazolio). Esta reacción es cuantitativa y la producción del compuesto de color rojo permite utilizar un simple colorímetro. Megazyme ofrece este producto (K-LMALMQ) y el colorímetro con los reagentes (G-LMALMQ) en formato 'Ácido L-Málico - MegaQuant™'.

**NOTAS:**



**Megazyme International Ireland Ltd.,  
Bray Business Park, Bray,  
Co. Wicklow,  
IRLANDA**

**Teléfono: (353.1) 286 1220**

**Fax: (353.1) 286 1264**

**Página Web: [www.megazyme.com](http://www.megazyme.com)**

**Correo electrónico: [info@megazyme.com](mailto:info@megazyme.com)**

---

**SIN GARANTÍA**

La información contenida en este librete está, al mejor de nuestro conocimiento, verdad y exacto, pero puesto que las condiciones del uso están más allá de nuestro control, de ninguna garantía se da o se implica por lo que se refiere a cualquier recomendación o sugerencia que puedan ser hechas o que ningún uso no infringirá ninguna patentes.