



KIT DE ANÁLISIS ENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO EN JUGO DE UVA Y EN VINO

PRODUCTO

Producto no. 4A100, permite 30 análisis, **sólo para el uso *in vitro***.

PRINCIPIO

El ácido acético puede ser un indicador de desperdicio en el vino, y es limitado por regulación en la mayoría de países productores. Se puede determinar enzimáticamente en el vino, controlando la reacción que produce NADH, de acuerdo al total de la siguiente ecuación:



La cantidad de NADH que se forma se mide a 340 nm y se relaciona estequiométricamente a la cantidad de acetato que se consume.

CONTENIDO

El kit contiene los siguientes reactivos:

| Reactivo No. | Reactivo | Preparación | Cantidad | Estabilidad |
|--------------|-------------------------|--|----------|----------------|
| 1 | Buffer | Ninguna | 33 mL | 18 meses a 4°C |
| 2 | Coenzimas (ATP/CoA/NAD) | Ninguna | 6,6 mL | 18 meses a 4°C |
| 3 | CS/MDH | Mezclar con suavidad por inversión antes de usar | 0,4 mL | 18 meses a 4°C |
| 4 | ACS | Mezclar con suavidad por inversión antes de usar | 0,7 mL | 18 meses a 4°C |
| 5 | Estándar | Ninguna | 3,3 mL | 18 meses a 4°C |

La vida útil de los reactivos 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**
- **Reactivo 1 es ligeramente corrosivo**
- **No ingerir el Buffer o el Estándar porque contienen azida de sodio que actúa como estabilizador.**

PROCEDIMIENTO

| | |
|-------------------------|--|
| Longitud de Onda | 340 nm |
| Cubetas | 1cm, cuarzo, silicio, metacrilato o poliestireno |
| Temperatura | 20 – 25°C |
| Volumen final en cubeta | 3,23 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 0,25 g/L. Para las muestras con una concentración más alta, una dilución apropiada debe llevarse a cabo. Como guía general, las mediciones de absorbancia no deben superar una unidad de absorbancia.

Los vinos tintos sin diluir o muestras de jugo muy coloreadas necesitan decoloración. Para decolorar, agregue aproximadamente 0,1 g de PVPP a 5 mL de muestra en un tubo de ensayo. Agite bien por un minuto. La clarificación se consigue si se deja reposar o se filtra 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 μ L) | 1,00 mL (1000 μ L) | 1,00 mL (1000 μ L) |
| 2. Coenzimas | 0,20 mL (200 μ L) | 0,20 mL (200 μ L) | 0,20 mL (200 μ L) |
| Agua Destilada | 2,00 mL (2000 μ L) | 1,90 mL (1900 μ L) | 1,90 mL (1900 μ L) |
| Muestra / Estándar | | 0,10 mL (100 μ L) | 0,10 mL (100 μ L) |

b. Mezclar bien por inversión y leer las absorbancias, A_1 .

c. Pipetear los siguientes reactivos en las cubetas:

| | | | |
|-----------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 3. CS/MDH | 0,01 mL (10 μ L) | 0,01 mL (10 μ L) | 0,01 mL (10 μ L) |
|-----------|----------------------|----------------------|----------------------|

d. Mezclar bien y leer las absorbancias, A_2 , después de 3 minutos.

| | | | |
|--------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 4. ACS | 0,02 mL (20 μ L) | 0,02 mL (20 μ L) | 0,02 mL (20 μ L) |
|--------|----------------------|----------------------|----------------------|

e. Mezclar bien por inversión y leer las absorbancias, A_3 , después de 10-15 minutos, o una vez completada la reacción.

CALCULOS*

1. Calcular las diferencias de absorbancia de la Muestra sin tratar, la Muestra y el Estándar, obteniendo con ello ΔA_1 y ΔA_2 :

$$\begin{aligned} \text{Diferencia de absorbancia, } \Delta A_1 &= A_2 - A_1 \\ \text{Diferencia de absorbancia, } \Delta A_2 &= A_3 - A_1 \end{aligned}$$

2. Calcular el contenido de absorbancia en ácido acético para la Muestra, ΔA_{ac} , usando la fórmula:

$$\Delta A_{ac} = [\Delta A_{2\text{muestra}} - (\Delta A_1)_{\text{muestra}}^2 \div \Delta A_{2\text{muestra}}] - [\Delta A_{2\text{muestra-sin-tratar}} - (\Delta A_1)_{\text{muestra-sin-tratar}}^2 \div \Delta A_{2\text{muestra-sin-tratar}}]$$

3. Hacer lo mismo con el Estándar, sustituyendo las absorbancias del Estándar en el lugar de las absorbancias de la Muestra.

4. Calcular la concentración de ácido acético como sigue:

$$\text{Concentración de ácido acético (g/L)} = \Delta A_{ac} \times 0,308 \times \text{Factor de Dilución}$$

* Una hoja de cálculo está disponible para descargar en:

<http://www.vintessential.com.au/certification/calculation-worksheets/>

REFERENCIAS

1. Bergmeyer, H.U. *et al* 1984, *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed., vol. 6, pp. 639-645; Verlag Chemie, Weinheim.