

AZOTO ASSIMILABILE

Questo documento raccoglie alcuni tra i più comuni metodi di analisi utilizzati per determinare nel mosto il contenuto di azoto assimilabile dai lieviti (APA).

L'APA viene definito come azoto ammoniacale + (azoto amminico-prolina).

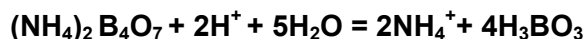
L'Azoto Totale è un'analisi standard che dà solamente un dato indicativo, dal momento che include anche l'azoto proteico e peptidico, oltre alla prolina. Alcuni studi indicano che l'azoto assimilabile rappresenta mediamente il 40% dell'azoto totale, ma la variabilità tra mosti è tale da rendere tale metodo poco consigliabile.

Il Numero di Formolo è un'altra analisi piuttosto datata, facile e veloce da eseguire quando si dispone di un pHmetro. Recenti esperienze hanno dimostrato come tale analisi determini in modo accettabile il solo azoto assimilabile, non essendo sensibile alla prolina. Il risultato ottenuto può avere errori anche del 10-15%, ma molti considerano tale dato sufficientemente buono ai fini pratici. Un limite di questa analisi è che impiega formaldeide, composto tossico e che va impiegato con precauzione.

Nei casi in cui sia necessario acquisire dati esatti a scopi sperimentali, è bene impiegare metodiche più accurate. L'Università di Davis, California, ha messo a punto una metodica, detta NOPA, in grado di misurare esattamente l'azoto α -amminico (detto FAN). A questo dato va però aggiunto il valore di azoto ammoniacale, determinato nei paesi anglosassoni con un elettrodo specifico.

AZOTO TOTALE

L'azoto totale si determina nei vini facendo ricorso alla metodica di Kjeldahl. La maggior parte dell'azoto nei mosti e nei vini è nella forma di amminoacidi, peptidi e proteine. Una volta completata la digestione, l'ammoniaca viene distillata in una soluzione di acido borico e titolata, secondo la reazione:



Procedura

Preparare un reagente dissolvendo 33 g di acido salicilico in 1 litro di acido solforico concentrato. Preparare una miscela composta da: 1 g di solfato di rame pentaidrato, 2 g di solfato ferroso eptaidrato e 20 g di solfato di sodio.

Prelevare 50 ml di campione se trattasi di vino secco, oppure 25 ml nel caso dei mosti o di vini dolci e mettere il campione in un recipiente Kjeldahl da 800 ml.

Evaporare fino ad un volume di 10 ml. Aggiungere quindi 40 ml di reagente solforico-salicilico, 10 g della miscela di cui sopra e 3 gocce di ossicloruro di selenio; miscelare e scaldare immediatamente. Se necessario, aggiungere una goccia di antischiuma al silicone. Scaldare vigorosamente per circa 20 minuti per ottenere una soluzione limpida.

Lasciare raffreddare a temperatura ambiente, aggiungere 300 ml di acqua, agitare, aggiungere lentamente 100 ml di NaOH 12 N facendolo scorrere lungo la parete del recipiente, infine aggiungere alcune gocce di fenoftaleina e miscelare.

Posizionare il recipiente nell'apparato di microdistillazione e distillare 150 ml in una beuta da 500 ml contenente 30 ml di acido borico al 4% ed alcune gocce di una soluzione di rosso di metile in etanolo al 60%. Rimuovere la beuta al termine della distillazione e risciacquare il condensatore.

Titolare il distillato fino al viraggio al rosso con una soluzione di acido cloridrico 0.1N.

Utilizzare 50 ml di acqua come bianco

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

Dove A = volume di acido cloridrico usato per la titolazione del campione (ml)
B = volume di acido cloridrico usato per la titolazione del bianco (ml)
N = normalità dell'NaOH
V = volume del campione (ml)

(estratto da: *Methods for Analysis of Musts and Wines*, C.S. Ough and M.A. Amerine, seconda edizione, Wiley-Interscience Publication, 1988)

AZOTO AMMONIACALE

Procedura

Preparare un mosto d'uva sintetico (200 g/l glucosio, 10 g/l acido malico e K_2HPO_4 in quantità sufficiente per portare il pH a 3.3).

Preparare anche una soluzione standard di ammonio (1000 mg/l NH_3 , 6.706 g di $(NH_4)_2SO_4$ per litro).

Prelevare 1.5, 10, 20 e 30 ml della soluzione standard in matracci. Portare a volume con mosto sintetico. Miscelare e pipettare 25 ml in becker con ancoretta. Mettere il becker sull'agitatore magnetico ed aggiungere 10 ml di NaOH 6N. Mantenendo in costante agitazione, immergere l'elettrodo ammonio. Attendere per 1-2 minuti il raggiungimento dell'equilibrio, poi leggere il valore in millivolt. Ripetere l'operazione per ogni livello dello standard. Tracciare una curva di riferimento per il mosto su scala logaritmica.

Prelevare quindi il campione di mosto e procedere come sopra. Leggere la risposta in millivolt e ricavare la concentrazione dalla curva standard.

(estratto da *Methods for Analysis of Musts and Wines*, C.S. Ough and M.A. Amerine, seconda edizione, Wiley-Interscience Publication, 1988)

AZOTO ALFA-AMMINICO (NOPA)

Procedura

Preparazione del mosto: centrifugare o far decantare a freddo il mosto.

Preparazione del reagente OPA/NAC (sufficiente per circa 300 analisi)

1. Soluzione A: 0,671 g di OPA (orto-ftaldialdeide, Sigma P 1378), dissolti in 100 ml di etanolo al 95%. Questa soluzione OPA è aggiunta ad un matraccio da 1000 ml contenente una soluzione acquosa di 3,837 g di NaOH, 8,468 g di acido orto-borico e 0,816 g di NAC (N-acetil-L-cisteina, Sigma A 9165). Portare a volume con acqua deionizzata aggiunta ad una soluzione acquosa.
2. Soluzione B (bianco): 100 ml di etanolo 95% aggiunti ad un matraccio da 1000 ml contenente una soluzione acquosa di 3,837 g di NaOH, 8,468 g di acido orto-borico e 0,816 g di NAC

I due reagenti possono essere conservati in frigorifero per 2 settimane. Prima di usarle, portare le due soluzioni a temperatura ambiente.

Analisi

Bianco

1. pipettare 50 μ L di acqua in una cuvetta in quarzo per UV
2. aggiungere 3000 μ L del reagente soluzione A
3. leggere l'assorbanza a 335 nm con uno spettrofotometro UV: questa lettura corrisponde al "bianco".

Campione

4. pipettare 50 μ L di mosto in una cuvetta. Se si stima che l'azoto sia superiore a 150 mgN/l, diluire il campione con acqua.
5. aggiungere 3000 μ L del reagente soluzione A.
6. Miscelare bene. Questa soluzione rappresenta il "campione"
7. leggere l'assorbanza a 335 nm dopo 10 minuti.

Bianco del campione

8. pipettare 50 μL di mosto (eventualmente diluito) in una cuvetta
9. aggiungere 3000 μL del reagente soluzione B .
10. miscelare bene. Questa soluzione è il "bianco del campione"
11. leggere l'assorbanza a 335 nm dopo 10 minuti.
12. Calcolare la differenza di assorbanza ($A_{\text{campione}} - A_{\text{bianco del campione}}$)

Risultato

Preparare una curva standard utilizzando una soluzione 10 mM di isoleucina (0,328 g di L-isoleucina, Sigma I 2752, in 250 ml di acqua deionizzata (suddividere la soluzione in aliquote da 2 ml e congelare per usi futuri)

La forbice di concentrazione suggerita è tra 2 e 10 mM, che corrisponde a 28 – 140 mgN/l.

Diluire il campione se il contenuto eccede il range della curva standard.

Ogni diluizione viene successivamente compensata con il calcolo del fattore di diluizione

Cuvetta	bianco	1	2	3	4	5
10 mM ile (μL)	0	10	20	30	40	50
Acqua (μL)	50	40	30	20	10	0
Reagente OPA (μL)	3000	3000	3000	3000	3000	3000
Assorbanza 335nm						
= Azoto (mg/L)	0	28	56	84	112	140

L'assorbanza netta è usata per calcolare la concentrazione in α -N amminoacidi, facendo uso della regressione lineare della curva di taratura e tenendo conto del fattore di diluizione:

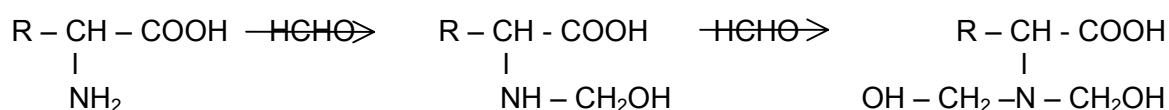
$$\text{mg N/L nel campione} = (\text{Assorbanza netta} \times \text{pendenza} + \text{intercetta}) \times \text{fattore di diluizione}$$

NB: il metodo misura solamente gli α -N amminoacidi

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

NUMERO DI FORMOLO

L'analisi non è specifica per amminoacido e misura anche altri componenti: il risultato è quindi maggiore rispetto a quanto ottenibile con il metodo alla ninidrina. La reazione è:



Il prodotto finale dell'amminoacido, dopo la reazione con 2 molecole di formaldeide, ha un carbossile che viene determinato per titolazione. L'analisi determina anche l'ammonio.

Reattivi:

- NaOH 1 N
- NaOH 0.1 N
- BaCl_2 20%
- Aldeide formica 40% portata a pH=8.00 con NaOH 1 N

Strumentazione:

- pHmetro
- buretta da ml 10
- pipetta da ml 5
- pipette da ml 20 e ml 50, spazio morto – classe A
- becher da 100 ml
- pipetta pasteur

– imbuto e carta da filtro.

Preparazione del reattivo (da eseguire ad ogni sessione di prove):

Porre la quantità necessaria di aldeide formica (calcolarne ml 20 per ciascuna determinazione) in un becher e portare a pH=8.00 mediante aggiunta di NaOH 0.1 N goccia a goccia.

Procedimento:

Si prelevano 50 ml esatti di mosto, si pone in un becher da 100 ml; si porta circa a pH=7.50 con l'aggiunta di NaOH 1 N. Si trasferisce quantitativamente in un matraccio da ml 100, vi si aggiungono 5 ml di BaCl₂ al 20%, si agita bene e si porta a volume. Si filtra la soluzione ottenuta e si recuperano esattamente 50 ml di liquido limpido che devono essere riportati a pH=8.00 per aggiunta di NaOH 0.1 N goccia a goccia con la pipetta pasteur. A questo punto si aggiungono 20 ml esatti di aldeide formica al 40% portata precedentemente a pH=8.00. Il pH diminuisce. Si titola con NaOH 0.1 N fino a pH=8.00, segnando il volume utilizzato in ml.

$$\text{APA (espresso in mgN/l)} = (\text{ml NaOH 0,1N}) \times 56$$

Un controllo dei reattivi si può effettuare a partire da una soluzione madre di treonina da 170.1 mg/100 ml, corrispondente esattamente a 200 mg/l di A.P.A., preparata di fresco.

Attenzione: Il procedimento analitico richiede la scrupolosa osservanza delle norme di corretta prassi di laboratorio. In particolare, si raccomanda di operare sotto cappa di aspirazione a causa dell'elevata tossicità dell'aldeide formica!

(Metodo Soresen modificato da ISVEA, Poggibonsi, Italy)