



## **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	Estável
2	NAC	Adicione 30 mL de água destilada e misture até dissolver	30 mL	>2 anos a 4°C (6 meses a 4°C uma vez dissolvido)
3	OPA	Pronto para uso	3,3 mL	>2 anos a 4°C
4	Padrão	Pronto para uso	3,3 mL	2 anos a 4°C

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 filtragem 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 absorvâncias,  $A_1$ .

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 absorvâncias,  $A_2$ , após 10 minutos.

## CÁLCULOS\*

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

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

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

$$\text{Absorvância Corrigida da Amostra, } A_C = A_L \text{ da Amostra} - A_L \text{ do Branco}$$

3. Faça o mesmo para o Padrão substituindo as absorvâncias do Padrão no lugar das absorvâncias 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.