

KIT DE ANÁLISIS ENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE AMONIACO EN JUGO DE UVA Y EN VINO

PRODUCTO

Producto número 4A120, permite 30 análisis, sólo para el uso *in vitro*.

PRINCIPIO

El amoníaco se encuentra en jugo de uva y en vino. Es un nutriente importante para la levadura durante la fermentación primaria. Se determina en forma enzimática de acuerdo a la siguiente ecuación:



El amoníaco reacciona con a-ketoglutarato y dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADH) en la presencia de glutamato-deshidrogenasa (GIDH), donde se forma L-glutamato y NAD. La cantidad de NADH consumida se mide a 340 nm y se relaciona estequiométricamente a la cantidad de amoníaco presente.

CONTENIDO

El kit contiene los siguientes reactivos:

Reagent N.	Reactivo	Preparación	Cantidad	Estabilidad
1	Buffer	Nil	33 mL	2 años a 4°C
2	NADH	Agregue 1,7 ml de agua destilada a cualquiera de las botellas según sea necesario, mezcle para disolver	2 x 1.7 mL	2 años a 4°C (1 mes a 4°C una vez diluido)
3	GIDH	Mezclar suavemente por inversión antes de usar.	0.7 mL	2 años a 4°C
4	Standard	Nil	3.3 mL	2 años a 4°C

La vida útil del Reactivo no. 1 se puede extender si se ponen alícuotas en el congelador. No congelar los reactivos de enzima 2 y 3. 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	3,12 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 mas de 40 mg/L (ppm). Para muestras con menos de 200 mg/L, una dilución de 1 en 5 es suficiente. Para muestras con menos de 400 mg/L, una dilución de 1 en 10 es suficiente. Como guía general, las mediciones de absorbancia no deben superar 1,20 unidad de absorbancia.

Los vinos tintos o muestras de jugo sin diluir y muy coloreadas necesitan 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	1,00 mL (1000 µL)	1,00 mL (1000 µL)	1,00 mL (1000 µL)
2. NADH	0,10 mL (100 µL)	0,10 mL (100 µL)	0,10 mL (100 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, A_1 , una vez constante (aproximadamente 5 minutos)

c. Pipetear los siguientes reactivos en las cubetas:

3. GIDH	0,02 mL (20µL)	0,02 mL (20µL)	0,02 mL (20µL)
---------	----------------	----------------	----------------

d. Mezclar bien y leer las absorbancias, A_2 , una vez completada la reacción (aprox. 20 minutos)

CALCULOS*

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

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

2. Calcular la Absorbancia Corregida, restando la Absorbancia Neta de la Muestra sin tratar de la Absorbancia Neta de la Muestra:

$$\text{Muestra de Absorbancia Corregida, } A_C = \text{Muestra } A_N - \text{Muestra sin tratar } A_N$$

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 Amoníaco como sigue:

$$\text{Concentración de Amoníaco (mg/L)} = A_C \times 84,3 \times \text{Factor de Dilución}$$

5. Calcular el amino nitrógeno como sigue:

$$\text{Nitrógeno Amoniacal (mg/L)} = \text{Amoníaco (mg/L)} \times 0,82$$

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. Bergmeyer, H.U. et al 1985, Methods of Enzymatic Analysis, 3rd ed., vol. 8, pp. 454 - 461; Verlag Chemie Weinheim