

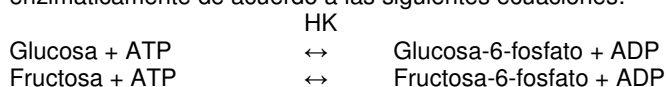
KIT DE ANÁLISIS ENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA Y FRUCTOSA EN JUGO DE UVA Y EN VINO

PRODUCTO

Producto número 4A145, permite 100 análisis, sólo para el uso *in vitro*.

PRINCIPIO

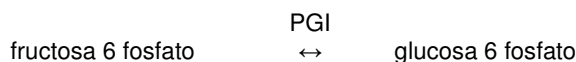
La glucosa y la fructosa son los azúcares principales que se encuentran en jugo de uva y en vino, y se determinan enzimáticamente de acuerdo a las siguientes ecuaciones:



La glucosa y la fructosa reaccionan con trifosfato de adenosina (ATP) en la presencia de la enzima hexocinasa (HK), y forman glucosa-6-fosfato (G6P) y fructosa-6-fosfato (F6P).



La G6P se oxida por dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina (NADP) en gluconato-6-fosfato, usando la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH) como catalizador. La cantidad de NADPH que se forma se mide a 340nm y se relaciona estequiométricamente con la cantidad de glucosa que se consume.



Luego, la enzima fosfoglucosa isomerasa (PGI) se agrega y convierte F6P a G6P. La G6P que se ha formado reacciona con NADP y el NADPH que se determina se relaciona estequiométricamente a la cantidad de fructosa en la muestra.

CONTENIDO

El kit incluye los siguientes reactivos:

Reactivo No.	Reactivo	Preparación	Cantidad	Estabilidad
1	Buffer	Agregue contenido de (una botella de) reagente número 2, coenzimas, en una botella de reagente número 1; mezcle hasta disolverse.	2 x 53 mL	1 año a 4°C 6 meses combinados una vez
2	Coenzimas (ATP/NADP)	Ninguna	2 x 0,35 g	1 año a 4°C
3	G6PDH/HK	Ninguna	2,2 mL	1 año a 4°C
4	PGI	Ninguna	2,2 mL	1 año a 4°C
5	Estándar	Ninguna	3,3 mL	1 año a 4°C

La vida útil del Reactivo no. 1 & 2 se puede extender si se ponen alícuotas en el congelador. No congelar los reactivos de enzima 3 & 4. La falta de mantener los reactivos a la temperatura recomendada reduce su vida útil. Para la concentración del Estándar, refiérase a la etiqueta de la botella.

PROCEDIMIENTOS DE SEGURIDAD

Usar gafas de seguridad

No ingerir el Buffer o el Estándar porque contienen azida de sodio que actúa como estabilizador.

PROCEDIMIENTO

Abertura Común

Longitud de Onda

340 nm

Cubetas

1 cm, cuarzo, silicio, metacrilato o poliestireno

Temperatura

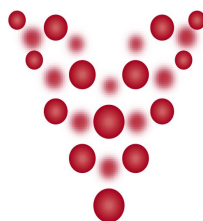
20 – 25°C

Volumen final en cubeta

3,04 mL

Cero

contra aire sin cubeta en el paso de luz



PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras deben diluirse con agua destilada, para asegurar que la concentración en la solución de ensayo no sea más de 1,0 g/L. Con la mayoría de las muestras de vinos secos, una dilución de 1 en 10 es suficiente. Los vinos semidulces pueden necesitar una dilución de 1 en 20 ó 1 en 50, mientras que los vinos de postre y fortificados pueden necesitar una dilución de 1 en 100 ó más.

Como guía general, se requiere más dilución si la medición de absorbancia supera una unidad de absorbancia. Las muestras se pueden usar directamente sin decoloración. Filtrar las muestras turbias en papel de filtro Whatman No. 1.

ANÁLISIS DE LA MUESTRA

a. Pipetear los siguientes volúmenes de reactivos en las cubetas:

Reactivo	Muestra sin tratar	Estándar	Muestra
1. Buffer	1,00 mL (1000 µL)	1,00 mL (1000 µL)	1,00 mL (1000 µL)
Agua Destilada	2,00 mL (2000 µL)	1,90 mL (1900 µL)	1,90 mL (1900 µL)
Muestra / Estándar		0,10 mL (100 µL)	0,10 mL (100 µL)

b. Mezclar bien y leer las absorbancias, A1, después de 3 minutos.

c. Pipetear los siguientes reactivos en las cubetas:

3. G6PDH/HK	0,02 mL (20µL)	0,02 mL (20µL)	0,02 mL (20µL)
-------------	----------------	----------------	----------------

d. Mezclar bien y leer las absorbancias, A2, después de 10 minutos

e. Pipetear el siguiente reactivo en las cubetas:

4. PGI	0,02 mL (20µL)	0,02 mL (20µL)	0,02 mL (20µL)
--------	----------------	----------------	----------------

f. Mezclar bien y leer las absorbancias, A3, después de 10 minutos

CALCULOS*

1. Calcular la absorbancia de la Muestra para la Glucosa:

$$\text{Absorbancia de Glucosa, } A_G = (A_2 - A_1) - (\text{Muestra sin tratar } A_2 - \text{Muestra sin tratar } A_1)$$

2. Calcular la concentración de Glucosa como sigue:

$$\text{Concentración de Glucosa (g/L)} = A_G \times 0,8637 \times \text{Factor de Dilución}$$

3. Hacer lo mismo para el Estándar, sustituyendo las absorbancias del Estándar en el lugar de las absorbancias de las Muestras.

4. Calcular la Absorbancia de la Muestra para la Fructosa:

$$\text{Absorbancia de Fructosa, } A_F = (A_3 - A_2) - (\text{Muestra sin tratar } A_3 - \text{Muestra sin tratar } A_2)$$

5. Calcular la concentración de Fructosa como sigue:

$$\text{Concentración de Fructosa (g/L)} = A_F \times 0,8694 \times \text{Factor de Dilución}$$

6. Sumar los resultados de la Glucosa y la Fructosa para obtener la concentración total de azúcar.

7. Precisión (donde x es la concentración de Glucosa en la Muestra en g/l):

$$\text{repetibilidad } r = 0,056 \times x \quad \text{Reproducibilidad } R = 0,12 + 0,076 \times x$$

* Una hoja de cálculo está disponible para descargar en: www.vintessential.com/enzyme_kits.htm

REFERENCIAS

1. "Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis" OIV, Vol 1, 2006, MA-E-AS311-02-GLUFRU5, p4