

TESTE ENZIMÁTICO PARA DETERMINAÇÃO DE FAN (NITROGÊNIO AMINO LIVRE) EM MOSTO DE UVA

PRODUTO

Produto no. 4A110, para 30 testes

CONTEÚDO

O kit inclui os seguintes reagentes:

N.º do reagente	Reagente	Preparação	Quantidade	Estabilidade
1	Buffer (tampão)	Pronto para uso	2 x 33 mL	Todos os reagentes (conforme fornecido) são estáveis por 18 meses a 4°C ou até a data de validade do kit, o que ocorrer primeiro. O Reagente 2 (NAC) é estável por 6 meses a 4°C uma vez dissolvido ou até a data de validade do kit, o que ocorrer primeiro.
2	NAC	Adicione 30 mL de água destilada e misture até dissolver	30 mL	
3	OPA	Pronto para uso	3,3 mL	
4	Padrão	Pronto para uso	3,3 mL	

Não armazenar os reagentes na temperatura recomendada reduzirá sua vida útil.

Para a concentração do Padrão, consulte o rótulo do frasco.

Recomendações de segurança

- Use óculos de segurança
- Reagente 1 é alcalino
- Não ingerir Padrão, pois eles contêm azida de sódio como estabilizador

PROCEDIMENTO

Parâmetros operacionais

Comprimento de onda	340 nm
Cubeta	1 cm, quartzo, sílica, metacrilato ou poliestireno
Temperatura	20 – 25°C
Volume final da cubeta	3,05 mL
Zero	contra o ar, sem a cubeta no feixe de luz

PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

As amostras devem ser refrigeradas após o recebimento ou congeladas até o teste. Dilua amostras de suco ou mosto com água destilada 1:1 se o FAN provavelmente estiver na faixa de 130-260 mg/L. A diluição com água destilada 1:4 (fator de diluição x5) permitirá a detecção de FAN de até 650 mg/L.

Filtre amostras muito turvas. Amostras altamente coloridas podem exigir descoloração. Para descolorir, adicione aproximadamente 0,1 g de PVPP a 5 mL de amostra em um tubo de ensaio. Agite bem por cerca de 1 minuto. A clarificação é obtida por decantação ou filtração através de papel de filtro Whatman No. 1. Evite o uso de carvão ativado.

ANÁLISE DA AMOSTRA

a. Pipete os seguintes volumes dos reagentes nas cubetas:

Reagente	Branco	Padrão	Amostra
1. Buffer (tampão)	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)
Água destilada	0.05 mL (50 µL)		
Amostra ou Padrão		0.05 mL (50 µL)	0.05 mL (50 µL)

b. Misture bem por inversão e leia as absorbâncias, A_1 .

c. Pipete o seguinte reagente nas cubetas:

3. OPA	0.10 mL (100 µL)	0.10 mL (100 µL)	0.10 mL (100 µL)
--------	------------------	------------------	------------------

d Misture bem por inversão e leia as absorbâncias, A_2 , após 10 minutos.

CÁLCULOS*

1. Calcule a Absorbância Líquida para o Branco, Amostra e Padrão:

$$\text{Absorbância Líquida, } A_L = A_1 - A_2$$

2. Calcule a Absorbância Corrigida subtraindo a Absorbância Líquida para o Branco da Absorbância Líquida para a Amostra:

$$\text{Absorbância Corrigida da Amostra, } A_c = A_L \text{ da Amostra} - A_L \text{ do Branco}$$

3. Faça o mesmo para o Padrão substituindo as absorbâncias do Padrão no lugar das absorbâncias da Amostra.

4. Calcule a quantidade de FAN na amostra usando a fórmula abaixo:

$$\text{Concentração de FAN (mg N/L)} = A_c \times 130 \times \text{Fator de diluição}$$

Para calcular YAN (Nitrogênio Assimilável por Levedura) basta adicionar o resultado de FAN ao de Amônia calculado do kit 4A120:

$$\text{YAN} = \text{FAN} + \text{AMÔNIA}$$

* A planilha de cálculo está disponível para download em

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

REFERÊNCIA

1. Dukes, B.C. and Butzke, C.E. 1998, "Rapid determination of primary amino acids in grape juice using an o-phthalaldehyde/N-acetyl-L-cysteine spectrophotometric assay", *Am.J.Enol.Vitic*, Vol 49, No.2, pp. 125-134.