

## UTILIDAD DEL TEST

Además de las hexosas monoméricas (glucosa y fructosa), el mosto contiene pequeñas cantidades del disacárido sacarosa, que se hidroliza en fructosa y glucosa por la enzima  $\beta$ -fructosidasa ( $\beta$ -F). El contenido natural de sacarosa en el mosto es relativamente bajo (y cero en el vino terminado), y su adición está específicamente prohibida en algunos países. Sin embargo, la adición de sacarosa es una práctica específica del proceso de la producción de vinos espumosos (segunda fermentación) y en la chaptalización (para aumentar el grado alcohólico artificialmente, en zonas específicamente autorizadas). La determinación del contenido total de azúcar, incluido el derivado de la hidrólisis de la sacarosa, mejora el control del proceso de fermentación tanto a su inicio como al final (azúcares residuales), mejorando el control general del mismo.

## MÉTODO

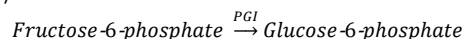
La  $\beta$ -fructosidasa cataliza la hidrólisis de la sacarosa D-glucosa y D-fructosa.



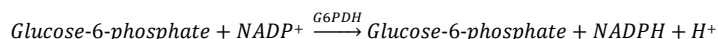
La hexoquinasa (HK) cataliza la fosforilación de D-Glucosa y D-Fructosa mediante la adenosin-5'-trifosfato ATP).



La fructosa-6-fosfato se convierte en glucosa-fosfato mediante la fosfoglucosa isomerasa (PGI).



La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) cataliza la oxidación de la glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconato mediante la reducción de NADP<sup>+</sup>.



El aumento de absorbancia a 340 nm asociada a la formación de NADPH es directamente proporcional a la concentración total de sacarosa, glucosa y fructosa en la muestra.

## CONTENIDO

R1A	2 x 30 mL	TEA 100 mM, pH 7.6, ATP 4 mM, NADP <sup>+</sup> 3 mM
R1B	2 x 1 mL	$\beta$ -Fructosidasa (suspensión)
R2	1 x 15 mL	HK (>0,5 UI/L), G6PDH (>1,8 UI/L), PGI (>8 UI/L)
CTRL	1 x 3 mL	Sacarosa 2 g/L

## PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Reactivo 1: Añadir el contenido de R1B al vial de R1A. Mezclar suavemente evitando la formación de espuma. El reactivo de trabajo es estable hasta 20 días conservado a 2-8 °C y evitando contaminaciones. No congelar.

Reactivo 2: Listo para uso.

Descartar los reactivos si la absorbancia del blanco es superior a 0.300 a 340 nm.

## MUESTRAS

Para uso con muestras de vino y mosto.

Las muestras deben estar libres de turbidez y partículas. Centrifugar o filtrar en caso necesario. La presencia de CO<sub>2</sub> introduce inestabilidad en la medida. Muestras que contengan CO<sub>2</sub> se deben desgasificar previamente. En muestras con intensidad de color muy alta, el pigmento puede interferir en la medida. Tratar con PVPP (0.1 g por cada 10 mL) para reducir el nivel de color. Muestras con concentración superior al rango de medida deben ser diluidas adecuadamente con agua destilada. Multiplicar el resultado final por el factor de dilución.

## PROCEDIMIENTO

Trate calibradores, controles y muestras como 'Muestra'. Utilice agua destilada como 'Blanco'.

Los volúmenes referidos pueden ajustarse a otros procedimientos analíticos. La funcionalidad esperada puede variar si se utilizan razones S:R1:R2 diferentes.

Pipetear en una cubeta:

	Reac. Blanco	Reac. Muestra
Reactivo 1	720 $\mu$ L	720 $\mu$ L
Agua destilada	9 $\mu$ L	--
Muestra/Patrón	--	9 $\mu$ L

Mezclar e incubar durante 1 minuto a 37 °C. Leer la absorbancia a 340 nm (A1). Después añadir a la cubeta:

	Reac. Blanco	Reac. Muestra
Reactivo 2	180 $\mu$ L	180 $\mu$ L

Mezclar e incubar durante 10 minutos a 37 °C. Leer la absorbancia a 340 nm (A2). La concentración conjunta de Sacarosa, D-Glucosa y D-Fructosa se determina como:

$$\text{Total Sugar} = \frac{(A_2 - 0.80 \times A_1)_{\text{sample}} - (A_2 - 0.80 \times A_1)_{\text{blank}}}{(A_2 - 0.80 \times A_1)_{\text{standard}} - (A_2 - 0.80 \times A_1)_{\text{blank}}} \times C \text{ g/L}$$

El factor 0.80 se usa para corregir la absorbancia por la dilución tras añadir R2. C es el valor de concentración indicado en el calibrador para glucosa.

## APLICACIÓN PARA ANALIZADORES DIONYSOS®

Modelo Dionysos	150	240
Nombre	AZUCAR TOTAL	
Método	Punto Final A	
Dirección	Creciente	
Onda Principal	340	
Onda Secundaria	--	
Muestra	3	
Reactivo 1	240	
Reactivo 2	60	
Calibración	Linear	
Ciclo Blanco [150   240]	3 - 4	3 - 4
Ciclo Lectura [150   240]	21 - 22	31 - 32
Unidades	g/L	
Decimales	0.00	
Rango medida	0.04 ~ 6 g/L	
R1 Lim. Abs	3000	
Ratio Dil. Auto.	--	
Vol. Muestra Dil. Auto	--	

El procedimiento es lineal hasta 6 g/L de azúcares totales o 4 g/l de sacarosa. Calibre con un único punto utilizando el calibrador de mayor concentración, o con varios puntos según determine su procedimiento de trabajo.

## CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS

Límite de Cuantificación (LoQ): 0.04 g/L

Límite de Linealidad: 6 g/L Glu+Fru+Sac (4 g/L Sac)

## NOTAS

Se recomienda utilizar vinos control para verificar la calidad de la calibración. Cada laboratorio debe establecer sus propios criterios de aceptación, así como las acciones correctivas necesarias en caso de rechazo.

