

UTILIDAD DEL TEST

Las levaduras necesitan nitrógeno para desarrollarse. Una de las fuentes principales de nitrógenos son las proteínas, péptidos y aminoácidos presentes en el medio (aminas primarias, PAN); la otra fuente principal es el propio ion amonio. La determinación previa a la fermentación de la cantidad de nitrógeno asimilable permite ajustarlo adecuadamente para evitar paradas del proceso de fermentación por déficit de nitrógeno.

MÉTODO

La glutamato deshidrogenasa (GLDH) cataliza la condensación del amoníaco y el α -cetoglutarato en L-glutamato en presencia de NADPH.



La disminución de absorbancia a 340 nm es directamente proporcional a la concentración de amoníaco presente en la muestra.

CONTENIDO

R1	2 x 30 mL	NADPH 0.5 mM, Tampón HEPES 100 mM, pH 8.0, conservantes
R2	1 x 15 mL	GLDH (>100 U/mL), α -cetoglutarato 20 mM
CTRL	1 x 3 mL	Solución Amonio 125 mg NH ₄ /L (110 – 140 mg NH ₄ /L)

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Los reactivos están listos para uso y son estables hasta la fecha de caducidad conservados a 2-8 °C. No congelar.

Descartar si la absorbancia del blanco es inferior a 1.000 OD a 340 nm.

MUESTRAS

Las muestras deben estar libres de turbidez y partículas. Centrifugar o filtrar en caso necesario. La presencia de CO₂ introduce inestabilidad en la medida. Muestras que contengan CO₂ se deben desgasificar previamente. En muestras con intensidad de color muy alta, el pigmento puede interferir en la medida. Tratar con PVPP (0.1 g por cada 10 mL) para reducir el nivel de color. Muestras con concentración superior al rango de medida deben diluirse acordeamente con agua destilada. Multiplicar el resultado final por el factor de dilución.

PROCEDIMIENTO

Trate calibradores, controles y muestras como 'Muestra'. Utilice agua destilada como 'Blanco'.

Utilice WINECONTROL (código SD2200) o WINECALRTU (código SY2100R) como calibrador.

Los volúmenes referidos pueden ajustarse a otros procedimientos analíticos. La funcionalidad esperada puede variar si se utilizan razones S:R1:R2 diferentes.

Pipetear en una cubeta:

	Reac. Blanco	Reac. Muestra
Reactivo 1	720 μ L	720 μ L
Agua destilada	9 μ L	--
Muestra/Patrón	--	9 μ L

Mezclar e incubar durante 1 minuto a 37 °C. Leer la absorbancia a 340 nm (A₁).

Después añadir a la cubeta:

	Reac. blanco	Reac. muestra
Reactivo 2	180 μ L	180 μ L

Mezclar e incubar durante 10 minutos a 37 °C. Leer la absorbancia a 340 nm (A₂).

La concentración de amoníaco se determina como:

$$\text{Ammonia} = \frac{(A_2 - 0.80 \times A_1)_{\text{sample}} - (A_2 - 0.80 \times A_1)_{\text{blank}}}{(A_2 - 0.80 \times A_1)_{\text{standard}} - (A_2 - 0.80 \times A_1)_{\text{blank}}} \times C \text{ g/L}$$

El factor 0.80 se usa para corregir la absorbancia por la dilución tras añadir R2. C es el valor de concentración indicado en el calibrador para el ion amonio.

APLICACIÓN PARA ANALIZADORES DIONYSOS®

Modelo Dionysos	150	240
Nombre	AMONIO	
Método	Punto Final A	
Dirección	Decreciente	
Onda Principal	340	
Onda Secundaria	--	
Muestra	3	
Reactivo 1	240	
Reactivo 2	60	
Calibración	Lineal	
Ciclo Blanco [150 240]	3 - 4	3 - 4
Ciclo Lectura [150 240]	20 -21	31 - 32
Unidades	mg/L	
Decimales	0.0	
Rango medida	14 ~ 260	
R1 Lim. Abs	10000	
Ratio Dil. Auto.	--	
Vol. Muestra Dil. Auto	--	

*La concentración en el calibrador WINECALRTU (SY2100R) viene expresada en mg NH₄/L y en mgN/L. Otros calibradores pueden expresar la concentración en otras unidades.

El procedimiento es lineal hasta 260 mg NH₄/L. Calibre con un único punto utilizando el calibrador de mayor concentración, o con varios puntos según determine su procedimiento de trabajo.

CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS

Límite de Cuantificación (LoQ): 14 mg N/L

Límite de Linealidad: 260 mg N/L

NOTAS

Se recomienda utilizar el control incluido en el kit para verificar la calidad de la calibración. Cada laboratorio debe establecer sus propios criterios de aceptación, así como las acciones correctivas necesarias en caso de rechazo.

El nitrógeno total asimilable (YAN) se calcula como (técnica calculada):

$$YAN = 0,78 * [\text{NH}_4^+] \text{ mg N/L} + [\text{PAN}] \text{ mg N/L}$$

La concentración de nitrógeno amoniacal también puede ser expresada como:

$$[\text{NH}_4^+] \text{ mg N/L} = [\text{NH}_4^+] \text{ mg NH}_3 / \text{L} \times 0,83$$

$$[\text{NH}_4^+] \text{ mg N/L} = [\text{NH}_4^+] \text{ mg NH}_4^+ / \text{L} \times 0,78$$

REFERENCIAS

1. Compendium of International methods of analysis – OIV, Vol1&2 (2008)
2. Bermyer, HU. Methods of Enzymatic Analysis, 2nd Ed. Vol. 1, p. 112-117. Academic Press, Inc. NY. (1974).

