

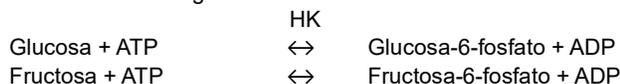
## **KIT DE ANÁLISIS ENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA Y FRUCTOSA EN JUGO DE UVA Y EN VINO**

### **PRODUCTO**

Producto no. 4A140, permite 30 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 el 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, se agrega la enzima fosfoglucosa isomerasa (PGI) y se convierte F6P a G6P. La G6P que se forma, 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 reagente número 2, coenzimas; mezcle para disolver	33 mL	18 meses a 4°C (6 meses combinados una vez)
2	Coenzimas (ATP/NADP)	Ninguna	0,2 g	18 meses a 4°C
3	G6PDH/HK	Agitar suavemente antes de usar	0,7 mL	18 meses a 4°C
4	PGI	Agitar suavemente 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 del Reactivo no. 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
- 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	1cm, 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 una dilución adicional si la lectura final de Absorbancia A3 es superior a 1.20 unidades de absorbancia deben superar 1,20 unidad de absorbancia. Se pueden usar las muestras 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	Blanco	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:

$$\text{Absorbancia de Glucosa, } A_G = (A_2 - A_1) - (\text{Blanco}_{A_2} - \text{Blanco}_{A_1})$$

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:

$$\text{Absorbancia de Fructosa, } A_F = (A_3 - A_2) - (\text{Blanco}_{A_3} - \text{Blanco}_{A_2})$$

5. Calcular la concentración de Fructosa como se muestra a continuación:

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

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.au/certification/calculation-worksheets](http://www.vintessential.com.au/certification/calculation-worksheets)

## REFERENCIAS

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