

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA POLITÉCNICA

CESARE PENNACCHI  
KARINA MIE FUTINO MIYARA

**Cinética das reações de Maillard e o efeito fisiológico de seus produtos sobre leveduras  
*Saccharomyces cerevisiae***

São Paulo  
2020

CESARE PENNACCHI  
KARINA MIE FUTINO MIYAURA

**Cinética das reações de Maillard e o efeito fisiológico de seus produtos sobre leveduras**  
*Saccharomyces cerevisiae*

Tese apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo para aprovação na disciplina PQI 3502 - Trabalho de Conclusão de Curso II.

Área de concentração: Engenharia de Bioprocessos  
Orientador: Prof. Dr. Thiago Olitta Basso

São Paulo  
2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Pennacchi, Cesare; Miyaura, Karina Mie Futino

CINÉTICA DAS REAÇÕES DE MAILLARD E O EFEITO FISIOLÓGICO DE SEUS PRODUTOS SOBRE LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae* / C. Pennacchi; K. M. F. Miyaura -- São Paulo, 2020.

23 p.

Trabalho de Conclusão de Curso - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1. Reação de Maillard 2. Fisiologia de leveduras 3. *Saccharomyces cerevisiae*  
I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.

## RESUMO

PENNACCHI, Cesare; MIYAURA, Karina Mie Futino. **Cinética das reações de Maillard e o efeito fisiológico de seus produtos sobre leveduras *Saccharomyces cerevisiae***. 2020. 23 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

O presente trabalho analisa a cinética das reações de Maillard entre sacarose e três aminoácidos, glutamina, asparagina e ácido aspártico, e a influência de seus produtos no crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*. Para tal, estudou-se primeiramente a cinética da reação entre esses dois grupos em diferentes temperaturas e em concentrações semelhantes às condições industriais a partir de medidas de absorvância em dois comprimentos de onda, em que se verificam a formação dos produtos intermediários e finais da reação. Nessas cinéticas, observou-se que a reação entre sacarose e ácido aspártico apresentou maior absorvância nos comprimentos investigados, indicando maior formação de produtos e cor no meio reacional. Após investigação da reação, o comportamento das leveduras em meios contendo esses reagidos foi estudado, de maneira que os resultados obtidos sugerem que as reações de Maillard com glutamina e asparagina tiveram pouco efeito no crescimento celular, enquanto que o ácido aspártico apresentou maior reatividade e teve maior influência na velocidade específica de crescimento da levedura. Paralelamente aos crescimentos e a fim de obter dados de velocidade específica máxima e tempo de fase lag a partir de curvas de crescimento realizadas em microplacas de forma consistente e sem viés, foi elaborada uma ferramenta no software matemático MATLAB, em que a curva de crescimento é ajustada a modelos exponenciais. Seis modelos foram escolhidos, dos quais três (Gompertz, Logístico e Boltzmann) foram reparametrizados a fim de serem funções da velocidade específica máxima de crescimento e do tempo de fase lag como parâmetros e os outros três modelos (Logístico deslocado, Richards e Power type) tiveram estes parâmetros fisiológicos escritos em função dos parâmetros originais dos modelos.

Palavras-chave: reação de Maillard. Fisiologia de leveduras. *Saccharomyces cerevisiae*.

## ABSTRACT

PENNACCHI, Cesare; MIYAURA, Karina Mie Futino. **Maillard reaction kinetics and the effects of their products on *Saccharomyces cerevisiae* yeasts.** 2020. 23 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

This project aims to analyze the reaction kinetics between sucrose and three amino acids, Glutamine, Asparagine and Aspartic Acid, as well as the influence of the products formed in the *Saccharomyces cerevisiae* yeast growth. With that in mind, curves generated from absorbance measurements at two wavelengths for each of the solutions containing sucrose and one of the three amino acids were studied. The results have shown that Aspartic Acid reacted the most when heated with Sucrose, whereas Asparagine and Glutamine had similar results between them, this can also be seen on the physiology screening, in which Aspartic Acid had the greatest effect on culture growth. In order to obtain maximum specific growth rate and lag phase from growth curves performed on microplates consistently and without bias, a tool was developed using the MATLAB software wherein the growth data points are fit into exponential models. Six models were used in this tool, three of which (Gompertz, Logistic and Boltzmann) were reparametrized as to be functions of specific growth rate and lag time while the others (Shifted Logistic, Richards and Power type) were manipulated to have these physiological parameters be a function of the original parameters.

Keywords: Maillard reaction. Yeast physiology. *Saccharomyces cerevisiae*.

PENNACCHI, Cesare; MIYAURA, Karina Mie Futino. **Cinética das reações de Maillard e o efeito fisiológico de seus produtos sobre leveduras *Saccharomyces cerevisiae***. 2020. 23 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	4
2 DESENVOLVIMENTO	5
2.1 Reações de Maillard	5
2.1.1 Metodologia e Método	5
2.1.2 Resultados	7
2.2 Efeito fisiológico sobre leveduras	7
2.2.1 Metodologia e Método	7
2.2.2 Resultados	8
2.3 Ferramenta matemática	9
2.3.1 Elaboração	9
2.3.2 Resultados	13
2.4.1 Discussão sobre a Reação de Maillard	18
2.4.2 Discussão sobre o efeito fisiológico na levedura	18
2.4.3 Discussão sobre a ferramenta	19
3 CONCLUSÕES	20
REFERÊNCIAS	21

## 1 INTRODUÇÃO

A reação de Maillard é uma das mais importantes que ocorrem no processamento de alimentos. A reação, que ocorre entre um grupo carbonila de um açúcar e um grupo amina de um aminoácido (JANG et al., 2013) em condições de alta temperatura foi descrita pela primeira vez por Louis Camille Maillard em 1912 (ZHOU; LI; YU, 2016).

Os produtos são formados em três etapas principais: inicial, intermediária e final. Na etapa inicial são formadas moléculas pequenas, chamadas de produtos de Amadori, a partir de pequenos rearranjos da molécula formada pela reação do açúcar com o aminoácido. Posteriormente, há a formação de compostos intermediários reativos alfa-dicarbonílicos a partir de rearranjos dos produtos iniciais. A partir destes compostos intermediários incolores ocorre a formação de compostos poliméricos finais que apresentam coloração marrom. As reações de Maillard ocorrem simultaneamente às reações de caramelização, reações de decomposição do açúcar através de enolização, desidratação, clivagem e aldolização. (KOCADAĞLI; GÖKMEN, 2016; HENNING; GLOMB, 2016).

As reações de Maillard têm um papel essencial na formação das cores, sabores e aromas em alimentos (GOLON et al., 2014), porém, os compostos gerados podem ser tanto benéficos quanto prejudiciais, tendo desde propriedades antioxidantes até efeitos tóxicos ou mutagênicos e está ligado a diversas enfermidades (KOCADAĞLI; GÖKMEN, 2016; HENNING; GLOMB, 2016).

No processo da produção de etanol de primeira geração, o melaço utilizado como substrato para as leveduras passa por diversas etapas desde a extração da cana-de-açúcar, incluindo etapas de tratamento de pH e de aquecimento de até 100 °C, permitindo que ocorram reações de caramelização e de Maillard (LAGO et al., 2012, DIAS et al., 2015). A composição do caldo da cana-de-açúcar, e por consequência do melaço, é de difícil definição, devido às variações que ocorrem em decorrência da condição do cultivo da cana, como solo, temperatura, clima, entre outros, além do período do ano em que a colheita é feita (RAGHAVENDRAN et al., 2017; LINO; BASSO; SOMMER, 2018).

Este trabalho pretende analisar a cinética das reações de Maillard entre a sacarose e três aminoácidos, glutamina, asparagina e ácido aspártico, e a influência dos produtos destas reações no crescimento de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, podendo futuramente auxiliar na elaboração de um melaço sintético definido para uso em estudos sobre fermentação. Além disso, haverá a elaboração e uso de uma ferramenta de obtenção



dos parâmetros de crescimento velocidade específica máxima e tempo de fase lag a partir de curvas de crescimento realizadas em microplacas.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 Reações de Maillard

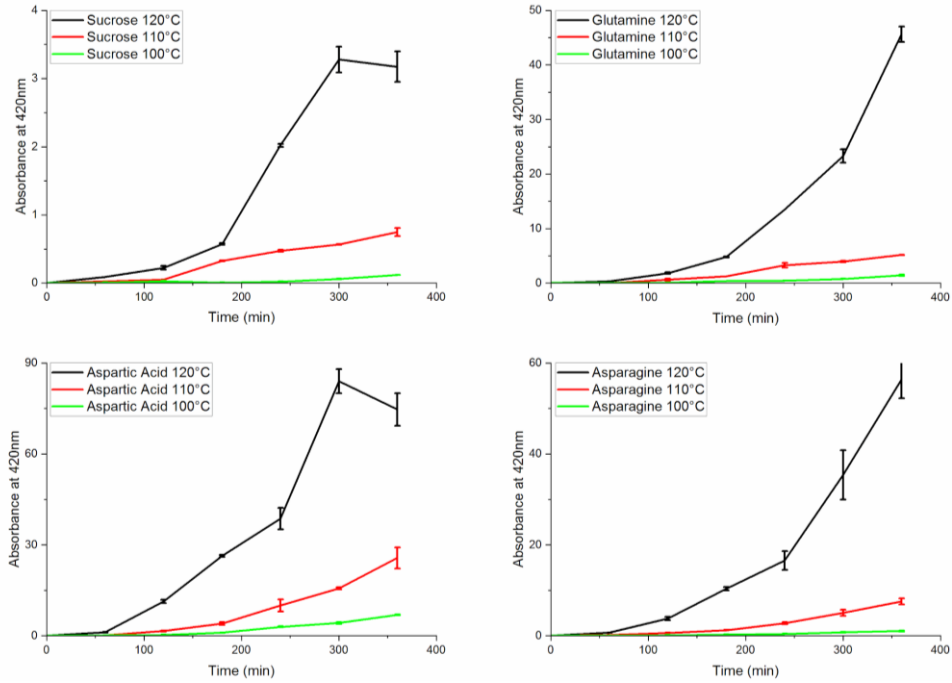
#### 2.1.1 Metodologia e Método

Três aminoácidos foram escolhidos para terem sua cinética estudada na reação de Maillard com a sacarose. O ácido aspártico (ASP), a asparagina (ASN) e a glutamina (GLN) foram escolhidos por serem os aminoácidos presentes em maior quantidade, tanto no caldo de cana quanto no melaço, assim como a sacarose (SUC) foi escolhida, uma vez que é o açúcar mais presente (LINO; BASSO; SOMMER, 2018).

Foram preparadas soluções de cada  $44,6 \text{ g.L}^{-1}$  de aminoácido e  $216 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose, que reflete a proporção de 5:1 encontrada no caldo de cana (AMORIM; BASSO; LOPES, 2009; DELLA-BIANCA et al., 2012), em uma solução tampão de acetato  $0,1\text{M}$  a pH 5.  $1,5 \text{ mL}$  da solução de aminoácido e açúcar foi adicionado a tubos de ensaio de  $15 \text{ mL}$  com tampa rosqueada, vedando-os e impedindo perda de vapores. Os tubos de ensaio foram aquecidos em um banho de silicone agitado, a temperaturas de  $100$ ,  $110$  e  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ , com tubos sendo removidos do aquecimento de hora em hora para medições, até a sexta hora, onde os últimos tubos eram retirados do banho. As amostras retiradas foram rapidamente resfriadas em um banho de gelo para cessar as reações.

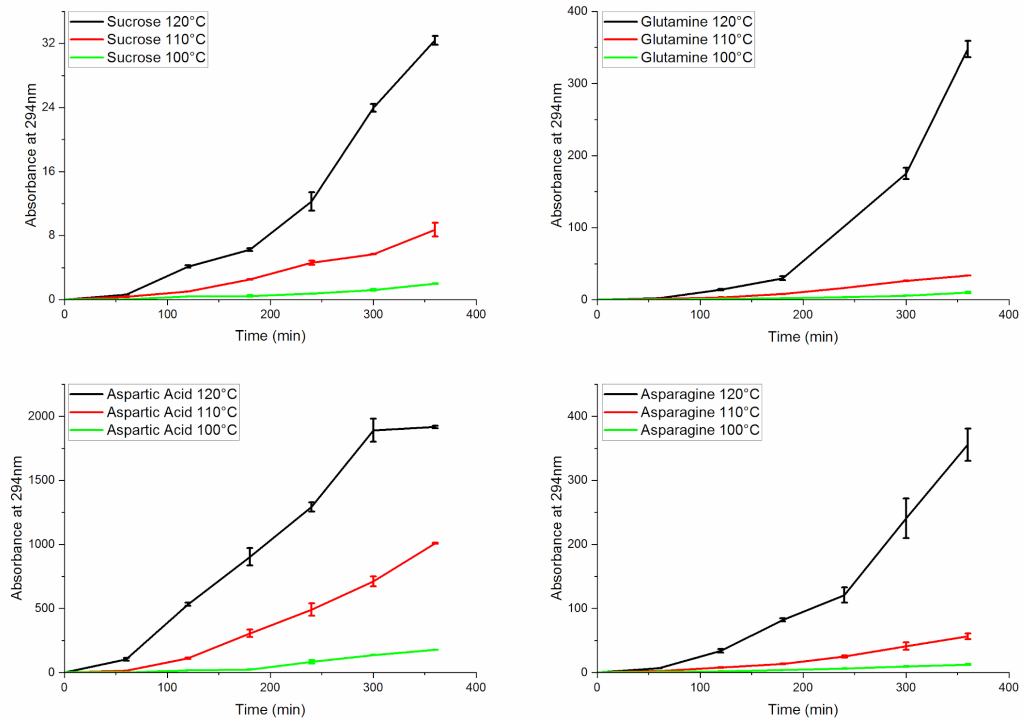
Foram feitas medidas de absorvância em dois comprimentos de onda, as medidas em  $294 \text{ nm}$  estão relacionadas aos produtos incolores iniciais e intermediários (ZHOU; LI; YU, 2016), mostrado na Figura 1, e as medidas em  $420 \text{ nm}$  estão relacionadas aos produtos finais da reação de Maillard, na Figura 2.

Figura 1 - Gráficos de absorvância em 420 nm por tempo para sacarose, glutamina, ácido aspártico e glutamina.



Fonte: Autor

Figura 2 - Gráficos de absorvância em 294 nm por tempo para sacarose, glutamina, ácido aspártico e glutamina.



Fonte: Autor

## 2.1.2 Resultados

Em ambos os comprimentos de onda o ácido aspártico apresentou os valores mais altos, a asparagina e a glutamina apresentaram valores próximos e a sacarose apresentou os valores mais baixos, sendo quase dez vezes menores que a asparagina e a glutamina. No comprimento de onda de 420 nm o ácido aspártico apresentou valores de  $74.7 \pm 5.33$  após 6h em 120 °C, a asparagina apresentou valores de  $56.4 \pm 4.16$ , a glutamina apresentou valores de  $45.6 \pm 1.40$ . No comprimento de onda de 294 nm o ácido aspártico apresentou valores de  $1917.3 \pm 9.61$ , após 6h em 120 °C, a asparagina apresentou valores de  $355.6 \pm 25.38$ , a glutamina apresentou valores de  $347.6 \pm 11.37$ .

## 2.2 Efeito fisiológico sobre leveduras

### 2.2.1 Metodologia e Método

A linhagem laboratorial CEN.PK 112 foi utilizada em todos os ensaios de fermentação deste estudo. Colônias foram colhidas de placas de Petri e usadas na inoculação do pré-inóculo em um meio de sacarose, peptona e extrato de levedura a 20, 20 e 10 g.L<sup>-1</sup> respectivamente e incubada a 30 °C e 250 rpm em um tubo para centrífuga de um dia para o outro (MADEIRA-JR; GOMBERT, 2018). As culturas foram reativadas em um novo meio de mesma composição três horas antes de serem utilizadas como inóculo.

O meio escolhido para o crescimento foi um meio mineral modificado (VERDUYN et al., 1992) composto de uma solução de 5,0 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio, 3,0 g.L<sup>-1</sup> de fosfato de potássio, 0,5 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de magnésio heptahidratado, 1 mL.L<sup>-1</sup> de solução de elementos traço, 1 mL.L<sup>-1</sup> de solução de vitaminas com as soluções de produtos de Maillard em uma proporção de 8:2, resultando em meios com 20 e 40 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. O mesmo meio foi preparado utilizando soluções de sacarose e aminoácidos sem aquecimento como experimentos de controle.

Os crescimentos foram realizados em microplacas de 96 poços cobertos com um filme impermeável a 30 °C com ciclos de agitação de 15 segundos e amplitude de 5 mm. Além dos meios inoculados foram colocados meios não inoculados com fins comparativos. A OD<sub>600</sub> inicial do crescimento foi de 0,1 e os cultivos tiveram duração de 24 h, com exceção do meio com ácido aspártico que foi deixado por 48 horas, pois não alcançou a fase estacionária após 24 horas (MELLO et al., 2019).

### 2.2.2 Resultados

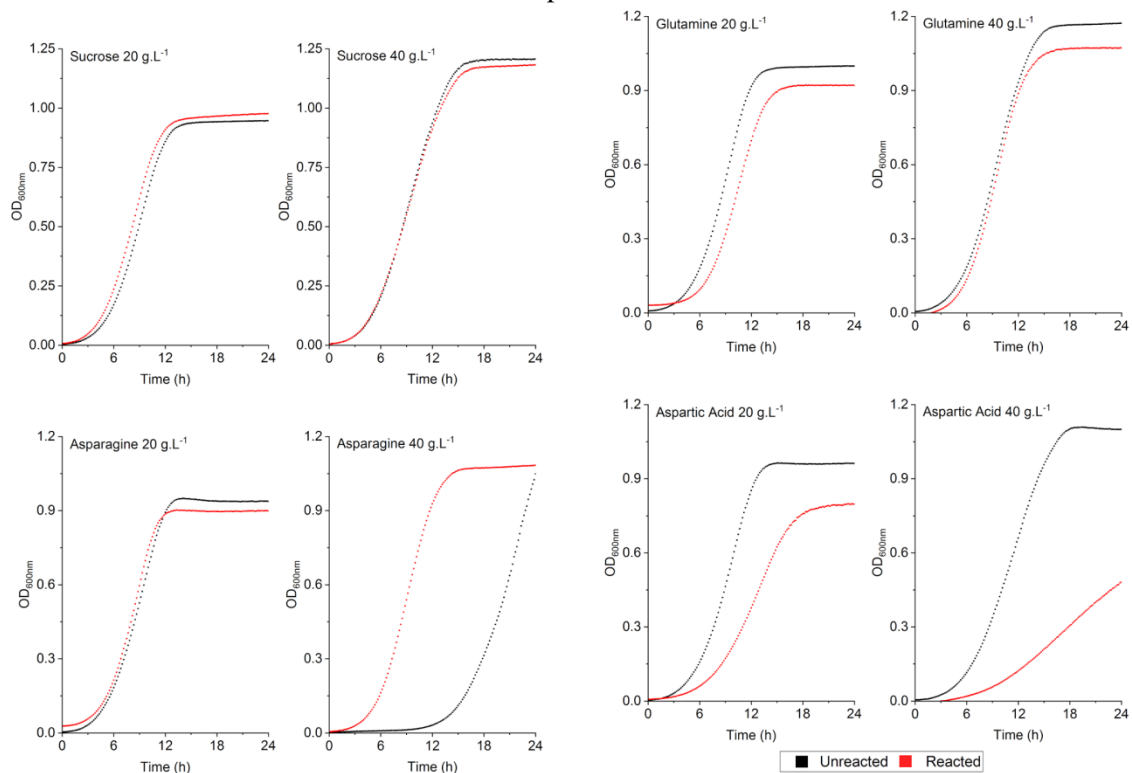
Os resultados obtidos sugerem que as reações de Maillard com glutamina e asparagina tiveram pouco efeito no crescimento (a asparagina a  $40\text{g.L}^{-1}$  teve um problema de inóculo). Porém, o ácido aspártico teve um efeito bastante evidente em ambas as concentrações, sendo mais acentuada na concentração de  $40\text{ g.L}^{-1}$ , dado que a velocidade máxima média de crescimento encontrada sem reação foi de  $0,236\text{ h}^{-1}$ , mas com reação o valor obtido foi de  $0,072\text{ h}^{-1}$ . Os demais valores estimados de velocidade máxima de crescimentos e de tempo lag obtidos linearmente são apresentados na Tabela 1 e a Figura 3 evidencia tal efeito.

Tabela 1 - Valores de velocidade máxima de crescimento e de tempo lag obtidos linearmente.

	$\mu$ máx médio [ $\text{h}^{-1}$ ]	$\lambda$ [h]
Suc Unreacted 20	0,297	2,500
Suc Reacted 20	0,300	2,083
Suc Unreacted 40	0,289	2,333
Suc Reacted 40	0,275	2,250
Gln Unreacted 20	0,289	2,417
Gln Reacted 20	0,223	5,000
Gln Unreacted 40	0,275	2,500
Gln Reacted 40	0,186	4,333
Asp Unreacted 20	0,267	2,667
Asp Reacted 20	0,163	4,500
Asp Unreacted 40	0,236	2,917
Asp Reacted 40	0,072	4,750
Asn Unreacted 20	0,284	2,417
Asn Reacted 20	0,241	3,417
Asn Unreacted 40	0,217	-
Asn Reacted 40	0,208	4,000

Fonte: Autor

Figura 3 - Gráfico de densidade ótica por tempo para sacarose, asparagina, glutamina e ácido aspártico.



Fonte: Autor

## 2.3 Ferramenta matemática

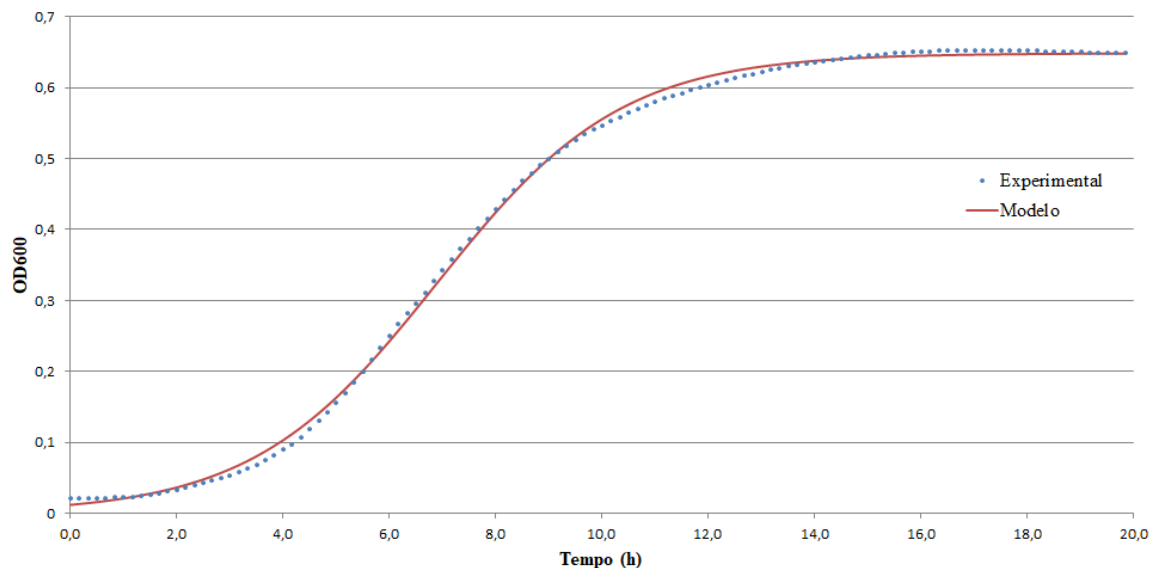
### 2.3.1 Elaboração

O uso de microplacas para o acompanhamento do crescimento das culturas de levedura permite que muitas curvas de crescimento sejam obtidas simultaneamente, porém o levantamento dos parâmetros de crescimento correspondentes à velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) e à duração da fase lag a partir de um método de linearização e uma subsequente tentativa de maximizar o coeficiente de determinação, como é comumente feito, é um processo que está sujeito a vieses, intencionais ou não, além de consumir tempo.

A ferramenta proposta tem como objetivo proporcionar parâmetros de crescimento consistentes com os obtidos do método mais rudimentar, porém através de um método que não traga nenhum viés nem erro relacionado à quem está analisando os dados. Para tal, o método encontrado, resumidamente, aproxima os dados a modelos sigmoidais e a partir dos modelos e seus parâmetros é possível realizar operações analíticas ao invés de numéricas para encontrar os parâmetros de crescimento.

Inicialmente, é necessário encontrar um modelo ao qual as curvas de crescimento se adaptem bem, para isso, foram considerados modelos de três parâmetros, como o de Gompertz, de quatro parâmetros, como os de Boltzmann e Logísticos, além de Logísticos modificados com cinco e um modelo Boltzmann duplo, com sete parâmetros. Todos os modelos se encaixam bem quando analisados por soma de resíduo ou coeficiente de determinação, porém, é possível perceber uma leve divergência na inclinação no começo da fase exponencial, como mostra a Figura 4, o que pode impactar os resultados.

Figura 4 - Gráfico de densidade ótica por tempo, comparando-se dados experimentais ao modelo.

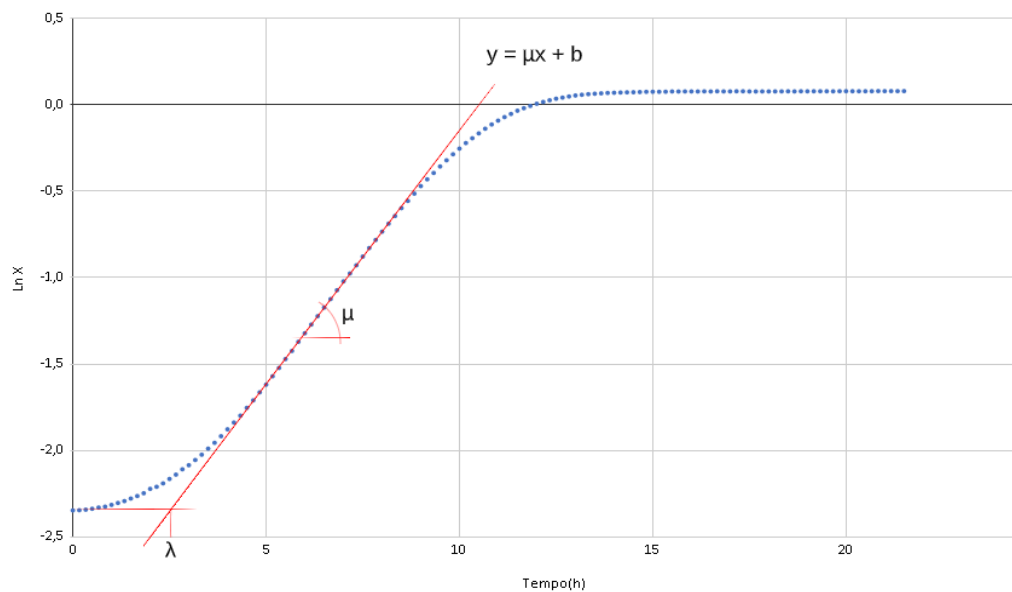


Fonte: Autor

Tendo um modelo definido é possível o utilizar para encontrar os parâmetros de crescimento. O primeiro parâmetro a ser definido é a velocidade específica máxima de crescimento, que é a variação da concentração de microrganismos por célula em função do tempo e para encontrá-la, existem dois métodos propostos. O primeiro método simula como a velocidade específica seria encontrada por linearização, mostrada na Figura 5. Aplica-se o logaritmo neperiano e, a partir da regressão linear do trecho reto com maior inclinação, obtém-se o valor da variação de células máximo, que é a velocidade específica máxima, através da seguinte expressão:

$$\mu_{m\acute{a}x} = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X} = \frac{d \ln(X)}{dt}$$

Figura 5- Determinação da velocidade específica através da linearização.



Fonte: Autor

A ferramenta usa uma expressão analítica da derivada do logaritmo neperiano da concentração celular em função do tempo a partir do modelo escolhido, obtendo valores de velocidade específica em um intervalo de tempo discretizado. Uma média dos maiores valores é feita, pois a velocidade específica no período exponencial, quando seria máxima, não é constante para modelos sigmóides e, portanto, a média desses valores se aproxima da inclinação de reta em uma regressão linear no método linearizado.

Um protótipo da ferramenta foi criado no software Excel, em que era possível obter a velocidade específica através do uso de modelos de sigmóides simples de quatro parâmetros. Porém, percebeu-se que algumas curvas não se encaixavam bem nestes modelos e algumas que se adequaram bem, com resíduo baixo e coeficiente de determinação muito próximo do unitário, possuíam desvio considerável na aceleração do crescimento na parte exponencial, apresentando uma curva mais suave em relação a que era experimentalmente obtida. Esta diferença resultava em ajustes aceitáveis em algumas curvas, porém não todas, o que diminui sua validade. A partir disto foi iniciada uma segunda versão da ferramenta, em um software mais robusto, permitindo a regressão de modelos não lineares com mais parâmetros para que seja possível ajustar mais curvas de crescimento.

Para a segunda versão da ferramenta, no software MATLAB, foram escolhidos modelos matemáticos exponenciais que poderiam se ajustar à curva de crescimento. Porém, os parâmetros dessas equações não apresentam significado físico, fazendo com que uma reparametrização fosse necessária. A Tabela 2 apresenta os modelos e o resultado das reparametrizações correspondentes.

Tabela 2- Modelos matemáticos utilizados para ajuste e suas reparametrizações.

Modelo	Equação	Reparametrização
Gompertz	$y(t) = ae^{be^{ct}}$	$y(t) = y_0 + Ae^{-e^{1+\frac{e\mu_{max}(\lambda-t)}{A}}}$
Logistic	$y(t) = \frac{L}{1 + e^{-k(t-t_0)}}$	$y(t) = y_0 + \frac{A}{1 + e^{2+\frac{4\mu_{max}(\lambda-t)}{A}}}$
Boltzmann	$y(t) = A + \frac{(A-B)}{1 + e^{\frac{C-t}{D}}}$	$y(t) = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\left(\frac{4\mu_{max}(t-\lambda)}{A_2-A_1}-2\right)}}$

Fonte: Autor

Contudo, não foi possível realizar a reparametrização de três dos modelos testados, uma vez que é impossível manipular a equação de forma a incluir parâmetros com significado físico. Para esses casos, os parâmetros de interesse,  $\lambda$  e  $\mu_{max}$ , foram escritos em função das variáveis da equação, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3- Modelos matemáticos utilizados para ajuste e seus parâmetros de interesse.

Modelo	Equação	Parâmetros de interesse
Richards	$y(t) = y_0 + \frac{a}{1 + ve^{-k(t-\tau)^{\frac{1}{v}}}}$	$y(t) = y_0 + \frac{a}{1 + ve^{-k(t-\tau)^{\frac{1}{v}}}}$ $\lambda = \tau + \frac{v+1}{k} \left( -1 + \frac{v+1}{1 + ve^{kt}} \right)^{\frac{1}{v}}$ $\mu_{max} = ak(v+1)^{-\frac{v+1}{v}}$
Logístico Deslocado	$y(t) = y_0 + \frac{A}{1 + e^{k(t_c-t)}} - \frac{A}{1 + e^{kt_c}}$	$y(t) = y_0 + \frac{A}{1 + e^{k(t_c-t)}} - \frac{A}{1 + e^{kt_c}}$ $\lambda = t_c - \frac{1}{k} \left( 2 - \frac{4}{1 + e^{kt_c}} \right)$ $\mu_{max} = \frac{Ak}{4}$

Continua



## Conclusão

Modelo	Equação	Parâmetros de interesse
Power Type	$y(t) = y_0 + \frac{At^n}{b + t^n}$	$y(t) = y_0 + \frac{At^n}{b} + t^n$ $\lambda = \left( b^{\frac{1}{n}} \frac{n-1}{n+1} \right)^{\frac{n+1}{n}}$ $\mu_{max} = \frac{A(n-1)^{\frac{n-1}{n}} (n+1)^{\frac{n+1}{n}}}{4nb^{\frac{1}{n}}}$

Fonte: Autor

O segundo método para encontrar a velocidade específica máxima de crescimento considera que a velocidade máxima é no instante em que a derivada segunda da concentração é nula (ZWIETERING et al., 1999, LONGHI et al., 2017). Este método tem a vantagem de, por utilizar um sistema de equações que possuem solução, permitir que os modelos sigmoidais sejam reparametrizados com parâmetros que possuam significados biológicos, porém possui a desvantagem de considerar o máximo em apenas um ponto, o que pode não condizer com o que seria encontrado fazendo-se a linearização do logaritmo natural, método usualmente aplicado.

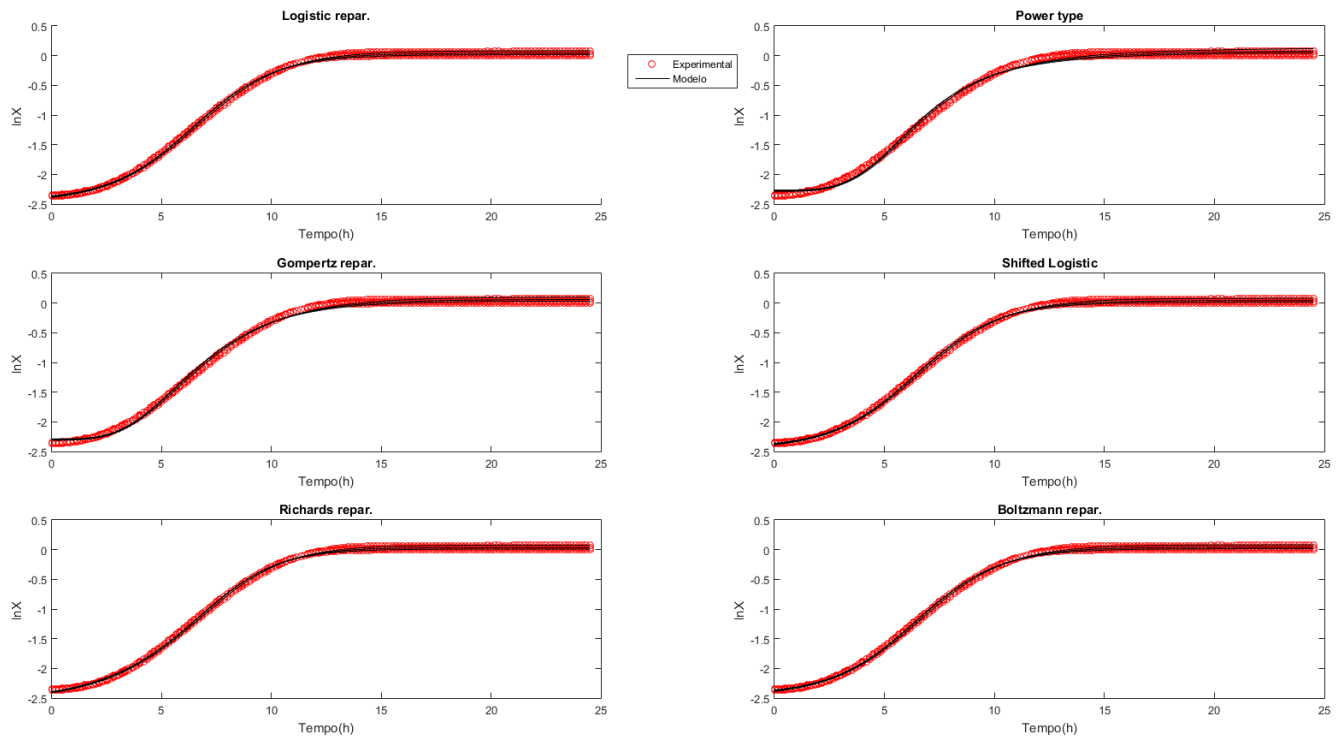
Em ambos os métodos para encontrar a velocidade específica máxima, a maneira proposta de encontrar a duração da fase lag é o encontro de duas retas, a primeira uma reta horizontal a partir da concentração inicial, a segunda uma reta com a inclinação obtida da velocidade específica partindo do ponto de mudança de inflexão na curva de crescimento. O instante no tempo em que as retas se encontram será a duração da fase lag.

### 2.3.2 Resultados

A ferramenta foi aplicada aos dados de crescimento obtidos nas microplacas, realizando regressões baseadas nos modelos escolhidos e retornando valores de velocidade específica máxima de crescimento, tempo *lag*, encontrados nas Tabelas 4 e 5, além de coeficiente de determinação e resíduo. Além dos valores obtidos, é gerado também um gráfico comparando modelos com dados experimentais, para uma análise visual dos dados obtidos, um exemplo pode ser visto na Figura 6, a seguir.

A ferramenta não foi capaz de encaixar os dados do ensaio da asparagina 40 g.L<sup>-1</sup> que teve problema de inóculo.

Figura 6- Comparação entre modelos obtidos e dados experimentais do meio de sacarose não reagido a 20 g.L<sup>-1</sup>



Fonte: Autor

Tabela 4- Valores de velocidade máxima de crescimento obtidos pela ferramenta, [h<sup>-1</sup>].

		Linear	Gompertz	Power Type	Logístico Deslocado	Logístico	Richards	Boltzmann
Suc Unreacted	Média	0,297 ± 0,001	0,341 ± 0,003	0,363 ± 0,003	0,325 ± 0,003	0,325 ± 0,003	0,320 ± 0,002	0,325 ± 0,003
	Resíduo	-	0,217 ± 0,008	0,346 ± 0,006	0,044 ± 0,002	0,044 ± 0,002	0,033 ± 0,002	0,044 ± 0,002
Suc Reacted	Média	0,300 ± 0,006	0,340 ± 0,006	0,365 ± 0,006	0,322 ± 0,007	0,322 ± 0,007	0,317 ± 0,007	0,322 ± 0,007
	Resíduo	-	0,141 ± 0,011	0,279 ± 0,010	0,026 ± 0,003	0,026 ± 0,003	0,022 ± 0,001	0,026 ± 0,003
Suc Unreacted	Média	0,289 ± 0,001	0,321 ± 0,002	0,343 ± 0,003	0,303 ± 0,002	0,303 ± 0,002	0,308 ± 0,001	0,303 ± 0,002
	Resíduo	-	0,080 ± 0,007	0,237 ± 0,013	0,038 ± 0,003	0,038 ± 0,003	0,032 ± 0,004	0,038 ± 0,003

Continua

Continuação

		Linear	Gompertz	Power Type	Logístico Deslocado	Logístico	Richards	Boltzmann
Suc Reacted	Média	0,275 ± 0,003	0,298 ± 0,004	0,319 ± 0,004	0,281 ± 0,004	0,281 ± 0,004	0,288 ± 0,003	0,281 ± 0,004
	Resíduo	-	0,057 ± 0,001	0,188 ± 0,004	0,043 ± 0,006	0,043 ± 0,006	0,031 ± 0,005	0,043 ± 0,006
Gln Unreacted	Média	0,289 ± 0,002	0,343 ± 0,003	0,365 ± 0,003	0,328 ± 0,003	0,328 ± 0,003	0,320 ± 0,002	0,328 ± 0,003
	Resíduo	-	0,259 ± 0,022	0,396 ± 0,028	0,060 ± 0,009	0,060 ± 0,009	0,038 ± 0,007	0,060 ± 0,009
Gln Reacted	Média	0,223 ± 0,010	0,251 ± 0,013	0,258 ± 0,013	0,244 ± 0,013	0,244 ± 0,013	0,244 ± 0,013	0,244 ± 0,013
	Resíduo	-	0,133 ± 0,32	0,113 ± 0,017	0,015 ± 0,003	0,015 ± 0,003	0,012 ± 0,005	0,015 ± 0,003
Gln Unreacted	Média	0,275 ± 0,001	0,318 ± 0,001	0,339 ± 0,001	0,302 ± 0,000	0,302 ± 0,000	0,299 ± 0,000	0,302 ± 0,000
	Resíduo	-	0,157 ± 0,005	0,330 ± 0,009	0,025 ± 0,001	0,025 ± 0,001	0,021 ± 0,002	0,025 ± 0,001
Gln Reacted	Média	0,186 ± 0,007	0,214 ± 0,008	0,223 ± 0,009	0,207 ± 0,007	0,207 ± 0,007	0,207 ± 0,007	0,207 ± 0,007
	Resíduo	-	0,084 ± 0,007	0,330 ± 0,009	0,005 ± 0,001	0,005 ± 0,001	0,004 ± 0,000	0,005 ± 0,001
Asp Unreacted	Média	0,267 ± 0,011	0,324 ± 0,016	0,344 ± 0,018	0,310 ± 0,015	0,310 ± 0,015	0,299 ± 0,013	0,310 ± 0,015
	Resíduo	-	0,355 ± 0,038	0,519 ± 0,031	0,121 ± 0,008	0,121 ± 0,008	0,069 ± 0,020	0,121 ± 0,008
Asp Reacted	Média	0,163 ± 0,008	0,184 ± 0,008	0,190 ± 0,008	0,182 ± 0,007	0,182 ± 0,007	0,182 ± 0,007	0,182 ± 0,007
	Resíduo	-	0,138 ± 0,038	0,151 ± 0,024	0,022 ± 0,014	0,022 ± 0,014	0,016 ± 0,013	0,022 ± 0,014

Continua

## Conclusão

		Linear	Gompertz	Power Type	Logístico Deslocado	Logístico	Richards	Boltzmann
Asp Unreacted	Média	0,236 ± 0,006	0,268 ± 0,006	0,281 ± 0,007	0,256 ± 0,006	0,256 ± 0,006	0,258 ± 0,006	0,256 ± 0,006
	Resíduo	-	0,132 ± 0,023	0,261 ± 0,022	0,054 ± 0,012	0,054 ± 0,012	0,052 ± 0,010	0,054 ± 0,012
Asp Reacted	Média	0,072 ± 0,007	0,077 ± 0,005	0,077 ± 0,006	0,080 ± 0,005	0,080 ± 0,005	0,080 ± 0,007	0,080 ± 0,005
	Resíduo	-	0,006 ± 0,003	0,010 ± 0,007	0,010 ± 0,012	0,010 ± 0,012	0,052 ± 0,010	0,010 ± 0,012
Asn Unreacted	Média	0,284 ± 0,013	0,349 ± 0,020	0,372 ± 0,022	0,332 ± 0,019	0,332 ± 0,019	0,322 ± 0,019	0,332 ± 0,019
	Resíduo	-	0,302 ± 0,007	0,467 ± 0,022	0,112 ± 0,025	0,112 ± 0,025	0,087 ± 0,028	0,112 ± 0,025
Asn Reacted	Média	0,241 ± 0,009	0,294 ± 0,009	0,309 ± 0,009	0,282 ± 0,009	0,282 ± 0,009	0,277 ± 0,010	0,282 ± 0,009
	Resíduo	-	0,200 ± 0,024	0,231 ± 0,015	0,047 ± 0,007	0,047 ± 0,007	0,023 ± 0,001	0,047 ± 0,007
Asn Unreacted	Média	0,217 ± 0,009	0,257 ± 0,012	0,239 ± 0,002	0,076 ± 0,003	0,250 ± 0,012	0,118 ± 0,002	0,250 ± 0,012
	Resíduo	-	0,462 ± 0,051	0,570 ± 0,229	128,720 ± 11,102	0,173 ± 0,021	55,017 ± 5,750	0,173 ± 0,021
Asn Reacted	Média	0,208 ± 0,007	0,241 ± 0,011	0,251 ± 0,011	0,232 ± 0,011	0,232 ± 0,011	0,232 ± 0,011	0,232 ± 0,011
	Resíduo	-	0,085 ± 0,014	0,096 ± 0,011	0,006 ± 0,001	0,006 ± 0,001	0,006 ± 0,001	0,006 ± 0,001

Fonte: Autor

Tabela 5- Valores médios de tempo *lag* obtidos pela ferramenta, [h].

	Linear	Gompertz	Power Type	Logístico Deslocado	Logístico	Richards	Boltzmann
Suc Unreacted 20	2,500 ±	3,110 ±	3,381 ±	2,880 ±	2,621 ±	2,778 ±	2,621 ±
	0,000	0,020	0,020	0,010	0,020	0,020	0,020
Suc Reacted 20	2,080 ±	2,590 ±	2,897 ±	2,327 ±	1,969 ±	2,248 ±	1,969 ±
	0,144	0,166	0,142	0,174	0,226	0,188	0,226
Suc Unreacted 40	2,333 ±	2,539 ±	2,884 ±	2,187 ±	1,570 ±	2,300 ±	1,570 ±
	0,289	0,166	0,130	0,154	0,209	0,154	0,209
Suc Reacted 40	2,250 ±	2,464 ±	2,815 ±	2,094 ±	1,406 ±	2,275 ±	1,406 ±
	0,000	0,109	0,090	0,110	0,165	0,106	0,164
Gln Unreacted 20	2,417 ±	3,122 ±	3,401 ±	2,901 ±	2,646 ±	2,765 ±	2,646 ±
	0,144	0,050	0,05	0,052	0,052	0,049	0,052
Gln Reacted 20	5,000 ±	5,456 ±	5,583 ±	5,366 ±	5,320 ±	5,365 ±	5,320 ±
	0,000	0,176	0,176	0,206	0,225	0,196	0,225
Gln Unreacted 40	2,500 ±	2,774 ±	3,117 ±	2,481 ±	1,994 ±	2,402 ±	1,994 ±
	0,000	0,082	0,070	0,083	0,106	0,096	0,106
Gln Reacted 40	4,333 ±	4,485 ±	4,654 ±	4,332 ±	4,230 ±	4,313 ±	4,230 ±
	0,289	0,226	0,214	0,230	0,242	0,242	0,237
Asp Unreacted 20	2,667 ±	3,164 ±	3,470 ±	2,951 ±	2,660 ±	2,728 ±	2,660 ±
	0,289	0,246	0,227	0,247	0,263	0,282	0,263
Asp Reacted 20	4,500 ±	5,149 ±	5,349 ±	5,026 ±	4,793 ±	4,994 ±	4,793 ±
	0,866	0,712	0,697	0,781	0,883	0,785	0,884
Asp Unreacted 40	2,917 ±	3,263 ±	3,516 ±	2,983 ±	2,363 ±	2,978 ±	2,363 ±
	0,382	0,222	0,205	0,251	0,333	0,189	0,333
Asp Reacted 40	4,750 ±	5,436 ±	5,595 ±	5,595 ±	4,732 ±	5,639 ±	4,732 ±
	0,250	0,575	0,480	0,497	0,677	0,666	0,677
Asn Unreacted 20	2,417 ±	2,994 ±	3,275 ±	2,765 ±	2,493 ±	2,601 ±	2,493 ±
	0,144	0,078	0,069	0,085	0,128	0,103	0,128
Asn Reacted 20	3,417 ±	3,692 ±	3,900 ±	3,551 ±	3,450 ±	3,464 ±	3,450 ±
	0,289	0,405	0,381	0,427	0,459	0,458	0,459
Asn Reacted 40	4,000 ±	4,213 ±	4,382 ±	4,039 ±	3,928 ±	4,034 ±	3,928 ±
	0,000	0,130	0,116	0,148	0,173	0,147	0,173

Fonte: Autor

## 2.4 Discussão

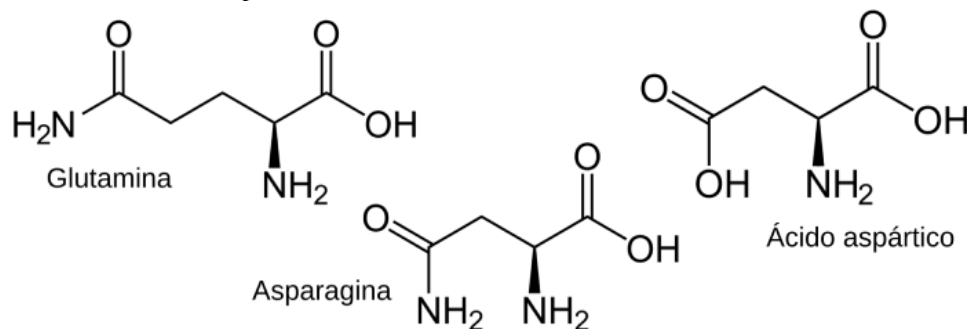
### 2.4.1 Discussão sobre a Reação de Maillard

A partir da análise da absorvância das soluções de sacarose com os diferentes aminoácidos, foi possível perceber que o ácido aspártico é o que atingiu os maiores valores de absorvância, tanto nos comprimentos de onda de 294 nm quanto nos de 420 nm, eventualmente indicando uma reatividade maior deste aminoácido. Uma possível causa é a presença de duas carboxilas em sua estrutura, como mostra a Figura 7, enquanto os demais aminoácidos apresentam apenas uma, que podem ter um efeito no desenvolvimento dos produtos de Maillard.

A reação proposta considera a interação entre a carbonila de uma molécula de açúcar redutor com o grupo amina do aminoácido, para tal é necessário que a molécula de sacarose sofra hidrólise no meio reacional, formando duas moléculas de hexoses.

Além disso, ao longo do aquecimento havia a formação de uma camada gelatinosa marrom e sólidos precipitados na interface entre a solução e o tubo de ensaio, possivelmente produtos poliméricos avançados e insolúveis das reações de Maillard, que pode estar relacionado com a queda das leituras absorvância no final do ensaio com o ácido aspártico.

Figura 7 - Dos aminoácidos presentes no caldo de cana de açúcar, apenas o ácido aspártico apresenta duas carbonilas em sua estrutura.



Fonte: Autor

### 2.4.2 Discussão sobre o efeito fisiológico na levedura

Além de sua maior reatividade, também é possível perceber uma maior influência do ácido aspártico na velocidade de crescimento das leveduras, tendo uma diminuição considerável. As soluções dos produtos de Maillard provenientes da asparagina e da glutamina tiveram efeitos bem menos notáveis ou desprezíveis, sendo necessária a obtenção dos parâmetros de crescimento para uma análise mais quantitativa.

Quanto ao quesito de tempo *lag* é possível se perceber que a presença de produtos de Maillard levou a um aumento deste, sendo mais perceptível novamente no ácido aspártico, que teve um tempo *lag* próximo a cinco horas, enquanto o do meio com sacarose durou aproximadamente duas horas.

Estes resultados iniciais demonstram um efeito bastante agressivo dos produtos de Maillard gerados a partir do ácido aspártico e da degradação da fonte de carbono nesta reação, com diminuição da velocidade específica e aumento substancial do tempo de fase *lag*. No caso do meio a  $20 \text{ g.L}^{-1}$  a velocidade específica do meio com ácido aspártico diminuiu de  $0,300 \pm 0,006$  no meio sem aminoácido reagido para  $0,267 \pm 0,011$  no meio com aminoácido sem reação para  $0,163 \pm 0,008$  no meio reagido. No caso do meio a  $40 \text{ g.L}^{-1}$  a velocidade específica do meio com ácido aspártico diminuiu de  $0,289 \pm 0,001$  no meio não reagido e sem aminoácido para  $0,236 \pm 0,006$  no meio não reagido para  $0,072 \pm 0,007$  no meio reagido, indicando neste caso maior presença de inibidores e ampliando seu efeito sobre as células. Em ambos os casos houve um aumento de duas horas do tempo *lag*.

#### 2.4.3 Discussão sobre a ferramenta

A ferramenta teve resultados mistos no cálculo dos parâmetros fisiológicos, para a velocidade específica de crescimento houve uma variação grande dos resultados, com alguns valores tendo uma diferença de 2% do valor calculado por linearização porém chegando a 17% nos casos dos modelos de Boltzmann, Logístico e Logístico Deslocado, que tiveram resultados muito próximos entre si. Apesar destes modelos terem apresentados os valores mais próximos com os obtidos pela técnica de linearização, o modelo de Richards foi o que apresentou melhor ajuste à curva, tendo o menor resíduo consistentemente, o que pode indicar que este seria o modelo mais adequado para a ferramenta, porém com a ressalva que no caso do Ácido aspártico a  $40 \text{ g.L}^{-1}$  o modelo não conseguiu se encaixar em uma das triplicatas, indicando possíveis problemas de convergência. Os valores obtidos de velocidade pela ferramenta em quase todos os casos e modelos foram maiores que os obtidos pela linearização, a causa provável disto é que este último leva em conta uma média das velocidades na fase exponencial, enquanto os modelos levam em conta a existência de um patamar de velocidade específica única e máxima na fase exponencial. Os resultados da ferramenta do tempo *lag* também foram bem variados porém o modelo de Richards apresentou dados consistentes com os obtidos pela linearização.

### 3 CONCLUSÕES

Tendo em vista a formulação de um meio sintético e definido que simule o melaço de cana-de-açúcar em estudos sobre fermentação, é necessária uma compreensão mais profunda desta substância e sobre o efeito de seus componentes em microorganismos. Para tal, foram estudadas as reatividades dos diferentes aminoácidos com maior presença no caldo da cana (Glutamina, Ácido aspártico e Asparagina) com a sacarose, açúcar principal do caldo e os impactos causados pelos produtos das reações de Maillard, a fim de melhor entender os efeitos fisiológicos destes produtos na levedura *Saccharomyces cerevisiae* e analisar a profundidade de seu impacto na fermentação, para que eventualmente possa ser concedido sua devida importância na formulação do meio sintético. Inicialmente, foram estudadas as diferentes reatividades dos aminoácidos considerados através de medidas de absorvância em dois comprimentos de onda, 294 e 420nm, ao longo do tempo e em diferentes temperaturas de meio reacional, visando quantificar a presença de produtos iniciais e produtos avançados relacionado a cada comprimento de onda, respectivamente. A solução contendo Ácido aspártico apresentou os maiores valores, uma possível causa pode ser a presença de dois grupos carboxila, o que corresponderia a mais sítios onde as reações de Maillard poderiam ocorrer. A próxima etapa foi estudar o impacto que cada meio reacional teria sobre a fisiologia da cepa CEN.PK 112 da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, para tal foram preparados meios minerais a partir das diferentes soluções contendo produtos de Maillard, que foram inoculados em microplacas e através de leituras de absorvância tiveram o crescimento celular acompanhado. O meio contendo os produtos de Maillard da reação com Ácido aspártico foi o que se mostrou mais danoso quando comparado ao meio de controle, apresentando atrasos mais longos e uma velocidade específica de crescimento menor, uma possível causa pode estar relacionada à quantidade de produtos de Maillard e não a qualidade, sendo necessários estudos qualitativos que ainda não foram realizados para dar continuidade ao estudo, porém os produtos de Maillard já demonstraram ter um impacto considerável na fisiologia das leveduras, portanto terão de ser considerados na formulação do melaço sintético.



## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

AMORIM, Henrique; BASSO, L. C.; LOPES, Mario. Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: Composition and usage. *The Alcohol Textbook*. p.39-46, 2009.

DELLA-BIANCA, Bianca Eli et al. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 97, n. 3, p.979-991, 28 dez. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-012-4631-x>.

DIAS, Marina Oliveira de Souza et al. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, [s.l.], v. 15, p.35-51, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envdev.2015.03.004>.

GOLON, Agnieszka et al. An Investigation of the Complexity of Maillard Reaction Product Profiles from the Thermal Reaction of Amino Acids with Sucrose Using High Resolution Mass Spectrometry. **Foods**, [s.l.], v. 3, n. 3, p.461-475, 7 ago. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/foods3030461>.

HENNING, Christian; GLOMB, Marcus A.. Pathways of the Maillard reaction under physiological conditions. **Glycoconjugate Journal**, [s.l.], v. 33, n. 4, p.499-512, 13 jun. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10719-016-9694-y>.

JANG, Hae Won et al. Formation of 4(5)-Methylimidazole and Its Precursors,  $\alpha$ -Dicarbonyl Compounds, in Maillard Model Systems. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 61, n. 28, p.6865-6872, 8 jul. 2013. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf401958w>.

KOCADAĞLI, Tolgahan; GÖKMEN, Vural. Multiresponse kinetic modelling of Maillard reaction and caramelisation in a heated glucose/wheat flour system. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 211, p.892-902, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.150>.

---

<sup>1</sup> De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

KROH, Lothar W. Caramelisation in food and beverages. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 51, n. 4, p. 373-379, jan. 1994. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90188-0](http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146(94)90188-0).

LAGO, André Corrêa do et al. Sugarcane as a carbon source: The Brazilian case. **Biomass And Bioenergy**, [s.l.], v. 46, p.5-12, nov. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.09.007>.

LINO, Felipe Senne de Oliveira; BASSO, Thiago Olitta; SOMMER, Morten Otto Alexander. A synthetic medium to simulate sugarcane molasses. **Biotechnology For Biofuels**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.1-12, 11 ago. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13068-018-1221-x>.

LONGHI, Daniel Angelo et al. Microbial growth models: A general mathematical approach to obtain  $\mu$  max and  $\lambda$  parameters from sigmoidal empirical primary models. **Brazilian Journal Of Chemical Engineering**, [s.l.], v. 34, n. 2, p.369-375, abr. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20170342s20150533>.

MADEIRA-JR, José Valdo; GOMBERT, Andreas Karoly. Towards high-temperature fuel ethanol production using *Kluyveromyces marxianus*: On the search for plug-in strains for the Brazilian sugarcane-based biorefinery. **Biomass And Bioenergy**, [s.l.], v. 119, p.217-228, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.09.010>.

MELLO, Fellipe da Silveira Bezerra de et al. Static microplate fermentation and automated growth analysis approaches identified a highly-aldehyde resistant *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Biomass And Bioenergy**, [s.l.], v. 120, p.49-58, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.10.019>.

RAGHAVENDRAN, Vijayendran et al. A simple scaled down system to mimic the industrial production of first generation fuel ethanol in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, [s.l.], v. 110, n. 7, p.971-983, 3 maio 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-017-0868-9>.

VERDUYN, Cornelis et al. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: A continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. **Yeast**, [s.l.], v. 8, n. 7, p.501-517, jul. 1992. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/yea.320080703>.

ZHOU, Yong-yan; LI, Ya; YU, Ai-nong. The effects of reactants ratios, reaction temperatures and times on Maillard reaction products of the L-ascorbic acid/L-glutamic acid system. **Food Science And Technology**, [s.l.], v. 36, n. 2, p.268-274, 20 jun. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457x.02415>.

ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of the Bacterial Growth Curve. **Applied And Environmental Microbiology**, Wageningen, v. 56, n. 6, p.1875-1881, abr. 1999. Disponível em: <<https://aem.asm.org/content/aem/56/6/1875.full.pdf>>. Acesso em: 7 dez. 2019.