KIT DE ANÁLISIS ENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO L-MÁLICO EN JUGO DE UVA Y EN VINO

PRODUCTO
Producto número 4A165, **permite 100 análisis, sólo para el uso *in vitro*.**

PRINCIPIO
El ácido L-málico se encuentra en jugo de uva y en vino, y se determina enzimáticamente de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\text{L-malato} + NAD^+ \xleftrightarrow{\text{MDH}} \text{Oxaloacetato} + NADH + H^+$$

El ácido L-málico se oxida por la nicotinamida-adenina dinucleotido (NAD) en oxaloacetato, usando la enzima L-malato-deshidrogenasa (MDH) como catalizador. El equilibrio no favorece la formación de oxaloacetato, y por consiguiente, el oxaloacetato se elimina por una enzima atrapadora. La cantidad de NADH que se forma se mide a 340 nm y se relaciona estequiométricamente con la cantidad de L-malato que se consume. En este método, el glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT) se usa como la enzima atrapadora. En la presencia de L-glutamato, el oxaloacetato se convierte irreversiblemente en L-aspartato.

$$\text{Oxaloacetato} + \text{L-glutamato} \xrightarrow{\text{GOT}} \text{L-aspartato} + \text{A-ketoglutarato}$$

CONTENIDO

Numero Reactivo	Reactivo	Preparación	Cantidad	Estabilidad
1	Buffer	Ninguna	2 x 53 mL	2 año a 4ºC
2	NAD	Agregar 22,0 mL de agua destilada, mezclar hasta disolverse	22,0 mL	2 año a 4ºC (Diluido: 1 año a 4ºC, 2 año a -20 ºC)
3	GOT	Mezclar con suavidad por inversión antes de usar	1,3 mL	2 año a 4ºC
4	MDH	Ninguna	1,3 mL	2 año a 4ºC
5	Estandar	Ninguna	3,3 mL	2 año a 4ºC

El kit contiene los siguientes reactivos:
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.

PROCEDIMIENOS DE SEGURIDAD

- Usar gafas de seguridad
- Reactivo 1 es ligeramente corrosive
- 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 – 25ºC
Volumen final en cubeta	2,22 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 0,4 g/L. Para las muestras con menos de 2 g/L, una dilución de 1 en 5 es suficiente. 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 decolorear, agregar aproximadamente 0,1 g de PVPP a 5 mL de muestra en un tubo de ensayo. Agitar 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. NAD	0,20 mL (200 µL)	0,20 mL (200 µL)	0,20 mL (200 µL)
Agua Destilada	1,00 mL (1000 µL)	0,90 mL (900 µL)	0,90 mL (900 µL)
3. GOT	0,01 mL (10 µL)	0,01 mL (10 µL)	0,01 mL (10 µL)
Muestra / Estándar		0,10 mL (100 µL)	0,10 mL (100 µL)

b. Mezclar bien y leer las absorbancias, A_1, después de 3 minutos.

c. Pipetear el siguiente reactivo en las cubetas:

4. MDH	0,01 mL (10µL)	0,01 mL (10µL)	0,01 mL (10µL)

d. Mezclar bien por suave inversión y leer las absorbancias, A_2, después de 10 minutos.

CALCULOS*

1. Calcular la Absorbancia Neta de la Blanco, la Muestra y el Estándar:

Absorbancia Neta, A_N = $A_2 - A_1$

2.Calcular la Absorbancia Corregida, restando la Absorbancia Neta de la Blanco de la Absorbancia Neta de la Muestra.

Muestra de Absorbancia Corregida, A_C = Muestra A_N – Blanco A_N

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

4. Calcular la concentración de Ácido L-Málico como sigue:

Concentración de Ácido Málico (g/L) = A_C x 0,4725 x Factor de Dilución

5. Precisión (donde x es la concentración de Ácido Málico en la Muestra en g/l):

Repetibilidad r=0,03 + 0,034 x Reproducibilidad R=0,05 + 0,071 x

* La hoja de cálculo está disponible para su descarga en
https://www.vintessential.com.au/resources/calculation-worksheets/

REFERENCIAS

1. “Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis” OIV, Vol 1, 2006, MA-E-AS313-11ALMENZ, p3.

Ninguna parte de esta publicación puede copiarse o reproducirse por ningún medio sin el permiso por escrito de Winechek. Fabricado por Winechek Pty Ltd, 10 Kalimna rd, Nuriootpa, Australia del Sur (AUS). Comuníquese con support@winechek.com o visite www.vintessential.com.au.