

TESTE ENZIMÁTICO PARA DETERMINAÇÃO DE AMÔNIA EM MOSTO DE UVA E VINHO

PRODUTO

Produto no. 4A120, **para 30 testes**, somente para uso *in vitro*.

CONTEÚDO

O kit inclui os seguintes reagentes:

N.º do reagente	Reagente	Preparação	Quantidade	Estabilidade
1	Buffer (tampão)	Não requer	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 (NADH) é estável por 1 mês a 4°C uma vez dissolvido ou até a data de validade do kit, o que ocorrer primeiro.
2	NADH	Adicione 1,7 mL de água destilada a qualquer frasco conforme necessário e misture até dissolver	2 x 1,7 mL	
3	GIDH	Não requer	0,7 mL	
4	Padrão	Não requer	3,3 mL	

O prazo de validade dos Reagentes 1 pode ser estendido colocando alíquotas em um freezer.

Não congele os reagentes 2 e 3.

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
- Não ingerir Buffer (tampão) ou 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	3,12 mL
Zero	contra o ar, sem a cubeta no feixe de luz

PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

As amostras devem ser diluídas com água destilada para garantir que a concentração na solução de ensaio não seja maior que 40 mg/L (ppm). Idealmente, A1 deve estar entre 0,90 – 1,20 unidades de absorbância.

Para amostras com menos de 200 mg/L de amônia, uma diluição de 1 em 5 deve ser suficiente.

Para amostras contendo entre 200 – 400 mg/L de amônia, uma diluição de 1 em 10 seria apropriada.

Vinhos tintos não diluídos ou amostras de suco/mostro não diluído e altamente coloridas requerem 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.

ANÁLISE DA AMOSTRA

a. Pipete os seguintes volumes dos reagentes nas cubetas:

Reagente	Branco	Padrão	Amostra
1. Buffer (tampão)	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)
Água destilada	2,00 mL (2000 µL)	1,90 mL (1900 µL)	1,90 mL (1900 µL)
Amostra ou Padrão		0,10 mL (100 µL)	0,10 mL (100 µL)

b. Misture bem por inversão e leia as absorbâncias, A_1 , quando estiverem constantes (aproximadamente 5 minutos).

c. Pipete o seguinte reagente nas cubetas:

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

d. Misture bem e leia as absorbâncias, A_2 , quando a reação estiver completa (aproximadamente 20 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 Amônia na amostra usando a fórmula abaixo:

$$\text{Amônia (mg/L)} = A \times 84,3 \times \text{Fator de diluição}$$

5. Calcule o Nitrogênio de Amônia da seguinte forma;

$$\text{Nitrogênio de Amônia (mg/L)} = \text{Amônia (mg/L)} \times 0,82$$

Para calcular o YAN (Nitrogênio Assimilável por Levedura), basta adicionar o resultado do Nitrogênio da Amônia (AN) ao Nitrogênio Amino Livre (FAN) calculado a partir do kit 4A110:

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

* 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.