

**AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DA ATIVIDADE DE ISOENZIMAS  
LIPOXIGENASES NA GERAÇÃO F4 DE LINHAGENS DE SOJA IAC-8 COM  
GERMOPLASMA -L1, -L2 E -L3.**

TAVARES

19/91

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Parecer

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

*Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por José Torquato de Queiroz Tavares e aprovada pela Comissão Julgadora em 15.07.91.  
Campinas, 15 de julho de 1991.*

*Det. Tavares*

AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DA ATIVIDADE DAS ISOENZIMAS  
LIPOXIGENASES NA GERAÇÃO F4 DE LINHAGENS DE SOJA IAC-8 COM  
GERMOPLASMA -L1, -L2 E -L3,

JOSÉ TORQUATO DE QUEIROZ TAVARES

ENGENHEIRO AGRÔNOMO

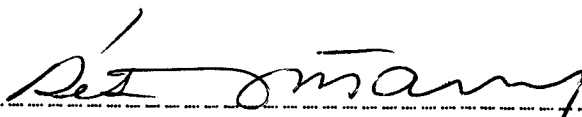
ORIENTADORA: PROF<sup>ª</sup>. DR<sup>ª</sup>. DÉBORA DE QUEIROZ TAVARES *~*

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da  
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título  
de Mestre em Ciência da Nutrição.

1991

1508014102

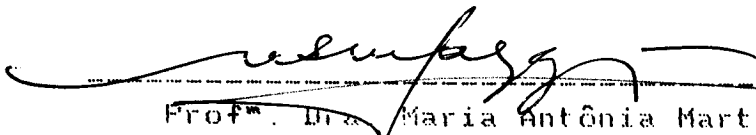
**BANCA EXAMINADORA**



Prof<sup>ma</sup>. Dra. Débora de Queiroz Tavares  
(Orientadora)

*Suplente*

Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira  
(Membro)



Prof<sup>ma</sup>. Dra. Maria Antônia Martins Galeazzi  
(Membro)



Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán  
(Membro)

Campinas, 15 de julho de 1991.

À Noelia e aos meus filhos ,  
Bruno e Torquato.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A DEUS

A Profa. Dra. Débora de Queiroz Tavares.

Ao Engo. Agrônomo Manoel A. C. Miranda (IAC).

Ao Prof. Dr. Jorge Antonio Gonzaga Santos (EAUFBA).

Ao Prof. João Albany Costa (EAUFBA).

As Técnicas Yara Fagnani Honório e Kimie Alice M. Shiosaha.

Aos colegas Márcio F. Cunha, Ricardo L. Cardoso e Hilda Torim.

A Universidade Federal da Bahia e ao Departamento de Química Agrícola e Solos da Escola de Agronomia.

A CAPES, à FAPESP e ao CNPq.

A Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação (ABIA) pelo fornecimento das cópias deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

Agradeço!...

## RESUMO

A redução da atividade das isoenzimas lipoxigenases foi avaliada qualitativa e quantitativamente nas sementes da geração F4 de plantas de soja [*Glicine max* (L.) Merrill] obtidas por retrocruzamento do cultivar comercial IAC-8 com os mutantes PI 408251 (-L1), PI 86023 (-L2) e TOHOKU N° 74 (-L3) .

A avaliação do extrato enzimático bruto das sementes através da eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS revelou que os padrões -L1, -L2, -L3 apresentaram ausência de uma banda enzimática, e, que os descendentes dos três grupos apresentaram resultados diferenciados: as linhagens descendentes do mutante -L3 apresentaram ausência da respectiva banda e metade dos descendentes de -L1 e -L2 apresentaram uma terceira banda fraca sugerindo a presença de quantidades residuais das isoenzimas.

A determinação da atividade enzimática foi efetuada por espectrofotometria em presença dos substratos específicos e ainda por reação acoplada de descoramento do caroteno. Os mutantes -L1, -L2, -L3 e seus descendentes demonstraram atividade enzimática muito reduzida com relação as respectivas isoenzimas.

A reação de descoramento do caroteno como teste para detectar a atividade enzimática dos mutantes -L1, -L2, -L3 e de seus descendentes confirmaram a redução das respectivas isoenzimas.

## SUMMARY

An attempt was made in order to measure the reduced enzymatic lipxygenase isoenzyme activity of the 4<sup>th</sup> progeny after the first back-cross obtained of a commercial cultivar of soybean, IAC-8, with the following mutants PI408251 (-L1) PI86023 (-L2) and TOHOKU n°.74 (-L3).

The qualitative evaluation of the raw enzymatic extracts of seeds was made through electrophoresis in polyacrylamide-SDS gel. The enzymatic activity was assayed through spectrophotometric determinations with specific substrate or indirectly through a carotene bleaching method.

The electrophoresis of mutants showed the absence of one mutant band. With regard to descendents, those derived from -L3 showed two bands only. Half of -L2 and -L1 descendents demonstrated unevenly a third unexpected band.

The enzymatic activity demonstrated quantitatively the marked reduction of -L1, -L2 and -L3 of the original seeds as well as of the descendent seeds.

The bleaching method was also effective to demonstrate the quoted isoenzyme reduction.

## ÍNDICE DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 1 - Discriminação dos grupos de plantas utilizados nas análises. ....                                                                                                                                                                                                         | 44 |
| TABELA 2 - Resultados dos testes de atividade enzimática das isoenzimas lipoxigenases em extrato enzimático bruto de sementes de cultivares de soja IAC-8, PI408251 (-L1) com seus descendentes (POOLs 13, 14, 15, 16), PI86023 (-L2) com seus descendentes (POOLs 1, 2, 3, 4). .... | 76 |
| TABELA 2A - Resultados dos testes de atividade enzimática das isoenzimas lipoxigenases em extrato enzimático bruto de sementes do cultivar de soja TOHOKU Nº.74 (-L3) com seus descendentes (POOLs 5, 6, 7, 8 com hilo preto e 9, 10, 11, 12 com hilo marrom). ....                  | 77 |
| TABELA 3 - Atividade enzimática da isoenzima lipoxigenase 1 (L1) nos cultivares de soja IAC-8, PI86023 (-L2), TOHOKU Nº.74 (-L3) e PI408251 (-L1) com suas linhagens descendentes (POOLs 13, 14, 15, 16). ....                                                                       | 78 |

TABELA 4 - Atividade enzimática da isoenzima lipoxigenase 2 (L2) nos cultivares de soja IAC-8, PI408251 (-L1), TOHOKU Nº.74 (-L3) e PI86023 (-L2) com suas linhagens descendentes (POOLS 1, 2, 3, 4). . . . . 79

TABELA 5 - Atividade enzimática da isoenzima lipoxigenase 3 (L3) nos cultivares de soja IAC-8, PI408251 (-L1), PI86023 (-L2) E TOHOKU Nº.74 (-L3) com suas linhagens descendentes (POOLS 59, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) . . . . . 80

TABELA 6 - Descoramento do caroteno (absorbância a 452nm) através do extrato enzimático bruto de sementes de cultivares de soja . . . . . 83

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1 - Oxidação do ácido linoléico e linolênico por lipoxigenases (GARDNER, 1988). . . . .                                                                                                                                                                | 24 |
| FIGURA 2 - Proposta do mecanismo de oxidação do C-9 (A) e do C-13 (B) assim como a remoção do hidrogênio do C-11 espacialmente idêntica de acordo com o arranjo da cabeça ou cauda da cadeia do ácido graxo no sítio ativo da enzima (GARDNER, 1988). . . . . | 28 |
| FIGURA 3 - Mecanismo de ação das lipoxigenases proposto por SIDDIQ & TAPPEL (1957). . . . .                                                                                                                                                                   | 32 |
| FIGURA 4 - Reação anaeróbica entre o ácido linoléico e o ácido 13-hidroperóxidolinoléico catalisada pela lipoxigenase da soja (VLIEGENTHART et alii, 1979). . . . .                                                                                           | 34 |
| FIGURA 5 - Sementes de cultivares de soja utilizados no retrocruzamento e como padrões nas análises de eletroforese e atividade enzimática. . . . .                                                                                                           | 42 |

FIGURA 6 - Percentagem de lipídios dos cultivares utilizados no retrocruzamento (IAC-8, PI408251, PI86023, TOHOKU Nº.74) e das respectivas linhagens descendentes (POOLs).  
..... 57

FIGURA 7 - Resultados da avaliação do nível de oxidação dos cultivares utilizados no retrocruzamento (IAC-8, PI408251, PI86023, TOHOKU Nº.74) e das respectivas linhagens descendentes (POOLs) através do índice de peróxidos (mEq/Kg de óleo).  
..... 58

FIGURA 8 e 8A - Resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS ilustrando as bandas e as mobilidades relativas correspondentes as isoenzimas L1, L2 e L3 nos cultivares de soja utilizados como padrões, IAC-8, PI408251 (-L1), PI86023 (-L2) e TOHOKU Nº.74 (-L3).  
..... 63

FIGURA 9 e 9A- Resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS ilustrando as bandas e as mobilidades relativas correspondentes as isoenzimas L1, L2 e L3 no cultivar de soja PI408251 (-L1) e nas suas linhagens descendentes (POOLs 13, 14, 15, 16).  
..... 64

FIGURA 10 e 10A - Resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS ilustrando as bandas e as mobilidades relativas correspondentes as isoenzimas L1, L2 e L3 no cultivar de soja PI86023 (-L2) e nas suas linhagens descendentes (POOLs 1, 2, 3, 4).

..... 65

FIGURA 11 e 11A - Resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS ilustrando as bandas e as mobilidades relativas correspondentes as isoenzimas L1, L2 e L3 no cultivar de soja TOHOKU Nº.74 (-L3) e nas suas linhagens descendentes (POOLs 5, 6, 7, 8).

..... 66

FIGURA 12 e 12A - Resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS ilustrando as bandas e as mobilidades relativas correspondentes as isoenzimas L1, L2 e L3 no cultivar de soja TOHOKU Nº.74 (-L3) e nas suas linhagens descendentes (POOLs 9, 10, 11, 12).

..... 67

## ÍNDICE GERAL

### Páginas

|                                                                               |      |
|-------------------------------------------------------------------------------|------|
| RESUMO .....                                                                  | vi   |
| SUMMARY .....                                                                 | vii  |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....                                                       | viii |
| ÍNDICE DE TABELAS .....                                                       | x    |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                           | 1    |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA .....                                                | 4    |
| 2.1 SOJA .....                                                                | 4    |
| 2.1.1 PROTEÍNAS DO GRÃO DE SOJA .....                                         | 6    |
| 2.1.2 PRODUTOS PROTEICOS DA SOJA .....                                        | 10   |
| 2.1.2.1 PROBLEMAS DE SABOR .....                                              | 12   |
| 2.1.2.2 MÉTODOS UTILIZADOS NA INDÚSTRIA<br>PARA INATIVAR A LIPOXIGENASE ..... | 15   |
| 2.2 LIPOXIGENASE E SEU MECANISMO DE AÇÃO .....                                | 23   |
| 2.3 MÉTODOS DE ANÁLISE DE LIPOXIGENASES .....                                 | 36   |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS .....                                                   | 41   |
| 3.1 MATERIAL .....                                                            | 41   |
| 3.1.1 MATÉRIA-PRIMA ESTUDADA .....                                            | 41   |
| 3.2 MÉTODOS .....                                                             | 45   |
| 3.2.1 PREPARO DAS AMOSTRAS .....                                              | 45   |

|       |                                                                        |    |
|-------|------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3   | EXTRAÇÃO DOS LIPÍDIOS E DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PERÓXIDOS .....      | 46 |
| 3.4   | ELETROFORESE .. .. .                                                   | 47 |
| 3.5   | ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....                                             | 48 |
| 3.5.1 | EXTRAÇÃO DAS ISOENZIMAS E DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS .....      | 48 |
| 3.5.2 | PREPARO DOS SUBSTRATOS .....                                           | 49 |
| 3.5.3 | DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA .                                 | 50 |
| 3.5.4 | DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA POR DESCORAMENTO DO CAROTENO..... | 52 |
| 3.6   | ANÁLISE ESTATÍSTICA .....                                              | 53 |
| 4.    | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                           | 55 |
| 4.1   | LIPÍDIOS E ÍNDICE DE PERÓXIDOS .....                                   | 55 |
| 4.2   | CARACTERIZAÇÃO ELETROFORÉTICA .....                                    | 59 |
| 4.3   | ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....                                             | 70 |
| 4.4   | ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE DESCORAMENTO DO CAROTENO                       | 79 |
| 5.    | CONCLUSÕES .....                                                       | 83 |
| 6.    | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                       | 85 |

## 1 INTRODUÇÃO

A soja e seus subprodutos possuem elevado teor de proteínas de baixo custo, quando comparado com o custo de proteínas de origem animal. Embora a distribuição de aminoácidos nas proteínas da soja seja próxima à recomendada pela FAO/WHO (FOOD AND AGRICULTURE/ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION), e seu óleo seja rico em ácidos linolênico e linoléico, a soja e seus derivados são pouco consumidos pela população brasileira.

A maior limitação ao consumo direto dos produtos derivados da soja deve-se ao sabor indesejável em relação aos padrões ocidentais. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, sendo que a maior parte da produção é exportada na forma de grãos e óleo.

Na soja, as isoenzimas lipoxigenases L1, L2 e L3, catalisam a reação de peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados; os peróxidos formados originam por degradação (enzimática ou não) os compostos carbonílicos

responsáveis pelo odor e sabor de feijão verde ou soja crua, os quais são rejeitados pela população.

A lipoxigenase tem sido inativada com o emprego de aquecimento, ou de solventes ou de misturas azeotrópicas. Esses métodos são pouco satisfatórios porque promovem alterações nas propriedades físicas e funcionais das proteínas provocando perda de solubilidade, de valor nutritivo, podendo ainda acrescentar sabores estranhos; por serem dispendiosos encarecem o produto final.

Uma das alternativas viáveis para melhoria dos derivados da soja é a eliminação genética das lipoxigenases. Os programas de melhoramento genético da soja estão introduzindo alelos recessivos para as isoenzimas L1, L2, e L3 em cultivares comerciais. Esta introdução deverá conferir maior estabilidade aos produtos protéicos e ao óleo, com melhoria de suas propriedades organolépticas. A Seção de Leguminosas do INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS vem desenvolvendo um trabalho neste sentido com o cultivar IAC-8.

Os centros de pesquisa que trabalham com esse tipo de melhoramento necessitam de métodos rápidos e eficientes para confirmar a eficiência dos cruzamentos e para identificar os genótipos obtidos.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a redução da atividade das isoenzimas lipoxigenases nas sementes da geração F4 das plantas obtidas por retrocruzamento do cultivar IAC-8 com os mutantes PI 408251 (-L1), PI 86023 (-L2) e TOHOKU nº.74 (-L3) testando métodos qualitativos e quantitativos para a detecção das isoenzimas no extrato enzimático bruto.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 SOJA

A soja [*Glicine max* (L.) Merrill] tem sido parte importante da dieta humana por vários séculos, especificamente no oriente. Em alguns países o consumo proteico dos derivados de soja chega a atingir 12 - 13% do total das proteínas consumidas pela população (CANTO & SANTOS, 1982).

Soja é a mais abundante e econômica fonte de proteína vegetal de alta qualidade. Numerosos estudos demonstraram a redução do colesterol plasmático induzida pela administração dietética de proteínas de soja em alguns animais e no homem (HILDEBRAND & KITO, 1984).

A soja constitui excelente fonte de nutrientes para o homem e animais domésticos, por armazenar altos teores de proteínas e lipídeos. O teor médio de proteínas é

de aproximadamente 40% da matéria seca, embora em alguns genótipos esse teor possa chegar até a 55% da matéria seca (DERBYSHIRE et alii, 1976; CHAPMAN, 1976; COSTA et alii, 1973/74).

O teor de óleo na soja varia de 12 a 24% da matéria seca (PIPER & MORSE, 1923; CHAPMAN et alii, 1976). Nos óleos o teor de ácidos graxos essenciais está em torno de 7 a 9% de ácido linolênico e 40 a 59% de ácido linoléico (DAVIES & NIELSEN, 1987; CHAPMAN et alii, 1976; COSTA et alii, 1973/74).

No mundo ocidental a soja passou a ser consumida em meados de 1930, com a implantação de indústrias visando o beneficiamento da soja, para obtenção de óleo comestível, produção de margarina, maioneses, etc.. Reconhecida pelo seu alto valor protéico e nutricional, foi empregada primeiramente como ração animal. Nos últimos 20 anos, contudo, muitos produtos comestíveis têm sido obtidos diretamente da soja e de seus subprodutos (IADEROZA, 1986; RESENDE, 1986).

Países como Estados Unidos da América, Brasil e Japão são grandes produtores de soja e possuem reconhecidos centros de pesquisa dedicados ao melhoramento genético da cultura. No Brasil esse melhoramento, além do aumento da

produtividade, visa a adequação da soja à diversidade climática e a melhoria de propriedades organolépticas. O esforço mundial de seleção e aprimoramento é responsável pela enorme diversidade de cultivares. Assim a soja dependendo da variedade, apresenta diferenças acentuadas da forma da semente (variando de esférica a alongada ou achatada), cor da casca (variando do amarelo claro ao marrom ou preto), tamanho dos grãos e peso (o peso de 100 sementes pode variar de 20 a 30g). A semente contém aproximadamente 8% de casca, 90% de cotilédones e 2% de embrião (PIPER & MORSE, 1923; MÖLLER, 1981; PEREIRA, 1981).

#### 2.1.1. PROTEÍNAS DO GRÃO DE SOJA

As proteínas encontradas na soja são de dois tipos: proteínas metabólicas e proteínas de reserva (MILLERD, 1975). As proteínas metabólicas estão ligadas principalmente a atividade enzimática e de proteção (fitohemaglutininas ou lectinas e inibidores de tripsina). As proteínas de reserva não apresentam atividade enzimática e sua função é fornecer nitrogênio e aminoácidos para a germinação e o desenvolvimento da plântula (BOUTER, 1976).

As proteínas de reserva acham-se estocadas em

partículas denominadas corpos protéicos ou grãos de aleurona e são encontrados sobretudo nos cotilédones (VERNOOY-GERRITSEN et alii, 1983; 1984; WOLF, 1970; CASTRO, 1976). A maior parte das proteínas da soja são globulinas com solubilidade mínima próxima do pH 4,5, correspondendo ao ponto isoelétrico deste tipo de proteína (WANG, 1986).

As proteínas da soja são classificadas de acordo com seu coeficiente de sedimentação em 11S (Glicinina) e 7S ( $\beta$ -conglícinina) e, finalmente a fração 2S que é composta por enzimas, inibidores de tripsina, lectinas e outras proteínas (RESENDE, 1986).

Cerca de 70% das proteínas do grão de soja são globulinas, tendo a glicinina e a  $\beta$ -conglícinina como as maiores frações (HILL & BREIDENBACH, 1974). Estas duas frações podem formar polímeros dissulfídicos e sofrer reações de associação e dissociação, apresentando estruturas quaternárias que podem ser modificadas por ácidos, álcalis, uréia, detergentes e calor (WOLF, 1970; 1972).

De acordo com MOREIRA et alii (1979), a proteína glicinina é uma molécula complexa com peso molecular em torno de 360.000 Daltons e é constituída de pelo menos 12 polipeptídeos diferentes, sendo seis de caráter ácido (P.M. 40.000) e seis de caráter básico (P.M. 20.000). STASWICK et

alii, (1981) relataram que os polipeptídeos básicos estão associados aos ácidos através de pontes dissulfídicas, formando complexos intermediários de 60.000 Daltons.

A proteína B-conglicinina (p.m. 180.000 II) é formada por três polipeptídeos denominados  $\alpha$ ,  $\alpha'$  e  $\beta$  cujos pesos moleculares estão respectivamente em torno de 72.000, 68.000 e 57.000 (FONTES, 1983 citado por RESENDE, 1986).

A importância da proteína da soja está na sua alta concentração de aminoácidos essenciais, particularmente a lisina, os aminoácidos aromáticos e a leucina (BOOKWALTER et alii, 1971).

É conhecido que soja tem relativo baixo teor de metionina (WOLF, 1970) e elevado teor de lisina o que torna a proteína de soja muito adequada para complementar os cereais nas dietas. Nas sementes das leguminosas inclusive a soja, o baixo teor de metionina e cisteína é em grande parte causado pela pequena ocorrência desses dois aminoácidos nos dois complexos de reserva 7S e 11S (THANH & SHIBASAKI, 1977).

O grupo das proteínas metabólicas da soja do complexo 2S compreende os inibidores de tripsina, as

fitohemaglutininas (ou lectinas), as enzimas e outras proteínas.

Os inibidores de tripsina e quimotripsina são proteínas que, quando ingeridas, como na farinha de soja sem o prévio tratamento térmico, causam hipersecreção de enzimas e hipertrofia pancreática podendo ainda causar depressão do crescimento em animais jovens ou perda de peso em animais adultos (BRAY, 1964; LIENER, 1979). Os inibidores de tripsina são pequenas proteínas que contêm 70 a 75 resíduos de aminoácidos. Essas moléculas são particularmente ricas em cisteína que corresponde a 20% do total de aminoácidos (LARKINS, 1983). São conhecidos vários inibidores de proteases entre os quais o  $I_{19S}$ , o  $F_1$ , o  $F_2$ , o SBTI- $A_1$ , o SBTI- $B_1$ , o SBTI- $B_2$  e os inibidores "KUNITZ" e "ROWMAN-BIRK"; estes dois últimos foram purificados e estudados detalhadamente na soja (LIENER & KAKADE, 1969; SGARBIERI & WHITAKER, 1982).

O teor médio de lectinas na farinha de soja desengordurada está em torno de 1 - 3% (LIENER, 1979; NIELSEN, 1985). A toxicidade das lectinas é devida a sua afinidade com a superfície da célula do epitélio intestinal, isto é, por seus receptores de membrana de natureza glicoprotéica. Quando a farinha de soja é ingerida, sem o devido tratamento térmico, as lectinas podem ligar-se à

superfície das células intestinais, diminuindo sensivelmente a absorção de nutrientes e causando descamação excessiva das células epiteliais, podendo ulcerar a parede intestinal (LIENER, 1979).

## 2.1.2. PRODUTOS PROTÉICOS DA SOJA

A soja no Oriente sempre foi utilizada na alimentação humana. No mundo Ocidental tem ocorrido expressivo aumento do emprego direto da proteína de soja na alimentação humana, através de produtos industrializados, como farinha integral, extrato hidrossolúvel, proteína texturizada, isolados e concentrados protéicos. A indústria de alimentos emprega-os como componentes de farinhas mistas, sopas, mingaus, embutidos de carne, "hamburger", produtos de confeitaria, biscoitos e outros (RESENDE, 1986).

A farinha desengordurada de soja, contendo no mínimo 50% de proteína, pode ser considerada como o mais importante produto industrializado da soja, uma vez que é largamente utilizada no enriquecimento protéico de diversos alimentos, bem como empregada na obtenção de produtos concentrados, isolados protéicos e proteína texturizada (HORAN, 1974; KELLOR, 1974).

Concentrado e isolado protéico de soja são obtidos a partir da farinha de soja desengordurada e contém 70% e 90% de proteína, respectivamente. O primeiro é obtido por lavagem da farinha em pH isoelétrico das proteínas, para solubilizar e remover carboidratos e outros materiais. O isolado protéico é obtido por solubilização da proteína da farinha em solução alcalina seguida de precipitação (COSTA et alii, 1976).

A proteína texturizada de soja é dividida em dois grupos de acordo com o processo de obtenção: os produtos obtidos por extrusão e os obtidos por fiação. Os produtos obtidos por extrusão são mais usados em "hamburger", bolinho de carne e outros produtos cárneos, ao passo que a proteína obtida por fiação é usada para obter produtos similares à carne (bife), presunto, etc., uma vez que ela apresenta elevado teor de proteína (COSTA et alii, 1976).

O extrato hidrossolúvel de soja (comumente conhecido como leite de soja) é obtido a partir de grãos integrais, envolvendo as etapas de seleção, lavagem, maceração, desintegração, filtração, adição de água e aquecimento (PIPER & MORSE, 1923; MORETTI & HINOJOSA, 1981).

#### 2.1.2.1. PROBLEMAS DE SABOR

A aceitação de alguns produtos protéicos de soja, particularmente do extrato hidrossolúvel de soja, é limitada pela questão do sabor. Quando a soja é macerada em água e moída da maneira convencional para preparo do extrato hidrossolúvel, a degradação oxidativa dos ácidos graxos desenvolve um sabor de feijão verde e de ranço (WILKENS et alii, 1967; KALBRENER et alii, 1974; KELLOR, 1977). O sabor de feijão verde, ou de soja crua, tem limitado a inclusão do extrato hidrossolúvel e outros derivados da soja no hábito alimentar da população ocidental, inclusive da brasileira (WANG, 1986)

Os eventos oxidativos são considerados como os maiores problemas da indústria de alimentos à base de soja reduzindo a aceitabilidade dos produtos (KITAMURA et alii, 1983; RACKIS et alii, 1979). A oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados linoléico e linolênico durante o processamento e estocagem de soja é um problema significativo para a indústria de alimentos. Os problemas de sabor podem ocorrer tanto em preparados protéicos como no óleo porque os compostos indesejáveis são reativos e podem se ligar covalentemente às proteínas durante o processamento (RACKIS et alii, 1979; DAVIES & NIELSEN, 1987).

Os compostos responsáveis pelo sabor e odor desagradáveis não estão presentes no grão de soja intacto mas aparecem quando os grãos são rompidos colocando a enzima em contato com o substrato (SESSA et alii, 1969; MUSTAKAS et alii, 1969). A ativação da lipoxigenase, pelo aumento da umidade durante o tratamento térmico, origina a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados, principalmente os ácidos linoléico e linolênico (MUSTAKAS, et alii, 1969; SESSA et alii, 1969).

As lipoxigenases são responsáveis pela produção de hidroperóxidos de lipídeos em alimentos processados inadequadamente. Os hidroperóxidos assim como seus produtos de decomposição são substâncias potencialmente reativas que podem causar a deterioração das proteínas ou dos aminoácidos dos alimentos (GARDNER, 1979).

Existe correlação significativa entre a atividade da lipoxigenase e a formação do sabor amargo. Ficou evidenciado que lipoxigenase 1, que normalmente oxida apenas ácidos graxos poliinsaturados livres, pode oxidar a forma aniônica da fosfatidilcolina purificada de soja. Análises dos ácidos graxos da fosfatidilcolina intacta revelaram a presença de várias formas oxigenadas incluindo o ácido trihidroxiocetadecenoico que é amargo (RACKIS et alii, 1979).

Os hidroperóxidos formados pela ação da lipoxigenase sobre os ácidos graxos insaturados podem ser decompostos enzimaticamente ou não, dando origem a grande variedade de subprodutos. Muitos destes compostos formados são voláteis e tem sabor e odor desagradáveis, característicos de soja crua (KALBRENER et alii, 1974; RACKIS et alii, 1979; WOLF, 1967).

Os hidroperóxidos produzidos por ação das lipoxidases podem reduzir o valor nutritivo dos alimentos devido a destruição de carotenóides, retinol, tocoferóis, ácido ascórbico, além de proteínas e aminoácidos. Também os hidroperóxidos e seus produtos de degradação, em excesso, tem efeito tóxico (HILDEBRAND & HYMOVITZ, 1981; GARDNER, 1979; 1988; KITAMURA et alii, 1983). Estes produtos da degradação, além de produzirem sabor desagradável, podem interagir com proteínas peptídios e aminoácidos provocando o escurecimento dos produtos e comprometendo o seu valor nutricional (KALBRENER et alii, 1974; RACKIS et alii, 1979; GARDNER, 1979).

MATTICK & HAND (1969) e WILKENS & LINS (1970) isolaram 80 compostos voláteis, sendo que, 40 a 41 deles foram identificados. A maioria deles são aldeídos, cetonas e alcoois, sendo o n-hexanal o maior componente volátil (25%

da fração total). Quase todos tem odor e sabor desagradável, em particular a etilvinilcetona que tem sabor típico de soja crua.

Segundo GOOSSENS (1974), os constituintes de sabores semelhantes à erva são bastante complexos, destacando-se entre eles o isopentanol, hexanol, heptanol, 1-octeno-3-ol, etilvinilcetona e 4-vinil-guaiacol.

Em relação ao óleo, a desodorização dos "off flavors" é parcialmente efetuada pela refinação, mas os componentes da degradação da fração lipídica permanecem causando o desenvolvimento do gosto desagradável. É necessária ainda a hidrogenação para aumentar a estabilidade do óleo (SAWAZAKI et alii, 1987).

#### 2.1.2.2 MÉTODOS UTILIZADOS NA INDÚSTRIA PARA INATIVAR A LIPOXIGENASE

Em alguns legumes o desenvolvimento de "off-flavors" pode ser realmente controlado pela rápida inativação das lipoxigenases com calor, álcool ou tratamento ácido (RACKIS et alii, 1979).

Para eliminar o sabor desagradável dos produtos de soja as indústrias precisam remover os compostos voláteis ou inativar as lipoxigenases. Essa remoção e/ou desnaturação é feita por diversos processos: moendo os grãos com água quente (WILKENS et alii, 1967); tratando a soja decortificada com calor seco (MUSTAKAS et alii, 1970); através de branqueamento (NELSON et alii, 1976); moendo a soja em pH ácido ou alcalino combinado ao tratamento térmico (KON et alii, 1970); moendo a soja em presença de álcool (ELDRIDGE et alii, 1977); etc.

WILKENS et alii (1967) submeteram grãos de soja inteiros ou descortificados ao aquecimento a seco a 100°C por 30min. mas não conseguiram inativar a lipoxigenase presente. No entanto, usando a temperatura de 200°C por 15 e 30min., verificaram que a atividade da lipoxigenase diminuía bastante, principalmente após 30 minutos. Constataram que ocorre diminuição na formação de compostos voláteis quando a soja é desintegrada em água quente a 80; 90 e 100°C, durante 10 min. o que se deve a inativação da lipoxigenase antes de ocorrer a oxidação.

MUSTAKAS et alii (1970) tratando grãos de soja descortificados (com 6% de umidade) com calor seco, a temperaturas que variavam entre 82°C por 28min. e 103°C por

62min. verificaram que à temperatura de 82°C ou abaixo ocorria uma inativação menor que 50%, mas a 103°C ocorria aproximadamente 98,4% de inativação das lipoxidases. Os autores verificaram também que o aquecimento úmido do grão e aquecimento por vapor direto, quando utilizados isoladamente em soja, são métodos eficientes na inativação da lipoxigenase. A farinha obtida dos grãos por um processo ou pelo outro apresentou, após dois anos de estocagem, boas características de sabor e odor. Observaram ainda que utilizando os dois processos em sequência promovia-se a inativação enzimática mas após dois anos de armazenamento apareceu o sabor desagradável de ranço na farinha proveniente desses grãos.

Com a utilização de vapor à pressão atmosférica foi possível criar condições ótimas para a inativação da lipoxigenase dos grãos de soja, sendo que o tempo necessário para a inativação diminuiu à medida que o teor de umidade dos grãos aumentou. O óleo e a farinha obtidos dos grãos térmicamente tratados com vapor apresentam maior estabilidade (RICE et alii, 1981).

Quando se procedeu a desintegração dos grãos em pH 3,85 ou mais baixo, combinando com o calor obtêve-se uma pasta que, cozida por uma hora e neutralizada com NaOH produz um extrato hidrossolúvel de soja livre de sabor ou

odor desagradável (KON et alii, 1970). Segundo os mesmos autores, ácido clorídrico concentrado, ácido fosfórico (85%), ácido láctico (85%) e ácido cítrico (2,7M) podem ser usados para acidificar o meio, embora os dois últimos interfiram no sabor, devido à necessidade do uso de grande quantidade para se atingir o pH desejado. A neutralização resulta na formação de 0,5% de sais que podem ser indesejáveis em algumas aplicações dos produtos (WOLF, 1975).

ELDRIDGE et alii (1977) utilizando a maceração por 24h ou desintegração em solução etanólica 40 a 60% (v/v) a 25°C obtiveram produtos com bom sabor pela redução da atividade enzimática e até inativação completa. Os compostos voláteis presentes são extraídos durante o processo de remoção do etanol a 30°C.

Utilizando solução etanólica (15 a 45%) a uma temperatura de 40° a 60°C para macerar grãos de soja inteiros por 2 a 6h, BORHAN & SNYDER (1979) conseguiram inativar as lipoxigenases. Eles combinaram a temperatura, o tempo e a concentração do etanol para obter uma inativação eficiente.

KANANI et alii (1982) verificaram que a vida de prateleira da farinha de soja integral poderia ser melhorada

utilizando-se um tratamento prévio do grão com radiação de infra-vermelho por um minuto à 124°C, seguido de manutenção em um recipiente isotérmico por 15 minutos. A farinha integral provenientes desses grãos não apresentou atividade da lipoxigenase.

NELSON et alii (1976) utilizaram o processo de maceração e branqueamento da soja integral em bicarbonato de sódio obtendo bons resultados quanto ao odor e sabor do extrato hidrossolúvel de soja.

ELDRIDGE et alii (1971) utilizaram diversas misturas azeotrópicas para extrair os lipídeos residuais em flocos de soja, obtendo o máximo de eliminação dos sabores desagradáveis com o tempo de uma hora. Os autores utilizaram misturas azeotrópicas de hexano e metanol, etanol ou 2-propanol. A mistura mais eficiente foi de hexano-etanol.

Extrações de farinhas com álcool ou misturas azeotrópicas tais como hexano e álcool, efetivamente removem ligações proteína-lipídeos produzindo concentrados livres de sabores. Concentrado de soja com sabor suave semelhante à farinha de trigo tem sido preparado por uma combinação de extração azeotrópica e aquecimento por vapor (RACKIS et alii, 1979).

CHIBA et alii (1979) utilizaram a enzima aldeído desidrogenase para decompor os compostos responsáveis pelo odor e sabor indesejável incubando extrato de soja com a enzima e nicotinamida adenina dinucleotídeo ( $\text{NAD}^+$ ), conseguindo remover completamente os sabores indesejáveis através da oxidação dos aldeídos e seus ácidos correspondentes.

O tema comum a quase todos os processos de inativação é a eliminação das lipoxigenases por aquecimento a altas temperaturas que reduzem a solubilidade das proteínas. WOLF, (1975) aconselhou a alternativa de extrair os componentes responsáveis pelo sabor através de misturas azeotrópicas porque ocorre reduzida desnaturação das proteínas.

Os vários tratamentos propostos para a inativação da lipoxigenase removem o sabor desagradável mas geralmente promovem alterações indesejáveis nas propriedades físicas e funcionais das proteínas da soja, emprestam sabores estranhos, além de não resolverem satisfatoriamente o problema, sendo dispendiosos tornam o produto final mais caro (KITAMURA et alii, 1983; KITAMURA, 1984; HILDEBRAND & HYMOWITZ, 1981; HILDEBRAND & KITO, 1984; DAVIES & NIELSEN, 1986; 1987).

A desnaturação térmica influi nas propriedades físicas de gelificação, texturização ou fibrilação das proteínas, e quando em excesso, pode reduzir o valor nutritivo, diminuindo os teores de aminoácidos sulfurados sensíveis ao calor e afetando ainda a biodisponibilidade pela reação de Maillard (SAWAZAKI et alii, 1987).

Uma das alternativas mais viáveis para melhorar o odor e sabor é a eliminação genética da lipoxigenase, principal fator que causa instabilidade da fração lipídica dos grãos de soja (RESENDE, 1986). Os programas de melhoramento genético da soja preferenciam cultivares cujos grãos apresentam baixa atividade de lipoxigenase uma vez que esta enzima está sob controle genético (CHAPMAN et alii, 1976; HAMOND et alii, 1972; KITAMURA et alii, 1983). Cultivares não comerciais (mutantes) com ausência de L1(-L1) (HILDEBRAND et alii, 1981), com ausência de L2(-L2) (KITAMURA, 1984; DAVIES & NIELSEN, 1986) e com ausência da L3 (-L3) (KITAMURA et alii, 1983; KITAMURA, 1984) foram identificados recentemente. Os genes que causam a ausência de L1, L2 e L3 em sementes de soja são alelos recessivos (HILDEBRAND & HYMOWITZ, 1981). Diversos autores já comprovaram ser possível a transferência dos alelos recessivos dos mutantes para o germoplasma de variedades comerciais obtendo-se cultivares -L1, -L2, -L3 (KITAMURA et

alii, 1983; KITAMURA, 1984; HILDEBRAND & HYMOWITZ, 1981; 1982; SAWAZAKI et alii, 1987. Já foram obtidos e identificados inclusive genótipos duplos recessivos  $lx_1lx_1.lx_3lx_3$  e  $lx_2lx_2.lx_3lx_3$  correspondentes aos fenótipos -L1.-L3 e -L2.-L3 respectivamente (DAVIES & NIELSEN, 1986; 1987; 1987a; KIKUCHI & KITAMURA, 1987; SAWAZAKI et alii, 1987).

O objetivo dos pesquisadores é obter o genótipo triplo recessivo  $lx_1lx_1.lx_2lx_2.lx_3lx_3$ . O que só poderia ser conseguido via recombinação gênica entre os locus  $lx_1$  e  $lx_2$ , que são ligados (DAVIES & NIELSEN, 1986).

Ainda é desconhecido o papel da lipoxigenase na fisiologia da planta existindo especulações sobre suas funções mas sem comprovação científica (ERIKSSON, 1975; GARDNER, 1975). O fato das sementes mutantes -L1, -L2, -L3 e das linhagens -L1.-L3, -L2.-L3 germinarem e se desenvolverem pode significar que as isoenzimas não são requeridas para a sobrevivência das plantas ou então que os métodos utilizados não são sensíveis na detecção de baixos níveis dessas isoenzimas. DAVIES & NIELSEN (1986) destacaram a necessidade da investigação de novos métodos ou técnicas mais sensíveis para estabelecer o limite superior do nível

dessas proteínas nas sementes dos mutantes.

A redução genética das lipoxigenases será uma solução prática para a indústria de soja. DAVIES & NIELSEN (1987) testando extrato hidrossolúvel de soja obtido de linhagens -L1, -L2, -L3, -L1. -L3 e -L2.-L3 através de análise sensorial e da medida de ácido tiobarbitúrico (TBA), observaram que a eliminação da L2 produziu significativa redução dos "off-flavors" e do índice de TBA. Similar tendência foi mostrada pela farinha de soja. A remoção da L1 e L3 não reduziram os valores de "off-flavors" e número de TBA quando comparados aos padrões

## 2.2. LIPOXIGENASE E SEU MECANISMO DE AÇÃO

As lipoxigenases (Linoleato: Oxigênio, oxirredutase EC 1.13.11.12, formalmente conhecida como lipoxidase) são enzimas encontradas em plantas e animais (GARDNER, 1988) que catalisam a hidroperoxidação de ácidos graxos poliinsaturados e seus ésteres contendo um sistema de ligação do tipo cis-cis-1,4-pentadieno como é ilustrado na figura 1.

Embora muito associadas a sementes de leguminosas,

notadamente a soja, alguns cereais e oleaginosas, HAMBERG & SAMUELSSON (1967) relataram o envolvimento da lipoxigenase na oxidação de ácidos graxos durante a biossíntese de prostaglandinas em tecidos mamários.

Elas são encontradas principalmente no citossol do parênquima de reserva das sementes. Durante a germinação ocorre redução da enzima no parênquima de reserva do grão e aumento na epiderme abaxial da folha, na epiderme e na bainha do feixe vascular da nova planta (VERNOOY-GERRITSEN et alii, 1983; 1984).

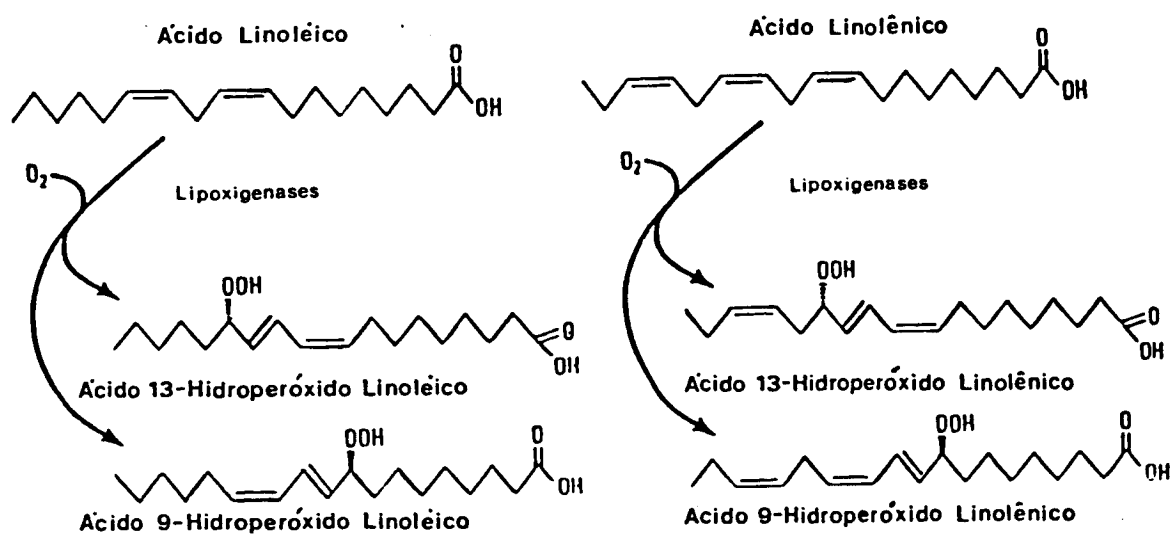


FIGURA 1 - A OXIDAÇÃO DO ÁCIDO LINOLÉICO E LINOLÊNICO POR LIPOXIGENASES (GARDNER, 1988).

A semente de soja é rica em lipoxigenases, constituindo cerca de 1 a 2% do total de proteínas

constituindo cerca de 1 a 2% do total de proteínas (KITAMURA, 1984; DAVIES & NIELSEN, 1986). Quatro isoenzimas já foram isoladas na semente de soja: lipoxigenase 1, 2, 3a, e 3b (L1, L2, L3a e L3b). A L3a e L3b por serem muito semelhantes, são consideradas em todos os ensaios como uma isoenzima única, a L3 (AXELROD et alii, 1981).

Todas as lipoxigenases, incluindo as quatro isoenzimas da soja, possuem peso molecular em torno de 100.000 Daltons (AXELROD et alii, 1981; GARDNER, 1988; HILDEBRAND & HYMOWITZ, 1981; CHRISTOPHER et alii, 1972). Essa isoenzimas podem ser purificadas por precipitação com sulfato de amônio e cromatografia em coluna de DEAE - SEPHADEX (AXELROD et alii, 1981).

Cada isoenzima contém um átomo de ferro ligado covalentemente e este não pode ser removido por agentes quelantes como EDTA, betafenantrolina, etc., a não ser que a enzima seja tratada com um reagente contendo grupo sulfidril como o TIRON (ácido 4, 5-dihidroxi-m-benzenodissulfônico) mas a remoção é lenta, caso a enzima permaneça íntegra (PISTORIUS & AXELROD, 1974; AXELROD et alii, 1981).

Dentro das condições ideais, as isoenzimas lipoxigenases variam na sua especificidade de acordo com a

posição de oxigenação dos ácidos graxos insaturados (C - 9 ou W 10 vs C - 13 ou W 6). A L1 induz a formação do ácido 13-hidroperóxido-cis-9,trans-11-octadienóico quantitativamente; a L2 induz quase iguais quantidades dos hidroperóxidos 9- e 13- enquanto a L3 produz aproximadamente 65% e 35% desses produtos (CHRISTOPHER et alii, 1970; AXELROD et alii, 1981; GARDNER, 1975).

O comportamento das diversas enzimas lipoxigenases com relação a oxidação das duas diferentes posições dos carbonos, assim como os produtos resultantes, são influenciados pelas condições da reação. Dependendo do pH, da concentração de  $O_2$  e temperatura, a L1 oxida o ácido linoléico produzindo misturas que variam em função da razão entre os isômeros 13-hidroperóxido e 9-hidroperóxido (CHRISTOPHER et alii, 1972). A especificidade posicional da oxidação por L2 é também dependente das condições do meio, mas essa dependência é menor do que a da L1 (GARDNER, 1988).

É possível observar o mecanismo de ação das lipoxigenases através do esquema proposto por GARDNER (1988) ilustrado na figura 2, que propõe um modelo de ação no qual podem ser formados os isômeros 13-hidroperóxido ou 9-hidroperóxido a partir de um mesmo ácido graxo. O modelo A mostra a oxidação inicial do ácido linoléico com o ataque do oxigênio e a transferência via sítio ferro-ativo; o modelo B

mostra a completa oxidação do produto, o hidroperoxidieno (anion).

De acordo com AXELROD et alii (1981) todas as substâncias ligadas a lipídeos que possuam um ou mais grupos cis-cis-1,4 pentadieno como ácidos graxos de cadeia reta, ésteres, fosfolipídios, álcoois, glicerídios, álcoois sulfatados e hidroxamatos podem ser utilizados como substratos de lipoxigenases.

As lipoxigenases da soja atuam eficientemente sobre os ácidos graxos com um grupo metileno situado no carbono W-8 entre duas duplas ligações. Os ácidos graxos mais comumente encontrados e adequados a estes requerimentos são o linoléico e linolênico (HAMBERG & SAMUELSSON, 1967; GARDNER, 1988). O linoleil sulfato de potássio foi indicado por BILD et alii (1977) como o melhor substrato para L1 pela sua alta solubilidade.

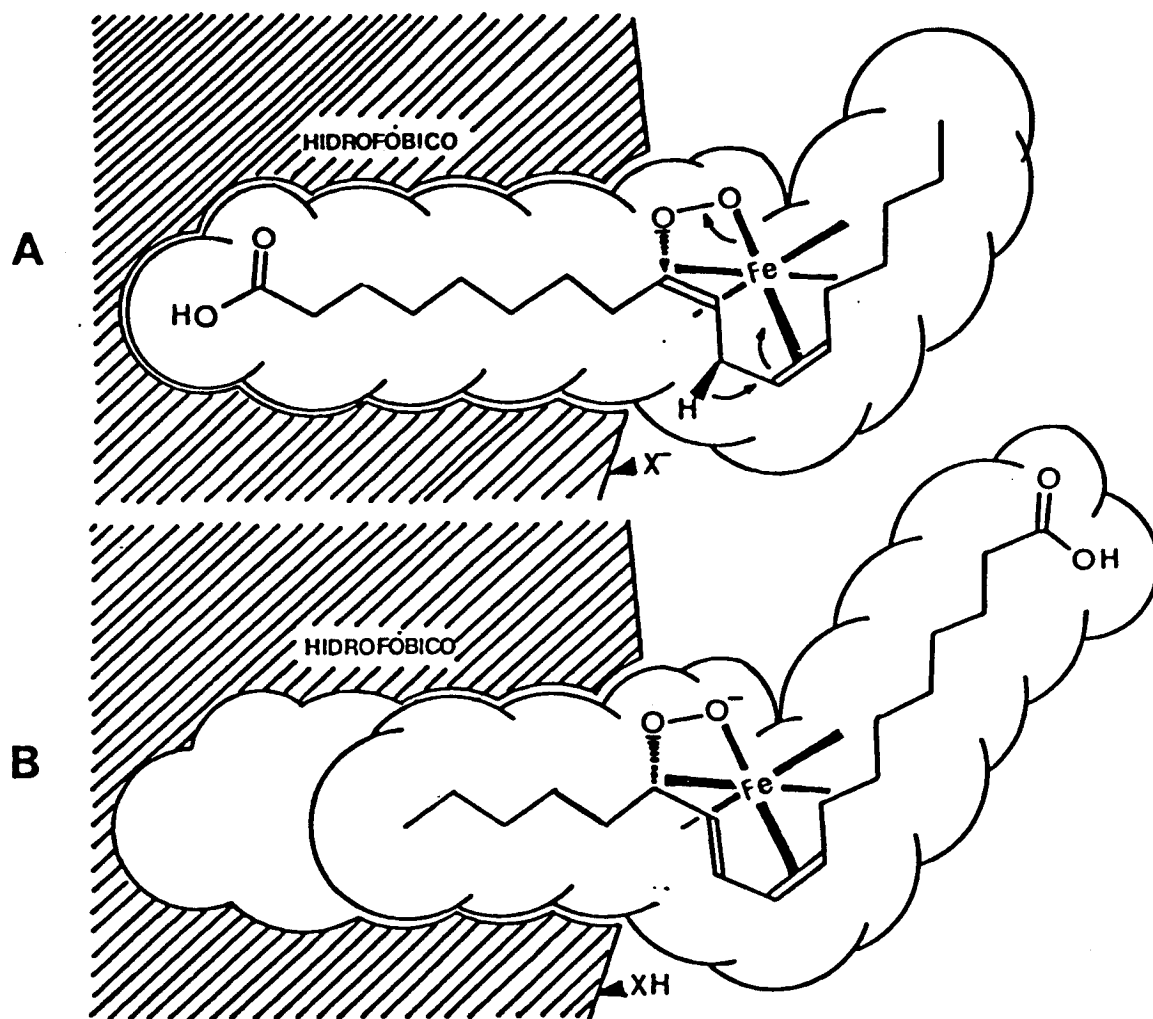


FIGURA 2 - PROPOSTA DO MECANISMO DE OXIDAÇÃO DA LIPOXIGENASE, MOSTRANDO A OXIDAÇÃO DO C-9 (A) E DO C-13 (B) ASSIM COMO A REMOÇÃO DO HIDROGÊNIO DO C-11 ESPECIALMENTE IDÊNTICA DE ACORDO COM O ARRANJO DA CABEÇA OU CAUDA DA CADEIA DO ÁCIDO GRAXO NO SÍTIO ATIVO DA ENZIMA (GARDNER, 1988).

A L1 é mais reativa com o ácido linoléico ao passo que a L2 e a L3 são mais reativas com metil-linoleato ou trilinoleína (BILD et alii, 1977; HILDEBRAND & KITO, 1984). A L1 tem preferência por ácidos graxos livres enquanto que a L2 e L3 por ésteres metílicos (CHRISTOPHER et alii, 1972; VERHUE & FRANCKE, 1972). A L2 é mais ativa contra o ácido araquidônico do que contra o ácido linoléico (AXELROD et alii, 1981).

Segundo HOLMAN et alii (1969), as velocidades ótimas das reações são conseguidas com os ácidos graxos que contêm ligações duplas no 6<sup>a</sup> e 9<sup>a</sup> átomos de carbono contados a partir do grupo metilo e cuja carboxila terminal não esteja estericamente impedida. As isoenzimas L2 e L3 preferem substratos não polares tais como ácido linoléico não ionizado, metil-linoleato, linoleil metano sulfonato, 10,13-nonadecadienoamino ou linoleil acetato (BILD et alii, 1977).

As isoenzimas L1, L2, L3a e L3b contêm em média 4, 4,2, 5,6 e 5,9 resíduos sulfidrilas por molécula, respectivamente. Após desnaturação em uréia e redução com  $\text{NaBH}_4$ , o número de grupos sulfidrilas aumenta para 8, 18, 6 e 6 na L1, L2, L3a e L3b respectivamente indicando 4, 9, 3 e 3 ligações do tipo dissulfeto presentes nas correspondentes enzimas nativas (AXELROD et alii, 1981). ZAKUT et alii

(1976) estudaram o centro ativo da enzima e apresentaram evidências de que a metionina é um resíduo essencial para a atividade da lipoxigenase e por isso estaria envolvida diretamente no processo enzimático. As três isoenzimas também diferem em seu comportamento com respeito à natureza do agente dispersante do substrato. A L1 apresenta a mesma atividade com o ácido linoléico disperso em etanol ou tween 20, no entanto L2 foi 3 vezes mais ativa com o referido ácido graxo preparado com etanol. Por outro lado a atividade da L3 foi 10 vezes maior quando o substrato foi disperso em tween 20 (BILD et alii, 1977). O pH ótimo aparente das várias isoenzimas depende de alguns fatores, tais como: concentração do substrato, potencial iônico, temperatura, presença de dispersante,  $\text{Ca}^{2+}$ , etc. Utilizando ácido linoléico como substrato a L1 tem um pH ótimo em torno de 9,5, a L2 em torno de 6,5 e a L3 tem uma faixa bastante ampla que vai de 4,5 a 9, não apresentando atividade no pH 9 (CHRISTOPHER et alii, 1972; HILDEBRAND & HYMOWITZ, 1981). A importância da natureza iônica do substrato pode ser ilustrada pelo comportamento do 9,12-octadeca-dienol-sulfato, que é um excelente substrato para L1 tanto no pH 6,8 como no pH 9. Em contraste, a L1 peroxida o ácido linoléico no pH 6,8 em apenas 3% da taxa de oxidação do pH 9.0 linoleil sulfato que é totalmente ionizado não é oxidado pelas isoenzimas L2 e L3 (BILD et alii, 1977; AXELROD et alii, 1981).

As isoenzimas diferem também quanto aos pontos isoelétricos que são 5,68 para L1, 6,25 para L2 e 6,15 para L3 (CHRISTOPHER et alii, 1972).

Proporcionalmente a L1 é 2,5 vezes mais ativa que a L2 em seus ótimos de pH e a L2 é 2,5 vezes mais ativa que a L3a ou L3b. A L1 é pelo menos 36 vezes mais estável à temperatura de 69°C que as demais isoenzimas (HILDEBRAND & HYMOWITZ, 1981).

A L3 difere da L2 no que diz respeito ao efeito do  $\text{Ca}^{++}$  na atividade enzimática. O  $\text{Ca}^{++}$  estimula a atividade da L2 e inibe a L3 em condições similares (CHRISTOPHER et alii, 1972; SAWAZAKI et alii, 1987).

Os valores de Km encontrados para as isoenzimas em condições de procedimento espectrofotométrico padrão foram para L1, ácido linoléico 0,012mM; para L3, ácido linoléico 0,34mM e para L2, ácido araquidônico 0,016mM em pH 6,1 e 0,096mM em pH 6,8 em presença de  $\text{Ca}^{++}$  (AXELROD et alii, 1981). Segundo HOLMAN & BERGSTROM (1951), o valor de Km das lipoxigenases para o ácido linoléico é de 1mM e a energia de ativação para as isoenzimas é 4,3Kcal/g.mol. Eles atestaram ainda que as lipoxigenases da soja são estáveis por meses à -20°C.

SIDDIQ & TAPPEL (1957) fizeram um estudo comparativo sobre as propriedades catalíticas das lipoxigenases do feijão, soja, trigo e amendoim e propuseram o mecanismo de reação ilustrado na figura 3.

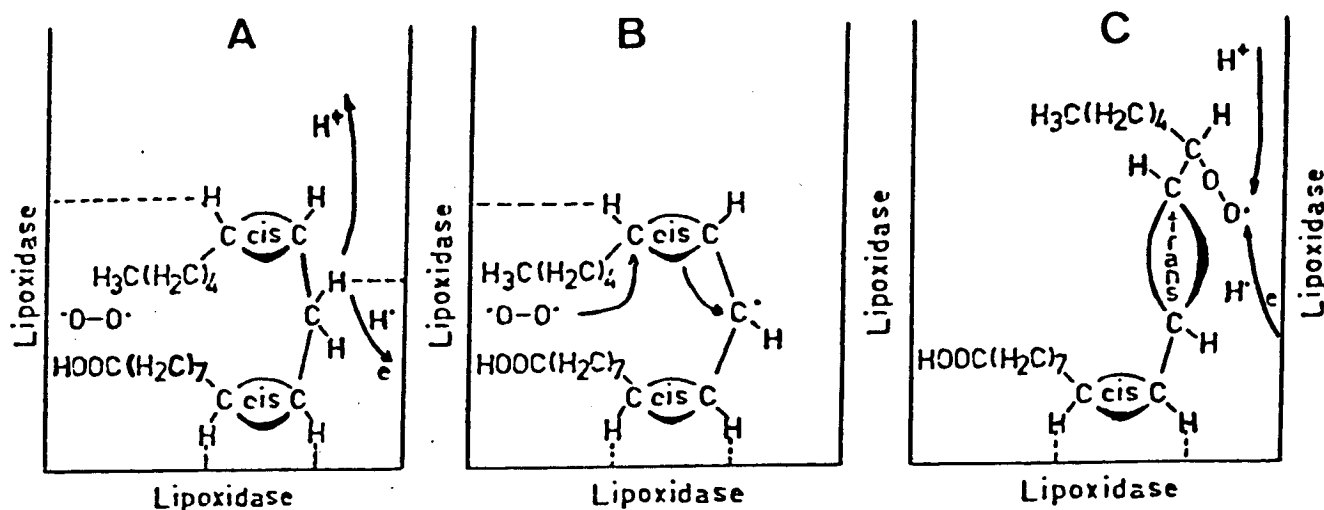


FIGURA 3 - MECANISMO DE AÇÃO DAS LIPOXIDASES PROPOSTO POR SIDDIQ & TAPPEL (1957).

Em A a cadeia protéica da lipoxigenase poderia, momentaneamente reter um elétron do grupo  $\alpha$ -metileno do linoleato, permitindo a oxidação. Ao mesmo tempo, em B, a lipoxigenase absorve o oxigênio e o entrega à molécula do linoleato. Logo a seguir ocorre a isomerização das ligações duplas, resultando na conjugação e na produção do radical cis-trans peroxila; em C, o oxigênio do radical peroxila é

levado à proximidade da cadeia protéica da lipoxigenase . Neste estado, ou a lipoxigenase transfere o elétron ao oxigênio, sendo o  $H^+$  retirado do meio, ou transfere o radical hidrogênio, permitindo, dessa maneira a formação de hidroperóxido de linoleato.

A formação de compostos carbonila na ausência do oxigênio a partir de hidroperóxidos do ácido linoléico depende da presença tanto da lipoxigenase nativa como dos ácidos graxos que são substratos normais da enzima. Sob condições anaeróbicas, acredita-se que a retirada do radical hidrogênio a partir de hidroperóxidos, seja a causa da formação do radical peroxila, o qual fica posteriormente sujeito a rearranjos estruturais (GARSSEN et alii, 1971).

O mecanismo da reação anaeróbica do ácido linoléico, catalisado pela lipoxigenase foi resumido por VLIEGENTHART et alii (1979) conforme o esquema na figura 4. Nessa reação a enzima férrica é reduzida pelo ácido linoléico a enzima ferrosa, a qual, por sua vez, é oxidada pelo ácido 13-hidroperóxido linoléico. Essa reação anaeróbica, catalisada pela Li, se processa até que um dos dois substratos seja consumido. Entretanto, independente das proporções molares iniciais dos dois substratos, 50% dos hidroperóxidos consumidos são convertidos em ácidos oxodienólicos.

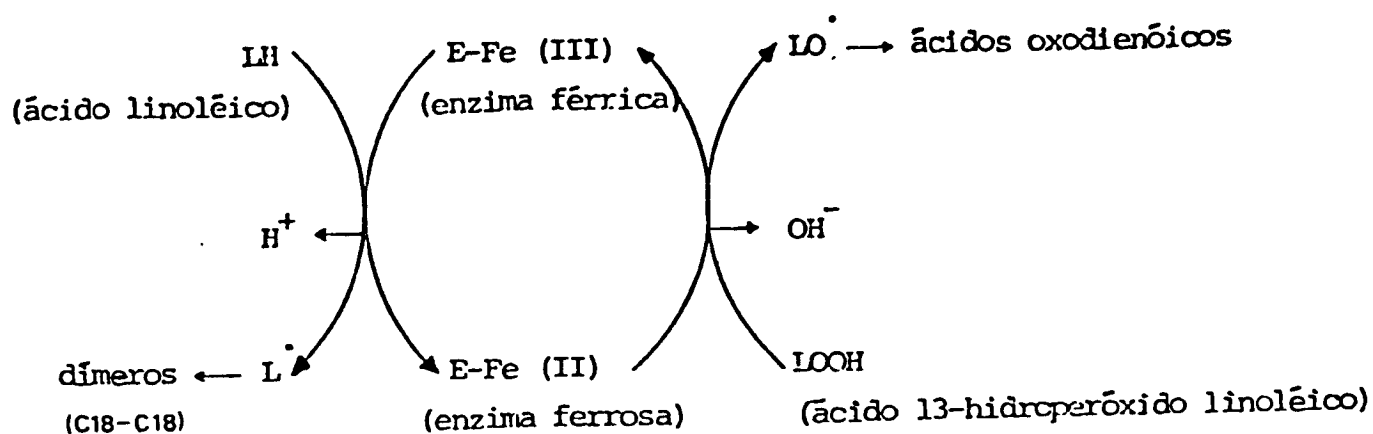


FIGURA 4 - REAÇÃO ANAERÓBICA ENTRE O ÁCIDO LINOLÉICO E O ÁCIDO 13-HIDROPERÓXIDO LINOLÉICO CATALISADA PELA LIPOXIGENASE DA SOJA (VLIEGENTHART et alii, 1979).

Todas as lipoxigenases catalisam reações secundárias produzindo outros produtos que não simples hidroperóxidos; desta forma L1 em condições de anaerobiose catalisa a interação de ácido linoléico e produtos de oxigenação primária (ácido 13-hidroperóxido linoléico) para formar ácidos oxodienóicos, pentano e alguns dímeros (C18-C18). A L3 catalisa a formação de ácidos oxodienóicos assim como dímeros e outros produtos. Diferentemente L1 e L3 catalisam estas reações na presença ou ausência de  $\text{O}_2$  e

desta forma esses produtos podem aparecer logo que iniciar a oxigenação primária. A L2 gera muito pouco cetodieno na presença ou ausência de  $O_2$  e suas reações secundárias não são prevenidas por baixas temperaturas, em contraste com as da L1 que são suprimidas a  $4^\circ C$  (AXELROD et alii, 1981). A L2 catalisa a formação de outros produtos secundários além do cetodienos. Assim são formados substanciais quantidades de derivados do ácido prostanóico, assim como éter cíclico (ácido 9(12)-oxi-8, 11, 15-triidroxieicosa-5, 13-dienoico) do ácido araquidônico (AXELROD et alii, 1981).

A oxidação de ácidos graxos insaturados pelas lipoxigenases é parte de um processo de oxidação acoplado, isto é, a oxidação do linoleato potencia a oxidação de outras substâncias. Os radicais livres intermediários da ação catalítica da enzima levam a co-oxidação de compostos facilmente oxidáveis como os carotenóides, os polifenóis, retinol, tocoferóis, clorofila, ácido ascórbico e tióis (GROSSMAN & ZAKUT, 1979; TAPPEL, 1962; GARDNER, 1988; HILDEBRAND & HYKOWITZ, 1982). Esta reação de co-oxidação é normalmente medida por descoramento através do espectrofotômetro (GARDNER, 1988).

As isoenzimas L2 e L3 são responsáveis pela ação de descoramento do caroteno, sendo particularmente conhecidas pelo seu potencial de co-oxidação (GARDNER,

1988). RAMADOSS et alii (1978) demonstraram que a completa oxidação do caroteno por lipoxigenase requer dois tipos de isoenzimas. KIKUCHI & KITAMURA (1987) relataram que a L3 é a enzima mais ativa na reação de descoloramento do caroteno.

Uma característica importante das lipoxigenases é sua destruição auto-catalítica durante a oxigenação dos ácidos graxos. Este fenômeno é comum a todas as lipoxigenases e ocorre devido a produção descontrolada de radicais livres que são parte do principal evento da hidroperoxidação. Os valores da constante de velocidade desta inativação são maiores para ácidos graxos que têm maior número de insaturações (SMITH & LANDS, 1970; 1972; GARDNER, 1988).

## 2.4 MÉTODOS DE ANÁLISE DE LIPOXIGENASES

Vários são os métodos empregados para determinar a atividade da lipoxigenase em extrato bruto de sementes e frações purificadas das isoenzimas. Eles estão divididos basicamente em dois tipos: Métodos baseados na captação de oxigênio molecular e métodos colorimétricos ou espectrofotométricos que são fundamentados na formação de compostos dieno conjugados.

A atividade da lipoxigenase pode ser determinada por medidas manométricas ou polarográficas de consumo de oxigênio molecular, titulação de hidroperóxidos ou absorbância espectral das ligações duplas (TAPPEL, 1962).

As restrições às duas técnicas de captação de oxigênio baseiam-se no fato que a absorção do oxigênio não é restrita à atividade da lipoxigenase, além do que esta metodologia é ineficiente na discriminação de L2 e L3 (AXELROD et alii, 1981; GROSSMAN & ZAKUT, 1979).

Os métodos quantitativos espectrofotométricos baseados no aumento do pico de absorção da luz ultra-violeta a 234nm e 280nm, apresentam a vantagem da rapidez e simplicidade, mas requerem o uso de soluções opticamente translúcidas (GROSSMAN & ZAKUT, 1979; AXELROD et alii, 1981; VERHUE & FRANCKE, 1972; SURREY, 1964; HILDEBRAND & HYMOWITZ, 1981).

Em suma, os métodos espectrofotométricos diferem entre si basicamente no preparo do substrato, no tipo de substrato, na variação do pH da reação e na interrupção ou não da reação durante o processo de leitura no espectrofotômetro.

Os métodos colorimétricos de SUMNER (1943) e KOCH (1958) são baseados na coloração dos hidroperóxidos produzidos pela reação enzimática com tiocianato, medindo o aumento da absorção a 480nm, com a interrupção da reação enzimática, antes da leitura, pela adição de etanol. Conforme HOLMAN (1955) este tipo de reação tem a desvantagem que a cor vermelha, produzida quando o tiocianato de ferro é formado, é muito sensível à variações de concentração, por isso as condições empíricas precisam ser rigidamente controladas para obter reprodutibilidade da cor.

SURREY (1964) mediu o pico de absorção de luz ultra-violeta em 234nm, em função da formação dos compostos dieno conjugados, e interrompeu também a reação antes da leitura com etanol e utilizou um branco e um controle que sofre a interrupção da reação por aquecimento no tempo zero.

HILDEBRAND & HYMOWITZ (1981) preocuparam-se com contaminantes pró-oxidantes, por acaso existentes, tais como o cobre, o ferro e heme oxidases. Para tanto, utilizaram no preparo do substrato, ácido cítrico para formar quelatos com os metais e NaCN para inativar as heme oxidases. Utilizaram também ácido linoléico e metil-linoleato como substratos. A restrição a esse método está na utilização do cianeto considerando-se que as isoenzimas lipoxigenases possuem

átomo de ferro em suas estruturas.

AXELROD et alii (1981) utilizaram pH e substratos específicos, ácido linoléico e araquidônico para cada reação enzimática e mediram as reações com as isoenzimas separadas por cromatografia em colunas de DEAE-SEPHADEX. BARROS et alii (1984) modificaram o método utilizando extrato bruto da semente não desengordurada, o que difere de todos os autores citados anteriormente.

Existem métodos baseados na co-oxidação ou oxidação acoplada, na qual os hidroperóxidos ou produtos da degradação deste, em presença do substrato apropriado, promovem o descoramento do caroteno, da clorofila ou outras substâncias. Esta reação de descoramento pode ser medida em espectrofotômetro (GROSSMAN & ZAKUT, 1979; KIKUCHI & KITAMURA, 1987). Entretanto, AXELROD (1981) e GROSSMAN & ZAKUT (1979) não recomendaram o descoramento do caroteno para quantificar a lipoxigenase porque a mistura ácido graxo poliinsaturado-caroteno é muito instável. A instabilidade se deve à proporcionalidade limitada entre a extensão da reação e a concentração da enzima e também porque a atividade de descoramento do caroteno é diferenciada entre as três isoenzimas. No entanto, KIKUCHI & KITAMURA (1987) testando um método simples para detectar a isoenzima L1 desenvolveram uma nova técnica usando a atividade enzimática de

descoramento do caroteno como um método auxiliar para a simples detecção das três isoenzimas.

Diferentes métodos são empregados na análise qualitativa das lipoxigenases. Os mais utilizados são a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo duodecil-sulfato de sódio (SDS) (KITAMURA et alii, 1983; KITAMURA, 1984; HILDEBRAND & HYMOWITZ, 1981) e focalização isoeletrica (HILDEBRAND & HYMOWITZ, 1981; VERHUE & FRANCKE, 1972; SAWAZAKI et alii, 1987). Emprega-se ainda a imunoafinidade cromatográfica ou difusão radial imunoquímica (ELISA) (HILDEBRAND & HYMOWITZ, 1981; YABUUCHI et alii, 1982; KITAMURA et alii, 1983; KITAMURA, 1984). Entre os métodos qualitativos citados o mais prático e rápido é o da eletroforese em gel de poliacrilamida. O mais eficiente na detecção das três isoenzimas é o da imunoafinidade cromatográfica; no entanto, a produção dos anticorpos específicos demanda tempo e requer purificação e isolamento das três isoenzimas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 MATÉRIA-PRIMA ESTUDADA

Foram utilizadas sementes de soja *Glycine max* (L.) Merrill, do cultivar IAC-8 (comercial), das mutantes PI 408251 (menos L1), PI 86023 (menos L2), TOHOKU nº 74 (menos L3), vistas na figura 5, e das linhagens provenientes da quarta geração do primeiro cruzamento (F4) dos mutantes sem lipoxigenase com o cultivar comercial IAC-8, um dos mais plantados no Brasil e portanto com alta capacidade adaptativa às mais diferentes regiões.

Todas as sementes foram fornecidas pelo Engº Agr. Manoel A. C. Miranda da Secção de leguminosas do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), provenientes da colheita de abril de 1990 (Centro Experimental, Fazenda Santa Elisa).



FIGURA 5 - SEMENTES DE CULTIVARES DE SOJA UTILIZADAS NO MELHORAMENTO GENÉTICO E COMO PADRÕES NOS ENSAIOS DE ELETROFORESE E ATIVIDADE ENZIMÁTICA.

As sementes oriundas do Japão<sup>1</sup> com genótipo recessivo para L1, L2 e L3 foram plantadas em casa de vegetação para uma pré-seleção e no ano seguinte semeadas em sete épocas, semanalmente, para que houvesse coincidência de florescimento com o cultivar IAC-8 e viabilizasse as hibridações, que foram realizadas de forma que o IAC-8 sempre fosse o parceiro feminino do cruzamento.

1 SEMENTES FORNECIDAS PELO DR. KEISUKE KITAHURA, FACULDADE DE AGRICULTURA, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE ALIMENTOS, SENDAI, MIYAGI, JAPÃO, 980.

A geração F<sub>1</sub> foi auto fecundada, dando na geração F<sub>2</sub> a proporção de 1 planta com ausência da lipoxigenase para 3 com a referida enzima. As plantas F<sub>2</sub> foram avaliadas em condições de campo quanto às características agronômicas e em laboratório para atividade enzimática. As plantas selecionadas com o carácter "ausência de lipoxigenase" foram semeadas em casa de vegetação e hibridadas com o cultivar IAC-8 constituindo-se o primeiro retrocruzamento. Após a autofecundação obteve-se a geração F<sub>3</sub> que sofreu nova avaliação e seleção. Estas, já apresentando ausência de lipoxigenase, foram plantadas e autofecundadas em casa de vegetação. A F<sub>4</sub>, plantada em linha no campo, foi objeto do presente trabalho.

Foram fornecidas sementes de 107 plantas com fator recessivo para a produção de lipoxigenase 1 (-L<sub>1</sub>), 200 plantas com fator rescessivo para a produção de lipoxigenase 2 (-L<sub>2</sub>) e 200 plantas com fator rescessivo para a produção de lipoxigenase 3 (-L<sub>3</sub>) sendo que, nas últimas, 123 apresentavam hilo preto e o restante, 77 apresentavam hilo marrom.

As sementes foram divididas em 16 pools para facilitar o processo de análise e estão apresentados na tabela 1. Desta forma todo o material obtido na geração F<sub>4</sub> foi analisado; a divisão em pools permitiu ainda detectar

variabilidade dentro da linhagem.

TABELA 1 - DISCRIMINAÇÃO DOS GRUPOS DE PLANTAS DA GERAÇÃO F4  
UTILIZADOS NAS ANÁLISES

| SEMENTES DA GERAÇÃO F4 |          |              |           |              |         |
|------------------------|----------|--------------|-----------|--------------|---------|
| LINHAGEM -L2           |          | LINHAGEM -L3 |           | LINHAGEM -L1 |         |
| GRUPOS                 | PLANTAS  | GRUPOS       | PLANTAS   | GRUPOS       | PLANTAS |
| "POOL"1                | 01 - 50* | "POOL"5      | 201 - 230 | "POOL"13     | 401-427 |
| "POOL"2                | 51 -100  | "POOL"6      | 231 - 260 | "POOL"14     | 428-454 |
| "POOL"3                | 101 -150 | "POOL"7      | 261 - 290 | "POOL"15     | 455-481 |
| "POOL"4                | 151 -200 | "POOL"8      | 291 - 323 | "POOL"16     | 482-507 |
|                        |          | "POOL"9      | 324 - 342 |              |         |
|                        |          | "POOL"10     | 343 - 361 |              |         |
|                        |          | "POOL"11     | 362 - 380 |              |         |
|                        |          | "POOL"12     | 381 - 400 |              |         |

\* N° de identificação das plantas

Além das sementes da geração F4 foram analisadas as sementes dos padrões: o IAC-B (comercial) e os mutantes -L1, -L2 e -L3.

### 3.2 MÉTODOS

#### 3.2.1 PREPARO DAS AMOSTRAS

As sementes foram congeladas, em seguida trituradas e acondicionadas em frascos com tampa em congelador à  $-10^{\circ}\text{C}$ , até momentos antes das análises, com exceção das amostras utilizadas para a eletroforese que foram previamente congeladas e trituradas no momento da análise. A análise preliminar da atividade enzimática de sementes trituradas e armazenadas por 2 semanas a  $-10^{\circ}\text{C}$  e de sementes moídas no momento da análise não indicou diferença significativa entre os valores encontrados.

#### 3.3 EXTRAÇÃO DOS LIPÍDEOS E DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PERÓXIDOS

Efetuuou-se a extração dos lipídios e a medida do índice de peróxidos das sementes do cultivar IAC-8, dos mutantes -L1, -L2, -L3 e dos 16 pools das linhagens

descendentes. Foi analisada a correlação entre o índice de peróxidos e a quantidade de lipídios nas linhagens descendentes.

Para a extração dos lipídios totais (L.T.) e determinação do índice de peróxidos foram utilizadas 3,0g de farinha de soja, 50,0mg de sais biliares em 8,0ml de água deionizada. Cada amostra foi mantida sob agitação, em agitador magnético, em velocidade constante durante 20min. (tempo estabelecido previamente em testes preliminares). Seguiu-se o método de BLIGH e DYER (1959) suprimindo-se entretanto a água da mistura extratora inicial e aumentando-se a quantidade de clorofórmio, em 5,0ml, na segunda etapa do processo, com a finalidade de utilizar 10,0ml da camada inferior (solução de lipídio em clorofórmio) para a determinação do índice de peróxidos. Em virtude deste acréscimo o valor do fator de diluição na fórmula de cálculo do teor de lipídeos totais foi alterado de 4 para 5:

$$\% \text{ L.T.} = \frac{\text{g de L} \times 5}{\text{g de amostra}} \times 100$$

O índice de Peróxidos foi determinado pelo método oficial da JAPAN OIL CHEMIST'S SOCIETY (J.O.C.S.), com as modificações sugeridas por HARA & TOTANI (1988) utilizando o amido como indicador e como solução titulante o tiosulfato de sódio N/1000. Cada amostra teve três repetições.

### 3.4 ELETROFORESE

As isoenzimas lipoxigenases foram extraídas e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo duodecil-sulfato de sódio (SDS) de acordo com KITAMURA (1984) com as seguintes modificações: o gel foi formado em tubos de vidro de 100x5,0mm, o volume do extrato enzimático bruto, ou seja, da amostra, foi aumentado para 20,0uL e a corrida foi realizada inicialmente a 100V por 15min e 160V por 2,5h à temperatura ambiente, com três repetições para cada amostra.

### 3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para quantificar e confirmar os resultados obtidos através da eletroforese foram utilizados dois métodos espectrofotométricos de determinação da atividade enzimática: o método de AXELROD et alii, 1981, modificado por BARROS et alii (1984) e RESENDE (1986) e o método do descoramento do caroteno de KIKUCHI & KITAMURA (1987).

### 3.5.1 EXTRAÇÃO DAS ISOENZIMAS E DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS

Foram pesadas 20,0mg da amostra (farinha de soja não descascada) e suspendidas com 2,0mL de tampão tris-HCl 50mM (pH 8) contendo  $\text{CaCl}_2$  20mM (KIKUCHI & KITAMURA, 1987) utilizando ultrassom Biosonic IV para homogeneizar a suspensão. O sobrenadante foi centrifugado em ultracentrífuga, Beckman mod.L5-75, a 4,0°C por 20min. a 10.000rpm. O extrato enzimático bruto foi utilizado para a determinação das atividades das isoenzimas e para as determinações de proteínas.

O teor de proteínas do extrato enzimático bruto foi determinado pelo método de BRADFORD (1976), usando solução de soro albumina bovina como padrão, sendo que a cubeta de vidro foi lavada entre as leituras, uma vez com álcool e duas vezes com água destilada.

Os resultados desta determinação foram utilizados no cálculo da atividade enzimática específica (AE) dividindo os valores de U (Unidade de atividade enzimática) pelo teor de proteínas existente em cada amostra:  $AE = U/mg$  de proteínas ( $\mu mol$  de dienos conjugados ou cetodienos/min /mg de proteínas).

### 3.5.2 PREPARO DOS SUBSTRATOS

A solução estoque de ácido linoléico 10mM foi preparada de acordo com KITAMURA (1984). Foram dispersos, com ultrasom de imersão, Bransonic 2, 140mg de ácido linoléico 99% em 5,0mL de água (deionizada, fervida e degaseificada com  $N_2$  gasoso por 15min) contendo 0,18mL de TWEEN 80. Foram adicionados à dispersão 0,28mL de NaOH 2N para torna-la translúcida. O volume foi então completado para 50mL com água e a solução foi estocada em alíquotas de 3.5mL em frascos criogênicos de 4mL, com tampa, substituindo o ar dos frascos por  $N_2$  gasoso e em seguida foram congelados à  $-10^{\circ}C$ . Foram abertos no momento das análises e mantidos em banho de gelo.

A solução estoque de metil-linoleato 10mM foi preparada dissolvendo 147,0mg do éster 99% em 5,0mL de

etanol 95% e em seguida o volume foi completado para 50,0mL com tampão fosfato 0,1M (pH 7). A solução estoque foi armazenada da mesma forma que a anterior.

### 3.5.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade da lipoxigenase 1 (L1) foi determinada de acordo com BARROS et alii (1984) ou RESENDE (1986), sendo que a leitura foi realizada ao longo de 2min usando espectrofotômetro Incibrás, mod.250 a 234nm. Foram feitos 2 ensaios com tampões diferentes, Tris-HCl 0,2M (teste I) e Borato de sódio 0,2M (teste II), ambos no pH 9.

Cada amostra continha 2,0mL de um dos tampões 0,2M, pH 9, 50,0µL do extrato enzimático bruto e 50,0µL do substrato ácido linoléico 10mM.

A atividade da lipoxigenase 2 (L2) foi determinada de acordo com RESENDE (1986), medindo-se o aumento da absorbância a 234nm ao longo de 5min. Foram realizados 2 ensaios com substratos diferentes, ácido linoléico 10mM (teste III) e metil-linoleato 10mM (teste IV).

Cada amostra continha 2mL de tampão fosfato de

sódio 0,2M (pH 6,1), 50 $\mu$ L do substrato (ác. linoléico ou metil-linoleato) e 50 $\mu$ L do extrato enzimático bruto.

A atividade da lipoxigenase 3 (L3) foi determinada de acordo com BARROS et alii (1984) ou RESENDE (1986) sendo que, a leitura foi realizada ao longo de 2min, em dois ensaios. Um a 280nm com ácido linoléico 10mM (teste V) e o outro a 234nm com metil-linoleato 10mM (teste VI).

Cada amostra continha 2mL de tampão fosfato de sódio 0,2M (pH 6,8), 50 $\mu$ L do substrato (ác. linoléico 10mM ou metil-linoleato 10mM) e 50 $\mu$ L do extrato enzimático bruto.

Todas as leituras foram feitas contra um branco contendo o tampão específico e o substrato correspondente com 4 repetições para cada amostra.

No ensaio com a L2 a cubeta foi lavada entre leituras, com álcool etílico 95% uma vez e com água, 3 vezes, para evitar que a pH 6,1 a enzima ficasse aderida as paredes da cubeta, o que normalmente não ocorre a pH 6,5 (AXELROD et alii, 1981).

Uma unidade de atividade (U) da isoenzima L1 ou L2 foi definida como a quantidade da enzima que produz 1  $\mu$ mol de dieno conjugado por minuto. A absortividade molar ou

coeficiente de extinção molar para os produtos da oxidação do ácido linoléico em 234nm é  $2,5 \times 10^4 \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

Uma unidade de atividade da isoenzima L3 foi definida como a quantidade da enzima que gera 1 umol de cetodieno por minuto. A absortividade molar ou coeficiente de extinção molar para este produto é  $2,2 \times 10^4 \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ , quando a leitura é realizada a 280nm (AXELROD et alii, 1981).

De acordo com SILVERSTEIN et alii (1979) a concentração do soluto, em espectrofotometria de UV, é dada pela fórmula:  $c = A/E.b$ ; Onde A é a leitura em absorbância; b é comprimento do caminho ótico (no caso 1cm); E é a absortividade molar e c a concentração do produto da reação em mol/L (no caso os dienos).

#### 3.5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA POR DESCORAMENTO DO CAROTENO

O ensaio foi feito segundo KIKUCHI & KITAMURA (1987) sendo que, o substrato ácido araquidônico foi substituído pelo metil-linolcato 10mM. Foram realizados três testes específicos para cada isoenzima: o teste I para

determinar a atividade de descoramento da L1 foi realizado utilizando o ácido linoléico 10mM mais solução saturada de caroteno em acetona como substrato iniciando a reação em tampão borato 0,05M no pH 9 por 1min a 20°C e posteriormente adicionando tampão fosfato 0,2M levando o pH a 6,8 por 30min a 20°C; o teste II para determinar a atividade de descoramento pela L2 foi feito utilizando o substrato metil-linoleato 10mM mais solução saturada de caroteno em acetona, em tampão fosfato 0,05m (pH 6,8) por 20min. a 20°C; o teste III para determinar L3 foi utilizado o ácido linoléico 10mM mais solução saturada de caroteno em acetona, em tampão fosfato 0,05m, pH 6,8 por 10min. a 20°C. As leituras foram feitas em espectrofotômetro, Incibrás mod.250, a 452nm.

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística de todos os caracteres estudados, foi realizada no Departamento de Engenharia Agrícola da Escola de Agronomia da UFBA, usando o programa estatístico SAEG.

Os resultados das análises de teor de lipídios, índice de peróxidos, atividade enzimática e descoramento do caroteno, foram analisados estatisticamente pelo teste F e

os parâmetros que apresentaram diferenças significativas foram submetidos ao teste de médias de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Procedeu-se um teste de correlação entre a unidade de atividade enzimática (U) e atividade enzimática específica (AE), assim como entre o percentual de lipídios e o índice de peróxidos.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 LIPÍDIOS E ÍNDICE DE PERÓXIDOS

TAPPEL (1962) relatou que o índice de peróxidos é uma das formas de se detectar a redução da atividade enzimática no óleo contido na farinha de sementes de soja. Uma das etapas desse trabalho tentou avaliar a eficiência desse método. A primeira etapa da avaliação do índice de peróxidos foi a extração e determinação percentual dos lipídios totais nos cultivares testados.

A determinação de lipídios quando realizada pelo método oficial (sugerido pela ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMISTS) separa o extrato etéreo (método de Soxhlet) quantificando apenas os lipídios não polares. Nesse trabalho a análise quantitativa dos lipídios foi feita pelo método de BLIGH & DYER (1959), o qual determinando os lipídios totais, inclui também os lipídios polares.

A análise percentual dos lipídios totais dos mutantes PI408251 (-L1), PI86023 (-L2) e TOHOKU Nº.74 indicou teores de lipídios inferiores ao cultivar comercial IAC-8 (figura 6). Esses resultados são semelhantes aqueles relatados por SAWAZAKI et alii (1986). As linhagens descendentes dos mutantes -L1 e -L3 (Pool 13, 14, 15, 16 e 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) apresentaram percentagem de lipídios inferiores ao IAC-8.

Em testes preliminares, através do índice de peróxidos, foi feita a avaliação do nível de oxidação da farinha de soja do cultivar IAC-8, com 8,75% de umidade, após exposição ao ar a uma temperatura constante de 30°C, por diferentes intervalos de tempo (5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 120 e 240min). Não foi observada nenhuma oxidação até os 120min; ocorreu a formação de 22,48 meq/Kg de peróxidos aos 240min. Para conseguir resultados em um espaço de tempo menor foi necessário umedecer e agitar as amostras para induzir a oxidação procedendo-se a leitura em 20min, valores estes apresentados na figura 7.

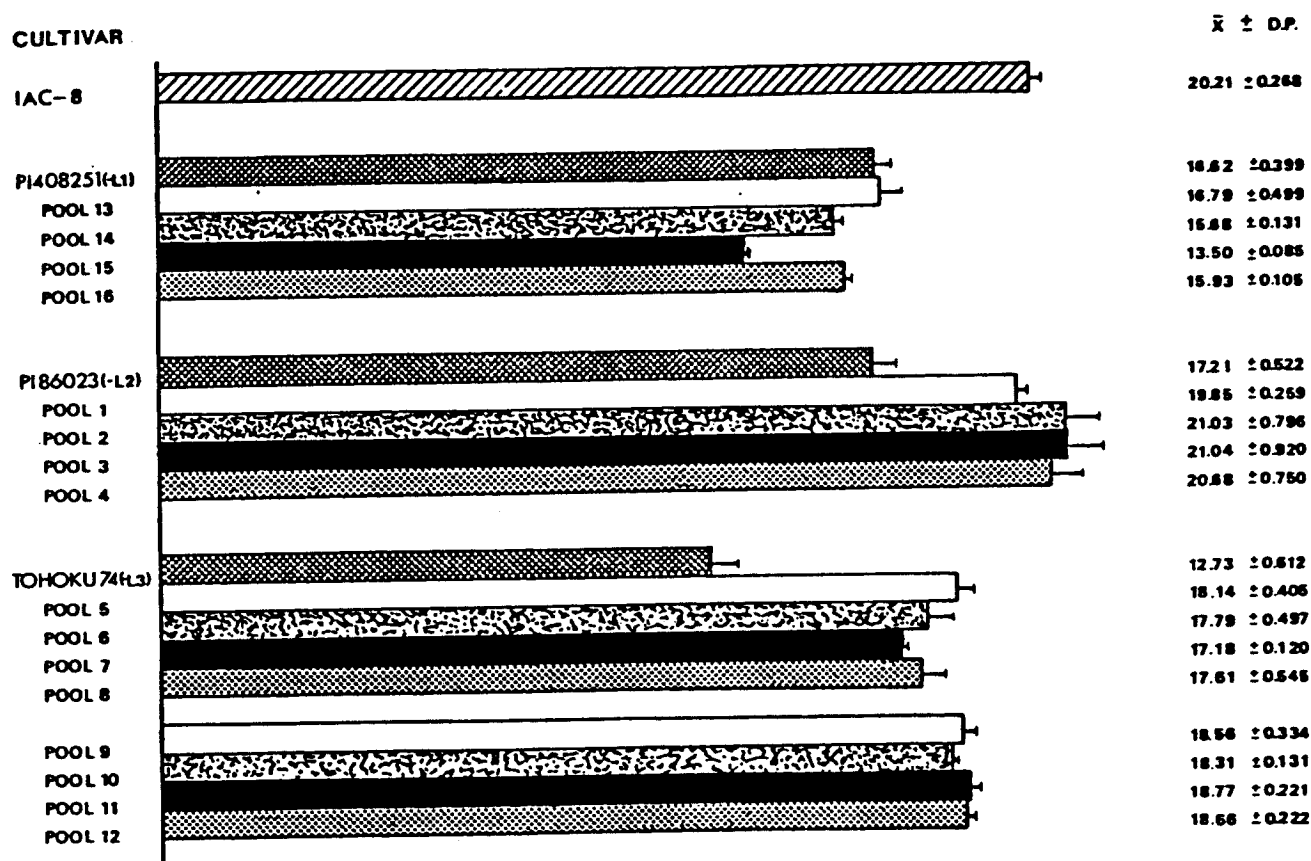


FIGURA 6 - PERCENTAGEM DE LIPÍDIOS (EM BASE ÚMIDA) DOS CULTIVARES UTILIZADOS (IAC-8, PI408251, PI86023, TOHOKU N° 74) E DAS RESPECTIVAS LINHAGENS DESCENDENTES (POOLS).

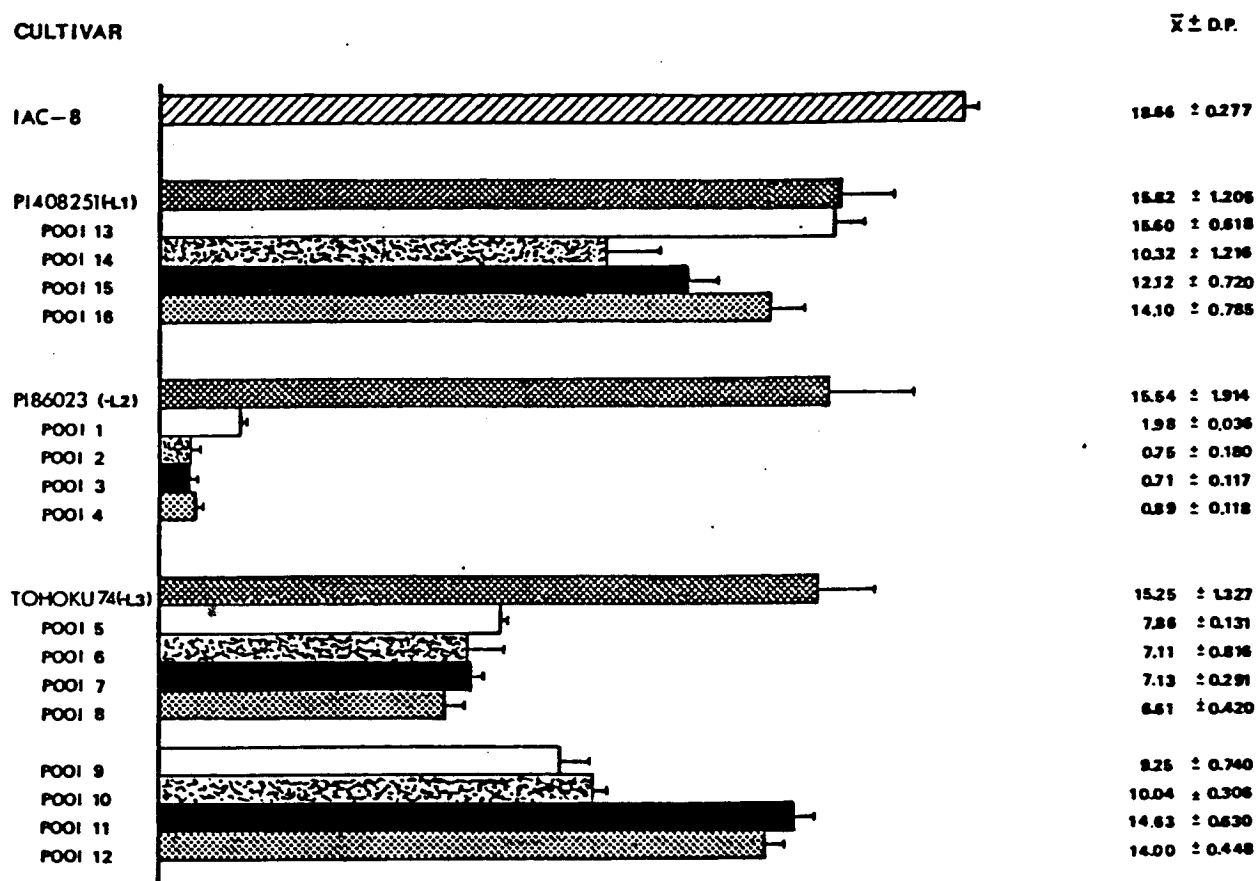


FIGURA 7 - RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE OXIDAÇÃO DOS CULTIVARES UTILIZADOS (IAC-8, PI408251, PI86023, TOHOKU N° 74) E DAS RESPECTIVAS LINHAGENS DESCENDENTES (POOLS), APÓS INDUÇÃO DA OXIDAÇÃO, ATRAVÉS DO ÍNDICE DE PERÓXIDOS (mEq/Kg de óleo)

Os resultados do índice de peróxidos evidenciaram que houve redução do potencial de oxidação das isoenzimas quando se compara o cultivar IAC-8 e os mutantes PI408251 (-L1), PI86023 (-L2) e TOHOKU Nº.74 (-L3). Entretanto, a comparação de todos os mutantes com as respectivas linhagens indicaram a existência de diferenças significativas entre os mutantes e seus respectivos descendentes. Estes resultados sugerem que a indução da oxidação pode ter sido inadequada.

#### 4.2 CARACTERIZAÇÃO ELETROFORÉTICA

A importância da eletroforese em estudos de genética de plantas, através da caracterização enzimática, deve-se a diversas razões. Ao contrário dos gens que governam caracteres morfológicos, resistência à doenças e outros, pode-se relacionar diretamente a variação fenotípica (bandas) com a variação genética, uma vez que as enzimas são produtos diretos dos gens. Além do mais, a grande maioria dos loci isoenzímicos apresentam segregação mendeliana simples e interação de forma co-dominante, então as bandas isoenzimáticas funcionam como marcadores genéticos KEPHART (1990).

As sementes das linhagens (POOLS) foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS para

verificar se a geração F4 mantinha as características introduzidas pelo retrocruzamento. Os cultivares IAC-8, PI408251 (-L1), PI86023 (-L2) e TOHOKU Nº.74 foram utilizados como padrões.

A eletroforese ocorreu em 2:30 a 3:00h, metade do tempo citado por KITAMURA (1984), HILDEBRAND & HYMOWITZ (1982), DAVIES & NIELSEN (1986) e RESENDE (1986). A redução do tempo pode ser atribuída a utilização de tubos cilíndricos de vidro para a polimerização do gel e para a realização da eluição, o que não foi utilizado pelos autores acima citados. BLOEMENDAL (1967) fez referências ao aparelho de eletroforese que realiza separações de proteínas em gel de poliacrilamida com SDS, em tubos cilíndricos de vidro, num intervalo de tempo de 35min à uma corrente constante de 5mA por tubo. KITAMURA et alii (1976) utilizando aparelho de eletroforese similar conseguiram a eletroforese de sub-unidades de proteínas de soja em 3:00h à uma voltagem constante de 150V.

A resolução das bandas das isoenzimas dos cultivares mutantes e das linhagens só foi conseguida com nitidez com o aumento da quantidade do extrato enzimático bruto (amostra) de 10µL para 20µL. Os geis, mantidos em solução descorante por 8 meses, conservaram a nitidez das bandas por todo o período.

Os resultados da análise por eletroforese podem ser observados nas figuras 8, 8A, 9, 9A, 10, 10A, 11, 11A, 12 e 12A. Na figura 8 e 8A observa-se a eletroforese dos cultivares utilizados como padrões e as *mobilidades relativas* (MR) das respectivas isoenzimas: o cultivar IAC-8 com três bandas (uma média e duas fortes) correspondendo às isoenzimas L1, L2 e L3; o cultivar PI408251 (-L1) com duas bandas fortes correspondendo às isoenzimas L2 e L3; PI86023 (-L2) com duas bandas fortes correspondentes à L1 e L3 e o cultivar TOHOKU Nº 74 (-L3) também com duas bandas fortes correspondentes à L1 e L2. No cultivar IAC-8, assim como nos mutantes -L1 e -L2 aparecem duas bandas fracas imediatamente abaixo das bandas fortes, ainda no cultivar comercial a primeira banda com MR 0,33 é de intensidade média e no mutante -L2 a banda 0,34 de intensidade fraca; observa-se que o fato ocorre onde as isoenzimas L3 estão presentes o que pode ter como causa provável a ação do SDS sobre as formas isoenzimáticas L3 que provocaria desdobramento em subunidades que ocupariam a posição das bandas fracas. AXELROD, (1974) relatou que as isoenzimas lipoxigenases quando submetidas a ação de SDS sofrem dissociação parcial. Excetuando-se as bandas fracas, os resultados acima, foram obtidos também por KITAMURA (1984), DAVIES & NIELSEN (1986) utilizando um ou dois cultivares comerciais e os mesmos três mutantes. Os resultados obtidos com os padrões mostraram ser satisfatórios para discriminar as isoenzimas nas linhagens descendentes.

A eletroforese do cultivar mutante PI408251 (-L1) utilizado como padrão e das linhagens descendentes (POOL 13, 14, 15, 16) são mostradas na figura 9 e 9A. O mutante PI408251 apresenta duas bandas fortes na posição das isoenzimas L2 e L3, com MR 0,34 e 0,39 e duas bandas fracas com MR em 0,47 e 0,5; o POOL 13 apresentou as duas bandas fortes em uma posição ligeiramente inferior às bandas correspondentes no padrão -L1, a L3 com MR de 0,4 e a L2 com 0,46 e três bandas fracas a primeira em 0,34 acima das bandas fortes, a segunda e a terceira abaixo, em 0,49 e 0,56. DAVIES & NIELSEN (1986) justificaram a presença de bandas L1 e L2 abaixo da posição original, "erro de leitura", como co-migração de bandas que ocasionalmente ocorrem. Essa co-migração observada em todos géis dos descendentes -L1, possivelmente pode ter sido causada pelo desdobramento parcial das isoenzimas de estrutura dímera e tetrâmera, durante o processo analítico, o que explicaria também a presença das bandas fracas superiores apenas nos descendentes. Os pools 14, 15 e 16 apresentaram 2 bandas correspondentes às isoenzimas L2 e L3, como no pool 13 e apenas 2 bandas fracas, uma acima e a outra abaixo das bandas fortes com MR de 0,34 e 0,56 respectivamente. Ficou evidenciado pela eletroforese SDS-PAGE que os POOLs descendentes apresentaram características comuns e equivalentes ao padrão, o mutante -L1.

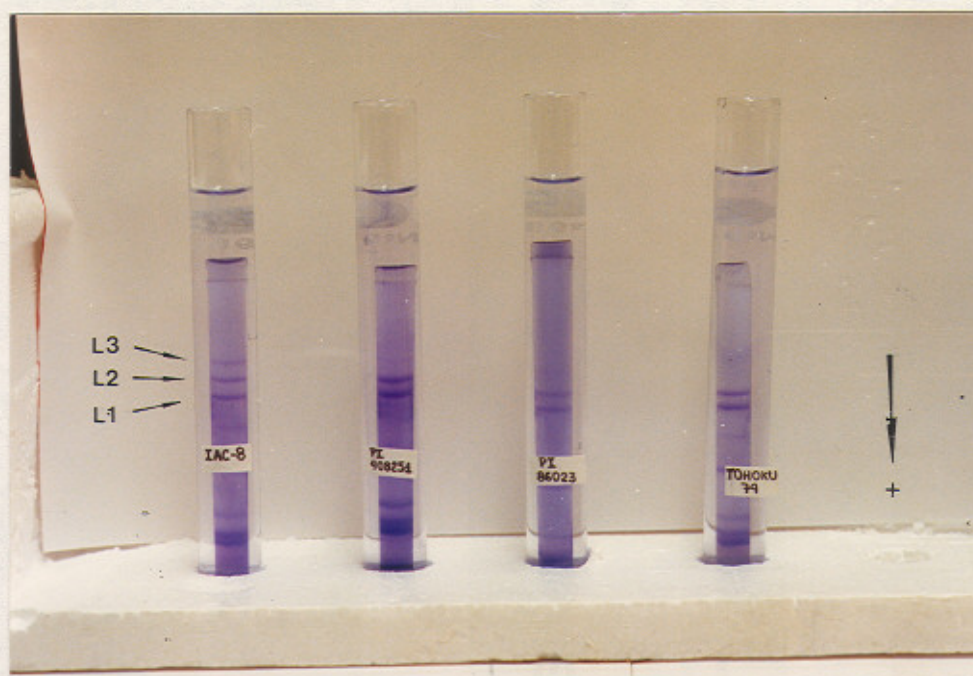


FIGURA 8 - RESULTADO DA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS ILUSTRANDO AS BANDAS CORRESPONDENTES AS ISOENZIMAS L1, L2 E L3 NOS CULTIVARES UTILIZADOS COMO PADRÕES, IAC-8 (COMERCIAL), PI408251 (-L1), PI86023 (-L2) E TOHOKU Nº 74 (-L3).

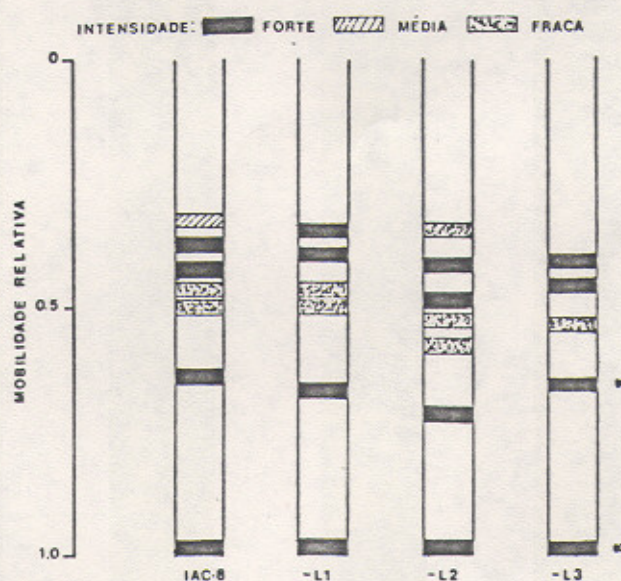


FIGURA 8A - ESQUEMA DA ELETROFORESE SDS-PAGE REPRESENTANDO A MOBILIDADE RELATIVA DAS ISOENZIMAS LIPOXIGENASES NOS CULTIVARES IAC-8, PI408251 (-L1), PI86023 (-L2) E TOHOKU Nº74 (-L3).

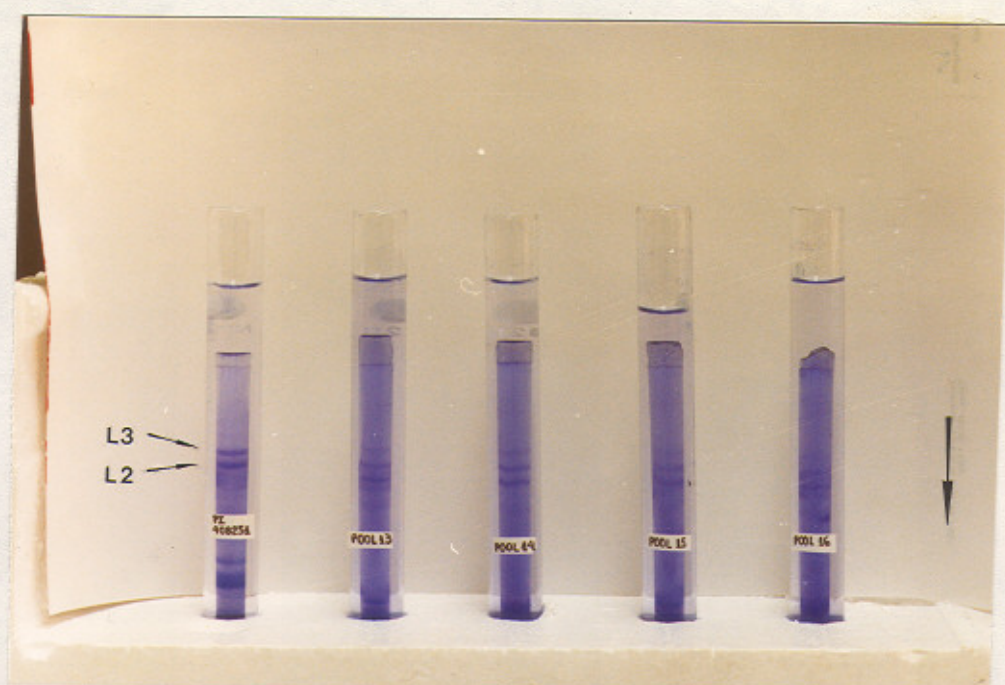


FIGURA 9 - RESULTADO DA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS ILUSTRANDO AS BANDAS CORRESPONDENTES AS ISOENZIMAS L1, L2 E L3 NO CULTIVAR PI408251 (-L1) E NAS LINHAGENS DESCENDENTES (POOLS 13, 14, 15, 16).

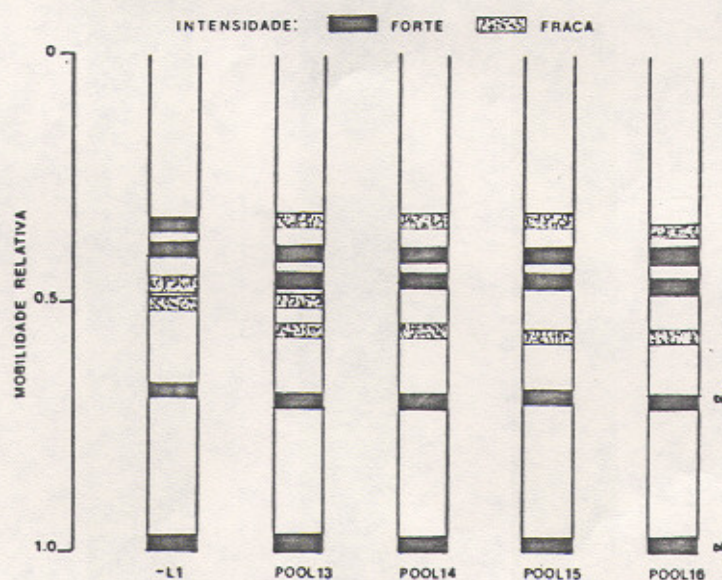


FIGURA 9A - ESQUEMA DA ELETROFORESE SDS-PAGE REPRESENTANDO A MOBILIDADE RELATIVA DAS ISOENZIMAS LIPOXIGENASES NOS CULTIVARES PI408251 (-L1) E DE SEUS DESCENDENTES (POOL 13, 14, 15 E 16).



FIGURA 10 - RESULTADO DA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS ILUSTRANDO AS BANDAS CORRESPONDENTES AS ISOENZIMAS L1, L2 E L3 NO CULTIVAR PI86023 (-L2) E NAS LINHAGENS DESCENDENTES (POOLS 1, 2, 3, 4).

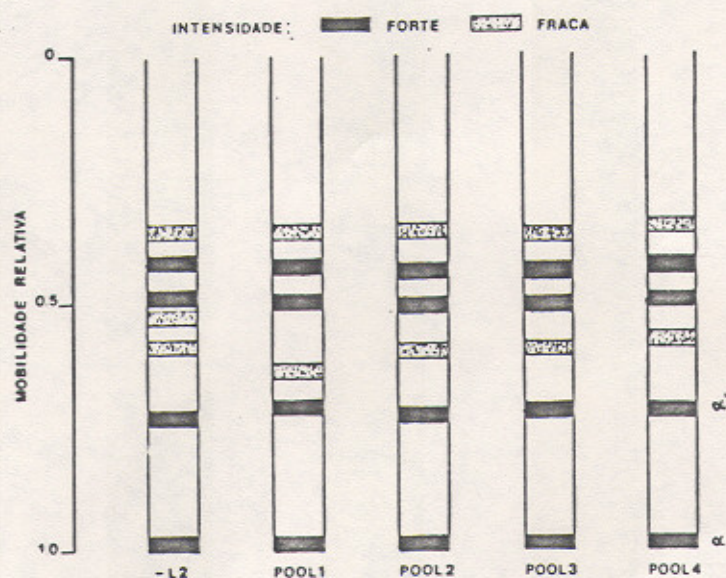


FIGURA 10A - ESQUEMA DA ELETROFORESE SDS-PAGE REPRESENTANDO A MOBILIDADE RELATIVA DAS ISOENZIMAS LIPOXIGENASES NOS CULTIVARES PI86023 (-L2) E SEUS DESCENDENTES (POOL 1, 2, 3 E 4).

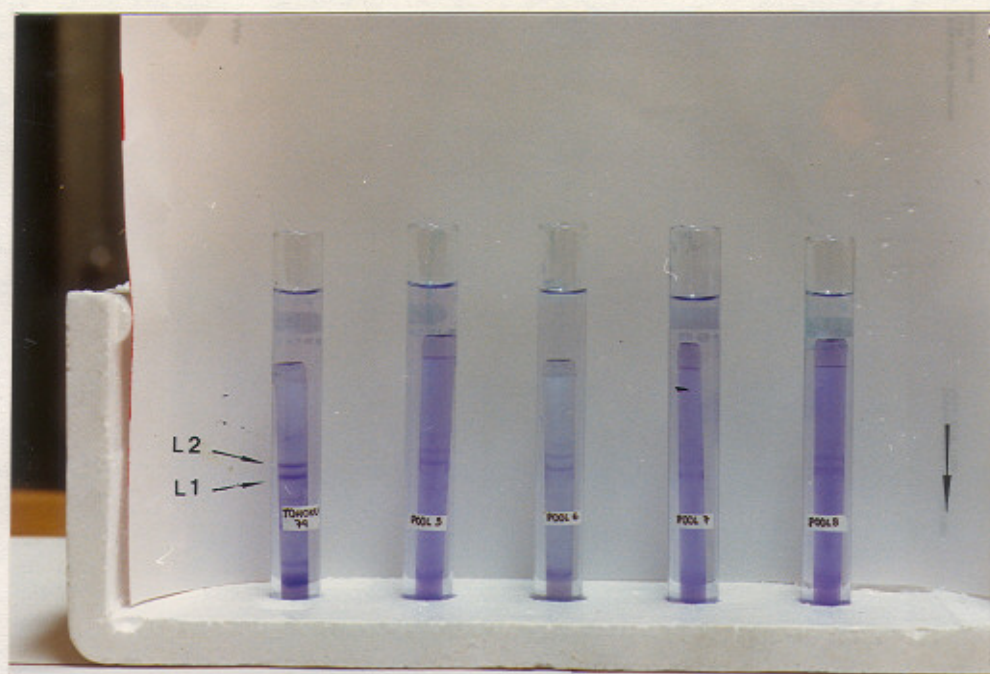


FIGURA 11 - RESULTADO DA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS ILUSTRANDO AS BANDAS CORRESPONDENTES AS ISOENZIMAS L1, L2 E L3 NO CULTIVAR TOHOKU Nº 74 (-L3) E NAS LINHAGENS DESCENDENTES (POOLS 5, 6, 7, 8).

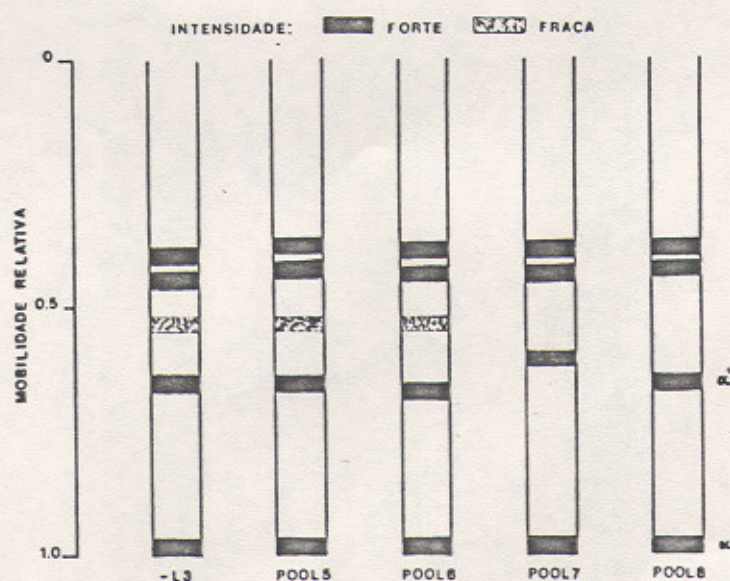


FIGURA 11A - ESQUEMA DA ELETROFORESE SDS-PAGE REPRESENTANDO A MOBILIDADE RELATIVA DAS ISOENZIMAS LIPOXIGENASES NOS CULTIVARES TOHOKU Nº74 (-L3) E SEUS DESCENDENTES (POOL 5, 6, 7, E 8).

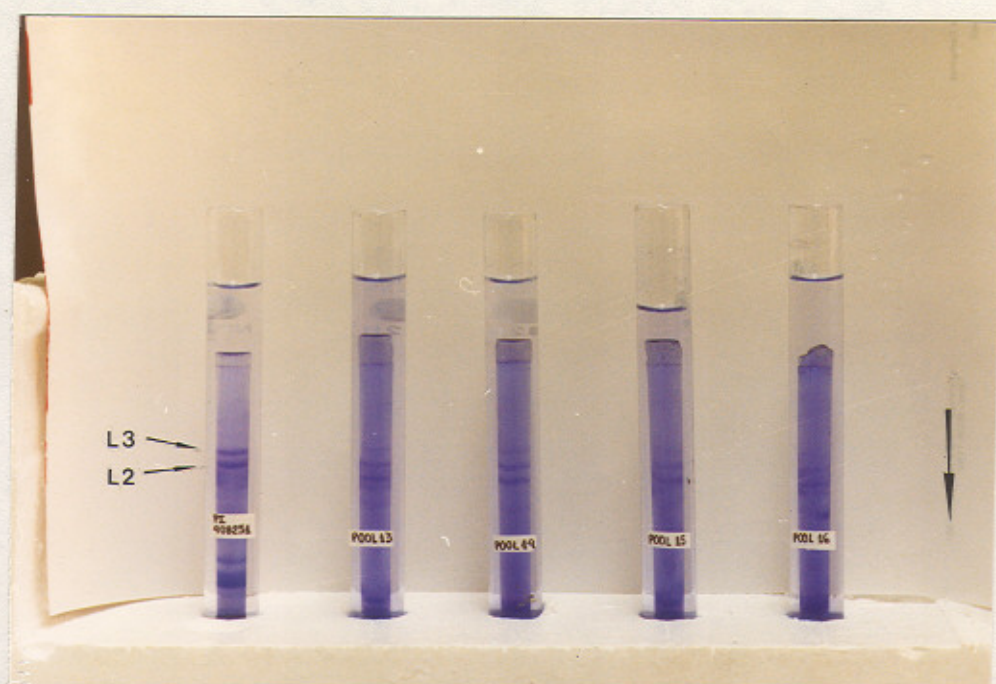


FIGURA 12 - RESULTADO DA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS ILUSTRANDO AS BANDAS CORRESPONDENTES AS ISOENZIMAS L1, L2 E L3 NO CULTIVAR TOHOKU Nº 74 (-L3) E NAS LINHAGENS DESCENDENTES (POOLS 9, 10, 11, 12).

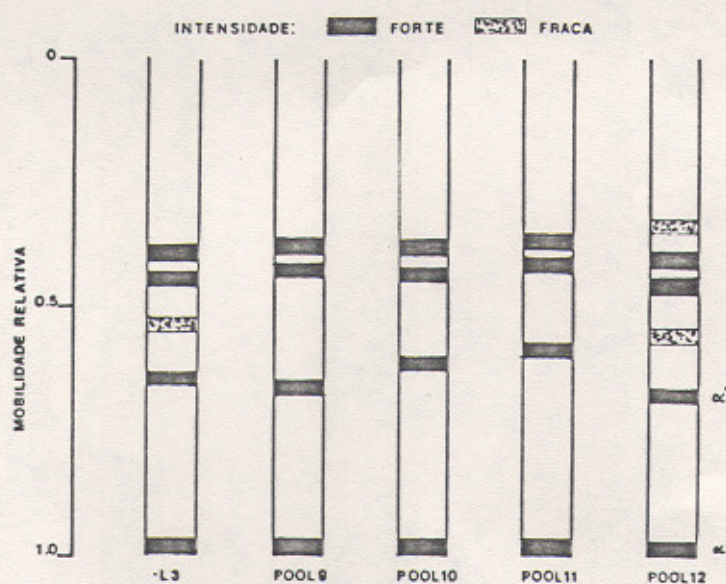


FIGURA 12A - ESQUEMA DA ELETROFORESE SDS-PAGE REPRESENTANDO A MOBILIDADE RELATIVA DAS ISOENZIMAS LIPOXIGENASES NOS CULTIVARES TOHOKU Nº74 (-L3) E SEUS DESCENDENTES (POOL 9, 10, 11 E 12).

Em todos os esquemas a representação de A e A' são bandas que correspondem as subunidades de 7S globulina (B-conglicinina) de acordo com KITAMURA (1984).

Na eletroforese do cultivar mutante PI86023 (-L2) e seus descendentes, figura 10 e 10A, observa-se que o mutante apresentou duas bandas fortes e três bandas fracas; as bandas fortes em 0,42 e 0,49 e as bandas fracas em 0,35, acima das bandas fortes e 0,53 e 0,59 abaixo. As bandas de todos os descendentes ficaram localizadas em posições semelhantes no que diz respeito a mobilidade relativa. As bandas correspondentes às isoenzimas L1 e L3 dos POOLs descendentes são idênticas às do padrão, à exceção da banda fraca 0,53 que não aparece nas referidas progênies; a distância relativa entre as duas bandas fortes no mutante e em suas progênies foi de 0,06 diferindo das distâncias relativas das bandas mais fortes dos demais cultivares que ficaram no máximo em 0,04 o que evidencia serem as duas bandas L1 e L3. Outro fato observado é a co-migração das bandas L1 e L3 situadas abaixo de suas posições padrões, que possivelmente pode ter sido resultante do desdobramento parcial de suas estruturas dímeras durante o processo.

Nas figuras 11, 11A, 12 E 12A encontram-se os resultados da eletroforese do cultivar mutante TOHOKU Nº 74 (-L3) e das linhagens descendentes (POOL 5, 6, 7, 8 com sementes de hilo preto e 9, 10, 11, 12 com sementes de hilo

marrom); observa-se que em todas as linhagens a banda correspondente à isoenzima L3 não é vista. O POOL 12 apresenta uma terceira e quarta bandas fracas com MR em 0,33 e 0,55 que podem ter suas origens explicadas pelo desdobramento parcial das formas tetrâmera e dímera da L2 e L1, respectivamente; a última banda fraca é encontrada também nos POOLs 5 e 6 e no mutante.

O termo isoenzima, *stricto sensu*, engloba bandas, "eletromorphs", sendo geradas por diferentes loci, ou diferentes alelos do mesmo locus (aloenzimas) e modificações pós-translacionais de enzimas (isoenzima secundária ou banda fantasma); esta última pode resultar de mudanças moleculares originadas por diferentes condições do ensaio como: técnica de congelamento, inadequada extração por tampão, condições não fisiológicas do ensaio, amostra velha, super aquecimento dos geis durante a eluição, ou outras causas (KEPHART, 1990).

As bandas fracas observadas nas figuras 8, 8A, 9, 9A, 10 e 10A, no cultivar IAC-8, nos mutantes -L1, -L2 e seus respectivos descendentes, podem ter sua origem explicada pela ação do SDS sobre as isoenzimas L3 que possivelmente provocaram o desdobramento em subunidades protéicas. KEPHART (1990) relatou que alelos nulos que não apresentam atividade isoenzimática, homozigotos e heterozigotos tornam-se visualmente indistintos quando as

proteínas são monoméricas; os heterozigotos mostram duas e quatro bandas fortes (fenotípicas) inesperadas nas formas diméricas ou tetraméricas das proteínas. Em alguns sistemas enzimáticos e dentro de certas condições experimentais, isoenzimas secundárias, bandas fantasmas (fracas) geralmente aparecem acompanhando bandas primárias. Apesar das isoenzimas lipoxigenases apresentarem estrutura dímera e possivelmente tetrâmera, os geis ilustrados não apresentam multiplicação de bandas fortes característico de plantas heterozigotas, mas sim bandas fracas, possivelmente isoenzimas secundárias oriundas de formas múltiplas, produzidas durante o processo, que apresentariam diferentes conformações, ocupando posições distintas no gel, como relatado por KEPHART (1990).

Analisando a presença destas mesmas isoenzimas HILDEBRAND & HYMOWITZ (1981), KITAMURA (1984) e DAVIES & NIELSEN (1986) obtiveram bons resultados com o SDS-PAGE. KITAMURA (1984) modificou o seu método original tornando a concentração do gel de corrida constante em 7,5% de acrilamida acabando com o gradiente de concentração; DAVIES & NIELSEN (1986) modificaram também o método original de KITAMURA et alii (1983) alterando as dimensões e concentrações do gel e o pH do tampão obtendo bons resultados. SAWAZAKI et alii (1987) tiveram dificuldades para obter a resolução das bandas utilizando o método SDS-PAGE de KITAMURA et alii (1983) utilizaram então a

focalização isoelétrica e obtiveram êxito. KIKUCHI & KITAMURA (1987) relataram textualmente problemas com a obtenção da resolução das isoenzimas pelo método SDS-PAGE, mesmo após as modificações sofridas no método e sugeriram a utilização de métodos complementares para avaliar a redução das isoenzimas. DAVIES & NIELSEN (1987) apontam a necessidade de métodos mais sensíveis que venham a detectar os níveis das isoenzimas lipoxigenases em cultivares e/ou linhagens reconhecidamente recessivas para as respectivas isoenzimas.

KITAMURA (1984) confirmou os resultados obtidos na eletroforese com a determinação da atividade enzimática, pelo método espectrofotométrico de AXELROD et alii (1981), utilizando os ácidos linoléico e araquidônico como substratos, tendo utilizado também a caracterização imunológica com focalização elétrica.

A eletroforese, como relatado anteriormente, foi eficiente na identificação das sementes dos cultivares mutantes assim como para as plantas da geração F4 recessivas para as três isoenzimas L1, L2 e L3, demonstrando que todas os POOLs avaliados apresentaram ausência da respectiva banda. Esse método entretanto foi seguido de outros métodos analíticos complementares para confirmar os resultados obtidos.

#### 4.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O método espectrofotométrico de determinação da atividade enzimática utilizando as condições adequadas de pH, os substratos específicos e substâncias auxiliares para inibir e ou estimular a atividade das isoenzimas, vem sendo eficiente para detectar redução de atividade das isoenzimas lipoxigenases em extratos enzimáticos de soja (AXELROD et alii, 1981; HILDEBRAND & HYMOWITZ, 1981; BARROS et alii, 1984; RESENDE, 1986).

Neste trabalho a atividade enzimática foi utilizada como um método quantitativo complementar à eletroforese. Foram utilizados seis testes para análise da atividade enzimática das lipoxigenases e selecionados os mais eficientes na discriminação das sementes das plantas -L1, -L2 e -L3.

Os resultados dos testes realizados para determinar a atividade enzimática expressos em  $\mu\text{mol}$  de dienos conjugados/min (testes I, II, III e IV) e  $\mu\text{mol}$  de cetodienos/min (testes V e VI), encontram-se na tabela 2 e 2A. Para avaliar a atividade da isoenzima L1 foram utilizados dois testes, o teste com o tampão Tris-HCl (I)

foi mais preciso,  $CV^2 = 2,24\%$ , do que o tampão borato (II),  $CV=7,55\%$ ; a menor solubilidade do tampão borato quando comparado ao tampão Tris e a precipitação do mesmo quando mantido sobre refrigeração ou em banho de gelo, provavelmente determinaram a diferença de precisão dos dois métodos. Entretanto os dois testes discriminaram bem as sementes de plantas -L1 das sementes dos demais cultivares.

Para a determinação da atividade da isoenzima L2 em pH 6,1 os resultados evidenciaram que o teste com metil linoleato (IV) foi mais eficiente na discriminação das sementes -L2 enquanto que o teste com ácido linoléico (III) não distinguiu as sementes -L2 das -L1. O CV para os testes foram 5,85% e 8,94% respectivamente.

Os resultados da determinação da atividade da isoenzima L3 encontram-se na tabela 2A; no teste utilizando o metil-linoleato a pH 6,8 (VI) ocorre a discriminação das sementes de plantas -L2 e -L3 das sementes de plantas -L1 e do IAC-8. Adicionalmente, o teste com o éster apresenta maior precisão ( $CV = 7,75\%$ ) que o teste com ácido linoléico ( $CV = 32,26\%$ ), no mesmo pH.

Os dados acima evidenciam a maior eficiência do teste I, para discriminar as sementes -L1; do teste IV para discriminar as sementes -L2 e o teste VI para discriminar as

---

2 CV = COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DO TESTE

-L2 e -L3. Os resultados da atividade enzimática para os cultivares avaliados utilizando os testes acima encontram-se nas tabelas 3, 4 e 5. Na tabela 3, encontram-se os resultados da atividade enzimática para a isoenzima L1, onde o mutante PI408251 (-L1) e suas linhagens descendentes (POOL 13, 14, 15 e 16) apresentaram atividade (U) menor que 1, diferindo estatisticamente dos cultivares mutantes PI86023 (-L2), TOHOKU Nº 74 (-L3) e o IAC-8. Esses resultados comprovam a incorporação dos alelos recessivos  $lx1.lx1$  e sua manutenção na geração F4 após o retrocruzamento, conforme já se demonstrou na eletroforese. Cumpre ressaltar que, embora na eletroforese dos POOLs 13, 14, 15 e 16 apareça uma banda fraca, a presença desta não implica em aumento da atividade enzimática, pelo contrário, ela permanece muito baixa como foi característico para o mutante -L1.

Na tabela 4 encontram-se os resultados para atividade da isoenzima L2 onde o cultivar mutante PI86023 (-L2) assim como seus descendentes (POOL 1, 2, 3 e 4) apresentaram atividade enzimática significativamente mais baixa que os demais cultivares, comprovando a redução da atividade enzimática através do retrocruzamento.

No teste de atividade enzimática para a isoenzima L3 (tabela 5) o mutante TOHOKU Nº 74 (-L3) e suas linhagens descendentes não diferem estatisticamente do mutante PI86023 (-L2), excetuando-se o POOL 8. Os mutantes -L2 e -L3 assim

como as linhagens (POOL 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12) diferem estatisticamente do cultivar IAC-8 e do mutante PI408251 (-L1). Esse teste não foi eficiente para discriminar as sementes -L2 das -L3 porque no pH 6,8 as duas enzimas apresentam atividade quase equivalente e possuem afinidade pelo mesmo substrato. Ainda assim os resultados obtidos evidenciam a redução da atividade enzimática na geração F4 e confirmam os resultados obtidos pela eletroforese.

TABELA 2 - RESULTADOS DE SEIS TESTES DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS ISOENZIMAS LIPOXIGENASES EM EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO DE SEMENTES DE CULTIVARES DE SOJA IAC-8, PI408251 (-L1) COM SEUS DESCENDENTES (POOLS 13, 14, 15, 16), PI86023 (-L2) COM SEUS DESCENDENTES (POOLS 1, 2, 3, 4).

|                   |    | T E S T E |        |        |        |        |        |
|-------------------|----|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|
| CULTIVAR          |    | I         | II     | III    | IV     | V      | VI     |
| IAC-8             | U  | 19,10     | 18,33  | 11,81  | 4,92   | 4,04   | 10,84  |
|                   | s  | 0,6667    | 1,3743 | 0,1295 | 0,1632 | 1,1675 | 0,9170 |
|                   | CV | 0,35      | 7,50   | 1,10   | 3,32   | 28,90  | 8,46   |
| PI408251<br>(-L1) | U  | 0,58      | 0,46   | 7,80   | 4,11   | 1,42   | 8,55   |
|                   | s  | 0,0155    | 0,0155 | 0,1056 | 0,0399 | 0,0249 | 0,3134 |
|                   | CV | 2,67      | 3,36   | 1,35   | 0,97   | 1,75   | 3,67   |
| POOL 13           | U  | 0,46      | -0,50  | 9,28   | 3,92   | 1,03   | 8,87   |
|                   | s  | 0,0155    | 0,0315 | 0,0992 | 0,1035 | 0,2966 | 0,0926 |
|                   | CV | 3,36      | 6,29   | 9,69   | 2,64   | 28,80  | 1,04   |
| POOL 14           | U  | 0,61      | 0,72   | 8,44   | 3,68   | 1,42   | 8,18   |
|                   | s  | 0,0345    | 0,0043 | 0,1547 | 0,1227 | 0,0906 | 0,3098 |
|                   | CV | 5,66      | 0,59   | 5,83   | 3,33   | 6,38   | 3,79   |
| POOL 15           | U  | 0,42      | 0,69   | 8,06   | 3,40   | 1,27   | 7,96   |
|                   | s  | 0,0027    | 0,1028 | 0,3291 | 0,0587 | 0,2209 | 0,1704 |
|                   | CV | 0,63      | 14,90  | 4,01   | 1,73   | 17,39  | 8,84   |
| POOL 16           | U  | 0,68      | 0,80   | 7,88   | 3,40   | 1,64   | 8,64   |
|                   | s  | 0,0750    | 0,0418 | 0,1312 | 0,0725 | 0,0428 | 0,2804 |
|                   | CV | 1,10      | 5,60   | 1,66   | 2,13   | 2,61   | 3,25   |
| PI86023<br>(-L2)  | U  | 13,35     | 15,78  | 9,56   | 1,16   | 0,60   | 5,45   |
|                   | s  | 0,1167    | 0,1669 | 0,1440 | 0,1099 | 0,0936 | 0,1052 |
|                   | CV | 0,87      | 1,06   | 1,15   | 9,47   | 15,61  | 1,93   |
| POOL 1            | U  | 15,54     | 15,55  | 9,42   | 1,36   | 0,69   | 6,27   |
|                   | s  | 0,1264    | 2,5167 | 0,2789 | 0,0357 | 0,0260 | 0,2877 |
|                   | CV | 0,81      | 16,18  | 2,96   | 2,63   | 3,77   | 4,59   |
| POOL 2            | U  | 16,22     | 17,71  | 9,32   | 1,68   | 0,53   | 5,71   |
|                   | s  | 0,0283    | 1,1748 | 0,2976 | 0,0523 | 0,0912 | 0,1431 |
|                   | CV | 0,17      | 6,63   | 3,19   | 3,11   | 17,21  | 2,51   |
| POOL 3            | U  | 11,15     | 11,73  | 8,72   | 1,16   | 0,33   | 5,91   |
|                   | s  | 0,2708    | 0,6583 | 0,1056 | 0,1205 | 0,0336 | 0,2375 |
|                   | CV | 2,43      | 5,61   | 1,21   | 10,39  | 10,19  | 4,02   |
| POOL 4            | U  | 14,38     | 15,86  | 8,12   | 1,00   | 0,48   | 5,46   |
|                   | s  | 0,1391    | 0,6288 | 0,1248 | 0,0591 | 0,0203 | 0,0299 |
|                   | CV | 0,96      | 3,96   | 1,54   | 5,01   | 5,89   | 0,55   |
| CV/TESTE          |    | 2,44      | 7,55   | 8,94   | 5,85   | 32,26  | 7,75   |

U = Unidade de atividade enzimática em umol de dienos conjugados/min. S - Desvio padrão.

CV - Coeficiente de variação (%). I, II - Testes realizados a pH 9 com ácido linoléico, tampão Tris e Borato respectivamente. III, IV - Testes realizados a pH 6,1 com os substratos ácido linoléico e n-til-linoleato. V, VI - Testes realizados a pH 6,8 com os substratos ácido linoléico e n-til-linoleato respectivamente.

TABELA 2A - RESULTADOS DE SEIS TESTES DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS ISOENZIMAS LIPOXIGENASES EM EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO DE SEMENTES DE CULTIVARES MUTANTE DE SOJA TOHOKU N° 74 (-L3) COM SEUS DESCENDENTES (POOLS 5, 6, 7, 8 DE HILO PRETO E 9, 10, 11, 12 DE HILO HARRON).

| CULTIVAR           |    | I      |        | E      |        | I      |        | E  |  |
|--------------------|----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----|--|
|                    |    | I      | II     | III    | S      | IV     | V      | VI |  |
| TOHOKU 74<br>(-L3) | U  | 9,65   | 10,50  | 11,12  | 4,40   | 0,86   | 4,81   |    |  |
|                    | s  | 0,0143 | 0,7109 | 0,5248 | 0,0357 | 0,1028 | 0,1003 |    |  |
|                    | CV | 0,15   | 6,72   | 4,72   | 0,81   | 11,95  | 2,09   |    |  |
| POOL 5             | U  | 14,11  | 14,39  | 10,00  | 4,32   | 0,99   | 4,55   |    |  |
|                    | s  | 0,0975 | 0,3759 | 0,7029 | 0,3189 | 0,1007 | 0,3710 |    |  |
|                    | CV | 0,69   | 2,61   | 7,03   | 7,38   | 10,47  | 8,15   |    |  |
| POOL 6             | U  | 12,54  | 12,70  | 11,44  | 3,80   | 0,65   | 3,90   |    |  |
|                    | s  | 0,0581 | 0,1264 | 0,2400 | 0,1792 | 0,0294 | 0,3550 |    |  |
|                    | CV | 0,46   | 1,00   | 2,10   | 4,72   | 4,50   | 9,10   |    |  |
| POOL 7             | U  | 14,77  | 14,22  | 11,48  | 4,40   | 0,73   | 4,41   |    |  |
|                    | s  | 0,0676 | 1,9632 | 0,7904 | 0,1248 | 0,2069 | 0,1757 |    |  |
|                    | CV | 0,46   | 13,81  | 5,89   | 2,84   | 28,31  | 3,98   |    |  |
| POOL 8             | U  | 14,14  | 12,45  | 10,48  | 3,88   | 0,81   | 3,78   |    |  |
|                    | s  | 0,0539 | 0,8367 | 0,5301 | 0,1824 | 0,2981 | 0,1334 |    |  |
|                    | CV | 0,38   | 6,72   | 5,06   | 4,70   | 36,68  | 3,53   |    |  |
| POOL 9             | U  | 15,14  | 13,06  | 11,56  | 4,59   | 0,98   | 4,96   |    |  |
|                    | s  | 0,0112 | 0,5904 | 0,3861 | 0,0100 | 0,1431 | 0,1501 |    |  |
|                    | CV | 0,07   | 4,52   | 3,34   | 0,22   | 14,60  | 3,03   |    |  |
| POOL 10            | U  | 12,54  | 14,44  | 11,83  | 4,44   | 0,95   | 5,36   |    |  |
|                    | s  | 0,0581 | 1,0699 | 0,2175 | 0,0928 | 0,1548 | 0,0674 |    |  |
|                    | CV | 0,46   | 7,41   | 2,35   | 2,09   | 16,30  | 1,26   |    |  |
| POOL 11            | U  | 14,77  | 15,28  | 11,80  | 4,76   | 0,90   | 5,05   |    |  |
|                    | s  | 0,0676 | 0,8395 | 0,3765 | 0,1173 | 0,2370 | 0,1785 |    |  |
|                    | CV | 0,46   | 5,49   | 3,19   | 2,46   | 26,34  | 3,53   |    |  |
| POOL 12            | U  | 14,14  | 14,66  | 12,00  | 4,48   | 0,91   | 5,36   |    |  |
|                    | s  | 0,0539 | 0,3899 | 0,3637 | 0,0363 | 0,2552 | 0,1296 |    |  |
|                    | CV | 0,38   | 2,66   | 3,03   | 0,81   | 28,04  | 2,42   |    |  |
| CV/teste           |    | 2,44   | 7,55   | 8,94   | 5,85   | 32,26  | 7,75   |    |  |

U - Unidade de atividade enzimática em unol de cetodinos/min. S - Desvio padrão.

CV - Coeficiente de variação (%). I, II - Testes realizados a pH 9 com ácido linolêico, tampão Tris e Borato respectivamente. III, IV - Testes realizados a pH 6,1 com os substratos ácido linolêico e acil-linolêato. V, VI - Testes realizados a pH 6,8 com os substratos ácido linolêico e acil-linolêato respectivamente.

TABELA 3 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ISOENZIMA LIPOXIGENASE 1 (L1) NOS CULTIVARES DE SOJA IAC-8, PI86023 (-L2), TOHOKU Nº 74 (-L3) E PI408251 (-L1) COM SUAS LINHAGENS DESCENDENTES (POOLS 13, 14, 15, 16).

| C U L T I V A R | F E N Ó T I P O |    |    | A T I V I D A D E E N Z I M Á T I C A |                 |
|-----------------|-----------------|----|----|---------------------------------------|-----------------|
|                 | L1              | L2 | L3 | U <sup>1</sup>                        | AE <sup>2</sup> |
| IAC-8           | +               | +  | +  | 19,10 A                               | 327,59 A        |
| PI86023         | +               | -  | +  | 13,35 B                               | 218,67 B        |
| TOHOKU 74       | +               | +  | -  | 9,65 C                                | 175,27 C        |
| PI408251        | -               | +  | +  | 0,58 D                                | 9,38 D          |
| POOL 13         | -               | +  | +  | 0,46 D                                | 5,33 D          |
| POOL 14         | -               | +  | +  | 0,61 D                                | 6,90 D          |
| POOL 15         | -               | +  | +  | 0,42 D                                | 4,84 D          |
| POOL 16         | -               | +  | +  | 0,68 D                                | 6,13 D          |

<sup>1</sup> U = unidade de atividade enzimática (umol de dienos conjugados/min.); <sup>2</sup> AE = atividade enzimática específica (U/mg de proteínas). 3 + e - indicativos da presença ou ausência da isoenzima. 4 A, B, C, D - As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 4 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ISOENZIMA LIPOXIGENASE 2 (L2) NOS CULTIVARES SOJA IAC-8, PI408251 (-L1), TOHOKU No.74 (-L3) E PI86023 (-L2) COM SUAS LINHAGENS DESCENDENTES (POOLS 1, 2, 3, 4).

| C U L T I V A R | F E N Ó T I P O |    |    | A T I V I D A D E E N Z I M Á T I C A |                 |
|-----------------|-----------------|----|----|---------------------------------------|-----------------|
|                 | L1              | L2 | L3 | U <sup>1</sup>                        | AE <sup>2</sup> |
| IAC-8           | +               | +  | +  | 4,92 A                                | 84,83 A         |
| PI408251        | -               | +  | +  | 4,11 B                                | 65,63 B         |
| TOHOKU 74       | +               | +  | -  | 4,40 AB                               | 80,00 AB        |
| PI86023         | +               | -  | +  | 1,16 C                                | 19,33 C         |
| POOL 1          | +               | -  | +  | 1,36 C                                | 21,25 C         |
| POOL 2          | +               | -  | +  | 1,68 C                                | 20,30 C         |
| POOL 3          | +               | -  | +  | 1,16 C                                | 17,58 C         |
| POOL 4          | +               | -  | +  | 1,00 C                                | 14,29 C         |

<sup>1</sup> U = unidade de atividade enzimática (umol de dienos conjugados/min.); <sup>2</sup> AE = atividade enzimática específica (U/mg de proteínas). 3 + e - indicativos da presença ou ausência da isoenzima. 4 A, B, C - As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 5 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ISOENZIMA LIPOXIGENASE 3 (L3) NOS CULTIVARES DE SOJA IAC-8, PI408251 (-L1), PI408251 (-L1) E TOHOKU Nº 74 (-L3) COM SUAS LINHAGENS DESCENDENTES (POOLS 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12).

| C U L T I V A R | F E N Ó T I P O |    |    | A T I V I D A D E E N Z I M Á T I C A |                 |
|-----------------|-----------------|----|----|---------------------------------------|-----------------|
|                 | L1              | L2 | L3 | U <sup>1</sup>                        | AE <sup>2</sup> |
| IAC-8           | +               | +  | +  | 10,84 A                               | 181,90 A        |
| PI408251        | -               | +  | +  | 8,55 B                                | 133,59 B        |
| PI86023         | +               | -  | +  | 5,45 CD                               | 90,83 CD        |
| TOHOKU 74       | +               | +  | -  | 4,81 CDE                              | 87,64 CDE       |
| POOL 5          | +               | +  | -  | 4,55 CDE                              | 58,33 CDE       |
| POOL 6          | +               | +  | -  | 3,90 DE                               | 56,34 DE        |
| POOL 7          | +               | +  | -  | 4,41 CDE                              | 63,00 CDE       |
| POOL 8          | +               | +  | -  | 3,78 E                                | 53,86 E         |
| POOL 9          | +               | +  | -  | 4,96 CDE                              | 90,00 CDE       |
| POOL 10         | +               | +  | -  | 5,36 CD                               | 86,45 CD        |
| POOL 11         | +               | +  | -  | 5,05 CD                               | 87,07 CD        |
| POOL 12         | +               | +  | -  | 5,36 CD                               | 79,56 CD        |

<sup>1</sup> U = unidade de atividade enzimática (umol de cetodienos/min.); <sup>2</sup> AE = atividade enzimática específica (U/mg de proteínas. 3 + e - indicativos da presença ou ausência da isoenzima. 4 A, B, C, D, E - As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Para o presente trabalho a atividade enzimática específica (AE), foi definida como sendo a razão entre a unidade de atividade enzimática (U) e o teor de proteínas encontrado no mesmo volume do extrato enzimático bruto. Os coeficientes de correlação entre U e AE (80% a 98%) indicaram que a fórmula utilizada para calcular os valores de AE nesse trabalho é eficiente a despeito de em literatura existirem outras formas de calcular esse parâmetro.

#### 4.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE DESCORAMENTO DO CAROTENO

Os resultados da avaliação da atividade enzimática por descoramento podem ser observados na tabela 6. O teste I do descoramento foi utilizado para detectar atividade da isoenzima L1; pode ser visto que foi satisfatório para discriminar os cultivares que apresentavam fenótipo -L1, o cultivar mutante PI408251 (-L1) e as linhagens POOL 13, 14, 15 e 16; este cultivar e suas respectivas linhagens descendentes apresentaram atividade de descoramento mais elevada. Os autores do método (KIKUCHI & KITAMURA, 1987) explicam que a incubação das amostras de sementes com isoenzima L1 em ácido linoléico a pH 9 por 1min a 20°C, funciona como um pré-tratamento pois nesse tempo a maior parte do substrato é convertido a hidroperóxidos e estes são

decompostos por enzimas hidroperoxido-liases antes da mistura ser ajustada para o pH 6,8, impossibilitando a utilização do substrato pelas isoenzimas L2 e L3. Segundo HILDEBRAND & HYMOWITZ (1982) essas isoenzimas são realmente necessárias e efetivas no processo do descoramento do caroteno; já os cultivares -L1, deixam muito substrato remanescente ocorrendo assim uma elevada atividade de descoramento através das isoenzimas L2 e L3 existentes nestas sementes.

No teste II os cultivares PI86023 (-L2) e TOHOKU Nº 74 (-L3) e suas respectivas progênies, apresentaram uma atividade de descoramento significativamente mais baixa que os cultivares IAC-8, o PI408251 (-L1) e suas linhagens descendentes, que possuem as isoenzimas L2 e L3. Estes resultados confirmam a eliminação e/ou redução das citadas isoenzimas nas progênies consideradas -L2 e -L3.

TABELA 6 - DESCORAMENTO DO CAROTENO (ABSORVÂNCIA A 452nm)  
 ATRAVÉS DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO DE SEMENTES DE SOJA

| CULTIVAR  | FENÓTIPO   |   |   | TESTES         |                 |                  |
|-----------|------------|---|---|----------------|-----------------|------------------|
|           | (L1,L2,L3) |   |   | I <sup>a</sup> | II <sup>a</sup> | III <sup>a</sup> |
| IAC-8     | +          | + | + | 0,705 B        | 0,159 A         | 0,208 A          |
| PI 408251 | -          | + | + | 0,149 A        | 0,171 A         | 0,195 A          |
| POOL 13   | -          | + | + | 0,143 A        | 0,188 A         | 0,213 A          |
| POOL 14   | -          | + | + | 0,151 A        | 0,164 A         | 0,213 A          |
| POOL 15   | -          | + | + | 0,167 A        | 0,162 A         | 0,205 A          |
| POOL 16   | -          | + | + | 0,155 A        | 0,183 A         | 0,194 A          |
| PI 86023  | +          | - | + | 0,789 C        | 0,338 BCDE      | 0,265 B          |
| POOL 1    | +          | - | + | 0,785 C        | 0,311 CDEFG     | 0,273 B          |
| POOL 2    | +          | - | + | 0,788 C        | 0,368 DEFG      | 0,285 B          |
| POOL 3    | +          | - | + | 0,793 C        | 0,376 DEFG      | 0,260 B          |
| POOL 4    | +          | - | + | 0,788 C        | 0,336 BCD       | 0,239 AB         |
| TOHOKU 74 | +          | + | - | 0,706 B        | 0,401 FG        | 0,469 DE         |
| POOL 5    | +          | + | - | 0,690 B        | 0,385 EFG       | 0,491 EF         |
| POOL 6    | +          | + | - | 0,732 B        | 0,395 FG        | 0,489 EF         |
| POOL 7    | +          | + | - | 0,698 B        | 0,399 FG        | 0,516 F          |
| POOL 8    | +          | + | - | 0,712 B        | 0,405 G         | 0,508 EF         |
| POOL 9    | +          | + | - | 0,718 B        | 0,329 BC        | 0,434 CD         |
| POOL 10   | +          | + | - | 0,692 B        | 0,313 B         | 0,430 CD         |
| POOL 11   | +          | + | - | 0,711 B        | 0,319 B         | 0,404 C          |
| POOL 12   | +          | + | - | 0,712 B        | 0,357 BCDEF     | 0,410 C          |

<sup>a</sup> TESTE PARA L1 COM ÁCIDO LINOLÉICO, INICIALMENTE EM TAMPÃO BORATO 0,05M (pH 9) POR 1MIN. A 20°C, POSTERIORMENTE EM TAMPÃO FOSFATO 0,2M (pH 6,8) POR 30min; <sup>b</sup> TESTE PARA L2 COM METIL-LINOLEATO EM TAMPÃO FOSFATO 0,05M (pH 6,8) POR 20min A 20°C; <sup>c</sup> TESTE PARA L3 COM ÁCIDO LINOLÉICO EM TAMPÃO FOSFATO 0,05M (pH 6,8) POR 10min A 20°C. 4 A, B, C, D, E, F - AS MÉDIAS SEGUIDAS DA MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE PELO TESTE DE TUKEY AO NÍVEL DE 5% DE PROBABILIDADE.

No teste III os cultivares IAC-8, o mutante PI408251 (-L1) e as progênies -L1 descoram mais intensamente o caroteno porque possuem as isoenzimas L2 e L3; o cultivar PI86023 (-L2) e suas linhagens descendentes descoram com menor intensidade, a exceção do POOL 4 que apresentou um descoramento superior aos seus similares; o cultivar (TOHOKU Nº 74 (-L3) e os seus descendentes (POOL 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) apresentaram uma atividade de descoramento baixa, diferindo significativamente das demais. As isoenzimas responsáveis pelo descoramento do caroteno são a L2 e principalmente a L3 conseqüentemente sua redução nas sementes das linhagens provoca a queda da atividade enzimática de descoramento.

O método da atividade de descoramento do caroteno foi mais eficiente na discriminação das sementes -L1 e -L3 através dos testes I e III respectivamente. No teste II possivelmente com um substrato mais adequado talvez se pudesse discriminar as sementes de plantas -L2 das -L3.

Estabelecendo uma correlação entre os resultados da eletroforese e da atividade enzimática, observa-se que a presença de bandas fracas nos POOLs -L1, -L2 e -L3 não resultou em acréscimo da atividade sobre substratos específicos, como sobre a capacidade de descoramento do caroteno. Estas subunidades protéicas provavelmente não implicam em atividade enzimática.

## 5. CONCLUSÕES

- O índice de peróxidos foi ineficiente na avaliação da redução da atividade enzimática em farinha de sementes de linhagens de soja -L1, -L2 e -L3.
- A eletroforese foi um método de análise eficiente na discriminação das bandas correspondentes as três isoenzimas lipoxigenases, discriminando as plantas que apresentaram ausência da respectiva banda.
- O método espectrofotométrico para determinar a atividade da isoenzima L1 utilizando tampão Tris-HCl trouxe maior precisão nos resultados.
- O metil linoleato foi o substrato mais eficiente na discriminação das sementes de plantas -L2 e das -L3.

- Os métodos espectrofotométricos de medida da atividade enzimática através da oxidação dos substratos específicos ou através do descoramento do caroteno foram eficientes na discriminação das plantas com diferentes níveis de atividade das lipoxigenases

- Através da eletroforese e da medida da atividade enzimática pelos métodos espectrofotométricos ficou evidenciado que os cultivares mutantes PI408251, PI86023, TOHOKU No 74 e seus descendentes diferiram do cultivar comercial IAC-8, ficando comprovado que os descendentes da geração F4 mantiveram os genes recessivos para as respectivas isoenzimas.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. AXELROD, B. Lipxygenases in: WHITAKER, J. R. (ed.) *Food related enzymes*. Washington, D. C., Am. Chem. Soc., 1974. p.324-48.
02. AXELROD, B; CHEESBROUGH, T. M.; LAAKSO, S. Lipoxigenase from soybeans. *Meth. Enzimol.*, 71: 441-51, 1981.
03. BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A.; FONTES, E.P.B. Atividades de lipoxigenases L1 e L3 em cultivares comerciais de soja. *Arq. Biol. Technol.*, 27: 381-5, 1984.
04. BILD, G. S.; RAMADOSS, C. S.; AXELROD, B. Effect of substrate polarity on activity of soybean lipoxxygenase isoenzymes. *Lipids*, 12(9): 732-35, 1977.
05. BLIGH, E.G. & DYER, W.J. A rapid method of total lipid extration and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37(8): 911-17, 1959.

06. BLOEMENDAL, H. High resolution techniques. In: BIER, M. (ed.) *Electrophoresis-Theory, Methods and Applications*. New York: Academic Press, 1967. V.2, C.8, p. 379-422.
07. BOOKWALTER, G. N.; MUSTAKAS, G.C.; KWOLEK, W.F.; MCGHEE, J. E.; ALBRECHT, W. J. Full-fat soy flour extrusion cooked; properties and food uses. *J. Food Sci.*, 36(1): 5-9, 1971.
08. BORHAN, M.; SNYDER, H. E. Lipxygenase destruction in whole soybeans by combination of heating and soaking in ethanol. *J. Food Sci.*, 44(2): 586-90, 1979.
09. BOUTER, D. Nucleic acids and synthesis in plants. In BOGARAD, L. & NIEL, H. (ed.) *Protein deposition in developing cereal and legume seeds*. Plenum Press, 1976. p. 261-78.
10. BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-54, 1976.
11. BRAY, D. J. Pancreatic hypertrophy in laying pullets induced by unheated soybean meal. *Poultry Sci.*, 43:382-84, 1964.

12. CANTO, W.L. & SANTOS, L.C. Soja uma fonte de alimentos.  
*Inf. Agropec.*, 8(94): 62-71, 1982.
13. CASTRO, L.A.B. de Proteínas de reserva das sementes.  
In: MIYASAKA, S. & MEDINA, J. C. (ed.) *A soja no Brasil*. Campinas, ITAL. 1981. p. 813 - 20.
14. CHAPMAN JR., G.W.; ROBERTSON, J.A.; BURDICK, D. Chemical composition and lipoxygenase activity in soybeans as affected by genotype and environment. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 53(2): 54-6, 1976.
15. CHIBA, H.; TAKAHASHI, N.; SASAKI, R. Enzymatic improvement of food flavor. II. Removal of beany flavor soybean products by aldehyde dehydrogenase. *Agric. Biol. Chem.*, 43: 1883-89, 1979.
16. CHRISTOPHER, J. R.; PISTORIUS, E. K.; AXELROD, B. Isolation of isozyme of soybean lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Acta*, 198(1): 12-9, 1970.
17. \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_ Isolation of a third isoenzyme of soybean lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Acta*, 284(1): 54-62, 1972.

18. COSTA, S. I. da; MIYA, E. E.; FUJITA, J. T. Composição química e qualidades organolépticas e nutricionais das principais variedades de soja cultivadas no estado de São Paulo. *Col. ITAL*, 5: 305-19, 1973/74.
19. COSTA, S. I.; QUAST, D. Q.; MORETTI, V.A.; CANTO, W.L.; COBRE, R.V. O emprego da soja na alimentação humana. *B. ITAL*, (46): 1-24, 1976.
20. DAVIES, C.S. & NIELSEN, N.C. Genetic analysis of null-allele for lipoxygenase-2 in soybean. *Crop Sci.*, 26: 460-63, 1986.
21. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_ Registration of soybean germoplasm that lacks lipoxygenase isozymes. *Crop Sci.*, 27: 370-71, 1987.
22. DAVIES, C. S.; NIELSEN, S. S.; NIELSEN, N. C. Flavor improvement of soybean preparations by genetic removal of lipoxygenase-2. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 64(10):1428-33, 1987.
23. DERBYSHIRE, E.; WRIGHT, D. J.; BOUTER, D. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochem.*, 15: 3-24, 1976.

24. ELDRIDGE, A. C.; KALBRENER, J. E.; MOSE, H. A.; HONIG, D.H.; RACKIS, J.J.; BOUTER, D. Laboratory evaluation of hexane: alcohol azeotrope-extracted soybean flakes as a source for bland protein isolates. *Cereal Chem.*, 48(6): 640-46, 1971.
25. ELDRIDGE, A. C.; WARNER, K.; WOLF, W. J. Alcohol treatment of soybeans and soybeans proteins products. *Cereal Chem.*, 54(6): 1229 -37, 1977.
26. ERIKSSON, C. Aroma compounds derived from oxidized lipids. Some biochemical and analytical aspects. *J. Agr. Food Chem.*, 23(2): 126-35, 1975.
27. FONTES, E.P.B. *Análise eletroforética da proteína de reserva de cultivares de soja e caracterização de mutantes*. Viçosa, U.F.V., impr. Univ., 1983. 60 p. (tese de mestrado). Citado por RESENDE (1986).
28. GARDNER, H. W. Decomposition of linoleic acid hidroperoxides enzymic reactions compared with nonenzymic. *J. Agric. Food Chem.*, 23(2): 129-36, 1975.
29. ----- Lipid hidroperoxide reativity with proteins and aminoacids: A review. *J. Agric. Food Chem.*, 27: 220-28, 1979

30. \_\_\_\_\_ Lipxygenase pathway in cereals. *Adv. Cer. Sci. Technol.*, 9: 161-215, 1988.
31. GARSSSEN, G. J.; VLIEGENTHART, J. F. C.; BOLDINGH, J. An anaerobic reaction between lipxygenase, linoleic acid and its hydroperoxides. *Biochem. J.*, 122(3): 327-32, 1971.
32. GOOSSENS, A.E. Protein foods; flavors and off-flavors. *Food Eng.*, 46(10): 59-60, 1974.
33. GROSSMAN, S. & ZAKUT, R. Determination of the activity of lipxygenase (lipoxydase). *Meth. Biochem. Anal.*, 25: 303 - 329, 1979.
34. GUSS, P. L.; RICHARDSON, T.; STAHMANN, M. A. The oxidation-reduction enzyme of wheat fraction and soybean. *Cer. Chem.*, 44: 607-10, 1967.
35. HAMBERG, M. & SAMUELSSON, B. On the specificity on the oxygenation of unsaturated fatty acids catalysed by soybean lipoxidase. *J. Biol. Chem.*, 242(22): 5.329-35, 1967.

36. HARA, S. & TOTANI, Y. A highly sensitive method for the micro - determination of lipid hidroperoxides by potentiometry. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65(12): 1948-50, 1988.
37. HILDEBRAND, D. F. & HYMOWITZ, T. Two soybean genotypes lacking lipxygenase-1. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 49:583-86, 1981.
38. ----- & ----- Inheritance of lipxygenase-1 activity in soybean seeds. *Crop Sci.*, 22: 851-53, 1982.
39. ----- & ----- Carotene and chlorophyll bleaching by soybeans with and without seed lipxygenase-1. *J. Agric. Chem.*, 30: 705-8, 1982.
40. HILDEBRAND, D. F. & KITO, M. Role of lipxygenase in soybean seed protein quality. *J. Agric. Food Chem.*, 32: 815-19, 1984.
41. HILL, J.E. & BEIDENBACH, R.W. Proteins of soybean seeds. II. Accumulation of the major proteins components during seeds development and maturation. *Plant Physiol.*, 53:747-51, 1974.

42. HOLMAN, R. T. Direct measurement of reductantes and products. *Meth. Biochem. Anal.*, 2: 116-19, 1955.
43. HOLMAN, R.T. & BERGSTRÖM, S. *The enzymes, chemistry and mechanism of action*. In SUMNER, J. B. & MYRBÄCK, K. (ed.), v.II, part 1, c.60, Academic press, 1951. 559 p.
44. HOLMAN, R.T.; EGWIN, P. O.; CHRISTIE, W. W. Substrate specificity of soybean lipoxidase. *J. Biol. Chem.*, 244(5): 1.149-51, 1969.
45. HORAN, F.E. Soy protein products and their production. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 51(1): 67A-73A, 1974.
46. IADEROZA, M. *Atividade da fosfolipase D e lipoxigenase em soja. Caracterização bioquímica e comportamento durante o armazenamento*. São Paulo, USP, 1986. 61 p. (tese de mestrado).
47. KALBRENER, J. E.; WARNER, K.; ELDRIDGE, A. C. Flavors derived from linoleic and linolenic acid hydroperoxides. *Am. Assoc. Cereal Chem.*, 51: 406-16, 1974.

48. KANANI, M.K.; VAN ZUILICHEM, D.J.; ROOZEN, J.P.; PILNIK, W. A modified procedure for low temperature infrared radiation of soybean; II. inactivation of lipoxygenase and keeping quality of full-fat flour. *Lebensmittel-Nissenschaft Technol.*, 15(3): 139-42, 1982.
49. KELLOR, L. R. Defatted soy flour an grits. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 51(1): 77A-80A, 1974.
50. KELLOR, U.; DATTA, I. C.; QUADRI, M. A.; KUSHWAH, H. S. Note on the chemical analysis and acceptability of soymilk. *Indian J. Agric. Sci.*, 47(9): 475-76, 1977.
51. KEPHART, S. R. Starch gel eletrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis techniques. *Am. J. Bot.*, 77(5):693-712, 1990.
52. KIKUCHI, A. & KITAMURA, K. Simple and rapid carotene bleaching tests for the detection of lipoxygenase isozymes in soybean seeds. *Japan. J. Breed.*, 37: 10-16, 1987.
53. KITAMURA, K.; DAVIES, C. S.; KAIZUMA, N.; NIELSEN, N. C. Genetic analysis of a null-allele for lipoxigenase-3 in soybean seeds. *Crop Sci.*, 23: 924-27, 1983.

54. KITAMURA, K Biochemical characterization of lipoxygenase lacking mutants, L-1-less, and L-2-less, and L-3-less soybeans. *Agric. Biol. Chem.*, 48(9): 2339-46, 1984.
55. KITAMURA, K.; TAKAGI, T.; SHIBASAKI, K. Subunit structure of soybean 11S globulin. *Agr. Biol. Chem.*, 40(9): 1937-44, 1976.
56. KOCH, R. B.; STERN, B.; FERRARI, C. G. Linoleic acid and trilinolein as substrates for soybean lipoxidase(s). *Arch. Biochem. Biophys.*, 78(1): 165-79, 1958.
57. KON, S.; WAGNER, J. R.; GUADAGNI, D. G.; HORVAT, R. J. pH adjustment control of oxidative off-flavors during grinding of raw legume seeds. *J. Food Sci.*, 35(4): 343-45, 1970.
58. LARKINS, B. A. Genetic engineering of seed storage proteins. In: KOSUGE, T. et alii (ed.) *Genetic Engineering of Plants*. Plenum, 1983. p. 93-117.
59. LIENER, I. E. Significance for humans of biologically active factors in soybeans and other food legumes. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 56(3): 121-29, 1979.

60. LIENER, I. E. & KAKADE, M. L. Protease inhibitors. In: \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_, (ed.) *Toxic constituents of plant foodstuffs*. New York, Academic Press, 1969. c. 2, p. 7-68.
61. MATTICK, L.R. & HAND, D.B. Identification of a volatile component in soybeans that contributes to the raw bean flavor. *J. Agric. Food Chem.*, 17(1): 15-7, 1969.
62. MILLERD, A. Biochemistry of legume seed proteins. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 26: 53-72, 1975.
63. MOREIRA, M.A.; HERMODSON, M.A.; LARKINS, B.A.; NIELSEN, N.C. Partial characterization of the acidic and basic polypeptides of glycinin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 210(2):633-42, 1979.
64. MORETTI, R.H. & HINOJOSA, R. Produção de leite de soja em escala semi-industrial. In: MIYASAKA, S. & MEDINA, J. C. (ed.) *A soja no Brasil*. Campinas, ITAL. 1981. p.979-86.
65. MÜLLER, L. Taxonomia e morfologia. In: MIYASAKA, S. & MEDINA, J.C. (ed.) *A soja no Brasil*. Campinas, ITAL, 1981. p.64 - 68.

66. MUSTAKAS, G. C.; ALBRECHT, W. J.; MCGHEE, J. E.; BLACK, L.T.; BOOKWALTER, G. N.; GRIFFIN JR., E. L. Lipoxidase deactivation to improve stability, odor and flavor of full-fat soy flours. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 46(11): 623-26, 1969.
67. MUSTAKAS, G. C.; ALBRECHT, W. J.; BOOKWALTER, G. N.; MCGHEE, J. E.; KWOLEK, W. F.; GRIFFIN JR., E. L. Extruder-processing to improve nutritional quality, flavor, and keeping quality of full-fat soy flour. *Food Technol.*, 24(11): 1.290-96, 1970.
68. NELSON, A. I.; STEINBERG, M. P.; WEI, L. S. Illinois process for preparation of soymilk. *J. Food Sci.*, 41(1): 57-61, 1976.
69. NIELSEN, N. C. Structure of soy proteins. *New Protein Foods*, 5: 27-64, 1985.
70. PEREIRA, G. L. A. Fatores que influem na qualidade da semente. In: MIYASAKA, S. & MEDINA, J.C. (ed.) *A soja no Brasil*. Campinas, ITAL. 1981. p.718 - 28.
71. PIPER, C.V. & MORSE, W.J. *The soybean*. New York, McGraw-hill, 1923. 329 p.

72. PISTORIUS, E. K. & AXELROD, B. Iron, an essential component of lipoxygenase. *J. Biol. Chem.*, 249(10): 3.183-86, 1974.
73. RACKIS, J. J.; SESSA, D. J.; HONIG, D.H. Flavor problems of vegetable food proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 56: 262-71, 1979.
74. RAMADOSS, C. S.; PISTORIUS, E. K.; AXELROD, B. Coupled oxidation of carotene by lipoxygenase require two isoenzymes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 190:549-52, 1978.
75. RESENDE, S. T. *Efeito da eliminação genética das lipoxigenases L-1 e L-3 e de características físicas no teor de n-hexanal em grãos de soja*. Viçosa, UFV, 1986. 41p. (tese de mestrado).
76. RICE, R. D.; WEI, L. S.; STEINBERG, M. P.; NELSON, A. I. Effect of enzyme inactivation on the extracted soybean meal and oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 58(5): 578-83, 1981.
77. SAWAZAKI, H. E.; TEIXEIRA, J. P. F.; MIRANDA, M. A. C. Avaliação da atividade da lipoxigenase em linhagens de soja. *Bragantia*, 46(2): 371-80, 1987.

78. SESSA, D.J.; HONIG, D. H.; RACKIS, J. J. Lipid oxidation in full-fat and defatted soybean flakes as related to soybean flavor. *Cer. Chem.*, **46**: 675-86, 1969.
79. SGARBIERI, V.C. & WHITAKER, J.R. Physical, chemical and nutritional properties of common bean (*Phaseolus*) proteins. *Adv. Food Research*, **28**: 93-166, 1982.
80. SIDDIQI, A. M. & TAPPEL, A. L. Comparison of some lipoxidases and their mechanism of action. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **34**(12): 529-33, 1957.
81. SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*, 3 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Dois, 1987. 299 p.
82. SMITH, W. L. & LANDS, W. E. M. The self-catalyzed destruction of lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**: 846-51, 1970.
83. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Oxygenation of unsaturated fatty acids by soybean lipoxygenase. *J. Biol. Chem.*, **247**(4): 1.038-47, 1972.
84. STASWICK, P. E.; HERMODSON, M. A.; NIELSEN, N. C. Identification of the acid and basic subunit complexes of glycinin. *J. Biol. Chem.*, **256** (16): 8.752-55, 1981.

85. SUMNER, R. J. Lipoid oxidase studies. A method for the determination of lipoxidase activity. *Anal. Chem.*, **15**: 14-15, 1943.
86. SURREY, K. Spectrophotometric method for determination of lipoxidase activity. *Plant Physiol.*, **39**(1): 65-70, 1964.
87. TAPPEL, A.L. Lipoxidase. *Meth. Enzimol.*, **5**: 539-42, 1962.
88. THANH, V.H. & SHIBASAKI, K. Beta conglycinin from soybean protein. Isolation and immunological and physiological properties of the monomeric forms. *Biochem. Biophys. Acta*, **490**: 370-84, 1977.
89. VERHUE, W.N. & FRANCKE, A. The heterogeneity of soybean lipooxygenase. *Biochem. Biophys. Acta*, **284**: 43-54, 1972.
90. VERNHOY-GERRITSEN, M.; BOS, A. L. M.; VELDINK, G. A.; VLIEGENTHART, J.F.G. Localization of lipooxygenase 1 and 2 in germinating soybean seeds by an indirect immunofluorescence technique. *Plant physiol.*, **73**: 262-67, 1983

91. VERNDOOY-GERRITSEN, M.; LEUNISSEN, J. L. M.; VELDINK, G. A.; VLIEGENTHART, J. F. G. Intracellular localization of lipoxygenase-1 and 2 in germinating soybean seeds by indirect labeling with protein A-colloidal gold complexes. *Plant Physiol.*, **76**: 1.070-79, 1984.
92. VLIEGENTHART, J.F.G.; VELDINK, G.A.; BOLDINGH, J. Recent progress in the study on the mechanism of action of soybean lipoxygenase. *J. Agric. Food Chem.*, **27**(3): 623-26, 1979.
93. WANG, SIN-HUEI *Tratamento de grão de soja com radiação de microondas e seus efeitos no sabor, extração e algumas propriedades nutricionais do leite de soja.* Campinas, FEA/UNICAMP, 1986. 138 p. (tese de doutorado).
94. WILKENS, W. F.; MATTICK, L. R.; HAND, D. B. Effect of processing method on oxidative off flavors soybean milk. *Food Technol.*, **21**(12): 86-9, 1967.
95. WILKENS, W. F. & LINS, F. M. Gas chromatographic and mass spectral analyses of soybean milk volatiles. *J. Agric. Food Chem.*, **18**(3): 333-35, 1970.

96. WOLF, W. J.; TAMURA, T. Heat denaturation of soybean 11S protein. *Cereal Chem.*, **46**(4):331-46, 1969.
97. WOLF, W. J. Soybean proteins, their functional, chemical, and physical properties. *J. Agric. Food Chem.*, **18**(6): 969-76, 1970.
98. \_\_\_\_\_ What is soy protein? *Food Technol.*, **26**(5): 44-54, 1972.
99. \_\_\_\_\_ Lipxygenase and flavor of soybean products. *J. Agric. Food Chem.*, **23**(2): 136-41, 1975.
100. YABUCHI, S.; LISTER, R.M.; AXELROD, B.; WILCOX, J.R.; NIELSEN, N.C. Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of lipxygenase isoenzymes in soybean. *Crop Sci.*, **22**: 333-37, 1982.
101. YOUNG, S.D. Implementation os SI units for clinical laboratory data. *Ann. Inter. Med.*, **106**: 114-29, 1987.
102. ZAKUT, R.; GROSSMAN, S.; PINSKY, A.; WILCHEK, M. Evidence for an essential methionine residue in lipxygenase. *Febs Letters*, **71**(1): 107-10, 1976.