

## ANÁLISIS DE NITRÓGENO

Este documento reúne los análisis más comúnmente usado para determinar el nitrógeno en el jugo de uva disponible en la nutrición de levadura (FAN= nitrógeno fácilmente asimilable).

El nitrógeno asimilable es usualmente definido como (N.Amoniacal + N.Amínico – Prolina).

El nitrógeno total el cual es un análisis standard solamente da un valor muy inexacto, como lo indica su nombre corresponde a un 40% de nitrógeno total, pero con una gran variabilidad en los mostos existentes.

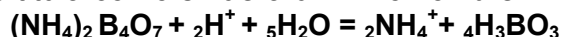
La titulación de formol es el análisis más utilizado en los laboratorios enológicos: a pesar de la toxicidad del formaldehído, y del resultado aproximado (10-15% de error que se debe esperar en algunos casos), es muy popular por su aplicación fácil y rápida.

Para los propósitos científicos o para obtener más datos exactos sobre el Nitrógeno fácilmente asimilable por las levaduras, en países de habla inglesa se usa especialmente, una combinación del análisis NOPA (medición de aminoácidos) y electrodo de amonio.

## NITRÓGENO TOTAL

El contenido de Nitrógeno total de vinos es determinado principalmente usando el método Kjeldahl.

El volumen de nitrógeno en mosto y vinos está en la forma de aminoácidos, péptidos o proteínas. Si lo que se va a determinar es el contenido de nitrógeno total de mostos o jugos de uva, es conveniente fermentarlos primero. Una vez que la digestión se completa, el amoníaco es destilado, dentro de una solución de ácido bórico y titulado hasta un punto final rojo metilo. El ácido bórico forma borato de amonio, el cual se titula como si fuera un Amonio libre:



### Procedimiento.

Preparar un reactivo de ácido sulfúrico-ácido salicílico pero disolviendo 33 gr de ácido salicílico en un 1 L de ácido sulfúrico concentrado.

Preparar una mezcla hirviente pero mezclando 1 gr de sulfato de cobre penta-hidratado, 2 gr de sulfato ferroso hepta-hidratado y 20 gr de sulfato de sodio.

Pipetear 50 ml de la muestra de vino seca o 25 ml del mosto o muestra de vino dulce (de postre) en un balón KJELDHL de 800 ml. Si el tiempo lo permite, fermentar el mosto o los vinos dulces desalcoholizados (por ebullición) en un balón de digestión para remover el azúcar.

Evaporar a 10 ml. Agregar 40 ml de reactivo ácido sulfúrico-salicílico, 10 gr de mezcla hirviendo, y 3 gotas de oxiclورو de selenio, mezclar e inmediatamente calentar a fuego lento. Si la evaporación es excesiva, agregar una gota de agente silicona antiespuma. Tan pronto descienda el calcinado inicial de los componentes del carbón, calentar vigorosamente hasta que la solución sea clara y continuar calentando por otros 20 minutos. Con un exceso de la presencia de azúcar, adicionar ácido sulfúrico. Si el ácido sulfúrico es disipado, las sales se disuelven, el amonio se evapora y hay resultados por defecto. Después de completar el período de calentamiento, llevar la solución a temperatura ambiente,

agregar 300 ml de agua, mezclar, dejar caer lentamente sobre el lateral del matraz 100 ml de hidróxido de sodio 12 N agregar varias gotas de solución fenolftaleína, y mezclar.

Si el color no se torna rosado, indicando que la solución es básica, agregar más solución de hidróxido de sodio hasta que el color vire al rosado. Llevar el balón a un aparato de macro-destilación y destilar 150 ml en un Erlenmeyer de 500 ml, conteniendo 30 ml de ácido bórico al 4%, unas pocas gotas de rojo de metilo al 0.2% en 60% de tanol. Remover el frasco después de finalizada la destilación e insertar la punta del condensador en el frasco. Titular el destilado a punto final rojo con ácido clorhídrico 0.1 N.

Preparar un blanco con 50 ml de agua en vez de vino siguiendo el procedimiento completo.

$$\text{Nitrógeno (mg/L)} = \frac{(A-B)(N)(14)(1000)}{V}$$

**Donde** A = volumen de ácido clorhídrico usado para titulación de la muestra (ml)

B = volumen de ácido clorhídrico para la titulación del blanco (ml)

C = normalidad de ácido clorhídrico

V = volumen de muestra de vino (ml)

(de Métodos para Análisis de Mostos y Vinos, C.S. Ough and M.A. Amerine, segunda edición, Wiley-Interscience Publication, 1988)

## **AMONIO (ELECTRODO)**

### **Procedimiento**

Componer un jugo de uva sintético (20gr/100 ml de glucosa, 10 g/L de ácido málico, y suficiente  $K_2HPO_4$  para llevar al pH a 3.3) o un vino sintético (como arriba se menciona, pero sustituir 10 ml / 100 ml de etanol para la glucosa). Preparar una solución de amonio (1000 mg / L  $NH_3$ , 6.706 g de  $(NH_4)_2SO_4$  por litro). Pipetear 1.5, 10, 20 y 30 ml de solución en matraz volumétricos. Completar el volumen con jugo sintético o el vino. Mezclar y pipetear 25 ml dentro de un vaso de precipitación con la ayuda de una barra de vidrio. Utilizar un agitador magnético y adicionar 10 ml de NaOH 6N; mientras se produce una agitación constante, introducir el electrodo de amonio; luego que se ha alcanzado el equilibrio (1 o 2 minutos) leer el valor milivoltio y registrar.

Repetir para cada nivel de standard. Dibujar una curva standard para jugo y vino usando papel logarítmico, la pendiente debería estar en el rango prescrito por el electrodo. Si se desvía o si se obtienen respuestas no razonables, chequear la membrana o recargar el electrodo. Tomar el jugo o el vino y reiniciar el tratamiento.

Leer la respuesta de milivoltio y a través de una curva standard apropiada obtener el valor. La única interferencia es etil-amina, la cual rara vez está presente en suficiente concentración.

Un método adicional es también descrito y tiene algunas ventajas. La fórmula para determinar la concentración de amonio desconocida es:

$$\text{Desconocido mg/L} = \frac{\text{Concentración del standard (mg/L)}}{\text{...}}$$

$$10^{AE / \text{pendiente}} (1 + V_x / V_s) - V_x / V_s$$

Donde  $AE$  = cambios in current (en mV)

pendiente = Nerstian pendiente del electrodo (en mV)

$V_x$  = volumen de adición desconocida (en mL)

$V_s$  = volumen of standard adicionado (in mL)

La concentración del patrón debería ser estimada cercana de tal manera de ser cercana a la desconocida para mejores resultados.

(de Métodos para Análisis de Mostos y Vinos, C.S. Ough and M.A. Amerine, segunda edición, Wiley-Interscience Publication, 1988).

## PROCEDIMIENTO NOPA

### Preparación del mosto

1. Clarificación del mosto por centrifugación o sedimentación fría.

### Preparación del reactivo OPA/NAC

La solución de reactivo, suficiente para realizar aproximadamente 300 análisis, son una modificación del utilizado por Medina-Hernández et al., 1990.

1. SOLUCIÓN DEL REACTIVO A: consiste en 0,671 g de OPA disuelto y llevado a 100 mL con etanol 95%vol. Esta solución OPA es agregada a 1000 mL conteniendo 3,837 g de una solución acuosa de NaOH (s), 8,468 g de ácido bórico (s) y 0,816 g NAC (s). Llevar a volumen con agua destilada.
2. SOLUCIÓN DEL REACTIVO B: consiste de 100 mL de etanol 95%vol agregado a una solución acuosa de 3,837 g NaOH (s), 8,468 g de ácido bórico (s), y 0,816 g NAC (s). Llevar a volumen con agua destilada.

Las soluciones de reactivo pueden ser almacenadas a 4 °C por dos semanas. Al momento de utilizarla, la solución debe estar a temperatura ambiente.

## MÉTODO

### Blanco

1. Pipetear 50  $\mu$ L de agua con pipeta digital y colocar en cubeta UV standard de metil-acrilato o de cuarzo.
2. Agregar 3000  $\mu$ L de la solución de reactivo A utilizando una Repipet II dispenser.
3. Llevar a cero el espectrofotómetro UV a 335 nm con este "blanco".

## Muestra

4. Pipetear 50  $\mu\text{L}$  de la muestra de mosto y colocar en una cubeta.
5. Agregar 3000  $\mu\text{L}$  de la solución de reactivo A.
6. Agitar bien.
7. Registrar la absorbancia total de la muestra a 335 nm. después de 10 minutos.

## Testigo

8. Pipetear 50  $\mu\text{L}$  de la muestra de mosto (diluida) y colocar en una cubeta.
9. Agregar 3000  $\mu\text{L}$  de la solución de reactivo B.
10. Agitar bien.
11. Registrar la absorbancia del testigo luego de 10 minutos a 335 nm.
12. Calcular: **Absorbancia neta = "Muestra" – " Testigo"**

## Curva patrón y cálculo de la concentración de Aminoácidos Primarios

Preparar la curva a partir de 10  $\mu\text{L}$  de solución de isoleucina (ile) obtenida, disolviendo 0,328 g de ile (s) en agua destilada, en matraz de 250 mL. Los valores de las concentraciones patrones sugeridos van desde 2 a 10  $\mu\text{L}$  ile, correspondiendo a 28 – 140 mg de Nitrógeno/L.

Si la concentración de la muestra excede este rango, diluir la misma. La dilución es posteriormente compensada por la multiplicación con un factor de dilución.

Cubeta	Blanco	1	2	3	4	5
10 ile( $\mu\text{L}$ )	0	10	20	30	40	50
Agua desionizada $\mu\text{L}$	50	40	30	20	10	0
Reactivo OPA ( $\mu\text{L}$ )	3000	3000	3000	3000	3000	3000
Absorbancia 335nm						
= Nitrógeno (mg/L)	0	28	56	84	112	140

La Absorbancia neta del testigo es utilizada para calcular la concentración de nitrógeno aminado con la ecuación de regresión lineal de la curva patrón y el factor de dilución correspondiente:

**mg de Nitrógeno/L en la Muestra = (Absorbancia \* Pendiente de la curva + Intersección)\* Factor de Dilución**

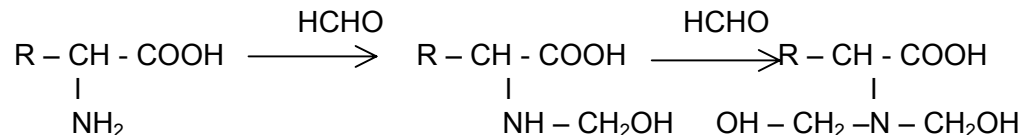
Nota: El procedimiento NOPA mide únicamente aminoácidos primarios.

(de Butzke & Dukes, 1998 <http://wineserver.ucdavis.edu/oldsite/nopa98.pdf>)

## TITULACIÓN FORMOL

La titulación por formol no es específica para aminoácidos ya que también mide otros componentes, dando resultados por exceso por el método ninhidrina.

La reacción es:



### Procedimiento

El método mide  $\alpha$ -amonió y aminoácidos pero no prolina (la cual no es usada por la levadura durante la fermentación de jugo de uva). Los grupos amino reaccionan con el formaldehído y se titula los grupos carboxilo.

Reactivos:

- NaOH 1N
- NaOH 0.1 N
- BaCl<sub>2</sub> 20%
- Formaldehído 40% llevado a pH= 8.00 usando NaOH 1 N

Preparación de reactivos (fresca para cada sesión de análisis):

Poner la cantidad necesaria de formaldehído (alrededor de 20 ml para cada análisis) en un Erlenmeyer y llevar el pH a 8.00 goteando NaOH 0.1 N.

### Análisis:

Muestra de 50 ml de jugo, poner en un Erlenmeyer y llevar pH a 7.50 pero adicionando NaOH 1 N. Transferir a un matraz de 100 ml, adicionar 5 ml de BaCl<sub>2</sub> 20%, agitar enérgicamente y llevar a volumen.

Filtrar y sacar una muestra de exactamente 50 ml de solución clara la cual debe ser llevada a pH 8.00 adicionando gota a gota NaOH 0.1 N con una pipeta.

Luego agregar 20 ml de formaldehído al 40%, previamente llevado a pH 8

La reacción aumenta la acidez. Retitular a pH 8.00 pero usando NaOH 0.1 N y tomar nota del ml de NaOH usado.

$$\text{FAN (Nitrógeno prontamente asimilable) (mg/L)} = (\text{mL NaOH } 0.1\text{n}) \times 56$$

Como standard puede utilizarse una solución recién preparada de Threonina a 170.1 mg/100 mL, que corresponde exactamente a 200mg/L FAN.

**PRECAUCIÓN:** debido a la toxicidad del formaldehído, el análisis debe ser hecho bajo condiciones apropiadas.

*(Método Soresen modificado por ISVEA, Poggibonsi, Italia).*