

## **KIT DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE ALFA AMINO NITRÓGENO EN JUGO DE UVA**

### **PRODUCTO**

Producto no. 4A110, permite **30 análisis**.

### **PRINCIPIO**

Durante la fermentación del jugo de uva, la levadura necesita una fuente de nitrógeno como nutriente. Los aminoácidos-alfa ayudan con parte de esta necesidad de nitrógeno. Este kit de análisis es apropiado para medir el contenido de alfa amino nitrógeno (AAN) en jugo de uva y en mosto no fermentado. En la presencia de un buffer alcalino, el orto-ftaldialdehido (OPA) y n-Acetil-L-cisteina (NAC) se unen con aminoácidos-alfa y forman complejos coloreados, cuya absorbancia se mide a 335 nm con un espectrofotómetro UV/VIS<sup>1</sup>. La cantidad de YAN (Nitrógeno Disponible en Levadura) en el jugo se puede determinar agregando el AAN al contenido de nitrógeno de amonio (AN). AN se determina utilizando el Kit de Análisis Enzimático 4A120 – de Vintessential Laboratories.

### **CONTENIDO**

El kit incluye los siguientes reactivos:

No.de reactivo.	Reactivo	Preparación	Cantidad	Estabilidad
1	Buffer	Listo para usar	2 x 33 mL	Estable
2	NAC	Agregue 30 ml de agua destilada y mezcle hasta que se disuelva	30 mL	>2 años a 4°C (6 meses a 4°C una vez disuelto)
3	OPA	Listo para usar	3.3 mL	>2 años a 4°C
4	Estándar	Listo para usar	3.3 mL	2 años a 4°C

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 alcalino
- Reactivo 4 es un solvente inflamable
- 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 ser refrigeradas una vez adquiridas, o congeladas hasta llevarse a cabo el análisis. Diluir el jugo con agua destilada 1:1 si hay probabilidad de que el AAN sea alto (130-260 mg/L). Dilución con agua destilada 1:4 si la detección de AAN es superior a 650 mg/L. El mosto puede necesitar diluirse si la fermentación apenas comienza.

Las muestras muy turbias se deben filtrar; las muestras muy coloreadas pueden necesitar decoloración. Para decolorar, 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	2,00 mL (2000 µL)	2,00 mL (2000 µL)	2,00 mL (2000 µL)
2. NAC	0,90 mL (900 µL)	0,90 mL (900 µL)	0,90 mL (900 µL)
Agua Destilada	0,05 mL (50 µL)		
Muestra / Estándar		0,05 mL (50 µL)	0,05 mL (50 µL)

b. Mezclar bien y leer las absorbancias,  $A_1$ .

c. Pipetear el siguiente reactivo en las cubetas:

3. OPA	0,10 mL (100 µL)	0,10 mL (100 µL)	0,10 mL (100 µL)
--------	------------------	------------------	------------------

d. Mezclar bien y leer las absorbancias,  $A_2$ , después de 10 minutos.

### CALCULOS\*

1. Calcular la Absorbancia neta del blanco, la Muestra y el Estándar:

$$\text{Absorbancia Neta, } A_N = A_2 - A_1$$

2. Calcular la Absorbancia Corregida, restando la Absorbancia Neta del blanco de la Absorbancia Neta de la Muestra.

$$\text{Absorbancia Corregida de la Muestra, } A_C = \text{Muestra } A_N - \text{Blanco } A_N$$

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

4. Calcular la cantidad de Alfa amino nitrógeno de las Muestras, usando la siguiente fórmula:

$$\text{Alfa amino nitrógeno (mg N/L)} = A_C \times 130 \times \text{Factor de Dilución}$$

Para calcular el YAN (nitrógeno disponible en levadura), agregue el Amino Nitrógeno y el nitrógeno amoniacal.

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

### REFERENCIAS

1. Dukes, B.C. and Butzke, C.E., "Rapid determination of primary amino acids in grape juice using an ophthalaldehyde/N-acetyl-L-cysteine spectrophotometric assay". Am.J.Enol.Vitic, Vol 49, No.2, 1998, 125134.