

## CINÉTICA DAS REAÇÕES DE MAILLARD E EFEITO DE SEUS PRODUTOS NA FISIOLOGIA DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

KP ELIODÓRIO<sup>1</sup>, C PENNACCHI<sup>1</sup>, GCG CUNHA<sup>1</sup>, TG GIACON<sup>1</sup>, R GIUDICI<sup>1</sup>, TO BASSO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade de São Paulo, Escola Politécnica, Departamento de Engenharia Química

E-mail para contato: kevypontes@usp.br

**RESUMO** – *Este trabalho teve por objetivo estudar o efeito de produtos das reações de Maillard entre sacarose e três aminoácidos presentes em substratos à base de cana-de-açúcar (glutamina, asparagina e ácido aspártico) no crescimento de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Foram acompanhadas leituras de absorbâncias de soluções contendo aminoácidos e açúcar nas temperaturas de 100, 110 e 120 °C em dois comprimentos de onda, 294 e 420 nm. Estas soluções contendo produtos foram usadas na preparação de um meio mineral modificado para o crescimento de leveduras da linhagem de *S. cerevisiae* laboratorial CEN.PK-122. As soluções contendo aminoácidos apresentaram leituras de absorbância maiores que as soluções contendo apenas sacarose, tendo o ácido aspártico os maiores valores e, portanto, maior reatividade para 120°C. Os crescimentos em soluções reagidas tiveram um impacto negativo no crescimento com diminuição da velocidade específica e aumento da duração da fase lag nos meios contendo os aminoácidos.*

### 1. INTRODUÇÃO

O tratamento térmico sofrido pela cana-de-açúcar durante a produção de etanol de primeira geração altera drasticamente a composição do meio devido à presença de reações químicas, dentre elas a reação de Maillard. Essa classe de reações é de grande importância, principalmente na indústria de alimentos, pois tem um papel fundamental na formação de cores, sabores e aromas considerados agradáveis nos alimentos. As reações ocorrem entre um grupo carbonila de um açúcar e um grupo amina de um aminoácido em condições de alta temperatura, entretanto os compostos gerados podem apresentar também efeitos prejudiciais como efeitos tóxicos e mutagênicos, além de estar relacionado a diversas enfermidades (Henning; Glomb, 2016; Zhou *et al.*, 2016).

Os produtos formados são diversos devido à complexidade da rede de reações reversíveis que ocorrem simultaneamente (Henning; Glomb, 2016). Estas reações são comumente separadas em três etapas principais: inicial, intermediária e final. A etapa inicial é composta de moléculas

pequenas formadas pela reação inicial e pequenos rearranjos das mesmas, chamadas de produtos de Amadori. Rearranjos destes produtos iniciais formam os produtos intermediários, compostos reativos alfa-dicarbonílicos. Tanto os produtos iniciais quanto intermediários são incolores. Os produtos finais são compostos poliméricos de coloração marrom que contribuem para o escurecimento de alimentos e meios contendo açúcares e aminoácidos (Henning; Glomb, 2016;).

O efeito destes compostos sobre leveduras nunca foi estudado e é importante, haja visto que na produção do etanol de primeira geração utiliza-se o caldo da cana-de-açúcar e o melaço como substrato, que sofrem severos aquecimentos e mudanças de pH que favorecem a ocorrência dessas reações de Maillard. Desta forma, este trabalho teve como objetivo analisar o impacto fisiológico dos produtos dessas reações em crescimentos de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*.

## 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.1. Cinética da Reação de Maillard

A cinética da formação de produtos de Maillard foi monitorada por meio da medida de absorbância em dois comprimentos de onda, 294 e 420 nm, referentes aos produtos iniciais e finais da reação, respectivamente (Zhou *et al.*, 2016). Assim, soluções foram preparadas contendo 44,6 g.L<sup>-1</sup> de cada aminoácido separadamente (asparagina, glutamina e ácido aspártico) na presença de 216 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (proporção 5:1) em tampão de acetato 0,1M a pH 5 e adicionadas a tubos de ensaio e aquecidas a três temperaturas, 100, 110 e 120 °C. Soluções contendo apenas sacarose 216 g.L<sup>-1</sup> em tampão também foram avaliadas comparativamente. As leituras de absorbância foram realizadas a cada hora por seis horas.

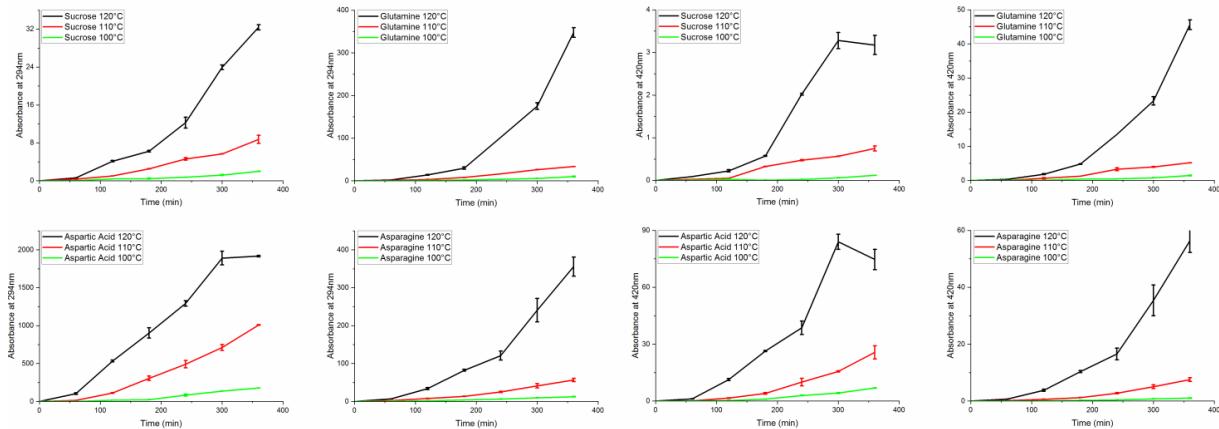


Figura 1 – Valores de absorbância a 294 nm e 420 nm por tempo das soluções de sacarose e soluções de sacarose junto ao aminoácido indicado.

As condições reacionais e concentrações, bem como os aminoácidos selecionados, refletem as condições encontradas no processamento do caldo de cana-de-açúcar na indústria sucroalcooleira. Os resultados foram apresentados na figura 1.

Os resultados indicaram que o ácido aspártico apresentou maior reatividade tanto no comprimento de onda de 294 nm quanto no comprimento de onda de 420 nm (Figura 1). No comprimento de 294 nm, o ácido aspártico atingiu valores de  $1917,3 \pm 9,61$  em 120 °C após seis horas, enquanto a asparagina atingiu valores de  $355,6 \pm 25,38$  e a glutamina  $347,6 \pm 11,37$ . No comprimento de onda de 420 nm, os valores obtidos tiveram uma variação menor entre si com o ácido aspártico novamente tendo os maiores valores de  $74,7 \pm 5,33$ , a asparagina apresentou valores de  $56,4 \pm 4,16$  e a glutamina apresentou valores de  $45,6 \pm 1,40$ . Uma hipótese para a reatividade elevada do ácido aspártico está relacionada à presença de dois grupos carboxílicos na molécula deste aminoácido, que teria maior efeito nos diversos rearranjos que ocorrem na rede de reações de Maillard, levando a uma maior quantidade de produtos.

## 2.2. Efeito fisiológico sobre levedura

A linhagem laboratorial diplóide CEN.PK-122 da levedura *S. cerevisiae* foi utilizada em todos os ensaios de crescimento deste estudo. O meio escolhido para o crescimento foi um meio definido (Verduyn et al., 1992), ao qual foram adicionadas as soluções reagidas da etapa anterior (como fonte de carbono) em uma proporção de 8:2 (v/v), resultando em meios com 20 e 40 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. O mesmo meio foi preparado utilizando soluções sem aquecimento como experimentos de controle. Os crescimentos foram realizados em um leitor de microplacas empregando-se microplacas de 96 poços cobertos com um filme impermeável a 30 °C com ciclos de agitação de 15 segundos e amplitude de 5 mm.

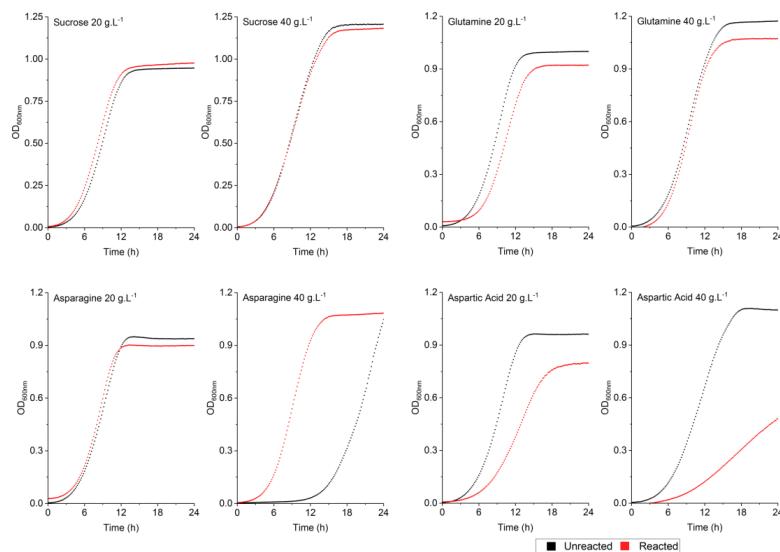


Figura 2 – Densidade óptica a 600 nm ao longo de 24h para os meios reagidos e não reagidos.

Os resultados dos crescimentos nesses meios contendo as reações de Maillard corroboram com as reatividades apresentadas na seção 2.1 e podem ser observados na Figura 2. Cabe destacar que o meio contendo asparagina não reagida apresentou problemas no inóculo e impossibilitou a

determinação da fase lag deste ensaio. De uma forma geral, os meios contendo os produtos de reação alcançaram patamares mais baixos de densidade óptica ao final do cultivo, e além disso, é possível notar alteração substancial em outros parâmetros fisiológicos, como a redução da velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) e o aumento da duração da fase lag ( $\lambda$ ) em todos os aminoácidos, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 – Velocidades máximas específicas de crescimento e duração da fase lag (em % do controle) para as concentrações de 20 e 40 g.L<sup>-1</sup>(Sac- sacarose, Glu- glutamina, Asp- ácido aspártico, Asn- asparagina)

	<b>Sac20</b>	<b>Glu20</b>	<b>Asp20</b>	<b>Asn20</b>	<b>Sac40</b>	<b>Glu40</b>	<b>Asp40</b>	<b>Asn40</b>
$\mu_{\text{máx}}$	101,12	77,14	60,97	84,84	95,16	67,60	30,64	95,70
$\lambda$	83,33	206,90	168,75	141,38	96,43	173,33	162,86	-

### 3. CONCLUSÃO

Dentre os aminoácidos estudados, o ácido aspártico apresentou maior reatividade na etapa de reação com sacarose e maior efeito na fisiologia da levedura com diminuição de  $\mu_{\text{máx}}$  e aumento de  $\lambda$ . O mesmo efeito na fisiologia foi observado em menor proporção para a glutamina e a asparagina. O meio contendo apenas a sacarose sem aminoácidos, em que ocorre a chamada reação de caramelização sob altas temperaturas, não gerou alteração significativa dos parâmetros de crescimento. Desta forma, o estudo possibilitou uma análise sistemática das reações de Maillard em condições industrialmente relevantes, e os seus efeitos na fisiologia da levedura *S. cerevisiae*.

### 4. REFERÊNCIAS

- HENNING, C; GLOMB, M, Pathways of the Maillard reaction under physiological conditions. *Glycoconjugate Journal*, v. 33, n. 4, p.499-512, 2016.
- VERDUYN, C, Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: A continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast*, v. 8, p.501-517, jul. 1992.
- ZHOU, Y; LI, Y; YU, A. 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*, v. 36, n. 2, p.268-274, 20 jun. 2016.

### 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo: 2019/08393-8, 2015/50684-9 e 2018/17172-2), CNPq (Processo: 309444/2016-0) e CAPES (código de financiamento 01).