

Megazyme

AMINO NITRÓGENO PRIMARIO (PAN)

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

K-PANOPA 04/05

(100 Ensayos por Kit)

Este folleto se puede conseguir en
www.megazyme.com en los siguientes idiomas:
Inglés-Francés-Alemán-Italiano-Portugués



INTRODUCCIÓN:

La adición de suplementos de nutrientes al zumo de uva antes o durante la fermentación ya se puede realizar de forma precisa en términos de Nitrógeno Disponible en levadura (YAN). El YAN es especialmente importante para determinar de forma precisa, dado que la falta de nitrógeno puede producir una fermentación lenta o pesada, generando sulfuro de hidrógeno (H_2S), mientras que demasiado nitrógeno, como en forma de fosfato de diamonio (DAP) puede producir la formación del compuesto carcinogénico etilcarbamato, especialmente cuando los niveles de L-arginina en el zumo es muy alto.

YAN TOTAL (YAN_T) se compone de tres componentes:

- (a) iones de amoníaco libres¹
- (b) nitrógeno amino primario (PAN, de los ácidos amino libres)²
- (c) la aportación de la cadena lateral de L-arginina (después de la hidrólisis por la arginasa de la levadura que crea ornitina y urea)¹.

Por tanto se tienen que medir todos los componentes de forma precisa antes de decidir si se va a añadir YAN adicional en forma de DAP o extracto de levadura (suplementos de nutrientes permitidos). El YAN del amoníaco y la L-arginina (YAN_{AG} , **a** mas **c**) se puede determinar de forma rápida y conveniente utilizando el kit L-Arginina/Urea/Amoníaco de Megazyme (K-LARGE); el componente PAN del YAN (**b**) se mide utilizando el kit de Nitrógeno Amino Primario de Megazyme (K-PANOPA). El YAN total se determina utilizando kits K-PANOPA y K-LARGE, pero como ambos miden el grupo amino primario de L-arginina, esto se tiene que tener en cuenta en los cálculos (véase página 6 y 7 de este folleto).

En procedimiento de ensayo PAN (K-PANOPA) que se describe en este folleto es una alternativa más precisa al formol tritration que también mide la prolina, un aminoácido que se encuentra en abundancia en el zumo de la uva que no contribuye a YAN en las fermentaciones anaeróbicas.

PRINCIPIO:

Los grupos de amino nitrógenos de aminoácidos libres en la muestra reaccionan con N-acetil-L-cisteína y o-ftaldialdehído para formar derivados de isoindol (1)².

(1) Amino nitrógeno + N-acetil-L-cisteína + o-ftaldehído

→ derivado de isoindole

La cantidad de derivado de isoindol formado en este reacción estequiométrica con la cantidad de amino nitrógeno. Lo que se mide es el derivado de isoindol por el aumento de la capacidad de absorción a 340 nm.

ESPECIFICIDAD, SENSIBILIDAD, LINEALIDAD Y PRECISIÓN:

El ensayo es específico para los aminoácidos que contienen grupos aminos primarios, es decir, la L-prolina no reacciona ya que contiene un grupo amino secundario.

El diferencial de absorción menor del ensayo es de 0,005 unidades. Esto corresponde a 0,65 mg/L de solución de muestra a un volumen máximo de muestra de 0,05 mL. El límite de detección es de 2,59 mg/L, que se deriva de un diferencial de absorción de 0,020 con un volumen máximo de muestra de 0,05 mL.

El ensayo es lineal a lo largo del intervalo de 0,2 a 10 μg de amino nitrógeno por ensayo. En determinaciones dobles utilizando una solución de muestra, se puede producir una diferencia de absorción de 0,005 a 0,010. Con un volumen de muestra de 0,5 mL, esto corresponde a una concentración de amino nitrógeno de aproximadamente entre 0,65 y 1,30 mg/L de solución de muestra. Si la muestra se diluye durante su preparación, el resultado se multiplica por el factor de dilución, F. Si en la preparación de la muestra, la muestra se pesa, por ejemplo, 10 g/L, cabe esperar una diferencia entre 0,02 a 0,05 g/100 g.

INTERFERENCIA:

Los iones de amoníaco dentro de la muestra producen un pequeño aumento inicial de la absorción. Esto contribuye a que la absorción total desaparezca, sin embargo, antes de transcurridos 10 minutos de reacción, por lo que hay que dejar que los ensayos reaccionen durante 15 minutos antes de leer los valores de absorción.

Si la conversión de amino nitrógeno libres se se ha completado en el tiempo especificado en el ensayo (aprox. 15 min), en general se puede concluir que no se ha producido ninguna interferencia. Sin embargo, se puede hacer otra comprobación añadiendo grupos de amino nitrógeno en forma de isoleucina (7 μg de nitrógeno en 0,05 mL) en la cubeta, cuando se complete la reacción. Se debería observar un aumento significativo de la absorción.

Las sustancias que interfieren en la muestra analizadas se pueden identificar incluyendo un estándar interno. Cabe esperar una recuperación cuantitativa de este estándar. Las pérdidas en la manipulación y extracción de la muestra se pueden identificar realizando experimentos de recuperación, es decir, añadiendo isoleucina a la muestra en las fases iniciales de la extracción.

SEGURIDAD:

En general, los reagentes utilizados en la determinación del amino nitrógeno primario no son materiales peligrosos según el Reglamento de Sustancias Peligrosas. Sin embargo, el etanol al 96 % (v/v) (en la botella 2) es muy inflamable. Es necesario observar todas las medidas generales de seguridad que se aplican a todas las sustancias químicas.

KITS:

Megazyme dispone de kits idóneos para realizar 100 determinaciones. Los kits contienen el método completo de ensayo además de:

- Botella 1:** Tabletas (100) que contienen bórax y N-acetil-L-cisteína (NAC). Estable durante > 2 years a 4°C ó -20°C.
- Botella 2:** Orto-ftaldialdehído (OPA; 160 mg) en 12 mL de etanol 96 % (v/v). Estable durante > 2 años a 4°C.
- Botella 3:** Solución de Isoleucina estándar (5 mL, 140 mg de nitrógeno/L). Estable durante > 2 años a 4°C.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES/SUSPENSIONES DE REAGENTES:

1. Disuelva una tableta de la botella 1 en 3 mL de agua destilada por cada ensayo y deje que se disuelva durante 2-3 minutos. Ayude a que se disuelva agitando o removiendo el contenido del tubo. **Esta es la Solución 1.** Prepare inmediatamente antes de utilizar.

NOTA: Caliente la botella a temperatura ambiente y seque la humedad de la parte exterior con un pañuelo de papel antes de abrir y sacar las tabletas. Si abre la botella mientras todavía está fría las tabletas absorberán la humedad y se reducirá la estabilidad de los componentes de la tableta.

2. Use el contenido de la botella 2 según se suministra. Esta solución es estable durante > 2 años cuando se guarda en la oscuridad a 4°C.
3. Use el contenido de la botella 3 según se suministra. Estable durante > 2 años a 4°C.

NOTA: La solución estándar de isoleucina solo se utiliza en el ensayo cuando existe alguna duda sobre la precisión del espectrofotómetro que se está utilizando o cuando se sospecha que las sustancias que intervienen en la muestra están produciendo una inhibición. La concentración de amino nitrógeno primario se determina directamente a partir de la ecuación de la página 6.

EQUIPO (RECOMENDADO):

1. Tubos de vidrio de prueba (con la base redonda; 16 x 100 mm).
2. Cubetas de plástico desechables (paso de luz de 1 cm, 3 mL).
3. Micropipetas, p. ej. Gilson Pipetman[®] (100 μ L).
4. Pipeta de desplazamiento positivo p.ej. Eppendorf Multipette[®]
 - con 5,0 mL de Combitip[®] (para administrar partes alícuotas de 0,1 mL de OPA - solución 2).
 - con 25 mL de Combitip[®] (para dispensar partes alícuotas de 3,0 mL de agua destilada y tapón NAC - solución 1).
5. Balanza de precisión.
6. Espectrofotómetro a 340 nm.
7. Agitador vibrador de tubos Vortex (p.ej. Agitador de tubos de prueba IKA[®] Yellowline TTS2).
8. Cronómetro.
9. Papel filtro Whatman No.1 (9 cm) y papeles filtro de fibra de vidrio GF/A (9 cm).

PROCEDIMIENTO:

Longitud de onda: 340 nm
Cubeta: Paso de luz de 1 cm (vidrio o plástico)
Temperatura: ~ 25°C
Volumen final: 3,15 mL
Solución de muestra: 0,2-10,0 µg de nitrógeno por cubeta
(en 0,05 mL de volumen de muestra)

Medir contra corriente de aire (sin cubeta en el paso de luz) o contra agua

Pipeta en cubetas	Muestra sin tratar	Muestra
solución 1 (tampón borato/NAC)	3,00 mL	3,00 mL
agua destilada	0,05 mL	-
muestra	-	0,05 mL
Mezcla*, lea la absorción de las soluciones (A_1) transcurridos aproximadamente 2 min e inicie las reacciones añadiendo:		
solución 2 (OPA)	0,10 mL	0,10 mL
Mezcla*, lea la absorción de las soluciones (A_2) transcurridos aproximadamente 15 min.		

* por ejemplo con una espátula de plástico o dándole la vuelta con cuidado después de taponar la cubeta con tapa o Parafilm®.

NOTA: OPA es sensible a la luz. Por tanto, las reacciones hay que realizarlas en la oscuridad (por ejemplo, en el compartimiento de la cubeta del espectrofotómetro con la tapa del fotómetro cerrada).

CALCULO:

Calcule las diferencias de absorción (A_2-A_1) con muestra y sin muestra. Reste la diferencia de absorción del vacío de la diferencia de absorción de la muestra, obteniendo con ello ΔA_{PAN} .

El valor de ΔA_{PAN} por regla general deberá ser de al menos 0,100 unidades de absorción para conseguir resultados suficientemente precisos.

La concentración de PAN (amino nitrógeno primario) se puede calcular de la siguiente forma:

$$c = \frac{V \times MW \times 1000}{\varepsilon \times d \times v} \times \Delta A_{PAN} \quad [\text{mg de N/L}]$$

Donde:

V = volumen final [mL]

MW = peso molecular del nitrógeno [g/mol]

1000 = conversión de g a mg de N/L

ε = coeficiente de extinción del derivado de isoindol a 340 nm
= 6803 [$\text{l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$]

d = paso de luz [cm]

v = volumen de muestra [mL]

Sigue para el PAN:

$$c = \frac{3,15 \times 14,01 \times 1000}{6803 \times 1,0 \times 0,05} \times \Delta A_{PAN} \quad [\text{mg de N/L}]$$
$$= 129,74 \times \Delta A_{PAN} \quad [\text{mg de N/L}]$$

NOTA: Estos cálculos se pueden simplificar utilizando la aplicación **Mega-Calc™** de Megazyme, que se puede descargar desde la página web donde aparece el producto (www.megazyme.com).

Nitrógeno Disponible en a Levadura (YAN) en mg de N/L:

YAN se puede estimar como la suma de sus tres componentes principales, es decir, la aportación del amino nitrógeno primario (PAN), amoniaco y la cadena lateral de la L-arginina. Sin embargo, durante la fermentación puede aparecer urea de la levadura por su liberación de la L-arginina. Por tanto si se determina el YAN después de iniciada la fermentación, habrá que incluir también la urea en los cálculos. Distintos factores, como la cepa de levadura utilizada, el nivel de L-arginina y los niveles de otras fuentes de nitrógeno, a saber los iones de amoniaco y de aminoácidos libres, determinarán la cantidad de urea excretada y su posterior reutilización. Para más información sobre la interrelación de todos estos factores y la importancia de la formación de etilcarbamato, véase referencia 3. Dado que los niveles de estos compuestos varían significativamente, cada componente se debe determinar para obtener un valor de YAN preciso. El YAN del amoniaco, urea y L-arginina (YANAUG) se puede determinar de forma cómoda y rápida utilizando el kit L-Arginina/Urea/Amoniaco (K-LARGE) de Megazyme de la forma siguiente:

$$YAN_{AUG} = 1000 \times \left[\frac{AM \text{ (g/L)} \times 14,01}{17,03} + \frac{UR \text{ (g/L)} \times 28,02}{60,06} + \frac{AR \text{ (g/L)} \times 42,03}{174,21} \right] \text{ [mg de N/L]}$$

Este cálculo se basa en un átomo de nitrógeno disponible de cada ion de amoniaco, dos de la urea y tres átomos disponibles de nitrógeno de cada molécula de L-arginina^{1,2}. Sin embargo, dado que la concentración de L-arginina varía mucho en el zumo de la uva y solo representa aproximadamente una tercera parte de todos los aminoácidos encontrados como mucho, solo se pueden conseguir valores totales de YAN (YAN_T) cuando también se determina la aportación de otros amino nitrógenos primarios (PAN). Esto se puede conseguir fácilmente utilizando este kit de Amino Nitrógeno Primario (K-PANOPA). En este caso, es importante no contar el grupo amino primario de L-arginina de nuevo y por tanto la ecuación será:

$$YAN_T = 1000 \times \left[\frac{AM \text{ (g/L)} \times 14,01}{17,03} + \frac{UR \text{ (g/L)} \times 28,02}{60,06} + \frac{AR \text{ (g/L)} \times 28,02}{174,21} \right] + PAN \text{ [mg de N/L]}$$

Si la muestra se diluye durante la preparación, el resultado se puede multiplicar por el factor de dilución F.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

1. Dilución de la muestra.

La cantidad de PAN presente en la cubeta (es decir, en los 0,05 mL de muestra que se está analizando) deberá situarse entre 0,2 y 10 µg. La solución de muestra por tanto se debe diluir lo suficiente como para conseguir una concentración de amino nitrógeno entre 4 y 200 mg N/L.

Tabla de dilución

Concentración estimada de PAN (mg N/L)	Dilución con agua	Factor de dilución (F)
< 200	No se requiere dilución	1
200-2000	1 + 9	10

Si el valor de ΔA_{PAN} debido al analito es demasiado bajo (p.ej. < 0,100), pese más muestra o diluya con menos fuerza.

EJEMPLOS PARA PREPARAR LAS MUESTRAS:

(a) Determinación del amino nitrógeno primario en el zumo de uva y vino.

Generalmente la concentración de amino nitrógeno primario en el zumo de uva blanca y roja y el vino en general se puede determinar sin tratar la muestra (salvo mediante dilución y filtrado, según la tabla de dilución, si fuera necesario).

Normalmente, no se requiere dilución y un volumen de muestra de 25-50 µL es adecuado.

REFERENCE:

1. Martin, O., Brandriss, M. C., Schneider, G. & Bakalinsky, A.T. (2003) Improved anaerobic use of arginine by *Saccharomyces cerevisiae*. *App. Env. Microbiol.* **69**, 1623-1628.
2. Dukes, B. & Butzke, C. (1998) Rapid determination of primary amino acids in grape juice using an o-phthaldialdehyde/ N-acetyl-L-cysteine spectrophotometric assay. *Am. J. Enol. Vitic.* **49**, 125-134.
3. Butzke, C. E. & Bisson, L. F. (1997) USFDA Center for Food Safety and Applied Nutrition, "Ethyl Carbamate Preventative Action Manual".

NOTAS:



**Megazyme International Ireland Ltd.,
Bray Business Park, Bray,
Co. Wicklow,
IRLANDA**

Teléfono: (353.1) 286 1220

Fax: (353.1) 286 1264

Página Web: www.megazyme.com

Correo electrónico: info@megazyme.com

SIN GARANTÍA

La información contenida en este librete está, al mejor de nuestro conocimiento, verdad y exacto, pero puesto que las condiciones del uso están más allá de nuestro control, de ninguna garantía se da o se implica por lo que se refiere a cualquier recomendación o sugerencia que puedan ser hechas o que ningún uso no infringirá ninguna patentes.