

EFEITO DA TEMPERATURA EM AMINOÁCIDOS E PROTEASES DE CAFÉ

Milton MASSAO SHIMIZU¹, Emerson ALVES DA SILVA³, Paulo MAZZAFERA¹ E-mail: pmazza@unicamp.br
Carlos A. COLOMBO³, Guilherme G. BAPTISTA³

¹ Departamento de Fisiologia Vegetal - IB, Unicamp, ² Instituto de Botânica de São Paulo; ³ Instituto Agronômico de Campinas.

Resumo:

Frutos de café foram mantidos em uma armação plástica, de forma a aumentar a temperatura durante o seu desenvolvimento. Frutos foram coletados verdes e maduros, sendo que como testemunhas foram coletados frutos a pleno sol e da sombra, sob a saia do cafeeiro. O endosperma dos frutos foi retirado para análise de aminoácidos e de proteases. Aminoácidos variaram bastante no aspecto quantitativo e qualitativo. Proteases foram caracterizadas quando à inibição por inibidores específicos para esta classe de enzimas e mostrou-se a presença de serino-proteases no endosperma de café. Discute-se preliminarmente os resultados em relação ao efeito da temperatura na alteração do padrão de compostos nitrogenados e sua relação com a qualidade da bebida.

Palavras-chave: endosperma, serino-proteases, qualidade de bebida.

EFFECT OF THE TEMPERATURE ON AMINO ACIDS AND PROTEASES IN COFFEE ENDOSPERM

Abstract:

Coffee fruits were maintained inside a plastic structure in order to increase the temperature during their development. Fruits were harvested at green and berry stages. Fruits growing under full sun light and shade (growing in branches in the bottom of the canopy) were collected as controls. The endosperms of these fruits were analyzed for amino acids and protease activity. Amino acids varied significantly among the three treatments. Serine-protease activity was detected in the endosperm. A preliminary discussion is carried out regarding the effect of the temperature on the nitrogen compounds of coffee and their relationship with coffee quality.

Key words: endosperm, serine-proteases, coffee quality.

Introdução

Em café, o aroma é formado por mais de 800 compostos voláteis e os precursores relacionados com a formação dos mesmos são: açúcares, aminoácidos, peptídeos, trigonelina, ácidos clorogênicos, ácidos orgânicos, lipídeos e carotenóides (Clifford, 1985). Interações entre açúcares redutores e o grupamento amino de aminoácidos e peptídeos, ou mesmo de proteínas (reação de Maillard), são tidas como essenciais para o desenvolvimento de aroma. Além do conteúdo endógeno da semente, outra fonte de açúcares para a ocorrência da reação de Maillard são os açúcares redutores formados durante a torração, a partir da quebra sacarose.

Selmar et al. (2001) destacam que alanina é um importante aminoácido no desenvolvimento de compostos aromáticos durante a torração de café, participando da reação de Maillard. Alanina, asparagina, ácido glutâmico, ácido aspártico e serina quantificam para aproximadamente 80% dos aminoácidos livres em sementes de café (Arnold and Ludwig, 1996; Shimizu and Mazzafera, 2000). Por outro lado, alanina não está entre os aminoácidos mais abundantes na principal proteína de reserva em café (Rogers et al., 1999), como também não está entre os aminoácidos em maior quantidade quando analisada a constituição de aminoácidos no hidrolisado de proteínas totais da semente de café (Shimizu and Mazzafera, 2000).

Sementes de café apresentam atividade de protease (Ludwig et al., 2000). Em estudo recente pudemos mostrar que a atividade nas sementes é bem maior do que a detectada por Ludwig et al. (2000), sendo necessária inclusão de DTT no meio de incubação para total ativação da enzima (Mazzafera e colaboradores, dados não publicados). Portanto, considerando que atividade de proteinase é encontrada em sementes de café (Ludwig et al., 2000; Mazzafera e colaboradores, dados não publicados) os fragmentos de polipeptídeos (Rogers et al., 1999; Ludwig et al., 2000) podem ser originados por ação dessas enzimas, influenciando a qualidade de bebida. Entretanto, não se sabe ao certo qual a contribuição dos mesmos na qualidade da bebida (Montavon et al., 2003).

Pesquisas preliminares têm revelado que cafés colhidos de plantas crescendo em regiões com acentuada diferença na temperatura média anual apresentam diferenças marcantes na qualidade da bebida (Silva, 2004). Análises estatísticas baseadas em de componentes principais mostraram que entre os vários compostos analisados, proteínas, aminoácidos, atividade de proteases e nitrogênio total explicam muito da variância observada, agrupando separadamente os cafés colhidos de local quente daqueles de clima ameno.

No presente estudo apresentamos dados sobre a caracterização de aminoácidos e proteases no endosperma de frutos de café que foram mantidos ou não em uma câmara plástica, levando ao aumento da temperatura média durante o amadurecimento. Também são apresentados resultados iniciais da atividade de proteases. O objetivo final deste trabalho é relacionar o efeito da temperatura sobre as proteases do café, que por sua vez afetarão a qualidade através da proteólise de proteínas do endosperma. Análises bioquímicas e moleculares estão sendo conduzidas neste sentido.

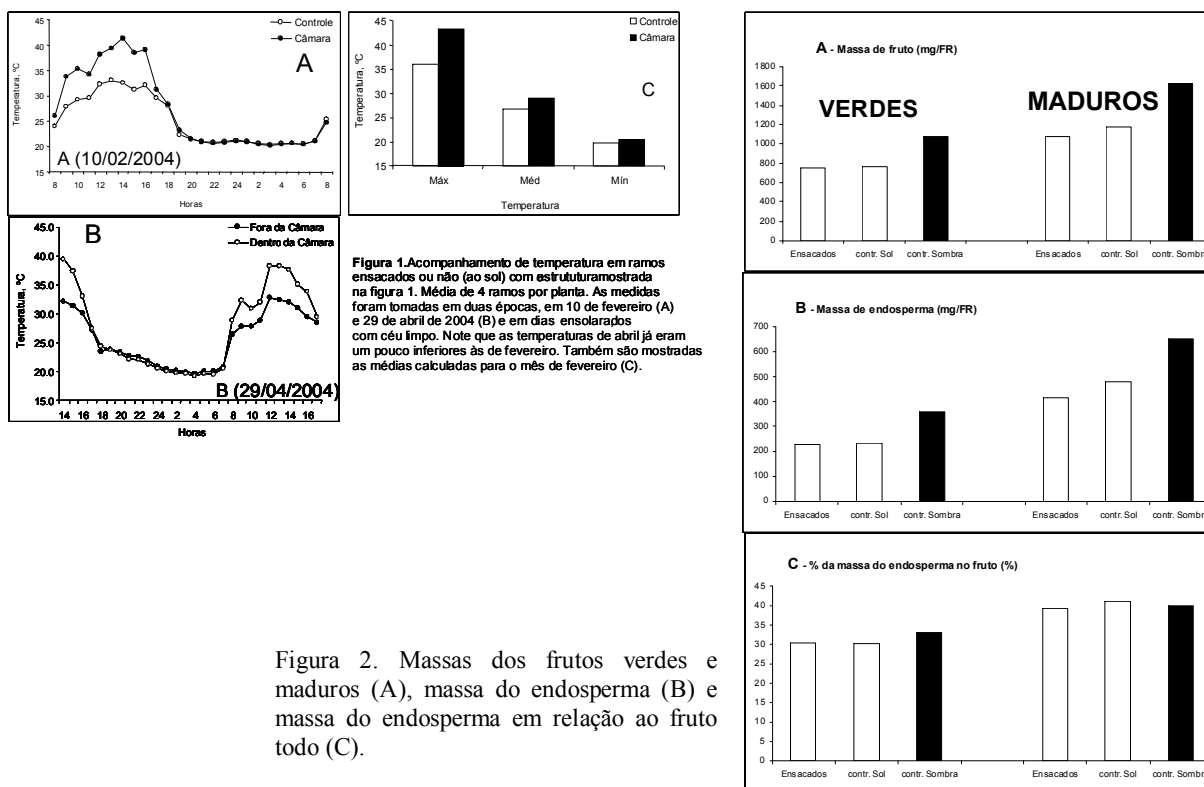
Material e Métodos

Frutos foram coletados de cafeeiros (*C. arabica* cv Catuaí Vermelho) crescendo na área experimental do Departamento de Fisiologia Vegetal da Unicamp. As armações de plástico foram colocadas em dezembro de 2004 e as temperaturas tomadas por termopares instalados sob os ramos e conectados a um datalogger. Fora coletados frutos em dois estágios, verde e cereja. O endosperma foi destacado e usado nas medidas de aminoácidos totais, composição de aminoácidos e proteases (Shimizu e Mazzafera, 2000; Silva 2004). Os controles foram frutos mantidos a pleno sol (não ensacados) e frutos coletados sob a saia da planta, denominados frutos de sombra.

Resultados e Discussão

A manutenção de ramos dentro de uma estrutura coberta com sacos plásticos, mas com as extremidades abertas mostrou-se adequada para o aumento da temperatura média, que ficou ao redor de 5°C acima da ambiente (figura 1a,b,c).

Frutos foram coletados em dois estágios, verdes e maduros (cerejas), sendo uma em 4/02/2004 e outra em 5/4/2004. As medidas tomadas dos frutos mostram claramente que frutos de sombra, verdes ou maduros, são maiores e que têm endosperma maior (figura 2a,b,c). Porém, é curioso notar que a proporção do endosperma se mantém semelhante. Em frutos verdes essa relação é menor que maduros porque o endosperma está em desenvolvimento, mas comparando frutos da sombra em cada estágio, não existe diferença. Portanto, ainda que exista diferença na massa do fruto inteiro e no endosperma, a proporção entre casca e endosperma se mantém.



Em relação à análise de aminoácidos no endosperma, notamos que: 1 – frutos verdes tendem a ter mais aminoácidos livres que os maduros; 2 – os frutos ensacados, verdes ou maduros, apresentaram menos aminoácidos que os de pleno sol; 3 – comparando-se apenas os frutos maduros, os de sombra é que apresentaram o menor teor de aminoácidos (figura 3a).

A figura 3b traz a composição de aminoácidos no endosperma dos frutos de café. Nela são mostrados os principais aminoácidos em termos quantitativos. Algumas informações podem ser prontamente obtidas dessa figura: 1 – asparagina (ASN) e ácido glutâmico (GLU) são os aminoácidos encontrados em maiores quantidades em todas as amostras; 2 – nas amostras de café verde provenientes do sol ou ensacadas, ASN foi o principal aminoácido, ao passo que quando maduros, GLU passou a ser o aminoácido em maior quantidade; 3 – Nas amostras de frutos maduros (Verm-SAC, Verm-SOL e Verm-SOMBRA) o padrão de aminoácidos é praticamente igual; 4 – No material da sombra, independente de serem verdes ou maduros os frutos, GLU foi o aminoácido em maior quantidade, mas próxima a ASP e ASN.

Na figura 3c são apresentadas as somas desses aminoácidos em cada amostra e se nota que o comportamento é semelhante entre o endosperma de frutos verdes e maduros no material ensacado e no de sol, sendo observado o oposto na

sombra. Por outro lado, o teor desses aminoácidos foi menor nos frutos verdes da sombra, quando comparados aos verdes ensacados e ao sol. Nos maduros, eles se igualam.

Estes dados surpreendem, pois mostram que outro fator além de temperatura pode estar influenciando a composição de aminoácidos. Muito se fala que frutos de plantas crescendo em locais de temperaturas mais amenas desenvolvem-se mais vagarosamente e que isto dá a oportunidade para que o metabolismo geral dos tecidos tenha tempo para formar um balanço adequado de componentes que determinam a qualidade do café. Os dados obtidos aqui sugerem que, talvez isto ocorra de fato, uma vez que o endosperma de frutos de sombra apresentaram comportamento diferente, no que diz respeito aos aminoácidos, em relação aos outros tratamentos. Na sombra ocorrem menores temperaturas, podendo afetar a composição de aminoácidos.

A figura 4 traz os resultados iniciais de caracterização do tipo de proteases no endosperma de café. Foi utilizado o material maduro de pleno sol. Após a separação das proteínas, o gel contendo BSA é incubado durante um período e depois colocado para colorir (o reagente Coomassie Blue reage com proteínas, dando coloração azul). No local onde as proteases se posicionaram no gel existe degradação do BSA e, portanto, não existe desenvolvimento de cor.

Confirmamos dados anteriores nossos que as proteases de café apresentam atividade muito baixa quando a incubação é feita sem a inclusão de ditionitrito (DTT). Não sabemos exatamente por que isto acontece, mas aparentemente a atividade é restaurada na presença desse redutor de pontes dissulfeto. É possível que alterações conformacionais ocorram na proteína com o DTT, expondo de forma mais intensa e eficiente o sítio ativo. Esta caracterização certamente auxiliará nos ensaios moleculares, por pode direcionar as buscas por seqüências de serino-proteases, que são inibidas por PMSF.

No gel da figura 4 também é possível observar claramente duas bandas de atividade, uma bastante superior e outra de massa molecular menor. O gel é de 10% de poliacrilamida, e proteínas de massa de 100 kDa entram facilmente pela malha do gel. Isto indica assim, que a atividade na parte superior ou se trata de proteína com alta massa molecular, certamente acima de 200 kDa ou de complexo protéico. Os dados moleculares certamente auxiliarão na identificação de uma ou outra hipótese.

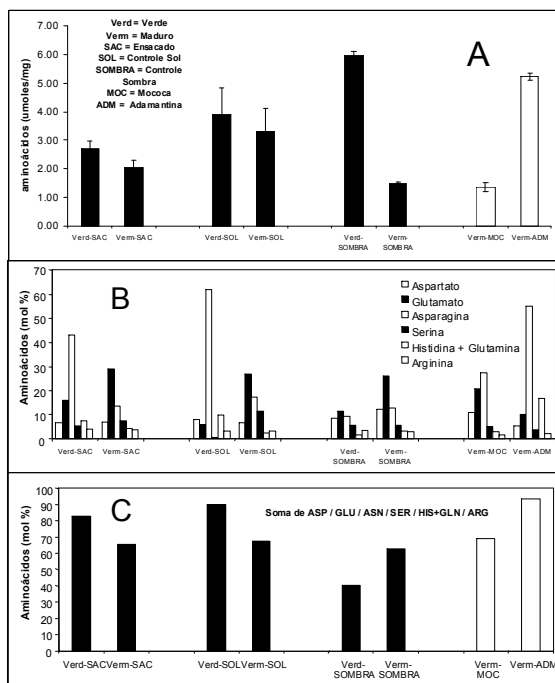


Figura 3. Teor de Aminoácidos livres (A), composição percentual de aminoácidos no endosperma (B), e soma dos principais aminoácidos encontrados no endosperma (C).

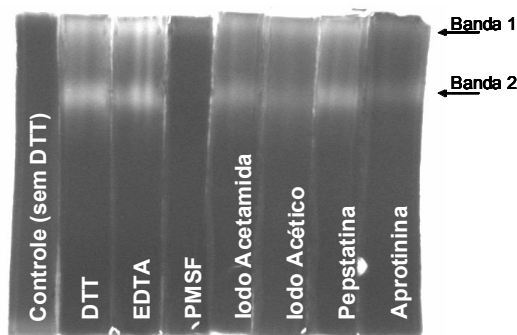


Figura 4 Gel de atividade para proteases. Exceto o controle sem DTT, todas as outras incubações foram feitas com DTT.

Segundo Barret (1986), o termo genérico protease inclui enzimas que degradam proteínas intactas, que devem ser chamadas de proteinases ou endopeptidases, e aquelas que degradam ligações peptídicas específicas, ou seja, que necessitam de uma posição terminal para gerar a especificidade, que devem ser denominadas exopeptidases. Estas últimas poderiam ser divididas ainda em carboxi ou amino peptidases, dependendo da posição terminal gerando a especificidade (Brzin & Kidric, 1995).

Proteinases são classificadas em quatro grupos: serina, cisteína, aspártico e metaloproteinases. A classificação se dá em função da presença de um aminoácido específico ou de íon metálico no sítio catalítico da enzima (Barret, 1986). Na planta, os substratos das enzimas de cada grupo variam sobremaneira, sendo de difícil caracterização. O problema é maior em estudos *in vitro* onde há a presença de exopeptidases. Porém, apesar de algumas poucas exceções, a classificação nestes quatro grupos tem sido bastante eficiente no agrupamento.

O controle do processo proteolítico é praticamente desconhecido, ou seja, existe uma série de sugestões de como ele pode ser desencadeado a nível celular, mas quase nada se conhece a nível molecular. A natureza dos estímulos celulares seria, por exemplo, a influência do metabolismo de lipídeos no nível das proteínas de membrana, interação de proteínas com moléculas de pequena massa molecular que afetaria a suscetibilidade ao ataque por proteases, efeito do pH celular, íons inorgânicos, compartimentalização celular, etc (Feller, 1986; Brzin & Kidric, 1995). Em um modelo mais recente sugere-se que a queda da fotossíntese e, conseqüentemente, de certos metabólitos fotossintéticos que atuariam reprimindo genes associados com a senescência (GAS), levariam a expressão dos mesmos, que desencadeariam uma seqüência de eventos, entre eles a proteólise em maior intensidade (Hensel et al., 1993).

Referências Bibliográficas

- Arnold U, Ludwig E (1996) Analysis of free amino acids in green coffee beans II. changes of the amino acid content in arabica coffees in connection with post-harvest model treatment. *Z. Lebensm Unters Forsch* 203: 379-384.
- Barret, A. J. The classes of proteolytic enzymes. In *Plant Proteolytic Enzymes*. Vol. I.; M. J. Dalling, Ed.; CRC Press, Inc.: Boca Raton, 1986; pp 1-16.
- Brzin, J.; Kidric, M. Proeinases and their inhibitors in plants: role in normal growth and in responses to various stress conditions. *Biotechnol. Gen. Engin. Rev.* 1995, 13, 421-467.
- Clifford MN (1985) Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. In MN Clifford, KC Wilson, eds, *Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*. AVI Publishing company, Inc., Westport, Connecticut, pp 305-374.
- Feller, U. Proteolytic enzymes in relation to leaf senescence. In *Plant Proteolytic Enzymes*. Vol. II.; M. J. Dalling, Ed.; CRC Press, Inc.: Boca Raton, 1986; pp 49-68.
- Hensel, L. L.; Grbiae, V.; Baumgarten, D. A.; Bleecker, A. B. Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1993, 5, 552-564.
- Ludwig E, Lipke U, Raczek U, Jager A (2000) Investigations of peptides and proteases in green coffee beans. *Eur. Food Res. Technol.* 211: 111-116.
- Montavon P, Duruz E, Rumo G, Pratz G (2003) Evolution of green coffee protein profiles with maturation and relationship to coffee cup quality. *J. Agric. Food Chem.* 51: 2328-2334.
- Shimizu, M.M., Mazzafera, P., 2000. Compositional changes of proteins and amino acids in germinating coffee seeds. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 43(3): 259-265.
- Rogers WJ, Bézard G, Deshayes A, Meyer I, Pétiard V, Marraccini P (1999) Biochemical and molecular characterization and expression of the 11S-type storage protein from *Coffea arabica* endosperm. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 261-272.
- Selmar D, Bytof G, Knopp S-E (2001) New aspects of coffee processing: the relation between seed germination and coffee quality. In: *XIX International Congress on Coffee – ASIC*.