

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	Coenzymes (ATP/CoA/NAD)	Ninguna	6.6 mL	18 meses a 4°C
3	CS/MDH	Antes de utilizar	0.4 mL	18 meses a 4°C
4	ACS	Antes de utilizar	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.

No 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 la mayoría de las muestras una dilución 1 en 5 debe ser suficiente. Idealmente, las lecturas de absorbancia A3 no deben ser mayores a 1.20 unidades 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	Blanco	Estándar	Muestra
1. Buffer	1,00 mL (1000 µL)	1,00 mL (1000 µL)	1,00 mL (1000 µL)
2. Coenzimas	0,20 mL (200 µL)	0,20 mL (200 µL)	0,20 mL (200 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 por inversión y leer las absorbancias, A_1 .

c. Pipetear los siguientes reactivos en las cubetas:

3. CS/MDH	0,01 mL (10µL)	0,01 mL (10µL)	0,01 mL (10µL)
-----------	----------------	----------------	----------------

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

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

e. Mezclar bien por inversión y leer las absorbancias, A_3 , después de 20 minutos, o una vez completada la reacción.

CALCULOS*

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

$$\text{Diferencia de absorbancia, } \Delta A_1 = A_2 - A_1$$

$$\text{Diferencia de absorbancia, } \Delta A_2 = A_3 - A_1$$

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

$$\Delta A_{ac} = [\Delta A_{2muestra} - (\Delta A_1)_{2muestra} \div \Delta A_{2muestra}] - [\Delta A_{2muestra-sin-tratar} - (\Delta A_1)_{2muestra-sin-tratar} \div (\Delta A_2)_{Blanco}]$$

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 se muestra a continuación:

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

* La hoja de cálculo está disponible para su descarga en

<https://www.vintessential.com.au/resources/calculation-worksheets/>

REFERENCIAS

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