**LAN0451 Açúcar e Bebidas – Aula prática FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA (13 / Out)**

A sacarose é o açúcar predominante no caldo de cana-de-açúcar, quando esta está madura. O **caldo de cana,** obtido por moagem e prensagem da cana, apresenta em torno de 80% de água, 20% de sacarose, 1% de açúcares redutores e o restante são cinzas e compostos nitrogenados. O pH do caldo varia entre 5,2 a 6,8.

O **melaço** **de cana** é um sub-produto da produção de açúcar. Sua composição contém, em geral, 20% de água, 62% de açúcares, 8% de cinzas, 3% de matéria nitrogenada e 7% de outros (gomas, ácidos, etc.). Pode-se dizer que o melaço contém 50% de açúcares fermentescíveis (32% de sacarose, 14% de glicose e 16% de frutose).

**1. Materiais**

Cada grupo irá necessitar de:

|  |  |
| --- | --- |
| - 1 Erlenmeyer de 250 mL | - algodão (tampar o Erlenmeyer) |
| - 1 proveta de 100 mL | - bastão de vidro |
| - 1 béquer de 250 mL | - pipetas |
| - tubos de ensaio (5) | - balão volumétrico |

**2. Metodologia**

A. Preparo do mosto

- Calcular o volume necessário de caldo e melaço para 20ºBrix para o mosto, para preparar 250mL (para 2 grupos), sendo 21% do açúcar proveniente do melaço e 79% proveniente do caldo.

- Cada grupo irá transferir 100mL do mosto para Erlenmeyer (250 mL).

- O mosto inicial será analisado quanto ao pH, Brix, DO, Acidez total e AR e ART.

- Fechar o frasco com tampão de algodão.

B. Inoculação do mosto

- O mosto será inoculado com 1g de fermento liofilizado.

- Pesar o fermento, adicionar ao frasco e agitar até completa dissolução do fermento.

- Incubar os frascos em estufa (32º C) por 15 horas

C. Análises finais

* Analisar pH e concentração das leveduras (1mL de amostra em 50 mL de água)
* Centrifugar o mosto fermentado (2000 rpm / 10 min / 10º C)
* Separar o sobrenadante
* Analisar ART e teor alcoólico do vinho delevurado

**3. Análises físico químicas e microbiológicas**

* 1. **pH**

- Analisar o pH do mosto em aparelho pHmetro.

* 1. **Acidez Total,** expressa em gramas de ácido acético por litro de amostra, obtida por meio de reação de neutralização

- Pipetar 20mL da amostra homogeneizada e transferir para Erlenmeyer (250mL);

- Adicionar 50mL de água destilada e 2-3 gotas da solução indicadora de fenolftaleína;

- Encher a bureta com hidróxido de sódio 0,1N e proceder à titulação até a mudança de coloração, anotando o volume gasto (Vg);

- Calcular a acidez total utilizando a equação:

$$Acidez total ( \frac{mg ácido acético}{L})=\frac{Vgasto x N x 60 x 1000}{Vinicial amostra}$$

Na qual: *Vgasto* = volume de NaOH 0,1N gasto na titulação

 *N* = normalidade corrigida pelo fator da solução de Na OH

 *60* = equivalente de ácido acético

* 1. **Brix**

- Analisar o Brix, porcentagem, em massa, de sólidos solúveis contidos em uma solução, utilizando um Refratômetro digital com correção de temperatura.

Obs. O **BRIX REFRATOMÉTRICO** é a Unidade da escala de um refratômetro que, por meio do índice de refração da luz, expressa a porcentagem em massa dos sólidos dissolvidos em uma solução açucarada a 20°C.

* 1. **Concentração de células obtida por DO**

A quantidade de fermento no mosto será determinada por medida de Densidade Ótica (DO) por meio da leitura de absorbância em 600nm

- Retirar amostras, como indicado abaixo e após diluir convenientemente, medir a concentração das leveduras por turbidimetria, obtendo a Absorbância a 600nm.

- Calcular a DO multiplicando o valor de Abs observado pela diluição correspondente

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| ***Amostra*** | ***Diluição***  | ***Volume amostra*** | ***Volume água*** |  |
| DO mosto | 11x | 0,5 mL | 5 mL | Tubo de ensaio |
| DO inicial do mosto inoculado | 50x | 0,5 mL | 25 mL | Balão volumétrico |
| DO final |

* 1. **Concentração de açúcar - AR e ART**

A química da reação do ácido dinitrossalicílico com açúcares redutores está elucidada em parte. O ácido 3,5-dinitrossalicílico é reduzido para ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, enquanto que, no caso mais simples, o grupamento aldeído parece ser oxidado a grupamento carboxila.



Figura 1: O ácido dinitrossalicílico é reduzido pelo açúcar redutor em meio alcalino. A.R. = Açúcar Genérico

A análise de açúcar redutor (AR) é realizada como descrito a seguir e a análise de açúcar redutor total (ART) é realizada após a hidrólise da sacarose.

**Procedimento:**

- Em tubo de ensaio, transferir 0,5 mL da amostra diluída a ser analisada;

- Adicionar 0,5 mL do Reagente DNS, homogeneizar bem;

- Colocar os tubos em banho de água fervente por 5 minutos;

- Retirar os tubos do banho e resfriar em água corrente até temperatura ambiente;

- Adicionar 4 mL com água destilada; Homogeneizar bem;

- Determinar a Abs em 540 nm;

**NOTAS:**

1. Preparar o “Branco da Reação” para calibração do Espectrofotômetro (T=100%, A=0,00), que é preparada como descrito acima, mas adicionando 0,5 mL de água destilada em vez da amostra.
2. Utilizar um cronômetro, para que o tempo de reação fique padronizado.

# HIDRÓLISE DA SACAROSE

**Procedimento**

- Em um balão volumétrico (100 mL) adicionar

25 mL de solução HCl 1,3N e

 5 mL da amostra

- Mergulhar o balão em um banho-maria a 60 – 65º C durante 30 minutos

- Após este tempo, resfriar o balão, em água corrente, até atingir a temperatura ambiente

- Neutralizar a solução obtida com uma solução de NaOH 4N, tendo como indicador papel de Tornassol

- Completar o volume do balão com água destilada e homogeneizar bem

- Diluir uma alíquota da amostra hidrolisada de modo a situar a concentração de açúcares redutores totais no intervalo de concentrações em que a equação obtida pela curva padrão do método adotado seja válida

- Determinar o teor de Açúcar Redutores Totais (ART), utilizando a metodologia descrita anteriormente para análise de AR.

# CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DE AÇÚCARES REDUTORES PELO MÉTODO DO DNS (efetuada previamente)

**a. Soluções de Uso**

- Solução de Glicose Padrão 20g glicose anidra / 1000 mL H2O destilada (conc. 20 mg/mL)

- Reagente DNS

**b. Obtenção da Curva de Calibração**

Diluir a solução de glicose (20mg/mL) para 1mg/mL. Transferir os volumes para tubo de ensaio, conforme tabela a seguir.

**Tabela I –** Construção da Curva de Calibração:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Solução Número** | **Concentração Diluição (g/L)** | **L Solução Padrão (1mg/mL)** | **H2O destilada (L)** |
| 0 | 0,0 | 0 | 500 |
| 1 | 0,2 | 100 | 400 |
| 2 | 0,4 | 200 | 300 |
| 3 | 0,6 | 300 | 200 |
| 4 | 0,8 | 400 | 100 |
| 5 | 1,0 | 500 | 0 |

**c. Procedimento**

- Em tubos de ensaio, transferir, com pipeta automática, os volumes acima apresentados;

- Adicionar a cada tubo 0,5 mL do Reagente do DNS. Homogeneizar bem;

- Colocar os tubos em banho-maria em ebulição por 5 minutos;

- Após este tempo, resfriar os tubos em água corrente até temperatura ambiente. Homogeneizar bem;

- Completar o volume dos tubos à marca de aferição com água destilada. Homogeneizar bem;

- Determinar a Abs em λ = 540 nm.

**d. Construção do Gráfico**

Construir um gráfico com os valores de Abs x Concentração

Obter a equação da reta.

* 1. **Contagem celular / Viabilidade celular**

A porcentagem de células viáveis será determinada por meio de exame a fresco da suspensão de leveduras coradas com azul de metileno, de acordo com Pierce (1970) e Antonini (2004).

- Transferir 0,1 mL da suspensão de células diluída para tubo de ensaio contendo 0,1 mL da solução de azul de metileno-citrato de sódio; homogeneizar

- Transferir um pequeno volume para câmara de Neubauer com o auxílio de uma pipeta.

- Proceder a contagem em microscópio óptico em objetiva de 40 vezes (aumento de 400 X).

$$Viabilidade \left(\%\right)=\frac{número de células viáveis}{número total de células} x 100$$

$$Número total de células por mL=número de células nos 25 campos x diluição x 10000$$

* 1. **Determinação de teor alcoólico em vinhos de destilarias pelo Densímetro Digital A. PAAR DMA - 45**

**Principio do método:**

Baseia-se na leitura da densidade de uma amostra obtida por destilação e passada por um densímetro digital para líquidos e gases cuja medida é automaticamente calculada por um processador aritmétrico. O principio da mensuração do instrumento é baseado na alteração da frequência natural do oscilador vazio e quando o mesmo é preenchido com diferentes líquidos ou gases.

Em realidade, no caso presente estamos fazendo a leitura da massa específica da solução a 20 C e relacionando-a através de uma tabela ao conteúdo em etanol. O aparelho é um densímetro eletrônico que permite obter qualquer relação de densidade.

Destilação:

* Colocar água na caldeira do destilador onde está a resistência até a marca “máximo”. O volume deverá ser completado quando o nível da mesma estiver próximo da marca “mínimo”;
* Ligar a água de alimentação do condensador;
* Certificar-se da voltagem do aparelho (110/220V);
* Colocar a chave na posição liga e o termostato no máximo (10), para aquecer a água da caldeira, mantendo abertas as torneiras de entrada de amostra e da caldeira e fechada a torneira do vácuo (torneira junto ao condensador);
* Quando a água da caldeira entrar em ebulição, abaixar a temperatura, (termostato = 0);
* Transferir, com o auxílio de uma pipeta volumétrica um volume conhecido de amostra (máximo de 50mL) para a câmara de destilação (com as torneiras de entrada de amostra e da caldeira abertas e a de vácuo fechada), devagar para que ela não suba pelo tubo de despejo;
* Lavar com o auxílio de uma pisseta contendo água destilada, o local onde foi colocada a amostra;
* Fechar a torneira de entrada de amostra e manter a da caldeira aberta;
* Colocar um balão volumétrico de volume desejado no final do condensador de tal forma que a ponta do condensador fique dentro do balão;
* Elevar a temperatura ao máximo (termostato = 10), até que a água da caldeira entre em ebulição;
* Após a água da caldeira entrar em ebulição, fechar a torneira da mesma, e colocar o termostato na temperatura de trabalho. Esta temperatura é determinada de modo que o material a ser destilado não ultrapasse a primeira bola do destilador;
* Destilar até completar o volume do balão volumétrico à marca de aferição;
* Retirar o balão;
* Abaixar a temperatura e ao mesmo tempo abrir a torneira do vácuo (manter as outras duas torneiras fechadas);
* Esperar até que toda a vinhaça seja ejetada pelo tubo de despejo;
* Lavar o destilador com água destilada;
* Homogeneizar bem a amostra.

Leitura no Densímetro Digital:

* Ligar o Densímetro Digital, certificar a voltagem (110/220V), verificar o volume de água do banho termostatizado;
* Colocar água destilada no copo receptor de amostra com a torneira aberta, deixando escoar a água de modo que preencha toda a tubulação;
* Fechar a torneira e esperar que o aparelho atinja as condições de trabalho, (d = 0,9982 a 20/4°C);
* Após o densímetro atingir as condições de trabalho, transferir uma alíquota da amostra para o copo receptor de amostra do Densímetro, tomando-se o cuidado de lavar tanto o copo receptor da amostra quanto o tubo do Densímentro com a solução a ser lida;
* Transferir o restante da amostra para o copo receptor da mesma, completando-se totalmente o tubo de Densímetro com a solução a ser lida, verificando se não houve formação de bolhas no tubo (no caso de formação de bolhas, deixar escoar a amostra lentamente até eliminação das mesmas);
* Aguardar a estabilização da temperatura da amostra, que é observada pala reprodutibilidade do mesmo valor da densidade;
* Anotar a leitura da densidade;
* Fazer a conversão da densidade lida, para concentração alcoólica da solução em %v/v utilizando a Tabela presente no Laboratório.

Os resultados são expressos em % v/v.





