



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO



IDENTIFICAÇÃO DE LIPOXIGENASES EM SEMENTES DE SOJA [*Glycine max* (L.) Merrill] DE DIFERENTES LINHAGENS

Luciano Bruno de Carvalho Silva
- Nutricionista -

Prof. Dr. Celio Kenji Miyasaka
- Orientador -

Campinas – SP
2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Si38i Silva, Luciano Bruno de Carvalho
Identificação de lipoxigenases em sementes de soja
[*Glycine Max* (L.) Merrill] de diferentes linhagens / Luciano
Bruno de Carvalho Silva.—Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Celio Kenji Miyasaka
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Soja. 2.Lipoxigenase. 3.Sabor. I.Miyasaka, Celio
Kenji. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade
de Engenharia de Alimentos. III.Título.

Luciano Bruno de Carvalho Silva
- Nutricionista -

**IDENTIFICAÇÃO DE LIPOXIGENASES EM SEMENTES
DE SOJA [*Glycine max* (L.) Merrill] DE DIFERENTES
LINHAGENS**

Prof. Dr. Celio Kenji Miyasaka
- Orientador -

Dissertação apresentada ao Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de mestre.

Campinas – SP
2004

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Celio Kenji Miyasaka
Orientador

Prof. Dr. Manoel Albino Coelho de Miranda
Membro

Prof. Dr. Nelson Raimundo Braga
Membro

Profa. Dra. Débora de Queiroz Tavares
Membro Suplente

DEDICATÓRIA

Ao meu pai que ficaria muito orgulhoso com esta conquista.

A minha mãe Maria Aparecida, pessoa mais importante em minha vida, pelas silenciosas e discretas lágrimas por mim derramadas, pelas noites sem dormir, pelo grande coração “mineirinho” apertado ao me ver sair daquela “imensa” cidade de nove mil habitantes, daquela casa calorosa e cheia de amor em busca de dias melhores para nós.

A vovó Geralda pelas orações e preocupações, e aos meus irmãos por sonharem e alimentarem minha vontade e coragem para enfrentar tudo em busca de um objetivo.

Vocês são a razão de tudo em minha vida, amo vocês!!!

“Se você tiver um sonho e desistir dele, você terá outros e desistirá também”

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força, saúde e coragem.

Ao prof. Dr. Celio Kenji Miyasaka pela orientação, paciência, amizade, por confiar e acreditar em mim. Por ter me acolhido e ajudado a concretizar este trabalho.

A Prof Dra. Débora de Queiroz Tavares pela grande ajuda neste trabalho, pela boa vontade, por sempre me ajudar em qualquer coisa, pelos ensinamentos e principalmente por confiar em mim.

Aos professores da banca Manoel Miranda e Nelson Braga, que sempre me recebeu bem, e pelas sugestões durante a revisão da dissertação.

Ao prof Dr. Aloísio José Antunes pelos primeiros meses de orientação.

A todos do BIOAGRO/UFV que me receberam de braços abertos, e que tiveram uma participação fundamental neste trabalho.

A minha querida mãe, a qual herdei a coragem, força e fé.

A vovó Geralda pelos ensinamentos, pelo exemplo de uma vida digna e saudável, pela diplomacia sempre aplicada a todos os momentos.

A meus irmãos Priscilla, Silas, Bruno e André que dão sentido a minha vida e a faz muito agradável, a vocês todo o meu amor e minha vida.

A tia Fioca e tio Morival pelo respaldo, e muita atenção durante este período.

As meninas da A5 (incluindo Adna e Lily) por literalmente ter me recebido nesta cidade, pela amizade, pelo exemplo do que é ser solidário, pelas risadas, piadas, pela companhia durante aqueles maravilhosos almoços e jantares, pelas inúmeras cervejas e madrugadas juntos.

A minha grande amiga Rachel, pelos momentos ao meu lado. Um grande exemplo de caráter e bom humor, e por sempre me apoiar e compreender meus momentos de estresse.

A minha amiga Hayda, uma pessoa que me faz muito feliz, pelo simples fato de existir. Pela amizade incondicional, companheira e amiga em todo momento, com quem aprendi e me diverti muito, e que nos momentos difíceis com suas “gracinhas” me fez esquecer de problemas.

A minha companheira, amiga e namorada Daniela por todo seu amor, carinho e amizade.

A minha amiga e parceira Suziley, pela paciência, companheirismo e por ter acolhido aquele “mineirinho caipira”, doente de saudade da mãe e dos irmãos. Pelas inúmeras disciplinas e trabalhos que fizemos juntos além das aulas de inglês, “thank’s a lot”.

A Adriana (Duda) que sempre me ensinou muita coisa, e proporcionou uma companhia agradável e engraçada durante todo este tempo, pelos trabalhos e artigos juntos, a você toda minha admiração e respeito, sou seu fã.

A todos meus amigos do DEPAN, Lara, Juliana, Isabela, Noemi, Carol, Fábio, Aline, Bete, Janai, De La Hoz, Adriana Botelho, Adriane, Patrícia, e a todos que direta ou indiretamente estiveram do meu lado.

A todos os técnicos e funcionários da FEA que me ajudaram quando precisei, Suzana, Chico, Fátima, Graça, Lia, Cidinha, André, Nice, Lia, Carla, Eliana, Soeli (DEPAN), Edma (NEPA), Bete (DTA).

A todos os amigos que fiz aqui. Em especial a Ana Maria e Eliane (DTA) que sempre me ajudaram e demonstraram muito carinho durante o PED.

Aos meninos da A6 Roberto, Flavio, Martin e Rodrigo pelo convívio durante o mestrado.

Aos amigos da A6-A pela amizade e boas risadas.

Ao meu amigo Josenilson que muito me ajudou, pela paciência e amizade.

Aos amigos Alcy e Claudia que ficaram sempre ao meu lado demonstrando amizade e confiança. As inúmeras “idas ao shopping”.

A todos os meus primos em especial aos meus grandes amigos Idelma, Maraiza e Marcão, por sempre estarem junto comigo, pela companhia insubstituível.

Ao SAE/UNICAMP por ter me oferecido moradia, alimentação e transporte durante os longos 13 meses sem bolsa.

A CAPES pelo apoio financeiro a partir do segundo ano de mestrado.

3.2.4. Método para inativação da LOX	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1. Procedência dos grãos de soja	24
4.2. Composição centesimal	25
4.2.1. Determinação de proteínas	26
4.2.2. Determinação de lipídios totais	27
4.2.3. Determinação de sólidos totais e umidade	28
4.2.4. Determinação de cinzas	28
4.2.5. Determinação de carboidrato	28
4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS	29
4.3.1. Extração das isoenzimas	30
4.3.2. Aplicação das amostras	30
4.4. Teste colorimétrico	31
4.4.1. Análise da LOX-3	32
4.4.2. Análise da LOX-1	32
4.4.3. Análise da LOX-2	32
4.5. Determinação da atividade enzimática	32
4.5.1. Preparo do substrato	33
4.5.1.1. Solução estoque de ácido linoléico 10 mM	33
4.5.1.2. Solução estoque de metil-linoleato 10mM	34
4.5.2. Proteínas solúveis	34
4.5.3. Determinação da atividade	34
4.5.2.1. Teste para LOX-1	34
4.2.2.2. Teste para LOX-2	35
4.2.2.3. Teste para LOX-3	35
4.6. Determinação da atividade enzimática por descoramento do β -caroteno	35
4.6.1. Preparo do substrato	36
4.6.2. Condições de leitura	36
4.6.3. Teste para LOX-1	36

4.6.4. Teste para LOX-2	37
4.6.5. Teste para LOX-3	37
4.7. Análise Estatística	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1. Composição Centesimal	38
5.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS	38
5.3. Teste colorimétrico	41
5.4. Determinação da atividade	42
5.5. Determinação da atividade enzimática por descoramento d β - caroteno	49
5.5.1. Teste para LOX-1	49
5.5.2. Teste para LOX-2	51
5.5.3. Teste para LOX-3	55
6. CONCLUSÕES	59
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantidade relativa e composição das frações protéicas da soja	4
Tabela 2. Características das isoenzimas LOX de sementes de soja	6
Tabela 3. Composição centesimal das cultivares e linhagens estudadas	38
Tabela 4. Teste colorimétrico realizado para LOX-1 e LOX-3	42
Tabela 5. Atividade específica das isoenzimas	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura tridimensional da LOX da soja	5
Figura 1a. Estrutura tridimensional da LOX da soja	5
Figura 2. Esquema geral da reação catalizada pela LOX sobre o ácido linoléico (SIEDOW, 1991)	11
Figura 3. Esquema da hidroperoxidação do ácido linoléico pela LOX sobre o ácido linoléico	12
Figura 4. Mecanismo proposto para reação primária da LOX (KLEIN et al., 1989)	13
Figura 5. Estrutura química geral da LOX em sementes de soja	14
Figura 6. Mecanismo de reação anaeróbica entre o ácido linoléico e o ácido 13-HPO linoléico catalisado pela LOX da soja (VLIEGENTHART et al., 1979)	17
Figura 7. Formação de dienos conjugados pela ação da LOX sobre o ácido linoléico	19
Figura 8. Mecanismo de co-oxidação acoplada do β -caroteno pelo ácido linoléico	20
Figura 9. Sementes de soja das diferentes cultivares e linhagens de soja avaliadas	24
Figura 10. Esquema dos cruzamentos e retrocruzamentos realizados pelo IAC	25
Figura 11. Resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida 9% contendo SDS ilustrando as bandas correspondentes as isoenzimas LOX extraídas do grão de soja	41
Figura 12. Aumento da absorbância a 234nm para a cultivar IAC 8-2	43
Figura 13. Aumento da absorbância a 234nm para a linhagem IAC 97-3503	44
Figura 14. Aumento da absorbância a 234nm para a linhagem IAC 97-3512	45
Figura 15. Aumento da absorbância a 234nm para a linhagem IAC 97-3545	46
Figura 16. Aumento da absorbância a 234nm para a linhagem IAC 00-3803	47
Figura 17. Aumento da absorbância a 234nm para a cultivar IAC 8-2, e as linhagens IAC 00-3803, IAC 97-3503, IAC 97-3512, IAC 97-3545	48

Figura 18. Determinação espectrofotométrica a 452nm da isoenzima LOX-1 na linhagem IAC 97-3503	50
Figura 19. Determinação espectrofotométrica a 452nm da isoenzima LOX-2 na cultivar IAC 8-2	52
Figura 20. Determinação espectrofotométrica a 452nm da isoenzima LOX-2 na linhagem IAC 97-3503	53
Figura 21. Determinação espectrofotométrica a 452nm da isoenzima LOX-2 na linhagem IAC 00-3803	53
Figura 22. Determinação espectrofotométrica a 452nm da isoenzima LOX-2 na linhagem IAC 97-3512	54
Figura 23. Determinação espectrofotométrica a 452nm da isoenzima LOX-2 na linhagem IAC 97-3545	55
Figura 24. Determinação espectrofotométrica a 452nm da isoenzima LOX-3 na cultivar IAC 8-2	56
Figura 25. Determinação espectrofotométrica a 452nm da isoenzima LOX-3 na linhagem IAC 97-3512	56
Figura 26. Determinação espectrofotométrica a 452nm da isoenzima LOX-3 na linhagem IAC 97-3545	57
Figura 27. Determinação espectrofotométrica a 452nm da isoenzima LOX-3 na linhagem IAC 00-3803	57

LISTA DE ABREVIATURAS

LOX. Lipoxigenase

LOX-1. Lipoxigenase tipo I

LOX-2. Lipoxigenase tipo II

LOX-3. Lipoxigenase tipo III

+ LOX. Presença de todos os tipos de lipoxigenases

- LOX. Ausência de todos os tipos de lipoxigenases

IAC. Instituto Agronômico de Campinas

HPO. Hidroperóxido

RH. Ácido linoléico

L. dímeros

LOX-Fe³⁺. Enzima férrica

LOX-Fe²⁺. Enzima ferrosa

RESUMO

A degradação oxidativa dos ácidos graxos da soja, ocorrida durante o processamento dos grãos, desenvolve o sabor de feijão verde ou de soja crua que altera a palatabilidade e conseqüentemente aceitabilidade dos produtos à base de soja, resultando em problemas para a indústria. A enzima lipoxigenase (linoleato: O₂ oxirredutase, EC 1.13.11.12), catalizadora dessa reação, está presente na soja sob a forma de três isoenzimas caracterizada por três genes dominantes, LOX-1, LOX-2 e LOX-3. O objetivo do presente trabalho foi a identificação e determinação qualitativa e quantitativa das frações de lipoxigenases em sementes de soja *Glycine max* provenientes da quarta geração do primeiro retrocruzamento (F4) dos mutantes isentos das respectivas LOX {PI-408251 (-LOX-1), PI-86023 (-LOX-2), TOHOKU nº 74 (-LOX-3)}, com o cultivar comercial IAC-8, resultando nas linhagens IAC 97-3503, IAC 97-3512, IAC 97-3545 e IAC 97-3803, fornecidas pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). A análise qualitativa e quantitativa destes quatro genótipos e do IAC 8-2 foi realizada através de 1) Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS, para discriminar as bandas existentes; 2) Teste colorimétrico e; 3) Determinação da atividade enzimática em espectrofotometria na presença de: 3.1) substratos específicos e, 3.2) reação acoplada de descoloramento do β -caroteno. Observou-se por eletroforese em gel as bandas correspondentes a cada isoenzima. A reação de oxidação da LOX sobre o β -caroteno (LOX-3) e azul de metileno (LOX-2 e LOX-1) foi sensível para a detecção da LOX-1 e LOX-3. O método de determinação de atividade enzimática com a utilização de substratos específicos (ácido linoléico para LOX-1 e LOX-3, e metil-linoleato para LOX-2) também foi sensível somente para a detecção de LOX-1 e LOX-3. Através da reação de cooxidação do β -caroteno pela LOX-2 e LOX-3 foi possível determinar todas as

isoenzimas, complementando os resultados obtidos através da eletroforese em gel de poliacrilamida. Constatou-se que através dos cruzamentos e retrocruzamentos realizados pelo IAC, na linhagem IAC 97-3503 não demonstrou atividade de LOX-1, não tendo ocorrido redução significativa ($p < 0,05$) nas outras três linhagens estudadas. Evidenciou-se redução significativa ($p < 0,05$) da LOX-2 nas linhagens IAC 97-3512 e IAC 97-3545, quando comparados ao padrão IAC 8-2. Para a LOX-3 ocorreu redução significativa ($p < 0,05$) no cultivar IAC 97-3503, não ocorrendo diminuição nas outras três linhagens em estudo.

Palavras chave: soja, lipoxigenase, sabor

SUMMARY

The oxidative degradation of the soybean fatty acids which has taken place at the grain processing, have developed the flavor of green bean or raw soybean. This degradation alters the palatability and consequently the acceptability of the products made by soybean, resulting in some industries problems. The lipoxygenase enzyme (linolenato: O₂ oxirredutase, EC 1.13.11.12), which is the component that catalyze the reaction, exists in soybean in the shape of 3 isoenzymes characterized by 3 dominant genes, LOX-1, LOX-2 and LOX-3. The main propose of this work was the identification and qualitative and quantitative determination of the lipoxygenase fractions in *Glycine max* soybean seeds, which had come from the fourth generation of the first crossing (F₄) of the mutants that didn't have the respective LOX {PI-408251 (-LOX-1), PI-86023 (-LOX-2), TOHOKU n^o 74 (-LOX-3)}, using the commercial cultivar IAC-8, resulting in the seeds IAC 97-3503, IAC 97-3512, IAC 97-3545 and IAC 97-3808, which have been furnished by the Instituto Agronômico de Campinas (IAC). The qualitative and quantitative analysis of the samples were done beyond: 1) Electrophoresis in gel of poliacrilamida and SDS, to discriminate the existing bands; 2) color test and; 3) determination of the enzymatic activity using espectofotometric in the presence of: 3.1) specific substracts and; 3.2) connected reaction of β-carotene bleaching. It has been observed that beyond electrophoresis in gel each band corresponds to each isoenzyme. The oxidation reaction of LOX in the β-carotene (LOX-3) and methyl blue (LOX-2 and LOX-1) was sensible for the detection of LOX-1 and LOX-3. The method for determination of enzymatic activities with utilization of substrates (linoleic acid for LOX-1 and LOX-3, and methyl-linoleate acid for LOX-2) it was sensible for detection of LOX-1 and LOX-3. Beyond the reaction of the co-oxidation of β-carotene by LOX-2 and LOX-3,

it was possible to determinate all the isoenzymes, adding the final result which was obtained first beyond electrophoresis in gel of poliacrylamide, and it has been saw that beyond the crossing and backcrosses been made by the IAC, the seed IAC 97-3503 haven't shown any activity of LOX-1, to he step of it hasn't been observed any significant reduction ($p < 0,05$) in the others seeds that had been studied. A significant reduction had been shown ($p < 0,05$) in LOX-2 in the seeds IAC 97-3512 and IAC 97-3545 when they were compared to the standard IAC 8-2. To LOX-3 it had been observed a significant reduction ($p < 0,05$) in the seed IAC 97-3503, and no reduction had taken place in the others cultures three seeds.

Key words: soybeans, lipoxygenase, flavor

1. INTRODUÇÃO

A soja é um dos produtos de maior importância para o Brasil, ocupando lugar de destaque na pauta de exportação do país, sendo cultivada praticamente em todo território nacional (SILVA et al., 2002). Devido a sua econômica fonte de proteínas e interessantes propriedades funcionais, a soja tem sido utilizada como importante alimento, também em escala industrial. No entanto, a aceitação de alguns produtos protéicos de soja, é limitada pela questão do sabor. Quando a soja é macerada em água e moída de maneira convencional, a degradação oxidativa de ácidos graxos desenvolve sabor de feijão verde (“beany flavor”) ou gosto amargo (“off flavor”). (KOBAYASHI, 1995). Esta oxidação de lipídios é um fenômeno comum em sementes oleaginosas e em seus produtos derivados. Sabe-se que este fenômeno é facilitado ou catalisado por vários fatores como luz, oxigênio, temperatura, umidade, microrganismos, íons metálicos e enzimas; particularmente as lipoxigenases, estão entre os catalisadores mais importantes (ST. ANGELO et al, 1979).

As enzimas lipoxigenases (linoleato: O₂ oxirredutase, EC 1.13.11.12), presente em grandes quantidades nos grãos de soja, catalisam a hidroperoxidação de ácidos graxos polinsaturados, livres ou esterificados, possuidores do grupamento cis, cis-1,4-pentadieno. Três isoenzimas, com comportamentos cinéticos distintos, estão presentes no grão de soja, lipoxigenase-1 (LOX-1), lipoxigenase-2 (LOX-2) e lipoxigenase-3 (LOX-3). A atividade catalítica destas isoenzimas, principalmente sobre o ácido linoléico do grão, é a principal fonte de hidroperóxidos (SELL, 1988). Estes hidroperóxidos, por sua vez, decompõem-se em ácidos, aldeídos e cetonas de cadeia curta (LEONI et al, 1985). Estes compostos carbonílicos limitam a utilização dos produtos protéicos de soja, por conferir-lhes sabores indesejáveis.

Diversos métodos químicos e físicos tem sido utilizados para inativação da LOX, porém estes também alteraram as propriedades físicas, funcionais, nutricionais, podendo acrescentar sabores estranhos, ou encarecer o produto final.

Uma das alternativas viáveis para melhoria dos derivados da soja é a eliminação genética das LOX. Os programas de melhoramento genético da soja estão introduzindo alelos recessivos para as isoenzimas LOX-1, LOX-2 e LOX-3 em cultivares comerciais. A secção de leguminosas do INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS (IAC), vem desenvolvendo um trabalho de melhoramento genético da qualidade da soja, visando obter variedades com atividade de lipoxigenase bastante reduzida.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

O presente trabalho objetivou a identificação e determinação da atividade de lipoxigenases em diferentes linhagens de soja, oriundos do programa de melhoramento genético do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), através de diferentes métodos.

2.2. Objetivos específicos:

- Identificar as isoenzimas LOX através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS;
- Determinar a atividade enzimática utilizando substratos específicos para cada isoenzima através de testes espectrofotométricos e colorimétrico;
- Determinar a atividade enzimática das isoenzimas através da reação baseado na cooxidação do β -caroteno pelas isoenzimas;
- Verificar o resultado dos cruzamentos e retrocruzamentos realizados pelo IAC nas diferentes linhagens.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1-Proteínas da Soja

As proteínas da soja são classificadas de acordo com seu coeficiente de sedimentação em 15S, 11S (glicinina), 7S (β -conglucina), e 2S (HERMANSSON, 1978). (Tabela 1).

O trímero correspondente a fração 7S 140-170 KDa é formado a partir de varias combinações das três subunidades (α , α' , β) (BADLEY et al., 1975), mantidas através de ligações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio. O peso molecular das subunidades α , α' , β pode variar de 57-76 KDa; 57-83 KDa e 42-53 KDa respectivamente (ARRESE et al., 1991). A β -conglucina corresponde a mais de 90% da fração 7S e normalmente é encontrada na forma de dímero. (THANH; SHIBASAKI, 1976). A fração 11S é formada por seis subunidades compostas de cadeias polipeptídicas ácidas e básicas unidas por ligações dissulfeto intermoleculares, apresentando peso molecular (PM) corresponde a 320-350 Kda, com polipeptídios básicos com PM entre 19-22 KDa e polipeptídios ácidos com 34-45 KDa (BADLEY et al., 1975). A fração 2S é constituída por inibidores de tripsina, lectinas, e LOX. A LOX perfaz um total de aproximadamente 2% das proteínas totais do grão de soja. (OOMAH, 1994). Estas LOX são as principais responsáveis pela limitação de alimentos à base de soja (KITAMURA, 1983).

Tabela 1. Quantidade relativa e composição das frações protéicas da soja

Fração	% do total	Componentes	Peso molecular
2S	22	Inibidores de tripsina	8.000-21.000
7S	37	Citocromo C	12.000
		Hemaglutinina	110.000
		Lipoxigenases	100.000
		β -amilase	67.700
11S	31	7S-Globulina	180.000-210.000
		11S-Globulina	350.000
15S	11	_____	600.000

* Wolf e Cowan (1975) *apud* Hermansson

3.2. Lipoxigenase

As LOX estão presentes em grande variedade de tecidos animais, como aves, peixes e mamíferos (GERMAN; KINSELLA, 1985; GROSSSMAN et al, 1988; HSIEH et al, 1988), e estão envolvidas no passo inicial da biossíntese do ácido araquidônico e de compostos ativos fisiologicamente, como leucotrienos e lipoxinas (NAVARATNAM et al, 1988; KULKARNI; COOK, 1988). Também em tecidos vegetais, tais como folhas (alfafa), sementes (cevada, abóbora, oliveira, girassol, milho, soja), frutos (maçã, tomate), tubérculos (batata). NIELSEN et al (2003), detectaram e analisaram compostos de aroma, decorrentes da ação da LOX em alho cortado não branqueado. PÉREZ et al (1999) verificaram LOX em morangos.

Dentre as plantas, a semente de soja é a fonte mais rica das enzimas (Figuras 1 e 1a), representando cerca de 2% do total de proteínas contidas no grão (AXELROD, 1974).

Na soja as LOX 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 de feixe vascular da nova planta (VERNOOY-GERRITSEN, et al., 1984).

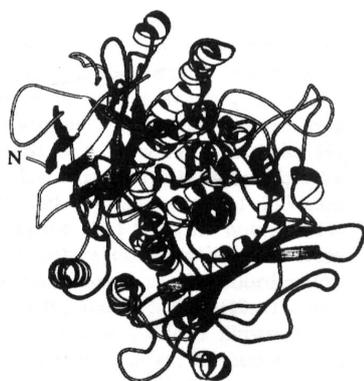


Figura 1. Estrutura tridimensional da LOX



Figura 1a. Estrutura tridimensional da LOX

Da semente de soja já foram isoladas quatro isoenzimas LOX, denominadas LOX-1, LOX-2, LOX-3 e LOX-3a. Entretanto, há grande similaridade entre as lipoxigenases 3 e 3a (AXELROD, et al, 1981), por essa razão, parece que qualquer diferença entre LOX-3 e LOX-3a resulta de modificação pós-tradução, não refletindo origens de *loci* genéticos distintos. Por enquanto a maioria dos pesquisadores a associam aos cotilédones de soja apenas três isoenzimas: LOX-1, LOX-2 e LOX-3 (HILDEBRAND, 1988, citados por LANNA, 1995). São proteínas globulares, solúveis em solução salina e consistem em uma cadeia polipeptídica simples, de peso molecular em torno de 100Kda (HILDEBRAND; HYMOWITZ, 1981; AXELROD et al., 1981), sendo destacados o peso molecular das isoenzimas: 94,038 (LOX1), 97,053 (LOX2) e 96,857 (LOX3); os pontos isoelétricos: 5,68, 6,25 e 6,15 respectivamente (Tabela1) (LANNA, 1995; ISLAS-FLORES, et al., 2002). São dioxigenases, contendo um mol de ferro em um grupamento não-heme, por mol de proteína (VLIEGENTHRT et al., 1979), ligado covalentemente à cadeia protéica da enzima, sendo essencial à sua ação catalítica (FEITERS et al., 1986).

Tabela 2. Características das isoenzimas LOX de sementes de soja

Isoenzimas	L1	L2	L3
PM	94,038	97,053	96,857
PI	5,68	6,25	6,15
PH ótimo	9.5	6.5	5,0 – 9,0
Especificidade pelo substrato	Ácidos graxos ionizados	Ácidos graxos não ionizados	Ácidos graxos não ionizados
Especificidade pelo produto	95:5 13 HPO/9HPO	50:50 13HPO/9 HPO	65:35 9HPO/13 HPO
Estabilidade	Alta	Baixa	Média
Reações secundárias	Média	Baixa	Alta

* LANNA, 1995

3.2.1. Sabor e qualidade

A atividade da LOX tem sido associada à diminuição da qualidade de vários produtos, e desperta o interesse de muitos cientistas, devido ao seu papel na gênese de compostos voláteis e na formação de radicais livres os quais podem atacar outros constituintes tais como vitaminas, compostos fenólicos e proteínas. Provocando o aparecimento de “off-flavors”, particularmente em produtos de soja. (DONNELLY e ROBINSON, et al., 1995).

Os compostos responsáveis pelo sabor e odor desagradáveis não estão presentes no grão intacto, mas aparecem quando os grãos são rompidos colocando a enzima em contato com o substrato (SESSA, et al 1969). Durante a estocagem, a ativação da LOX tem sido o primeiro passo na via de formação de compostos do “flavor” e aroma, demonstrando uma grande contribuição no desenvolvimento de sabores indesejáveis (BARRET; THEERAKULKAIT, 1995; LIU, 1999). A ativação da LOX, pelo aumento da umidade durante o tratamento térmico, origina a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados, principalmente os ácidos linoléico e linolênico (MUSTAKAS, 1969).

RIDOLFI et al (2002), caracterizaram LOX em alguns cultivares de oliva e verificaram alta atividade desta nos cultivares. Observaram também que nestes cultivares a concentração de compostos que contribuem para o aparecimento de “off flavor” (aldeídos, cetonas e álcoois), era maior quando comparados a outros cultivares com atividade de LOX diminuída.

KURIBAYASHI et al (2002), purificaram LOX a partir do cogumelo (*Pleurotus ostreatus*), verificando associação direta com a formação de subprodutos (1-octeno-3-ol) responsáveis pelo aroma no cogumelo.

NIELSEN (2003) detectaram e analisaram compostos de aroma, decorrentes da ação da LOX em alho cortado não branqueado.

De acordo com HSIEH et al., (1981), existem dois grupos principais de sabores em produtos de soja. Um deles é composto pelos voláteis, responsáveis pelos sabores “gramíneos” (grassy) e de “feijão cru” (beany); o outro, pelos compostos não voláteis, responsáveis pela adstringência e pelo gosto amargo.

O sabor de “feijão cru” é normalmente referido como proveniente, principalmente, da degradação oxidativa de ácidos graxos pela ação das LOX (WOLF, 1975). Utilizando a fração volátil do extrato de soja (obtido após a hidratação dos grãos por duas horas a 40°C e a trituração a 25°C), WILKENS; LIN (1970), através de cromatografia a gás, detectaram 80 picos, sendo 41 compostos identificados, possuindo a maior parte deste sabor indesejável. Isolaram, hexanal, hexanol, etil vinil cetona e 2-pentil furano, todos os quais tendo odores “gramíneo” e de “feijão cru”. Estudos de GOOSSENS (1974), demonstraram que o gosto amargo, é formado por deterioração oxidativa de aminoácidos e por hidrólise enzimática. FUJIMAKI, et al. (1965), demonstraram que o n-hexanal, produto secundário, derivado da hidroxidação do ácido linoléico, é o principal responsável pelo “gosto amargo e aroma de feijão cru” em produtos de soja. Sendo a LOX-2 a principal enzima responsável pela geração do hidroperóxido n-hexanal em produtos derivados da soja (MATOBA, et al., 1985).

NISHIBA; SUDA (1998) realizaram estudos em cultivares de soja com padrão triplo nulo (-LOX) e triplo positivo (+LOX), verificando que nos cultivares triplo nulo a degradação de vitamina E, Vitamina C e luteína, foi menor que nos cultivares com presença das três isoenzimas. Assim as sementes isentas destas isoenzimas além de

possuírem caracteres sensoriais superiores, ainda demonstraram maior qualidade nutricional.

As LOX produzem hidroperóxidos responsáveis pela redução do valor nutritivo dos alimentos, ocorrendo também destruição de carotenóides, retinol, tocoferóis, ácido ascórbico, além de proteínas e aminoácidos. A interação destes produtos da degradação com peptídeos e aminoácidos, provocam escurecimento dos produtos e comprometimento do seu valor nutricional. (GARDNER, 1988).

JARÉN-GALÁN; MINGUEZ-MOQUERA (1999), realizaram estudos “in vitro” com pimenta, à 20°C, onde 30% dos pigmentos carotenóides foram destruídos após 24 horas de reação. A quantidade de 2,5% foram destruídos devido a autooxidação de pigmentos, 4,5% pela oxidação induzida pela presença de ácido linoléico, e 22% pela presença da LOX e produtos de reações catalisadas por estas isoenzimas.

3.2.2. Mecanismo de Ação

No reino vegetal operam, fundamentalmente, quatro sistemas enzimáticos para a modificação oxidativa dos ácidos graxos: α -oxidação, β -oxidação, ω -oxidação e os sistema da LOX. Em geral, pode-se dizer que os três primeiros carecem de uma especificidade em relação ao substrato. O sistema LOX ao contrário, apresenta uma alta especificidade para os ácidos graxos polinsaturados com estrutura cis, cis-1,4-pentadieno (SANZ et al., 1992).

Essas enzimas catalisam a hidroperoxidação de ácidos graxos contendo estes grupos cis-cis 1,4 pentadieno. (CARVALHO, et al., 1999). As LOX compreendem uma classe de dioxigenases contendo ferro não heme, os quais oxida ácidos graxos

insaturados para ácidos hidroperóxidos conjugados. MACCARRONE et al., (1991)
Essas enzimas são distribuídas em plantas e animais. (TAKAMURA, et al., 1991).

De acordo com AXELROD et al., (1981), todas as substâncias ligadas a lipídios que possuam um ou mais grupos cis-cis 1,4 pentadieno como ácidos graxos de cadeia longa, ésteres, fosfolipídios, álcoois, glicerídios, álcoois sulfatados e hidroxamatos podem ser utilizados como substratos de LOX. Todas as LOX catalisam reações secundárias.

As enzimas LOX, operam distintamente no sistema, sendo a LOX-1 uma enzima muito caracterizada, possui atividade ótima em torno de pH 9,0, enquanto que a LOX-2 e LOX-3 em pH 6,5 e 7,0 respectivamente (WHITAKER, 1991). As três isoenzimas LOX possuem ligeiras diferenças quanto ao substrato específico. A LOX-1 tem maior atividade com o ácido linoléico em um pH de 9,0, a LOX-2 com o ácido araquidônico, e a LOX-2 e LOX-3 com o metil linoleato (AXELROD, et al., 1981). A LOX-1 pode reagir com o linoleil sulfato solúvel em água, visto que LOX-2 e LOX-3 possuem atividade limitada para este substrato. (BILD, et al. 1977).

A ação das LOX sobre esses substratos pode proceder-se aeróbica ou anaerobicamente (GALLIARD; CHAN, 1980; KLEIN et al., 1984). Em meio aeróbico, a reação de LOX com ácido linoléico produz radicais que podem formar dímeros, ácidos oxodienóicos e pentano (VLIEGENTHART, et al, 1979), catalisam a hidroperoxidação de ácidos graxos polinsaturados livres ou esterificados que contenham grupos cis,cis-1,4 pentadieno, utilizando o oxigênio molecular e produzindo 9 ou 13-cis, transidroperóxidos que se decompõem em ácidos, aldeídos, cetonas e álcoois de cadeia carbônica curta (HSIEH et al., 1981; LEONI et al., 1985, MATOBA et al., 1986) (Figura 2).

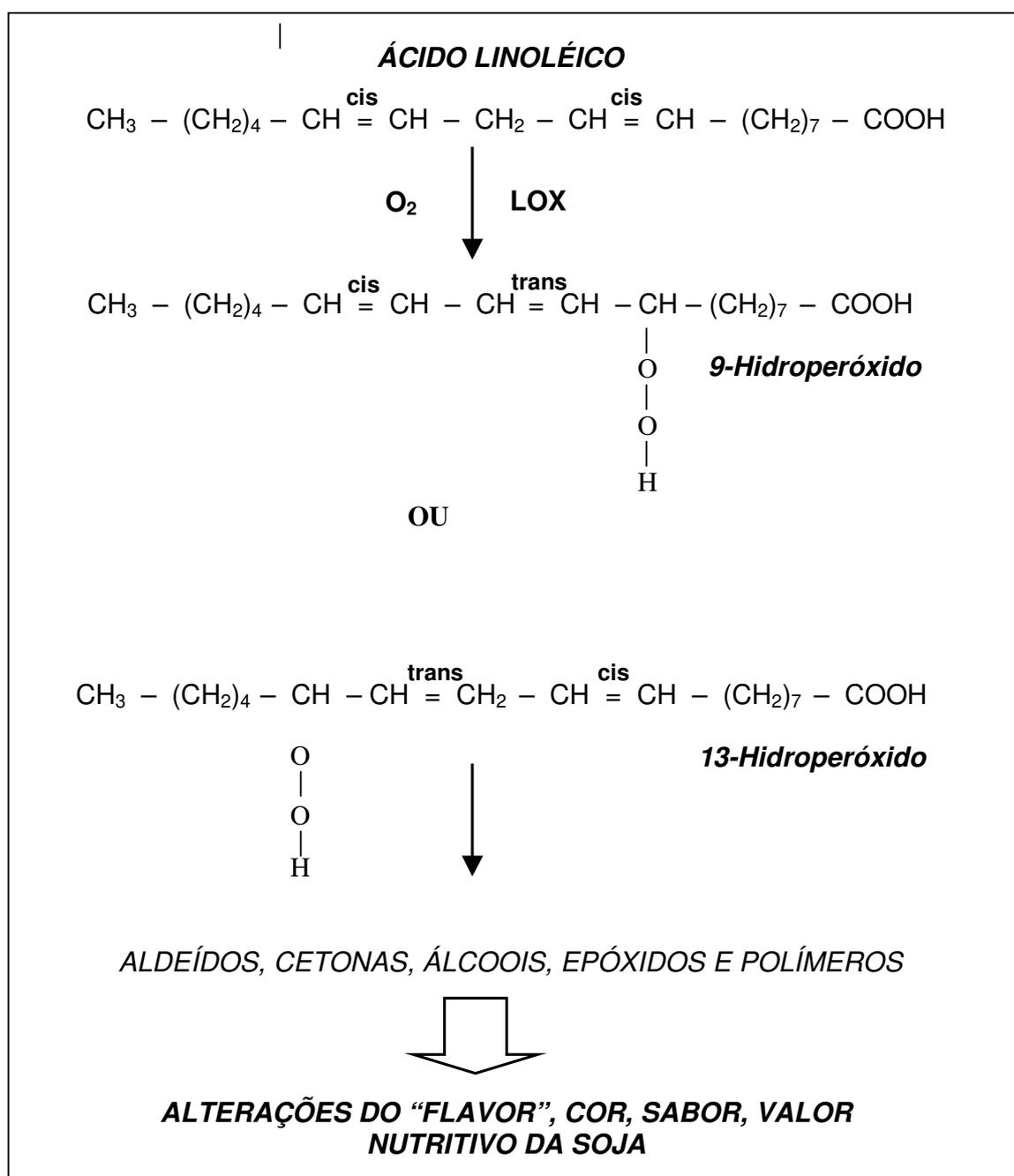


Figura 2 – Esquema geral da reação catalisada pela LOX sobre o ácido linoléico (SIFDOW, 1991).

Hidroperóxidos de ácidos graxos são produtos da oxidação catalisada pela LOX, os quais subseqüentemente podem ser convertidos química ou enzimaticamente em produtos de oxidação secundária. (WHITAKER, 1991).

Três passos são assumidos para a formação de hidroperóxidos: (1) ativação da enzima inativa, (2) remoção de um próton a partir do grupo metileno ativado e (3) inserção de O_2 na molécula de substrato com formação do hidroperóxido (Figura 3).

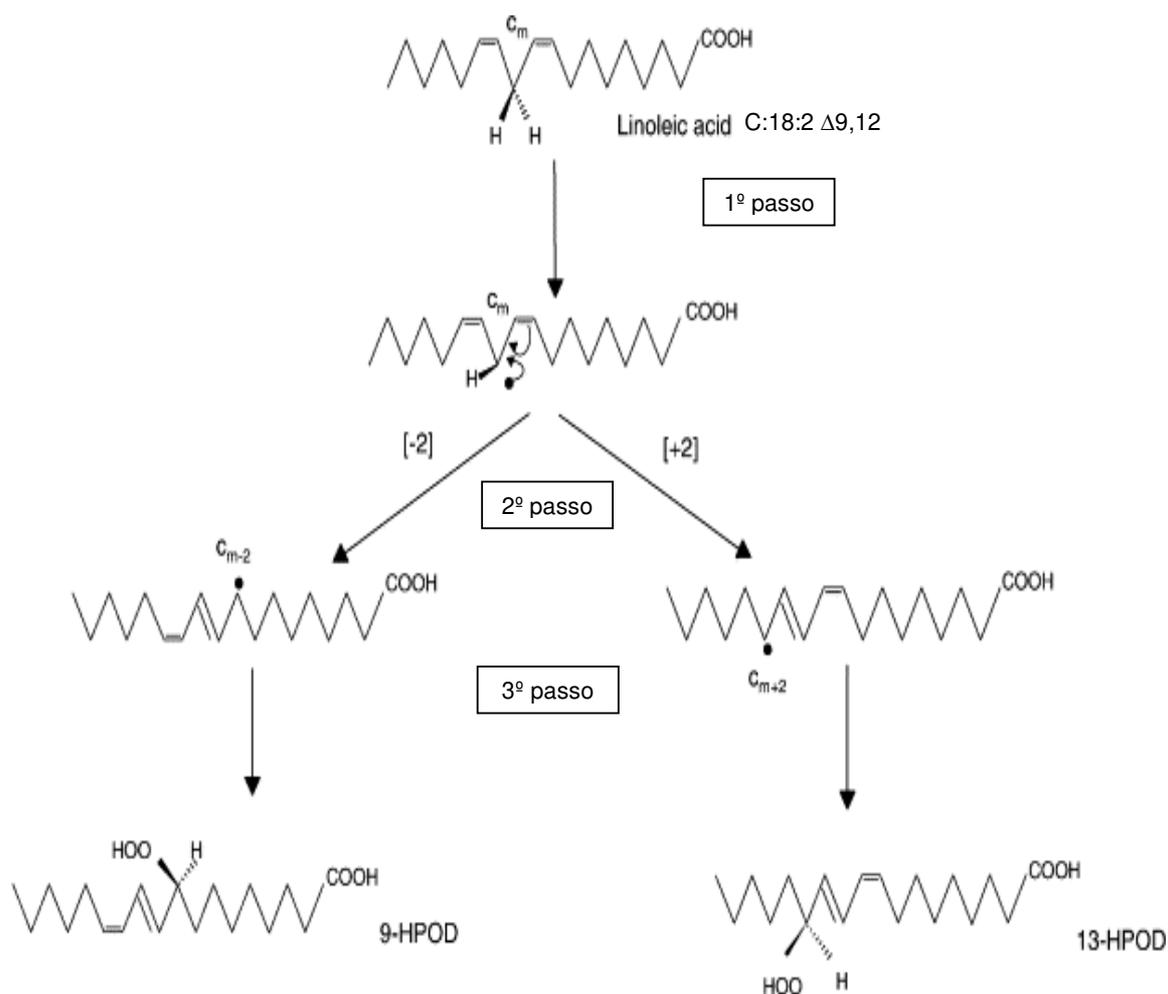


Figura 3. Esquema geral da hidroxilação do ácido linoléico pelas LOX (GILBERT; CARMONA, 2002).

O ferro da enzima nativa existe predominantemente na forma Fe^{2+} , os quais não afeta a dioxigenase, em consequência é improvável que esta forma catalise a hidroperoxidação (FEITERS et al., 1985; PETERSSON et al., 1985). A forma Fe^{3+} tem sido associada a ativação da LOX, e responsável por iniciar a reação de hidroperoxidação (BOYINGTON et al., 1993). Como a concentração de LOX-Fe^{3+} é muito pequena (aproximadamente 1%), a proporção inicial de catalise é também muito pequena (SLAPPENDEL et al., 1981). (Figura 4)

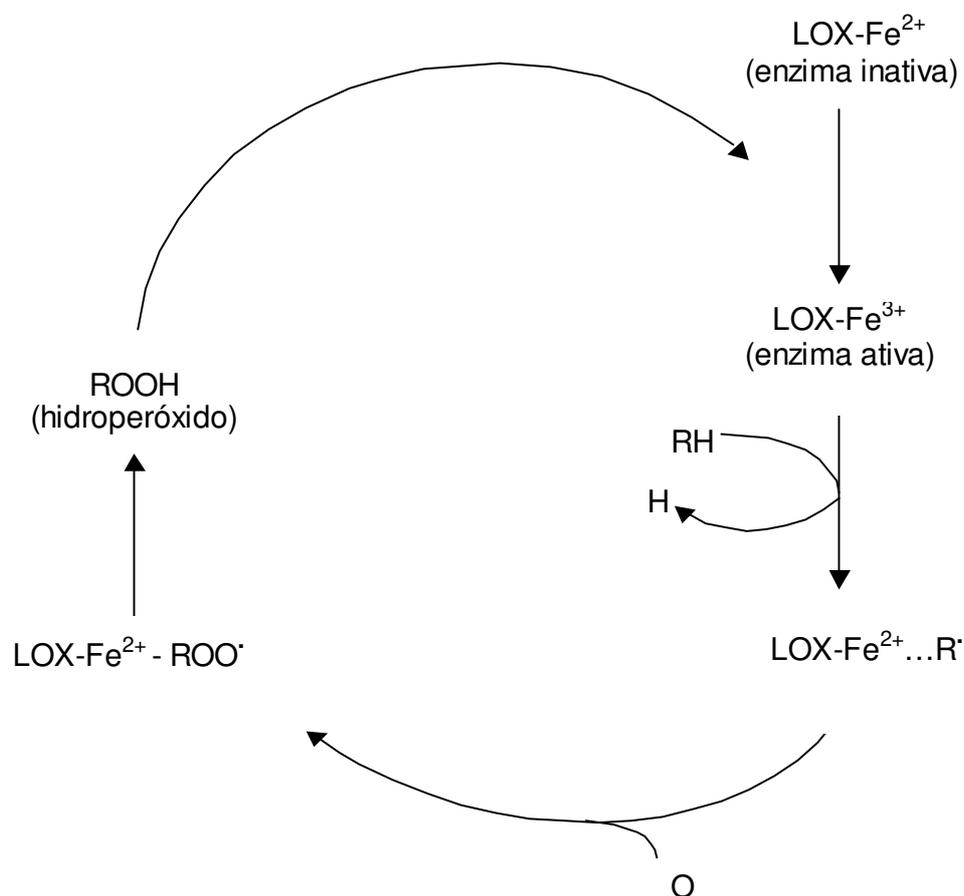


Figura 4. Mecanismo proposto para a reação primária da LOX (KLEIN et al, 1985)

A forma LOX-Fe³⁺ pode complexar com seis ligantes. Quatro destes ligantes são átomos de nitrogênio (N) da histidina e oxigênio da isoleucina (NAVARATNAM et al., 1988; BOYINGTON et al., 1993; CHIKERE et al., 2000). Os outros dois ligantes são a dupla ligação na molécula de substrato e a molécula de oxigênio (GARDNER, 1988).

Figura 5 .

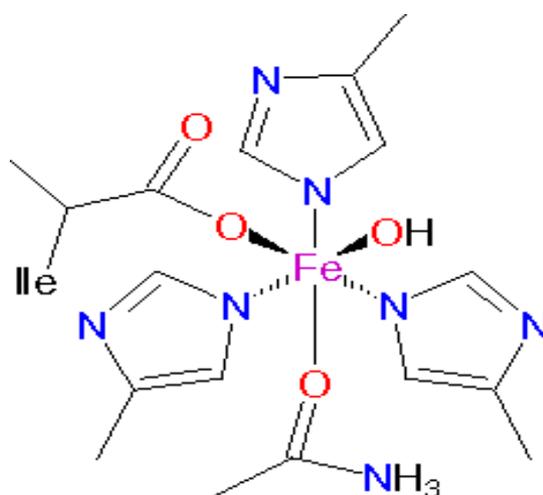


Figura 5. Estrutura química geral da LOX em sementes de soja (NELSON; SEITZ, 1994)

A forma inativa Fe²⁺ pode ser oxidada à Fe³⁺, e a reação inicial aumenta pelo hidroperóxido formado, tais como 13-hidroperóxido (13-HPO) pela LOX-1. A falta de produtos análogos, hidroperóxidos, tais como hidróxidos, hidroperóxidos na longa cadeia acil ou água oxigenada, limitam o aumento da hidroxidação (GIBIAN; GALAWAY, 1976; VELDINK; VLIAGENTHART, 1984). Então a longa cadeia e o grupo hidroperóxido são cruciais para inicialização da atividade enzimática (GIBIAN; GALAWAY, 1976). No entanto, somente o hidroperóxido formado pode afetar a cinética.

O segundo passo (Figura 3) envolve a retirada do hidrogênio a partir da molécula de substrato complexada com a enzima, para formar o radical livre (CHEESBROUGH; AXELROD, 1983; VELDINK; VLIGENTHART, 1984).

Durante o terceiro passo (Figura 3) o oxigênio pode ser introduzido estereoespecificamente, então o radical peróxido finalmente recaptura um átomo de hidrogênio (HAMBERG; SAMUELSSON, 1967). A inserção do oxigênio molecular é posicionalmente específica, visto que a oxidação do ácido linoléico pela LOX de plantas pode-se localizar no carbono-9 (à esquerda do esquema na Figura 2) e/ou carbono-13 (à direita do esquema na Figura 2). A LOX-1 produz uma quantidade exclusiva de 13-HPO quando o ácido linoléico foi usado como substrato em condições de pH 9,0 e temperatura de 0°C (ROZA; FRANCKE, 1973), ao passo que a temperatura de 25°, pequenas quantidades de 9-hidroperóxido (9-HPO) foi detectada. No entanto uma grande quantidade de 9-HPO foi formada em baixos valores de pH na mesma temperatura, indicando uma correlação entre a quantidade de 9-HPO formado e a diminuição do pH (GARDNER, 1989; MARCZY, et al, 1995).

Nestas condições não são formados radicais. O aparecimento de radicais pode resultar de reações anaeróbicas e atividade de algumas hidroperoxidases e LOX (VICK; ZIMMERMAN, 1987a), ou alternativamente, clivagem homolítica para formar radicais lipoxis (DONNELLY; ROBINSON, 1995). O mecanismo de reação anaeróbica foi sugerido por VLIEGENTHART et al. (1979) de acordo com a Figura 6, onde a enzima férrica (Fe^{2+}) é reduzida pelo ácido linoléico a enzima ferrosa (Fe^{3+}), a qual, por sua vez, é oxidada pelo ácido 13-HPO linoléico. Essa reação catalisada pela LOX-1, se processa até que um dos dois substratos seja consumido. Entretanto, independente das proporções molares iniciais dos dois substratos, 50% dos hidroperóxidos (HPO)

consumidos são convertidos em ácidos oxodienóicos, pentano e alguns dímeros (C18-C18). A LOX-3 catalisa a formação de ácidos oxodienóicos assim como dímeros e outros produtos. Diferentemente LOX-1 e LOX-3 catalisam estas reações na presença ou ausência de O₂ desta forma esses produtos podem aparecer logo que iniciar a oxigenação primária. A LOX-2 gera muito pouco cetodieno na presença ou ausência de O₂ e suas reações secundárias não são prevenidas por baixas temperaturas, em contraste com as da LOX-1 que são suprimidas a 4°C. A LOX-2 catalisa a formação de outros produtos secundários além de cetodienos. Assim são formados substanciais quantidades de derivados do ácido prostanóico.

Os HPO, produtos da LOX, são moléculas muito reativas os quais são rapidamente transformadas em outros compostos, servindo como substratos para diferentes enzimas específicas, dentre as quais hidroperóxido liase, peroxigenase, hidroperóxido redutase, que também contribuem para a formação do “off flavor” em produtos de soja (VICK; ZIMMERMAN, 1987; BLÉE, 2002).

Além de HPO, ácidos graxos cetodienóicos tem sido detectados e identificados em um grande grupo de produtos oriundos da oxidação do ácido linoléico ou araquidônico após a incubação com LOX-1 da ervilha (KUHN, et al., 1991), e do ácido linoléico com LOX-2 e LOX-3 também da ervilha (WU et al., 1999).

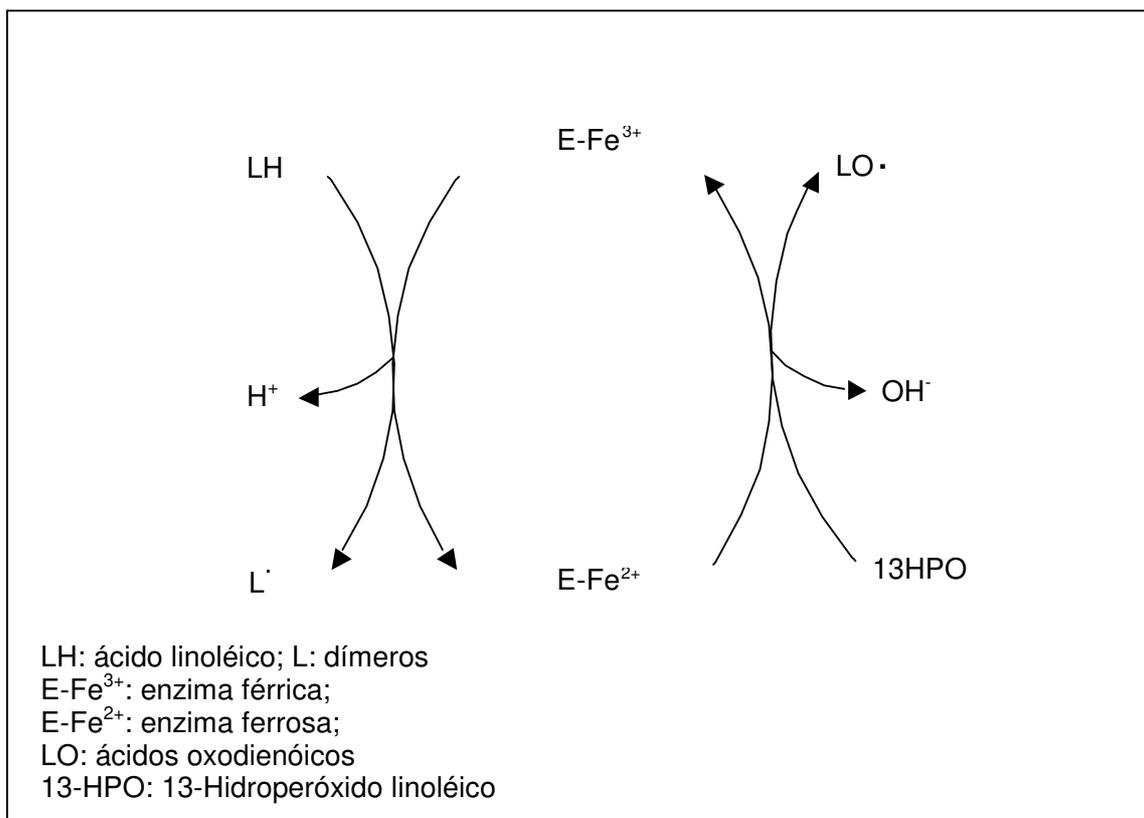


Figura 6. Mecanismo de reação anaeróbica entre o ácido linoléico e o ácido 13-HPO linoléico catalisada pela LOX da soja (VLIEGENTHART et al., 1979)

Os produtos da oxidação primária catalisada pelas LOX podem ser degradados em uma variedade de sub-produtos, incluindo diferentes aldeídos, cetonas e álcoois, muitos os quais são responsáveis pelos "off-flavors" (MacLEOD; ARMES, 1988). Frente a ação de hidroperóxido liases e isomerases no carbono-9 e carbono-6, compostos do aroma característicos podem ser formados.

3.2.3. Métodos de Análise das LOX

3.2.3.1. Método Imunoquímico ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Este método possui alta sensibilidade, é muito utilizado na seleção de sementes de plantas em segregação, permitindo a identificação de genótipos em heterozigose (SELL, 1988).

3.2.3.2. Método baseado no consumo de oxigênio

Este método determina o consumo de oxigênio pelo substrato, na presença da enzima. Permite a utilização tanto do extrato bruto quanto do extrato purificado (GROSSMAN; ZAKUT, 1978). Apresenta restrições, pois a absorção de oxigênio não é restrita à atividade da LOX, além do que esta metodologia é insuficiente para LOX-2 e LOX-3, pois não fornece um bom relacionamento estequiométrico. Com LOX-2 na presença de ácido linoléico, os resultados ainda, podem ser fidedignos, mas o relacionamento estequiométrico não é estritamente linear e é fortemente influenciado pela concentração do substrato. Se o ácido araquidônico for usado com LOX-2 a estequiometria torna-se ainda mais problemática (GROSSMAN; ZAKUT, 1978).

3.2.3.3. Método do tiocianato férrico

Este método colorimétrico é baseado na coloração dos hidroperóxidos produzidos pela reação enzimática com o tiocianato medindo o aumento da absorbância a 480nm, com a interrupção da reação enzimática, antes da leitura, pela adição de etanol (SUMNER, 1943; KOCH, 1958). Possui a desvantagem que a cor vermelha, produzida quando o tiocianato férrico é formado, é muito sensível à variações de concentração (HOLMAN, 1955).

3.2.3.4 – Formação de dienos conjugados

Método espectrofotométrico que mede o aumento na absorção no ultra-violeta, em 234 nm, em função da formação do dieno conjugado (Figura 6), que é proporcional ao tempo de concentração da enzima. É um método simples e rápido, mas requer soluções opticamente translúcidas (BEM-AZIZ et al 1970; GROSSMAN; ZAKUT, 1978; FORNAROLI, et al., 1999). (Figura 7)

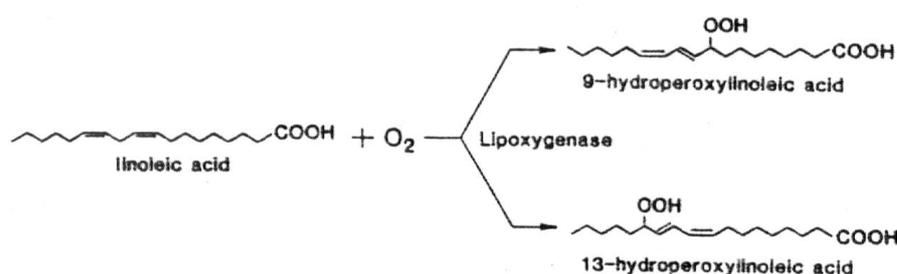


Figura 7. Formação de dienos conjugados baseados na ação da LOX sobre o ácido linoléico

3.2.3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A técnica consiste, basicamente, na utilização de um gel formador de camadas com 4,5% de acrilamida e 0,1% de SDS em Tris-HCl pH7,0 e um gel de separação, formado com 9% de acrilamida em Tris-HCl pH8,5. A separação das isoenzimas se dá pela diferença de peso molecular e pode ser observada em bandas específicas no gel. A revelação do gel é feita com Comassie Brilliant Blue G-250 (KITAMURA 1984; KITAMURA et al., 1983).

3.2.3.6. Métodos Colorimétricos

3.2.3.6.1. Método espectrofotométrico baseado no descoloramento de caroteno

Na reação de co-oxidação ocorre a retirada de um átomo de hidrogênio do carotenóide, resultando na formação de radicais que pode se combinar com o oxigênio

para formar compostos carbonilas (KLEIN et al, 1985). Esses produtos podem tanto pela decomposição quanto pela condensação de radicais formar dímeros ou grandes polímeros (CABIBEL; NICOLAS, 1991). Um mecanismo envolve a saída de um radical peróxido pela ação da enzima os quais pode então atacar o carotenóide, presumivelmente na posição adjacente à dupla ligação. A segunda possibilidade é que ocorra uma espécie de oxidação formando uma ligação enzima + hidroperóxido. O terceiro mecanismo pode ser a geração de radicais livres em uma reação catalisada pela via anaeróbica das LOX. De qualquer forma no mecanismo primário, o efeito gerado pela ligação do carotenóide contendo um radical livre, pode então reagir com o oxigênio para clivar a dupla ligação adjacente formando dois fragmentos carbonil. Em adição o descoloramento do caroteno leva a formação de moléculas aromáticas (WU et al., 1999). (Figura 8)

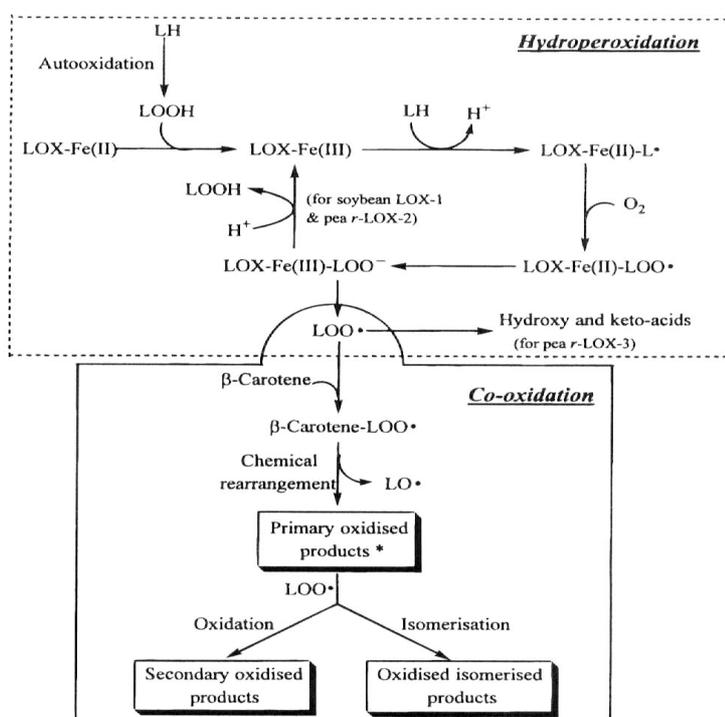


Figura 8. Mecanismo de co-oxidação acoplada do β -caroteno pelo pela LOX-3 da soja

3.2.3.6.2. Método visual baseado na reação da LOX com β -caroteno e azul de metileno

Método rápido e prático, onde se faz necessário a utilização de amostras de cultivares com presença somente de uma das isoenzimas. Baseia-se na atividade decolorante das isoenzimas sobre o substrato ácido linoléico e co-oxidação com o azul de metileno e β -caroteno, a partir de produtos formados pela reação enzima-substrato com formação de radicais peroxil que interagem com os indicadores azul de metileno e β -caroteno, ocorrendo descoloramento (SUDA et al., 1995).

3.2.3.6.3. Método espectrofotométrico baseado na reação de subprodutos da ação da LOX com MBTH e DMAB

ANTHON e BARRET (2001), desenvolveram um método de determinação da atividade enzimática de LOX. Simples e rápido, o método se baseia na detecção de LOX a partir de produtos da reação com o ácido linoléico. Os hidroperóxidos formados, se ligam com 3-metil-2-benzotiazolina (MBTH) e 3-(dimetil-amino) ácido benzóico (DMAB). A leitura, realizada espectrofotometricamente a 590nm. Este método não discrimina o tipo de LOX.

3.2.4. Métodos para Inativação da LOX

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

TANGWONGCHAI, et al., (2000), demonstraram que LOX em ambos tampões citrato-cosfato e tris, foram estáveis a temperatura ambiente, mas quando submetidas ao tratamento utilizando alta pressão a 400Mpa por 10 min, a atividade foi diminuída com agregação envolvendo ligações dissulfeto, e diminuindo ainda mais com pasteurização a 600Mpa por 10 min. Foi totalmente destruída após tratamento a 600 Mpa por 20 min, resultando em grande diminuição das concentrações de hexanal, cis-3-hexanal, e trans hexanal. O efeito do tratamento foi analisado por eletroforese-PAGE.

Com a utilização de vapor de água à pressão atmosférica foi possível criar condições ótimas para inativação da LOX dos grãos de soja, sendo que o tempo necessário para a inativação diminuiu à medida que o teor de umidade dos grãos aumentou. (RICE et al., 1981).

CLAPP, et al., (2002), realizaram ensaios utilizando concentrações micromoleculares de tiols hidrofóbicos diferentes sobre a LOX-1, observando uma inativação irreversível, através de um mecanismo que envolve oxidação e sulfuração.

A aplicação de alta pressão hidrostática aos grãos de soja levou à redução parcial da atividade da LOX, avaliada no extrato hidrossolúvel. Quando associada ao tratamento térmico a 50°C, observou-se inativação (SOBREIRO L.G, 2001).

Os vários tratamentos propostos para inativação do LOX 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 (HILDEBRAND; HYMOWITZ, 1981; KITAMURA et al, 1983; KITAMURA, 1984; HILDEBRAND; KITO, 1984, DAVIES; NIELSEN, 1986; 1987; GILABERT; CARMONA, 2002).

Assim, a obtenção de cultivares com ausência de LOX, por manipulação genética, é uma alternativa viável, na tentativa de minimizar os problemas de sabor e odor dos derivados da soja.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido nos Laboratórios de Análise de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos.

4.1. Procedência dos grãos de soja

O material genético utilizado neste trabalho (Figura 9) foi fornecido pelo Instituto Agronômico de Campinas. Os padrões isentos de LOX-1, LOX-2 e LOX-3 foram fornecidos pelo Laboratório de proteínas do Departamento de Bioquímica aplicado a Agronomia – BIOAGRO - da Universidade Federal de Viçosa - UFV. O padrão triplo nulo BRS-213, foi fornecido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA.



Figura 9. Sementes de soja das diferentes cultivares e linhagens estudadas

Foram utilizadas sementes de soja *Glycine max*, da cultivar IAC-8 (comercial), das mutantes PI-408251 (-L₁), PI-86023 (-L₂), TOHOKU nº 74 (-L₃), e das linhagens provenientes da quarta geração do primeiro retrocruzamento (F₄) dos mutantes isentos das respectivas LOX com o cultivar comercial IAC-8.

As sementes oriundas do Japão com genótipo recessivo para LOX-1, LOX-2 e LOX-3 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 a cultivar IAC-8 e viabilizasse as hibridações, que foram realizadas de forma que a IAC-8 sempre fosse o parceiro feminino do cruzamento (Figura 10)

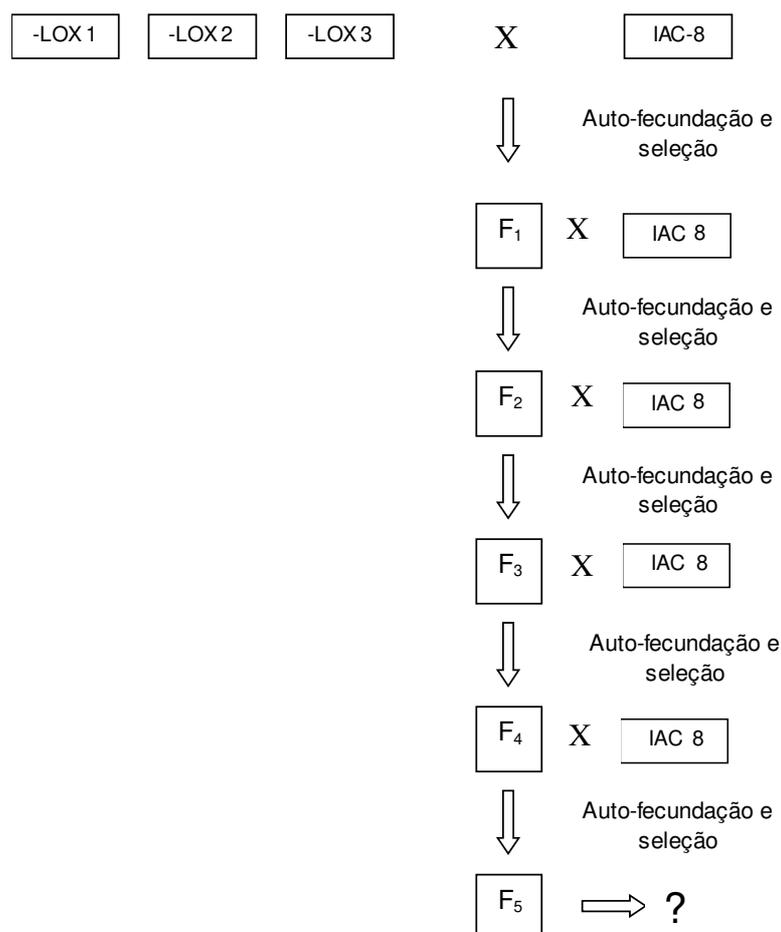


Figura 10. Esquema dos cruzamentos e retrocruzamentos realizados pelo IAC

A geração F₁ foi auto-fecundada, dando na geração F₂ a proporção de uma planta com ausência de LOX para três com a referida enzima. As plantas F₂ foram avaliadas em condições de campo e quanto às necessidades agronômicas e em laboratório para atividade enzimática. As plantas selecionadas com o caráter “ausência de LOX” foram semeadas em casa de vegetação e hibridadas com o cultivar IAC-8 constituindo-se o primeiro retrocruzamento. Após a auto-fecundação obteve-se a geração F₃ que sofreu nova avaliação e seleção. Estas já apresentando ausência de LOX, foram plantadas e auto-fecundadas em casa de vegetação. A geração F₄, plantada em linha de campo foi avaliada, selecionada e hibridadas novamente, resultando na geração F₅, denominadas IAC 97-3503, IAC 97-3512, IAC 97-3545, IAC 00-3803, supostamente isentas de LOX-1, LOX-2, LOX-3 (Figura 9).

4.2. Composição Centesimal

4.2.1. Determinação de proteínas

Reagentes/Soluções:

- Ácido sulfúrico concentrado MERCK;
- Mistura catalisadora (95g de sulfato de potássio MERSE e 5g de sulfato de cobre MERSE);
- Hidróxido de sódio 50% NUCLEAR;
- Ácido bórico 2% MERSE;
- Indicador de Anderson: solução de vermelho de metila MERCK (0,10g de vermelho de metila em 80ml de álcool etílico), solução de azul de metileno MERCK (0,10g de azul de metileno em 75ml de álcool etílico);
- Ácido clorídrico 0,02N MERCK.

Equipamentos:

- Bloco digestor TECNAL-Piracicaba-Brasil, modelo TE 40/25;
- Destilador semi-micro Kjeldahl TECNAL, modelo TE 036/1;
- Balança analítica SAUTER, modelo 424

A determinação de proteínas foi realizada segundo o método de semimicro Kjeldahl 1975, onde a matéria orgânica foi digerida em meio fortemente ácido na presença de catalisador, sendo o Nitrogênio orgânico fixado sob a forma de sulfato de amônia. Após a adição de um excesso de álcali o NH_4^+ destilado foi captado por uma solução titulada de ácido. Este método determina a matéria nitrogenada total de uma amostra. Para determinação da “proteína bruta” multiplicou-se o nitrogênio total encontrado pelo fator de conversão nitrogênio/proteína 6,25.

4.2.2. Determinação de Lipídios totais

Reagentes/Soluções

- Clorofórmio P.A. MERCK;
- Metanol P.A. MERCK;
- Sulfato de sódio P.A. SYNTH;
- Sulfato de sódio SYNTH, solução a 1,5% em água;

Equipamentos:

- Evaporador rotativo;
- Estufa FANEM-São Paulo Brasil, modelo 315E;
- Balança analítica SAUTER modelo 424.

A amostra foi homogeneizada com uma mistura de clorofórmio e metanol. Uma diluição e nova extração posterior com volumes determinados de clorofórmio e água.

Separou-se o sistema monofásico em duas camadas formando um sistema bifásico: camada clorofórmica mais pesada contendo lipídios; e a camada metanólica contendo água e os compostos não lipídicos. Desta forma, foi obtido um extrato lipídico purificado quando a camada clorofórmica foi isolada. (BLIGH e DYER, 1959).

4.2.3. Determinação de sólidos totais e umidade

Equipamentos:

- Estufa FANEM modelo 315E;
- Balança analítica SAUTER modelo 424;

Realizou-se evaporação de água presente no alimento e pesagem do resíduo não volatilizado (LEES, 1976).

4.2.4. Determinação de cinzas

Equipamentos:

- Bico de Bunsen;
- Forno de mufla FORNITEC-São Paulo-Brasil, modelo 1.994;
- Balança analítica SAUTER modelo 424;

Foi determinado o resíduo inorgânico após calcinação da matéria orgânica da amostra segundo LESS (1976).

4.2.5. Determinação de carboidrato

A partir da determinação das porcentagens de umidade, cinzas, proteína bruta e lipídios, obte-se as porcentagens de carboidrato por diferença.

4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

Equipamentos:

- Aparelho de eletroforese Bio Rad;
- Microcentrifuga SIGMA-Mensungen-Alemanha, modelo 2K15;
- Banho-maria TECNAL modelo TE 053;
- Balança analítica SAUTER modelo 424;

Soluções/Reagentes:

- Tris-HCl 50mM pH 8,8 MERSE;
- Tris-HCl 50mM pH 6,8 MERSE;
- SDS 10% SIGMA;
- Acrilamida-Bis SIGMA (30%T, 2,67%C – 22,2g de acilamida + 80ml de N'N'metileno-bis-acrilamida);
- Persulfato de amônia 10% SIGMA;
- β -mercaptoetanol SIGMA;
- Azul de bromofenol SIGMA;
- HCl 6N MERCK;
- Solução corante:
 - o Sulfato de amônia 15% MERSE,
 - o Coomassie brilliant blue R-250 SIGMA;
 - o Ácido fosfórico 0,29M MERSE,
- Tampão da amostra:
 - o água deionizada,
 - o Tris-HCl 500mM, pH 6,8 ,
 - o 20% glicerol MERCK,

- 2% SDS 10% ,
- 5% β -mercaptoetanol,
- azul de bromofenol,
- Tampão para corrida 3X:
 - Tris base 25mM=1X,
 - 192mM Glicina MERCK,
 - 0,1% SDS

4.3.1. Extração das isoenzimas para discriminação das bandas

Adotou-se o método descrito por Kitamura (1983), com as seguintes modificações:

As sementes foram cortadas, retirando-se uma alíquota de 10mg de cada cultivar, homogeneizada com 500 μ l de tampão Tris 0,05M, pH 8,0, em gral de porcelana. Este homogenato foi centrifugado a 16000g por 20 minutos a 4°C em microcentrífuga. O sobrenadante (extrato enzimático bruto) foi usado nas análises de LOX.

4.3.2. Aplicação da amostra

Um volume de 60 μ L do sobrenadante foi misturado a 60 μ L do tampão da amostra (Tris 50mM, SDS 0,20%, Uréia 5M, β -mercaptoetanol, Coomassie brilliant blue). Aplicou-se 20 μ L da amostra em um gel de poliacrilamida preparado conforme descreveram FONTES et al (1983). Formou-se o gel separador na concentração de 9 % de acrilamida, contendo Tris HCl pH8,8, 0,2% de SDS. Sobre este colocou-se o gel empilhador de 5% de acrilamida contendo tris HCl pH 6,8, com 0,2% de SDS. Conduziu-se a eletroforese à temperatura ambiente iniciando com uma pré-corrida com

voltagem de 80W por 30 minutos, ou até o marcador chegar no gel de separação, seguido de 100W por 5 horas. Utilizou-se como tampão do eletrodo uma diluição 3,3 vezes da solução estoque (KITAMURA et al, 1983). As proteínas separadas foram reveladas com “Coomassie Brilliant Blue” R-250 em metanol:ácido acético:água (25:5:67), sendo o gel descorado, com metanol:ácido acético:água (45:9:46).

4.4. Teste colorimétrico

O teste colorimétrico para determinação da atividade das isoenzimas LOX foi realizado de acordo com SUDA et al.,(1995), baseado na atividade de descoloramento das isoenzimas LOX em contato com o azul de metileno (LOX-1 e LOX-2) e β -caroteno (LOX-3).

Soluções/Reagentes:

- Tampão borato 50mM;
- Azul de metileno;
- Linoleato de sódio 10mM;
- Água deionizada;
- Fosfato de sódio 200mM;
- β -caroteno em acetona 1:1;
- Ácido linoléico 10mM;
- Tween-20 MERCK

Equipamento:

- Balança analítica SAUTER modelo 424;

Foram cortadas 10mg de semente de soja para análise das LOX.

4.4.1. Análise da LOX-3

As sementes foram colocadas em tubo de ensaio com água deionizada, após 5 minutos, adicionou-se 0,4mL da solução reagente, contendo 2,8 mL de tampão fosfato de sódio 200mM pH 6,8 , 500 μ L de β -caroteno, 500 μ L de água deionizada, mais 1,3g de extrato de LOX 2 (500 μ g de semente).

4.4.2. Análise da LOX-1

Adicionaram-se 0,22mL de azul de metileno 100mM a solução anterior. A leitura foi realizada 2 minutos depois.

4.4.3. Análise da LOX-2

O ensaio foi realizado em tampão fosfato, pH 6,0, com azul de metileno, acetona, ditiotreitol, linoleato de sódio e semente de soja (500 μ g).

4.5. Determinação da Atividade enzimática

Soluções/Reagentes:

- Fosfato de sódio 200mM
- Tris base;
- Solução de ácido linoléico 10mM;
- Solução de metil-linoleato 10mM;
- Água deionizada;
- Tween-80 MERCK;
- Hidróxido de sódio 2N;

- Etanol MERCK

Equipamentos:

- Espectrofotômetro BECKMAN;
- Ultrasson de imersão;
- Agitador magnético FISATON modelo 752;
- Balança analítica;
- pHmetro MICRONAL modelo 8374

4.5.1. Preparo do substrato:

4.5.1.1. Solução estoque de ácido linoléico 10mM

Adicionaram-se 280 μ L de Tween 80 em 5mL de água (deionizada, fervida e degaseificada com N₂ por 15 minutos). Juntou-se a esta solução 140mg de ácido linoléico. Adicionou-se a dispersão 0,28ml de NaOH 2N para torna-la translúcida. O volume foi então completado para 50 ml de água. O substrato foi dividido em frações de aproximadamente, 3 ml e estocadas em frascos criogênicos , substituindo o ar dos frascos por N₂ gasoso e em seguida foram congeladas à -10°C. Durante os ensaios, os frascos foram mantidos em banho de gelo, protegidos da luz e abertos somente na hora do uso (KITAMURA, 1984).

4.5.1.2. Solução estoque de metil-linoleato 10mM

O substrato metil-linoleato foi gentilmente cedido pela profa. Lireni Aparecida Guaraldo Gonçalves do Laboratório de lipídios da FEA/UNICAMP.

Foram dispersos 147mg do éster metil-linoleato SIGMA em 5,0 ml de etanol 95% e em seguida o volume foi completado com tampão fosfato 0,1M (pH7,0).A solução foi armazenada da mesma forma anterior.

4.5.2. Proteínas solúveis

O conteúdo de proteína solúvel foi analisado pela método de BRADFORD, 1976.

4.5.3.Determinação da atividade

A atividade da LOX sobre o ácido linoléico foi realizada, segundo o método de AXELROD et al. (1981). Nesse método, é medido o aumento da absorbância a 234nm, resultante da formação de um sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido formado. Foram realizados testes específicos para cada isoenzima a temperatura de 25°C, contra um branco (2ml de tampão Tris-HCl + substrato ácido linoléico) e um controle (2ml tampão Tris-HCl + extrato enzimático).

4.5.3.1.Teste para LOX-1

Adicionou-se 2ml de tampão específico Tris-HCl 200mM, pH 9,0, seguido do extrato enzimático bruto 10µl e por último o 50 µl substrato ácido linoléico 10mM. A leitura foi realizada em 2 minutos.

4.5.3.2.Teste para LOX-2

O teste para detecção da isoenzima LOX-2 foi realizado adicionando-se 2ml de tampão fosfato 200mM (pH6,1), 50 µl extrato enzimático bruto e 50µl do substrato metil-linoleato 10mM. A leitura foi realizada em 2 minutos.

4.5.3.3. Teste para LOX-3

Adicionaram-se 2 ml de tampão fosfato de sódio (pH6,8), 50µl de extrato enzimático e 50µl do substrato ácido linoléico. A leitura foi realizada em 2 minutos.

4.6. Determinação da atividade enzimática por descolorimento de caroteno

Soluções/Reagentes:

- Solução de metil-linoleato 10mM;
- Solução de ácido linoléico 10mM;
- Solução de β -caroteno 99% em acetona;
- Tampão borato 0,05M;
- Fosfato de sódio 200mM;
- Acetona MERCK;

Equipamentos:

- Espectrofotômetro BECKMAN-EUA;
- Rotaevaporador TECNAL modelo TE 130;
- Agitador magnético FISATON modelo 752;
- Balança Analítica SAUTER modelo 424;
- pHmetro MICRONAL modelo 8374

4.6.1. Preparo do substrato

A solução foi preparada conforme descrito por KIKUCHI e KITAMURA (1987), onde 10mg de β -caroteno 99% foram dissolvidos em 10ml de acetona.

O β -caroteno foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Carotenóides FEA/UNICAMP, coordenado pela Dra. Delia R. Amaya, e suspenso em éter de

petróleo, sendo quantificado espectrofotometricamente, realizando uma varredura a 500nm para detecção do pico máximo de absorbância. O solvente foi retirado em evaporador rotativo, seguido de ressuspensão em acetona 1:1. A solução foi preparada de acordo com KIKUCHI e KITAMURA (1987).

4.6.2. Condições de leitura

Todas as reações foram realizadas em espectrofotômetro à 452nm, contra um branco (2,0ml de tampão específico, substrato ácido linoléico, solução saturada de β -caroteno) e um controle (2,0ml de tampão específico, solução saturada de β -caroteno, extrato enzimático bruto).

4.6.3. Teste para avaliação da LOX-1

Este teste foi realizado conforme descrito por KIKUCHI e KITAMURA (1987). Adicionou-se a um tubo de ensaio, 2mL de tampão borato 50mM pH9,0, 50 μ l de ácido linoléico 10mM, 100 μ l de solução de β -caroteno 90% e 200 μ l de extrato de grão de soja a ser analisado. A mistura era mantida em repouso durante 1 minuto, à temperatura de 20°C, e após este tempo o pH era corrigido para 6,8, pela adição de 2 mL da solução de fosfato de sódio 0,2M, pH 6,8, seguido de leitura em espectrofotômetro a 20°C por 10 minutos.

4.6.4. Teste para avaliação da LOX-2

Adicionou-se 2mL de tampão fosfato 0,05M (pH6,8), 50 μ l do substrato metil-linoleato 10mM, 100 μ l de extrato enzimático bruto, 100 μ l de solução de β -caroteno. A mistura era mantida em banho à 10°C, durante 30 minutos seguido da leitura por 10 minutos.

4.6.5. Teste para LOX-3

Adicionou-se a um tubo de ensaio, 2ml de tampão fosfato de sódio 200mM (pH 6,8), 50 µl de substrato ácido linoléico 10mM, 100µl de solução de β-caroteno e 40µl de extrato enzimático à 20°C, seguido de leitura em espectrofotômetro a 20°C por 10 minutos.

4.7. Análise Estatística

Os resultados foram submetidos a análise estatística usando o programa STATISTICA® para ambiente Windows®, através da análise de variância (ANOVA) e análise entre as medias segundo teste de Tuckey, considerando $p < 0,05$ como critério de significância.

5. RESULTADOS E DISCUSSAO

5.1.Composição Centesimal

Tabela 3. Composição centesimal das diferentes cultivares e linhagens estudadas.

Cultivares	Proteína (%)	Lipídio (%)	Umidade (%)	Cinzas (%)	Carboidrato (%)
IAC 8-2	39,20±0,08	17,4±0,08	6,27±0,21	4,77±0,09	32,34
IAC 97-3503	42,03±0,04	15,03±0,24	5,57±0,07	4,83±0,04	32,53
IAC 97-3512	39,64±0,13	19,06±0,12	6,51±0,31	4,65±0,11	30,12
IAC 97-3545	42,2±0,28	15,43±0,19	6,57±0,10	4,72±0,04	31,07
IAC 00-3803	40,55±0,06	16,63±0,09	6,75±0,02	4,9±0,04	31,53
BRS-213	36,83±0,23	23,13±0,18	6,56±0,14	4,81±0,01	28,65

* Média ± desvio padrão

A composição centesimal da farinha de soja está apresentada na Tabela 3. Para cálculos da conversão do nitrogênio em proteína foi utilizado o fator 6,25 que é amplamente empregado pelas indústrias de alimentos. Os resultados para o teor de proteína nos cultivares avaliados foi superior aos encontrados por YAMADA et al (2003), que foi em torno de 34,46%. De acordo com os resultados apresentados na tabela acima, observou-se uma quantidade de lipídios inferior aos encontrados por YAMADA et al (2003), que foi em média 20,07%.

5.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese, como método analítico para estudo de substâncias de alto peso molecular, possibilita obter a composição polipeptídica da proteína de soja (FONTES, 1983).

As sementes das linhagens foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS para verificar se a geração F₅ mantinha as características introduzidas pelo retrocruzamento. Foram utilizadas como padrão IAC-8, BRS-213 (triplo-nulo/EMBRAPA) e os padrões -LOX1;-LOX2 e -LOX3; -LOX2; -LOX; e Triplo positivo(+LOX 1, LOX2 e LOX3) fornecidos pelo BIOAGRO/UFV.

O tempo de corrida das amostras na análise eletroforética ocorreu em 5 horas, de acordo com o tempo citado por KITAMURA (1984).

A resolução das bandas das isoenzimas só foi conseguida com nitidez com o aumento da quantidade do extrato enzimático bruto e diminuição do tampão de amostra na proporção 1:1 (60µL:60µL). Quando a concentração de extrato enzimático foi menor que a de tampão da amostra, as bandas referentes as isoenzimas, não foram bem discriminadas.

A quantidade aplicada também foi importante na discriminação das bandas. KITAMURA (1984), utilizou-se 10µL de amostra em um gel de 7% de acrilamida. Quando a mesma quantidade foi utilizada, as bandas não foram nitidamente discriminadas. TAVARES (1991) conduziu o experimento com 20µL de amostra, obtendo resultados satisfatórios. No presente trabalho não se observou nitidez com 10 e 20µL, mas com 15µL as isoenzimas foram bem visualizadas.

Os resultados da análise estão na figura 11. A primeira canaleta referente ao BRS-213 demonstrou ausência das três bandas. A linhagem IAC 00-3803 foi caracterizado, observando-se três bandas referentes as três isoenzimas, quando comparados ao padrão IAC-8. A linhagem IAC97-3503 apresentou duas bandas correspondentes às isoenzimas LOX-2 e LOX-3. Nas linhagens IAC97-3512 e 97-3545,

observou-se a presença da LOX-1 e LOX-3, quando comparados ao padrão triplo positivo e os padrões fornecidos pelo BIOAGRO.

Ficou evidenciado pela eletroforese que os cultivares avaliados, apresentaram características comuns aos padrões utilizados, podendo-se diferenciar as bandas equivalentes.

KITAMURA (1984), utilizou um gel de empacotamento de 4,5% e de separação de 7%, conseguindo discriminar as respectivas bandas. Quando a mesma concentração foi utilizada, as bandas não foram separadas apresentando uma banda única referente a LOX. REZENDE (1986), utilizou um gradiente de concentração de 4,7 a 10,3% de acrilamida.

A eletroforese demonstrou ser um método eficiente para identificação das isoenzimas nas sementes dos cultivares. KITAMURA (1984); TAVARES (1991), obtiveram bons resultados com a SDS-PAGE, confirmando os resultados obtidos, com a determinação da atividade enzimática pelo método espectrofotométrico de AXELROD et al., (1981).

No presente trabalho a discriminação das bandas foi eficiente quando a concentração do gel de separação foi aumentada para 9% de acrilamida, não sendo observadas em outras concentrações.

Quando realizada no aparelho BIO RAD[®], com placas de vidro pequenas, as isoenzimas se apresentaram em uma banda única. Utilizando placas de eletroforese maiores 16,7 por 12,7 cm, as mesmas foram separadas.

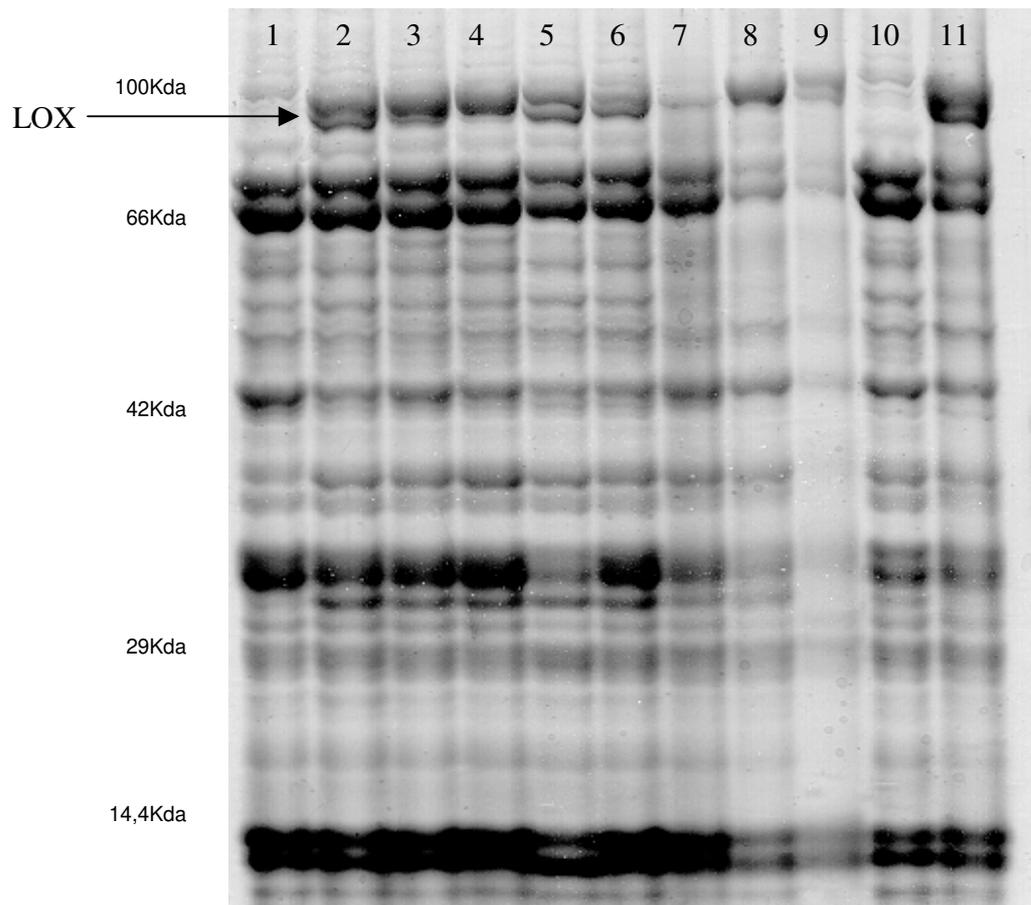


Figura 11: Resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida 9% contendo SDS ilustrando as bandas correspondentes as isoenzimas LOX extraídas do grão de soja. 15 μ L de amostra foram aplicados no gel. 1: BRS 213, 2: IAC 8-2, 3: IAC 00-3803, 4: IAC 97-3503, 5: IAC 97-3512, 6: IAC 97-3545, e os padrões fornecidos pelo BIOAGRO/UFV 7: -LOX-2 e -LOX-3, 8: -LOX-1, 9: -LOX1 e -LOX-3, 10: -LOX e 11: +LOX.

5.3. Teste colorimétrico

Este método baseado na atividade de descoloramento das isoenzimas LOX em contato com o azul de metileno (LOX-1 e LOX-2) e β -caroteno (LOX-3), não foi sensível para a determinação da atividade de LOX-2, provavelmente pela sua relação com a LOX-3 (SUDA et al., 1995), enquanto que as isoenzimas LOX-1 e LOX-3 foram identificadas Tabela 4. Verificou-se a ausência de LOX-1 na linhagem IAC 97-3503, e a presença da LOX-3 em todas as linhagens, confirmando os resultados obtidos na eletroforese.

Tabela 4. Teste colorimétrico realizado para as cultivares IAC 8-2, e as linhagens IAC 97-3503, IAC 97-3512, 6: IAC 97-3545, IAC 00-3803. Baseado na atividade de descoramento das isoenzimas LOX em contato com o azul de metileno (LOX-1 e LOX-2) e β -caroteno (LOX-3). Para LOX-3 as sementes foram colocadas em tubo de ensaio com água deionizada, após 5 minutos, adicionou-se 0,4mL da solução reagente, contendo 2,8 mL de tampão fosfato de sódio 200mM pH 6,8 , 0,5 ml de β -caroteno, 0,55ml de água deionizada, mais 1,3 g de extrato de LOX 2 (0,5 mg de semente). Para LOX-1, 22ml de azul de metileno 100mm a solução anterior. A leitura foi realizada 2 minutos depois.

CULTIVARES	LOX-1	LOX-3
IAC 8-2	+	+
IAC 97-3503	-	+
IAC 97-3512	+	+
IAC 97-3545	+	+
IAC 00-3803	+	+

5.4. Atividade enzimática

Métodos espectrofotométricos baseados no aumento do pico de absorção de luz ultravioleta a 234nm, são eficientes para detectar a atividade das isoenzimas em soluções salinas opticamente translúcidas (AXELROD et al.,1981).

Segundo TAVARES, 1991, utilizando como tampão Tris-HCl 200mM em pH9,0 , quando comparado com tampão borato de sódio 200mM no mesmo pH, o coeficiente de variação (cv) foi menor (2,24%) do que do tampão borato (7,55%).

TAVARES, 1991, determinou a atividade da isoenzima LOX-2 em pH6,1. Os resultados evidenciaram que o teste com ,metil-linoleato (cv 5,85) foi mais eficiente, enquanto que o teste com ácido linoléico não demonstrou bons resultados (cv 8,14).

A atividade das isoenzimas LOX-1, LOX-2 e LOX-3 foram expressas em unidade de atividade enzimática (em μmols de dienos conjugados formados/ minuto para LOX-1 e 2, e μmols de cetodienos conjugados/minuto para LOX-3) por mg de proteína solúvel.

Os nossos resultados para LOX-3, utilizando como substrato o ácido linoléico, pH6,8 em tampão Fosfato de sódio 50mM demonstraram resultados satisfatórios. Quando o metil-linoleato foi utilizado não se observou reação com a enzima. DIAS (1999), também utilizou o ácido linoléico 10mM e obteve resultados fidedignos.

O cultivar BRS-213 (EMBRAPA padrão triplo nulo), foi utilizado para testar a sensibilidade do método, não sendo observado atividade enzimática das isoenzimas.

Os valores do aumento da absorbância a 234nm para o cultivar IAC-8 (padrão triplo +) estão na figura 12.

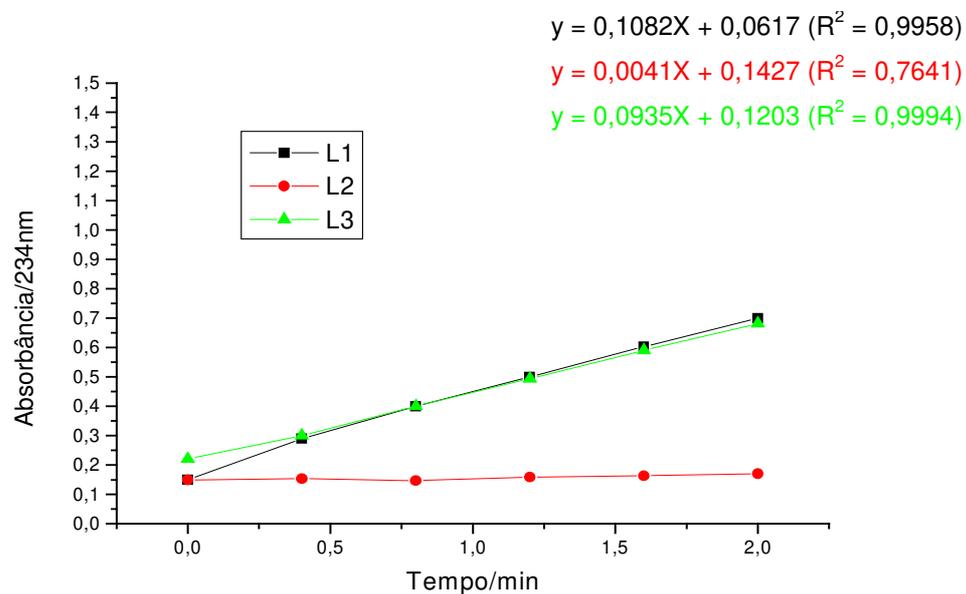


Figura 12. Aumento da absorbância a 234 nm para a cultivar IAC 8-2, resultante da formação de um sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido formado, expressos em μmols de dienos conjugados (para LOX-1 e LOX-2) e μmol de cetodienos conjugados (para LOX-3). Utilizando 2mL de tampão específico Tris-HCl 200mM (pH 9,0), 10 μL extrato enzimático bruto e 50 μL substrato ácido linoléico para LOX-1; 2mL de tampão fosfato de sódio 200mM (pH6,1), 50 μL extrato enzimático bruto e 50 μL do substrato metil-linoleato 10mM para LOX-2; 2 mL de tampão fosfato de sódio (pH6,8), 50 μL de extrato enzimático e 50 μL do substrato ácido linoléico 10mM para LOX-3.

O aumento da absorbância baseado na atividade enzimática específica das isoenzimas na linhagem IAC 97-3503 estão representados na Figura 13. Quando comparados ao padrão IAC-8, pode se notar que não foi detectada atividade de LOX-1 nesta linhagem. Para LOX-3 observou-se diminuição significativa ($p < 0,05$) da atividade.

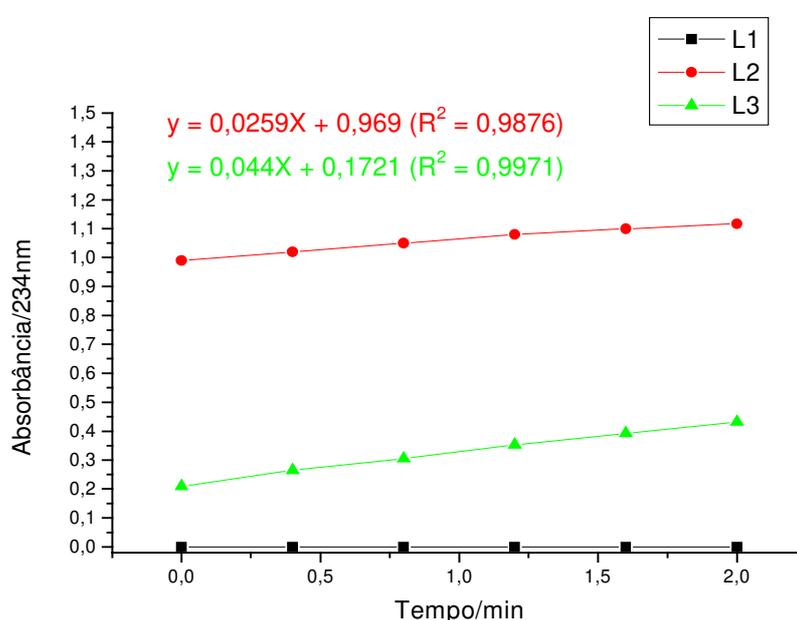


Figura 13. Aumento da absorbância a 234 nm para a linhagem IAC 97-3503, resultante da formação de um sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido formado, expressos em μmols de dienos conjugados (para LOX-1 e LOX-2) e μmols de cetodienos conjugados (para LOX-3). Utilizando 2mL de tampão específico Tris-HCl 0,2M (pH 9,0), 10 μL extrato enzimático bruto e 50 μL substrato ácido linoléico para LOX-1; 2ml de tampão Fosfato de sódio 0,2M (pH6,1), 50 μL extrato enzimático bruto e 50 μL do substrato metil-linoleato 10mM para LOX-2; 2 mL de tampão fosfato de sódio 200mM (pH6,8), 50 μL de extrato enzimático e 50 μL do substrato ácido linoléico 10mM para LOX-3.

Na linhagem IAC 97-3512, não foi demonstrada a diminuição da atividade de LOX-1. A atividade de LOX-2 ($p < 0,05$) não foi detectada. Observou-se atividade de LOX-3, mas ainda significativamente menor ($p < 0,05$) que o padrão. (Figura 14)

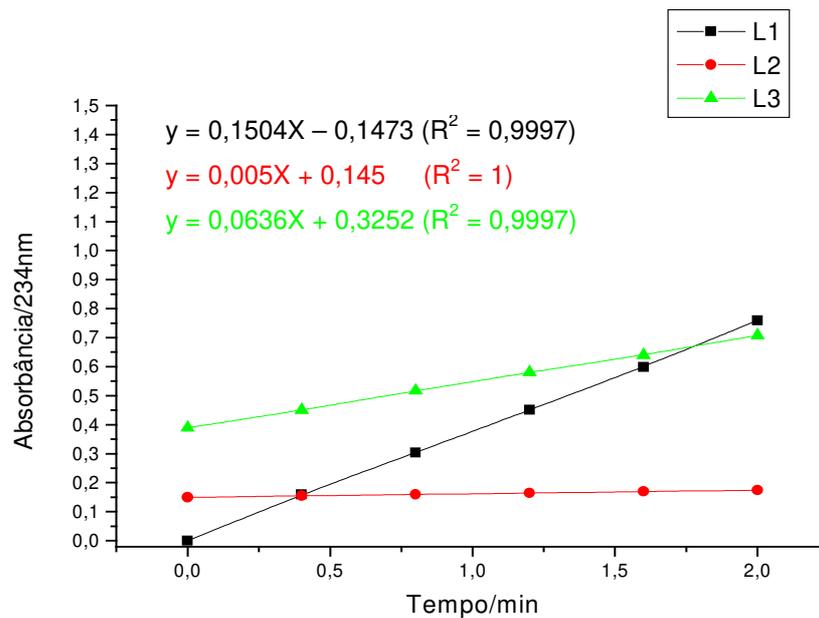


Figura 14. Aumento da absorbância a 234 nm para a linhagem IAC 97-3512, resultante da formação de um sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido formado, expressos em μmols de dienos conjugados (para LOX-1 e LOX-2) e μmols de cetodienos conjugados (para LOX-3). Utilizando 2mL de tampão específico Tris-HCl 200mM (pH 9,0), 10 μL extrato enzimático bruto e 50 μL substrato ácido linoléico para LOX-1; 2ml de tampão fosfato de sódio 200mM (pH6,1), 50 μL extrato enzimático bruto e 50 μL do substrato metil-linoleato 10mM para LOX-2; 2 mL de tampão fosfato de sódio 200mM(pH6,8), 50 μL de extrato enzimático e 50 μL do substrato ácido linoléico 10mM para LOX-3.

Na linhagem IAC 97-3545, quando comparado com a cultivar IAC 8-2 não se observou diminuição da atividade da LOX-1, mas sim, redução significativa ($p < 0,05$) da LOX-2. Para LOX-3 também não foi verificado redução da atividade nesta mesma linhagem. (Figura 15)

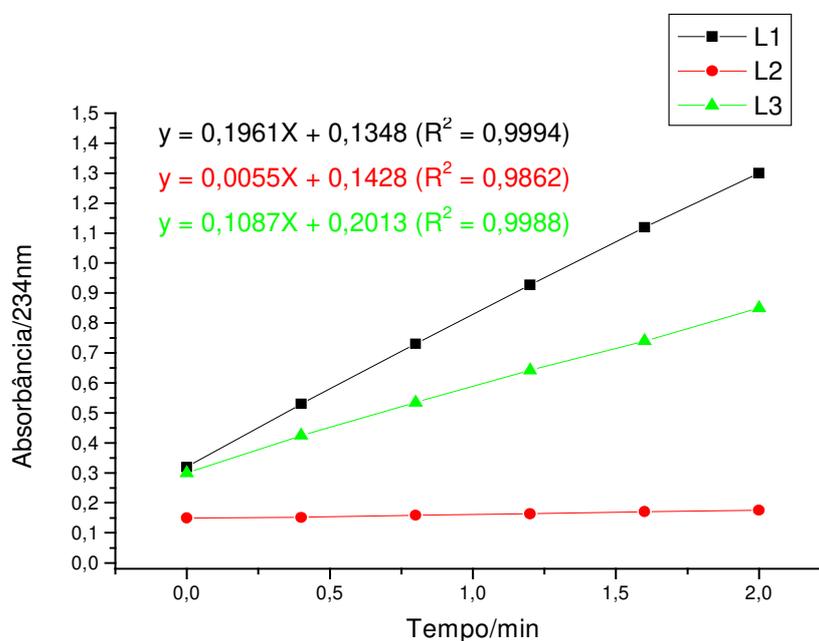


Figura 15. Aumento da absorbância a 234 nm para a linhagem IAC 97-3545, resultante da formação de um sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido formado, expressos em μ ols de dienos conjugados (para LOX-1 e LOX-2) e μ ols de cetodienos conjugados (para LOX-3). Utilizando 2mL de tampão específico Tris-HCl 200mM (pH 9,0), 10 μ L extrato enzimático bruto e 50 μ L substrato ácido linoléico para LOX-1; 2mL de tampão fosfato de sódio 200mM (pH6,1), 50 μ L extrato enzimático bruto e 50 μ L do substrato metil-linoleato 10mM para LOX-2; 2 mL de tampão fosfato de sódio 200mM (pH6,8), 50 μ L de extrato enzimático e 50 μ L do substrato ácido linoléico 10mM para LOX-3.

Na linhagem IAC 00-3803, observou-se redução da atividade da LOX-1 e LOX-2. O mesmo não pode ser observado para a isoenzima LOX-3, visto que esta demonstrou altos valores de absorbância. (Figura 16)

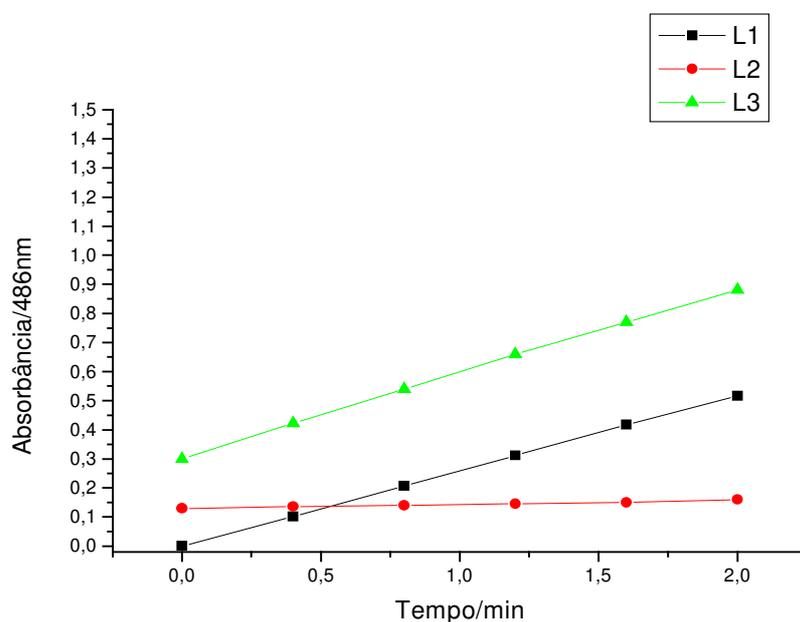


Figura 16. Aumento da absorbância a 234 nm para a linhagem IAC 00-3803, resultante da formação de um sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido formado, expressos em μmol s de dienos conjugados (para LOX-1) e μmol s de cetodienos conjugados (para LOX-3). Utilizando 2 mL de tampão específico Tris-HCl 200mM (pH 9,0), 10 μL extrato enzimático bruto e 50 μL substrato ácido linoléico para LOX-1; 2 mL de tampão Fosfato de sódio 200mM (pH6,1), 50 μL extrato enzimático bruto e 50 μL do substrato metil-linoleato 10mM para LOX-2; 2 mL de tampão fosfato de sódio 200mM (pH6,8), 50 μL de extrato enzimático e 50 μL do substrato ácido linoléico 10mM para LOX-3.

Na Figura 17 estão representados os resultados da determinação da atividade específica das três isoenzimas nas linhagens estudadas. Pode-se notar redução ($p < 0,05$) e eliminação da LOX-1 nos cultivares IAC 00-3803 e IAC 97-3503 respectivamente, complementando os resultados demonstrados na eletroforese. Em relação a LOX-2, notou-se diminuição ($p < 0,05$) da atividade em todas as linhagens. No entanto este método não demonstrou sensibilidade para detecção da LOX-2, devido relação com a LOX-3 em termos de pH (6,8) (TAVARES, 1991), ou mesmo especificidade pelo substrato.

Sendo necessário a utilização de um método mais sensível para esta isoenzima. Os resultados obtidos para atividade de LOX-3 confirmam os obtidos pela eletroforese, verificando redução ($p < 0,05$) da atividade na linhagem 97-3503, quando comparado ao padrão IAC 8-2.

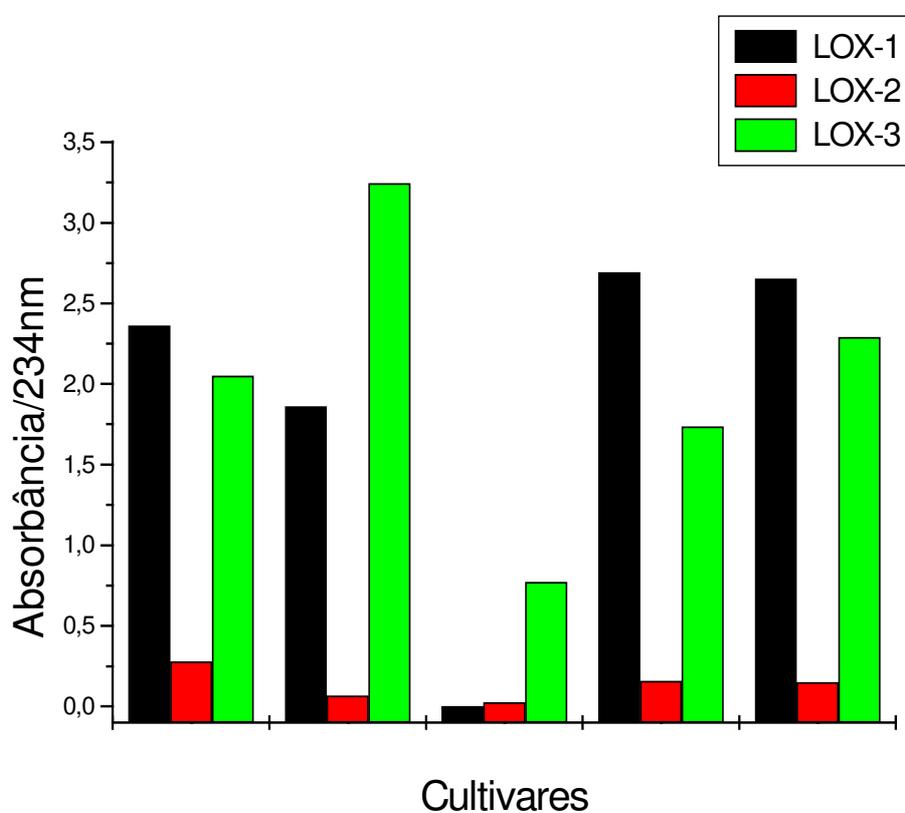


Figura 17. Aumento da absorbância a 234 nm para a cultivar IAC-8-2, e as linhagens IAC 00-3803, IAC 97-3503, IAC 97-3212 e IAC 97-3545, resultantes da formação de um sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido formado, expressos em μmols de dienos conjugados (para LOX-1 e LOX-2) e μmols de cetodienos conjugados (para LOX-3).

A atividade específica das demais isoenzimas, nas linhagens analisados estão representadas na Tabela 5.

Tabela 5. Atividade Específica (AE) das isoenzimas LOX-1, LOX-2 e LOX-3 nas linhagens de soja IAC-8, IAC 97-3503, IAC 97-3512, IAC 97-3545 e IAC 00-3803.

CULTIVARES	LOX-1	LOX-2	LOX-3
IAC 8-2	2,36	0,28	2,05
IAC 97-3503	—	0,05	0,77
IAC 97-3512	2,73	0,14	1,73
IAC 97-3545	2,65	0,15	2,29
IAC 00-3803	1,86	0,59	3,24

* Valores de AE (U/mg de proteína) expressos em μmol de dienos conjugados (para LOX-1 e LOX-2) e μmol de cetodienos conjugados (para LOX-3).

5.5. Determinação da atividade enzimática por descoloramento do β -caroteno

5.5.1. Teste para LOX-1

A LOX-1 possui alta especificidade, e conseqüentemente atividade sobre o ácido linoléico. Assim, extratos de grãos de soja isentos de LOX-1 não promovem formação detectável do dieno conjugado em pH9,0. Contudo, nestas condições de pH, a LOX-1 é responsável por quase toda a formação de peróxidos a partir do ácido linoléico, mas não é capaz de provocar o descoloramento de caroteno (KLAJN, 1991) .

Baseados na alta especificidade da LOX-1 pelo ácido linoléico, KIKUCHI e KITAMURA (1987), explicam que a incubação das amostras das sementes com a LOX-1 com este substratos em pH9,0 (ótimo para LOX-1) por um 1minuto a 20°C, funciona como um pré-tratamento. Os hidroperóxidos formados são decompostos por enzimas hidroperóxidos-liases, antes da mistura ser ajustada para pH6,8 (MATOBA et al., 1985).

No presente trabalho, quando a mistura foi ajustada para pH6,8 (ótimo para LOX-3) o descoramento foi observado no cultivar IAC 97-3503 . Nestas condições de pH, como o substrato não foi utilizado, o descoramento ocorreu normalmente, através da atuação da LOX-3. Comprovando a ausência de LOX-1 na linhagem IAC 97-3503. (Figura 18)

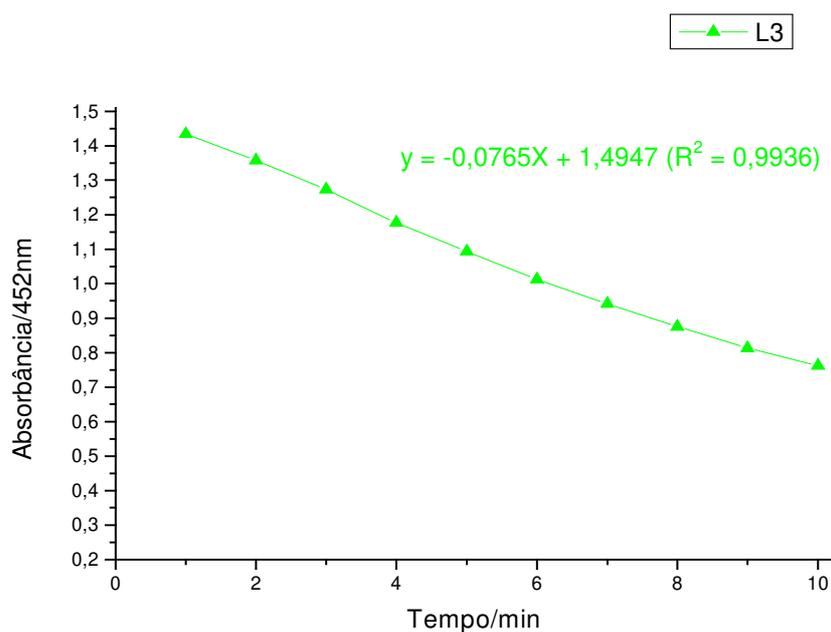


Figura 18. Determinação espectrofotométrica á 452nm da isoenzima LOX-1 na linhagem IAC 97-3503. Inicialmente em 2.mL de tampão borato 50mM pH9,0, 50µL de ácido linoleico 10mM, 100µL de solução de β-caroteno e 200µL de extrato enzimático, mantida em repouso durante 1 minuto, à temperatura de 20°C. seguido de ajuste do pH para 6,8 (para promover ação de LOX-3), pela adição de 2 mL de solução de fosfato de sódio 200mM, seguido de leitura por de 10 minutos.

Após a incubação das amostras nas condições para LOX-1 mostradas, não foi observado descoramento do caroteno na cultivar IAC 8-2, e nas linhagens IAC 97-3512, IAC 97-3545 e IAC 00-3803.

Devido do consumo do substrato ácido linoléico pela LOX-1, não havendo substrato remanescente suficiente para provocar a reação de cooxidação pela LOX-2 e LOX-3, confirmando a presença de LOX-1 nestas linhagens.

5.5.2. Teste para LOX-2

A especificidade da LOX-2 sobre o substrato metil-linoleato, foi importante na sua determinação. Diferente do ácido linoléico que é substrato preferencial para LOX-3, o que poderia levar a resultados de atividade de descolorimento confusos entre LOX-2 e LOX-3. Tendo como base o efeito sinérgico da LOX-3, o substrato metil-linoleato foi utilizado para que o descolorimento fosse decorrente da atividade da LOX-2.

RAMADOSS, et al (1978), demonstraram que a LOX-2 individualmente não promove reação de cooxidação do β -caroteno, não ocorrendo quando misturada a LOX-1. A combinação de LOX-2 e LOX-3 foi efetiva no descolorimento.

SUDA et al., (1995), observaram efeito sinérgico da LOX-2 e LOX-3, verificando a atividade da LOX-2 somente quando associada a LOX-3.

Nas linhagens IAC 97-3503, IAC 00-3803, não foi observado redução da atividade de decoloração significativa (Figuras 20 e 21) quando comparadas ao padrão IAC 8-2 ($p,0,05$). (Figura 19).

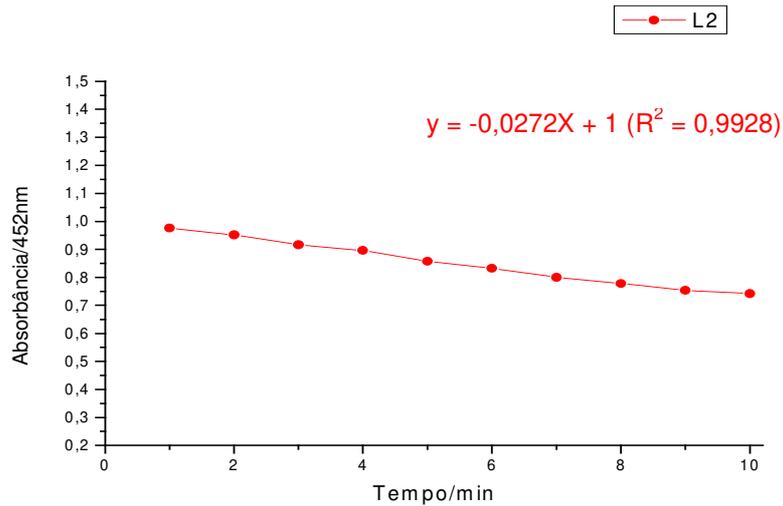


Figura 19. Determinação espectralométrica á 452nm da isoenzima LOX-2 na cultivar IAC 8-2 (padrão). Adicionando-se 2mL de tampão fosfato 50mM (pH6,8), 50 μ L do substrato metil-linoleato 10mM, 100 μ L de extrato enzimático bruto, 100 μ L de solução de β -caroteno 99% em acetona, seguido de leitura por 10 minutos.

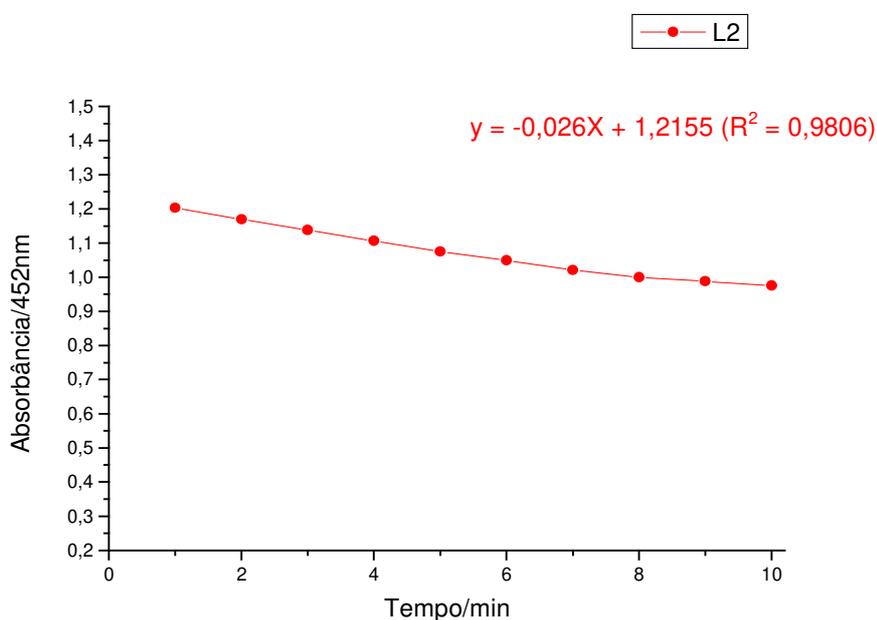


Figura 20. Determinação espectralométrica á 452nm da isoenzima LOX-2 na linhagem IAC 97-3503. Adicionando-se 2mL de tampão fosfato 50mM (pH6,8), 50µL do substrato metil-linoleato 10mM, 100µL de extrato enzimático bruto, 100µL de solução de β-caroteno 99% em acetona, seguido de leitura por 10 minutos.

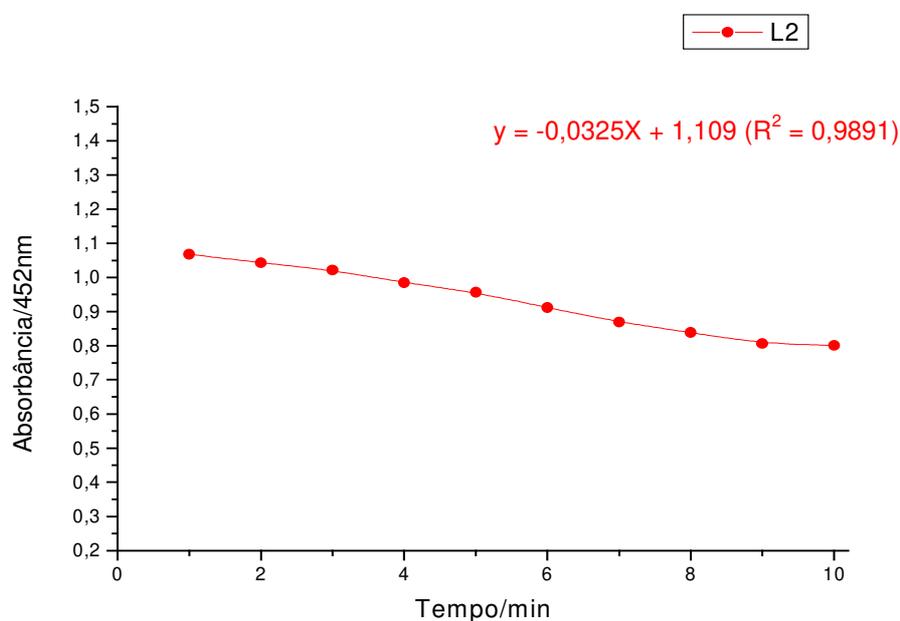


Figura 21. Determinação espectralométrica á 452nm da isoenzima LOX-2 na linhagem IAC 00-3803. Adicionando-se 2mL de tampão fosfato 50mM (pH6,8), 50µL do substrato metil-linoleato 10mM, 100µL de extrato enzimático bruto, 100µL de solução de β-caroteno 99% em acetona, seguido de leitura por 10 minutos.

Nas linhagens IAC 97-3512 e IAC 97-3545, foi verificada baixa atividade de descoramento ($p < 0,05$) pela LOX-2 quando comparados ao padrão IAC 8-2, confirmando redução da atividade desta isoenzima nestas linhagens. (Figuras 22 e 23)

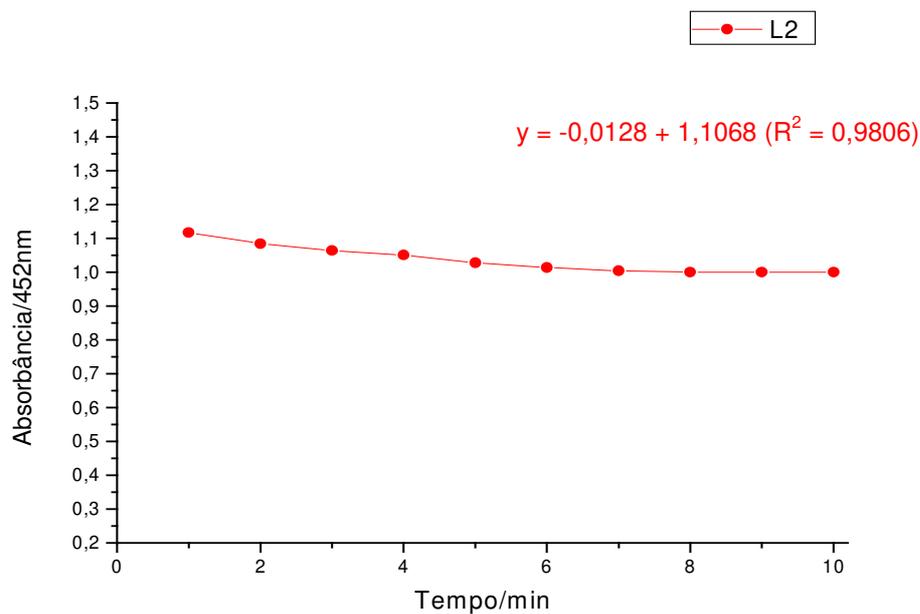


Figura 22. Determinação espectrofotométrica á 452nm da isoenzima LOX-2 na linhagem IAC 97-3512. Adicionando-se 2mL de tampão fosfato 50mM (pH6,8), 50µL do substrato metil-linoleato 10mM, 100µL de extrato enzimático bruto, 100µL de solução de β-caroteno 99% em acetona, seguido de leitura por 10 minutos.

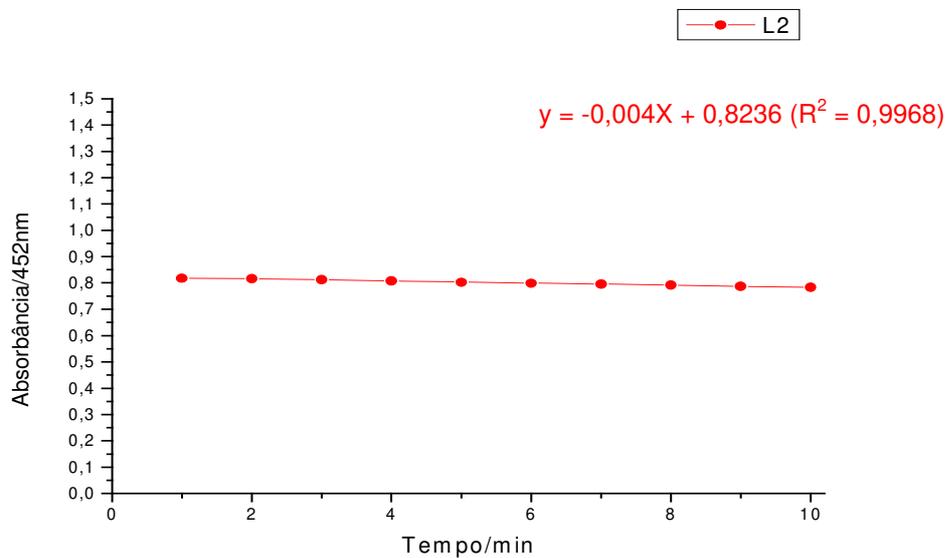


Figura 23. Determinação espectrofotométrica á 452nm da isoenzima LOX-2 na linhagem IAC 97-3545. Adicionando-se 2mL de tampão fosfato 50mM (pH6,8), 50µL do substrato metil-linoleato 10mM, 100µL de extrato enzimático bruto, 100µL de solução de β-caroteno 99% em acetona, seguido de leitura por 10 minutos.

5.5.3. Teste para LOX-3

Nas linhagens IAC 97-3503 (Figura 18), IAC 97-3512 IAC 97-3545 e IAC 00-3803 (Figuras 25, 26 e 27), não foi observado diminuição da atividade para LOX-3, observando descoramento do caroteno, não ocorrendo diferença significativa ($p < 0,05$) do padrão IAC 8-2 (Figura 24). Nas linhagens IAC 97-3512, IAC 97-3545 e IAC 00-3503, as isoenzimas apresentaram baixa capacidade de oxidar o caroteno nos primeiros minutos da reação quando comparados ao IAC 97-3503. Mas, ao final da reação verificou-se uma oxidação parcial do caroteno. KIKUCHI; KITAMURA (1987) também demonstraram que a LOX-3 é essencial para promover a reação de cooxidação e, conseqüentemente, oxidar o β-caroteno. Devido a sua alta atividade de descoramento, a LOX-3 foi facilmente detectada por este teste.

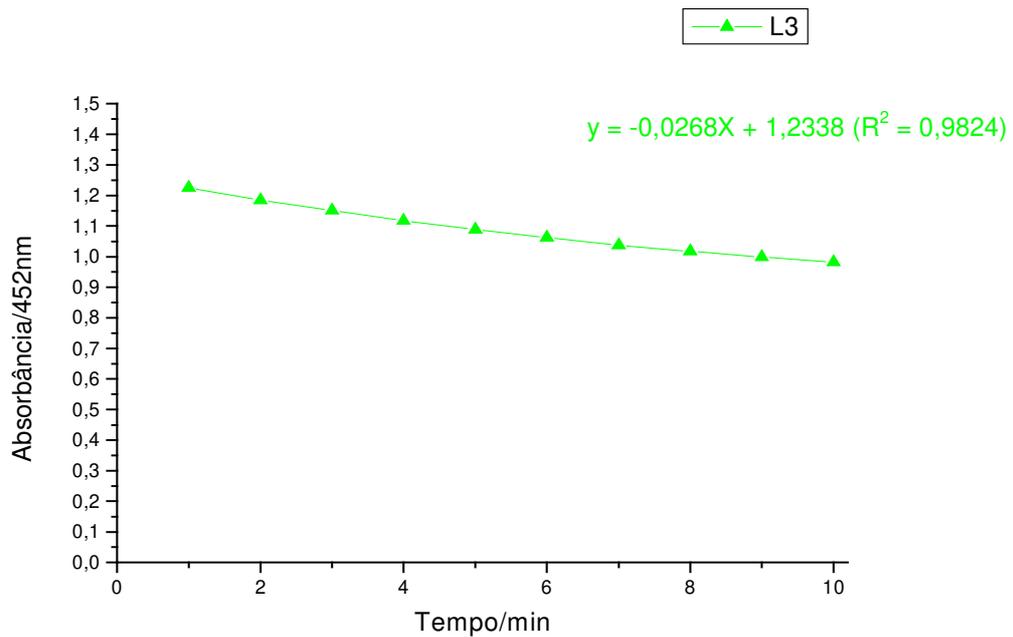


Figura 24. Determinação espectrofotométrica á 452nm da isoenzima LOX-3 na cultivar IAC 8-2 (padrão). Adicionando-se 2mL de tampão fosfato de sódio 200mM (pH 6,8), 50 µL de substrato ácido linoléico 10mM, 100µL de solução de β-caroteno 99% em acetona, e 40µL de extrato enzimático à 20°C, seguido de leitura por 10 minutos.

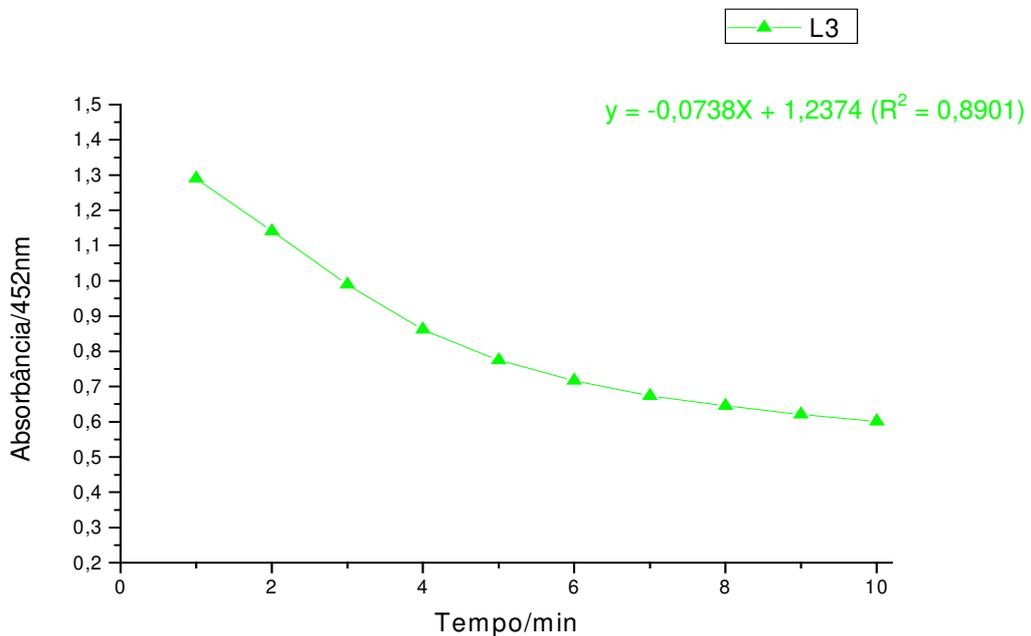


Figura 25. Determinação espectrofotométrica á 452nm da isoenzima LOX-3 na linhagem IAC 97-3512. Adicionando-se 2mL de tampão fosfato de sódio 200mM (pH 6,8), 50 µL de substrato ácido linoléico 10mM, 100µL de solução de β-caroteno 99% em acetona, e 40µL de extrato enzimático à 20°C, seguido de leitura por 10 minutos.

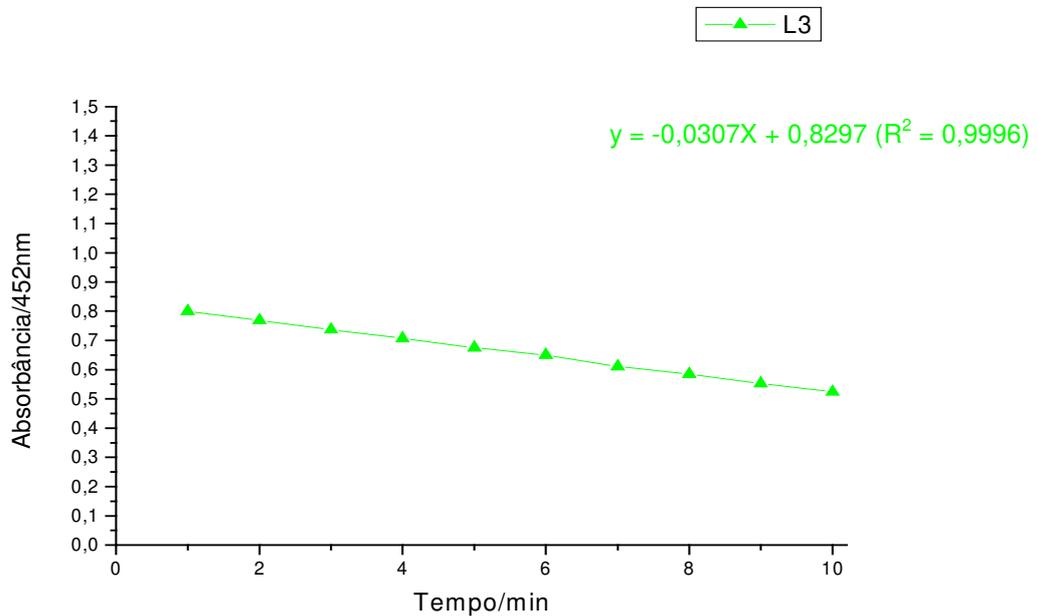


Figura 26. Determinação espectrofotométrica á 452nm da isoenzima LOX-3 na linhagem IAC 97-3545. Adicionando-se 2mL de tampão fosfato de sódio 200mM (pH 6,8), 50 µL de substrato ácido linoléico 10mM, 100µL de solução de β-caroteno 99% em acetona, e 40µL de extrato enzimático à 20°C, seguido de leitura por 10 minutos.

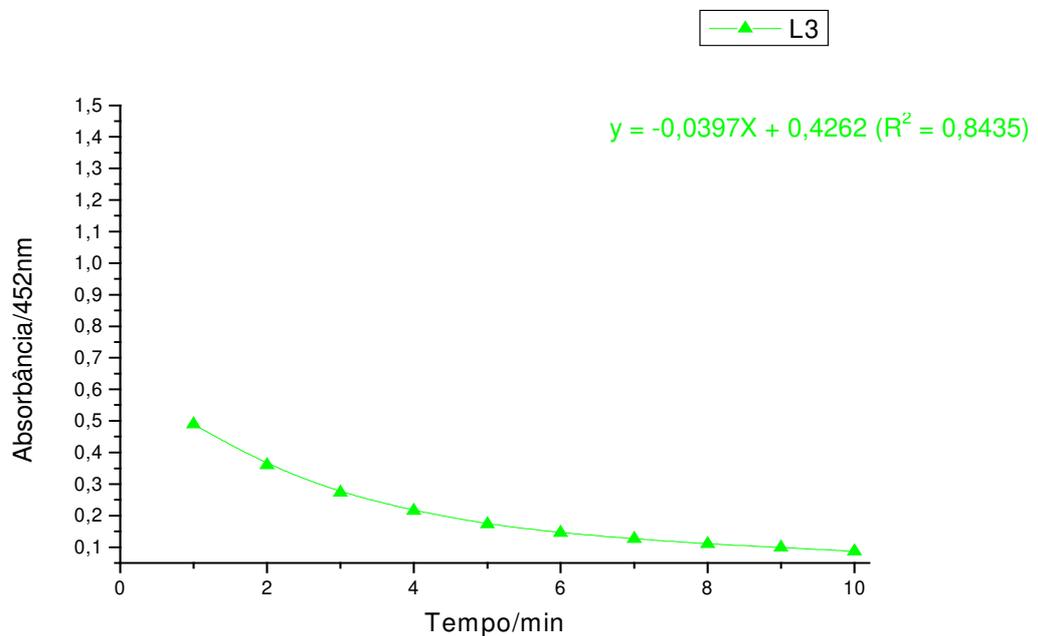


Figura 27. Determinação espectrofotométrica á 452nm da isoenzima LOX-3 na linhagem IAC 00-3803. Adicionando-se 2mL de tampão fosfato de sódio 200mM (pH 6,8), 50 µL de substrato ácido linoléico 10mM, 100µL de solução de β-caroteno 99% em acetona, e 40µL de extrato enzimático à 20°C, seguido de leitura por 10 minutos.

A partir dos resultados obtidos nas análises de descoramento do β -caroteno observamos que a LOX-1 e LOX-3 são facilmente determinadas. Para determinação da LOX-2 foi necessário a presença de LOX-3 com a utilização de um substrato específico metil-linoleato para LOX-2. Ambos os testes evidenciaram que a LOX-2 e LOX-3 (especialmente LOX-3) são responsáveis pela reação de cooxidação.

Os resultados obtidos para a linhagem IAC 97-3545, como já mencionado acima, não evidenciou ausência de LOX, diferente de TAVARES (1991), que observou ausência de LOX-3 nesta linhagem. Como se trata de caráter recessivo não haveria possibilidade de reversão da característica. Podendo ter ocorrido contaminação do material fornecido pelo IAC por outros genótipos durante o processo de obtenção de linhagens puras (auto-fecundações), o que ficou claro pelos testes qualitativos e quantitativos. Isso mostra a importância do monitoramento das características durante o melhoramento genético.

6. CONCLUSÕES

→ Através da Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS na concentração de 9% de acrilamida, as bandas correspondentes a LOX foram discriminadas.

→ O teste colorimétrico e a determinação da atividade enzimática em espectrofotometria em presença de substratos específicos demonstraram ser eficientes na determinação da LOX-1 e LOX-3. Não demonstrando sensibilidade para LOX-2, devido a alta relação desta com a LOX-3.

→ Através do método baseado na reação de cooxidação do β -caroteno pela LOX-2 e LOX-3 foi possível determinar estas isoenzimas.

→ Os demais testes realizados complementaram os resultados obtidos através da eletroforese em gel de poliacrilamida, constatando que através dos cruzamentos e retrocruzamentos realizados pelo IAC, o cultivar IAC 97-3503 não demonstrou atividade de LOX-1, ao passo que não foi detectado redução significativa ($p < 0,05$) nas outras linhagens estudadas. Evidenciou-se redução significativa ($p < 0,05$) da LOX-2 nas linhagens IAC 97-3512 e IAC 97-3545, quando comparados ao padrão IAC 8-2. Para a LOX-3 notou-se redução significativa ($p < 0,05$) na linhagem IAC 97-3503, não ocorrendo diminuição nas outras linhagens avaliadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTHON, G.E.; BARRET, O.M. Calorimetric method for the determination of lipoxygenase activity. **J. Agric. Food Chem.** Easton, 49:32-37, 2001.

AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T.M.; LAAKSO, S. Lipoxygenase from soybeans. **Meth. Enzim.**, 71:441-51, 1981.

BEN-AZIZ, A.; GROSSMAN, S.; ASCARELLI, I.; BUDOWSKI, P. Linoleate oxidation induced by lipoxygenase and heme proteins: a direct spectrophotometric assay. **Analytic. Biochem.** New York, 34:88-100, 1970.

BADLEY, R.A.; ATKINSON, H.N.; ODANI, D.; STUBBS, J.N. The structure, physical and chemical properties of the soybean protein glycinin. **Biochem. Biophys. Acta.** Amsterdam, 490:370-84, 1975.

BILD, G.S.; RAMADOSS, C.S.; AXELROD, B. Effect of substrate polarity on activity of soybean lipoxygenase isoenzymes. **Lipids.** Champaign, 12(9): 732-35, 1977.

BLÉE, E. Impact of phyto-oxylipins in plant defense. **Trends Plant Sci.** Oxford, 7:315-321, 2002.

BLIGH, E. G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian J. of Bioch and Phys.** Ottawa, 37(8):911-917, 1959.

BOYINGTON, J.C.; GAFFNEY, B.J.; AMZEL, L.M. The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase. **Science.** Washington, 260:1482-86, 1993.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. **Anal Biochem.** New York, 72: 248-254, 1976.

CABIBEL, M.; NICOLAS, J. Lipoxygenase from tomato fruit (*Lycopersion esculentum* L.). Partial purification, some properties and *in vitro* cooxidation of some carotenoid pigments. **Sci. Aliments.** Paris, 11:277-92, 1991.

CARVALHO, W.L.; OLIVEIRA, M.G.A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Lipoxygenases affect protease inhibitor levels in soybean seeds. **Plant Physiology. Biochemistry.** Paris, 37(6): 497-501, 1999.

CHIKERE, A.C.; GALUNSKY, B.; SHUNEMANN, V.; KASKE, V. Stability of immobilized soybean lipoxygenase: influence of coupling conditions on the ionization state of the active site Fe. **Enzyme and Microb. Techn.** New York, 28:168-175, 2001.

CLAPP, C.H.; GRANDIZIO, A.M.; YANG, Y.; KAGEY, M.; TURNER, D.; BICKER, A.; MUSKARDIN, D. Irreversible inactivation of soybean lipoxygenase-1 by hidrofobic thiols. **Biochem.** New York, 41(8): 11504-11, 2002.

DIAS, A.C.P. Atividade de lipoxigenase, durante a germinação e qualidade fisiológica de sementes de soja. Viçosa,UFV, Imp. Univers., 1999. 64p (Dissertação de mestrado)

ELDRIDGE, A.C.; WARNER, K.; WOLF, W.J. Alcohol treatment of soybeans and soybeans proteins products. **Cereal Chem.** Sant Paul, 54 (6): 1229-37, 1977.

FEITERS, M.C. AASA, R.; MALMSTROM, B.G.; SLAPPENDEL, S.; VELDINK, G.A., VLIEGENTHART, J.F.G. Substrate fatty acid activation in soybean lipoxygeanse-I catalysis. **Biochem. Biophys. Acta.** Amsterdam, 831: 302-5, 1985.

FEITERS, M.C.; VELDING, G.A.; VLIEGENTHART, J.F.G. Heterogeneity of soybean lipoxygenase-2. **Biochem. Biophys Acta.** Amsterdam, 870:367-71, 1986.

FUJIMAKI, M.; ARAI, S.; KIRIGAYA, N.; SAKURAI, Y. Studies of flavor compounds in soybean. Part1. aliphatic carbonyl compounds. **Agric. Biol. Chem.** Easton, 29: 855-858, 1965.

FONTES, E.P.B. Análise eletroforética da proteína de reserva de cultivares de soja e caracterização de mutantes. Viçosa, UFV, Imp. Univers., 1983. 60p (Dissertação de mestrado).

FORNAROLI, S.; PETRUSSA, E.; BRAIDOT, E.; VIANELLO, A.; MACRI, F. Purification of a plasma membrane-bound lipoxygenases from soybean cotyledons. **Plant Sci.** Limerick, 145: 1-10, 1999.

GALLIARD, T.; CHAN, H.W.S. Lipoxygenases. In:STUMPF, PK.,(ed). The biochemistry of plants. a comprehensive treatise. New York, Academic Press, 1980. p.131-157.

GARDNER, H.W. Soybean lipoxygenase-1 enzymically forms bth (9S) and (13S)-hidroperoxides from linoleic acid by a pH-dependent mechanism. **Biochm. Biophys. Acta.** Amsterdam 1001: 247-81, 1989.

GARDNER, H.W. Lipoxygenase pathway in cereals. In Advances in Cereal Science and Technology. VolIX, edY. Pomeranz. Am. Assoc. Cereal Chem., St Paul. MN, USA, 1988, 161-215p.

GERMAN, J.B.; KINSELLA, J.E. Lipid oxidation in fish tissue, enzymatic initiation via lipoxygenase. **J. Agric. Food Chem.** Easton, 33:680-83, 1985.

GIBIAN, M.J. GALAWAY, R.A. Eteady-state kinetics of lipoxygenase oxygenation of unsaturated fatty acids. **Biochem.** New York, 15:4209-14, 1976.

GILABERT, M.P.; CARMONA, F.G. Chromatographic analysis of lipoxygenases products. **Analytic Chemical**. 465: 319-335, 2002.

GOSENS, A.E. Protein foods; flavor and off-flavors. **Food Eng.** New York, 46(10): 59-60, 1974.

GROSSMAN, S.; BERGMAN, M.; SKLAN, D. Lipoxygenase in chicken muscle. **J. Agric. Food Chem.** Easton, 36:1268-70, 1988.

GROSSMAN, S.; ZAKUT, R. Determination of the activity of lipoxygenase (lipoxidase). **Meth. Biochem. Analysis**, 25: 303-29, 1978.

HAMBERG, M.; SAMUELSSON, B. On the specificity of the oxygenation of unsaturated fatty acids catalysed by soybean lipoxygenase. **J. Biol. Chem.** Seoul, 242: 5329-35, 1976.

HILDEBRAND, D.F.; HAMILTON-KEMP, T.R.; LEGG, C.S.; BOOKJANS, G. Plant lipoxygenases: occurrence, properties and possible function. **Curr.Topics in Plant Biochem. Physiol.** New York, 7:201-19, 1988.

HILDEBRAND, D.F.; HYMOWITZ, T. Carotene and chlorophyll bleaching by soybeans with and without seed lipoxygenase-1. **J. Agric. Food, Chem.** Easton, 30:705-8, 1982.

HILDEBRAND, D.F.; HYMOWITZ, T. Two genotypes lacking lipoxygenase-1. **J. Am. Oil Chem.** New York, 49: 583-86, 1981.

HILDEBRAND, D.F.; KITO, M. Role of lipoxygenase in soybean seed protein quality. **J. Agric. Food Chem.** Easton, 32: 815-19, 1984.

HOLMAN, R.T. Direct measurement of reductants and products. **Meth. Bioch. Anal.**, 2:116-19, 1955.

HSIEH, R.J.; GERMAN, J.B.; KINSELA, J.E. Lipoxygenase in fish tissue: some properties of the 12-lipoxygenase from trout gill. **J. Agric. Food Chem.** Easton, 36:680-85, 1988.

HSIEH, R.J.; HUANG, S.; CHANG, S.S. Isolation and identification of objectionable volatile flavor compounds in defatted soybean flour. **J. Am. Sci.**, 47:18-18, 1981.

ISLAS-FLORES, I.; CORRALES-VILLAMAR, S.; BEARER, E.; RAYA, J.C.; VILLANUEVA, M.A. Isolation of lipoxygenase isoforms from *Glycine max* embryo axes based on apparent cross-reactivity with anti-myosin antibodies. **Biochem. Biophys. Acta.** Amsterdam, v.1171, n.1, 64-70, 2002.

JARÉN-GALÁN, M.; MINGUEZ-MOSQUERA, M.I. Effect of pepper lipoxygenase activity and its linked reactions on pigments of the pepper fruit. **J. Agric. Food Chem.** Easton, 47:4532-36, 1999.

KIKUCHI, A.; KITAMURA, K. Simple and rapid corotene bleaching tests for the detection of lipoxygenase isozymes in soybean seeds. **Japan J. Breed.** Tokyo, 37: 10-16, 1987.

KITAMURA, K.; DAVIES, C.S.; KAIZUMA, N.; NIELSEN, N.C. Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase-3 in soybean seeds. **Crop Science.** Madison, 23: 924-27, 1983.

KITAMURA, K. Biochemical characterization of lipoxygenase lacking mutants, L-1-less, and L-2-less, and L-3-less soybeans. **Agric. Biol. Chem.** Tokyo, 48:9, 339-46, 1984.

KITAMURA, K.; DAVIES, C.S.; KAIZUMA, N.; NIELSEN, N.C. Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase-3 in soybean seeds. **Crop Sci.** Madison, 23:924-7, 1983.

KLAJN, V.M.; Avaliação de lipoxygenases em soja pela cooxidação do β -caroteno e ação destas enzimas no branqueamento de farinha de trigo. Viçosa, UFV, Imp. Univers., 1991, 47p (Dissertação de mestrado).

KLEIN, B.P.; GROSSMAN, S.; KING, D.; COHEN, B.S.; PINSKY, A. Pigment bleaching carbonyl production and antioxidant effects during the anaerobic lipoxygenase reaction. **Biochem. Biophys. Acta.** Amsterdam, 793:72-79, 1984.

KLEIN, B.P.; KING, D.; GROSSMAN, S. Cooxidation reactions of lipoxygenase in plant systems. **Adv. Free Radical Biol. Medicine.** New York, 1:309-43, 1985.

KOBAYASHI, A.; TSUDA, Y.; HIRATA, N.; KUBOTA, K.; KITAMURA, K. Aroma constituents of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]Milk lacking lipoxygenase isozymes. **J. Agric.Food Chem.** Easton, 43(9): 2449-2452,1995.

KOCH, R.B.; STERN, B.; FERRARI, C.G. Linoleic acid and trilinolein as substrates for soybean lipoxidase(s). **Arch. Bioch. Biophys.**, 78:165-79, 1958.

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.** Chicago, 35(4): 343-45, 1970.

KULKARNI, A.P.; COOK, D.C. Hidroperoxidase activity of lipoxygenase: a potential pathway for xenobiotic metabolism in the presence of linoleic acid. **Research Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.**, 61(3): 305-14, 1988.

KUN, H.; EGGERT, L.; ZABOLOSKY, O.A.; MYAGKOVA, G. I.; SCHEWE, T. Keto fatty acids not containing doubly allylic methylenes are lipoxygenase substrates. **Biochem.** Amsterdam, 30: 10269-73, 1991.

KURIBAYASHI, T.; KAISE, H.; UNO, C.; HARA, T.; HAYAKAWA, T.; JOH, T. Purification and characterization of lipoxygenase from *Pleurotus ostreatus*. **J. Agric.Food Chem.** Easton, 50:1247-53, 2002.

LANNA, A. C. Caracterização cinética do sistema lipoxigenase de folhas de soja de genótipos com e sem lipoxigenases nas sementes. Viçosa, MG: UFV, 1995. 79p. Dissertação. Universidade Federal de Viçosa, 1995.

LEONI, O.; IORI, R.; PALMIERI, S. Purification and properties of lipoxygenase in germination sunlower seeds. **J. Food Sci.** Chicago, 50:88-92, 1985.

LESS, R. Manual de analyses de alimentos (Laboratory handbook of methods of food analysis) - Zaragoza, Ed. Acribia, 1979, 124-125, 17p.

LIU, K. Soybeans: Chemistry, technology, and utilization. An Aspen Publication: New York, 1999, 57-63p.

LUDIKHUYZE, L.R.; BROECK, I.V.D.; WEEMAES, C.A.; HENDRICKX, M.E. High pressure and thermal denaturation kinetics of soybean lipoxygenase a study based on gel electrophoresis. **Academic Press**. 31: 680-86, 1998.

MacLEOD, G.; AMES, J. Soya flavour and its improvement. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** Oxford, 27: 219-400, 1988.(Citado por ROBINSON, 1994).

MARCZY, J.S.; SIMON, M.L. MOZSIK, L.; SZAJANI, B. Comparative study on the lipoxygenase activities of some soybean cultivars. **J. Agric. Food Chem.** Easton, 43(2): 313, 1995.

MATOBA, T.; HIDAKA, H.; KITAMURA, K.; KAIZUMA, N.; KITO, M. Contribution of hidroperoxide lyase activity to n-hexanal formation in soybean. **J. Agric. Food Chem.** Easton, 33: 856-8, 1985.

MATOBA, T.; HIDAKA, H.; NARITA, H.; KITAMURA, K.; KAIZUMA, N.; KITO, M. Lipoxygenase-2 isozyme is responsible for generation of n-hexanal in soybean homogenate. **J. Agric. Food Chem.** Easton, 33: 852-5, 1985.

MOHAMMADI, M.; KARR, A.L. Induced lipoxygenases in soybean root nodules. **Plant Sci.** Limerick, 164:471-479, 2003.

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.** Chicago, 46(11), 623-26, 1969.

MUSTAKAS, G.C.; ALBRECH, 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 Tech.** Chicago, 24(11), 290-96, 1970.

MACCARRONE, M.; VELDINK, G.A.; VLIEGENTHART, J.F.G. Phytochrome control and anoxia effect on the activity and expression of soybean seedling lipoxygenases 1 and 2. **FEBS**, 291(1): 117-121, 1991.

NAVARATNAM, S.; FEITERS, M.C.; AL-HAKIM, M.; ALLEN, J.C.; VELDINK, G.A.; Vliegenthart, J.F.G. Iron environment in soybean lipoxygenase-1. **Biochem. Biophys. Acta.** Amsterdam, 956:70-76, 1988.

NELSON, M.J.; SEITZ, S.P. The structure and function of lipoxygenase. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, 4:878-884, 1994.

NELSON, A.I.; STEINBERG, M.P.; WEI, L.S. Illinois process for preparation of soymilk. **J. Food Sci.** Chicago, 41(1): 57-61, 1976.

NIELSEN, G.S.; LARSEN, L.M.; POLL, A. Formation of aroma compounds and lipoxygenase (EC 1.13.11.12) activity in unblanched leek (*Allium ampeloprasum* var. *bulga*) slices during long-term frozen storage. **J. Agric. Food Chem.** Easton, 51:1970-76, 2003.

NISHIBA, Y.; SUDA, I. Degradation of vitamin E, vitamin C, and lutein in soybean homogenate: A comparison of normal soybean and lipoxygenase lacking (triple-null) soybean. **J. Agric. Food Chem.** Easton, 46:3708-12, 1998.

OOMAH, B.D., VOLDENG, H., FREGEAU-REID, J.A. Characterization of soybean proteins by HPLC. **Plant. Food Human Nutr.**, 45: 251-263, 1994.

PETERSON, L. SLAPPENDEL, S.; Vliegenthart, J.F.G. The magnetic susceptibility of native soybean lipoxygenase-1. Implications for the symmetry of the iron environment and the possible co-ordination of dioxygen to iron (II). **Biochem. Biophys. Acta.** Amsterdam, 828:81-5, 1985.

PÉREZ, A.G.; SANZ, C.; OLIÁS, R.; OLIÁS J.M. Lipoxygenase and hidroperoxide lyase activities in ripening strawberry fruits. **J. Agric. Food Chem.** Easton, 47:253, 1999.

RAMADOSS, C.S.; PISTORIUS, E.K.; AXELROD, B. Coupled oxidation of carotene by lipoxygenase requires two isoenzymes. **Arch. Biochem. Biophys.**, 190(2): 549-52, 1978.

REZENDE, 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, Imp Univers.1986, 41p. (Dissertação de mestrado).

RICE, R.D.; WEI, L.S.; STEINBERG, M.P.; NELSON, A.I. Effect of enzyme inactivation on the extractable soybean meal and oil. **J. Am. Oil Chem. Soc.** New York, 58(5): 578-83, 1981.

RIDOLFI, M.; TEREZIANI, S.; PATUMI, M.; FONTANAZZA, G. Characterization of the lipoxygenases in some olive cultivars and determination of their role in volatile compounds formation. **J. Agric. Food Chem.** Easton, 50:835-39, 2002.

ROBINSON, D.S.; WU, Z.; DOMONEY, C.; CASEY, R. Lipoxygenases and the quality of foods. **Food Chem.** Oxford, 54: 33-43, 1995.

- ROZA, M.; FRANCKE, A. Product specificity of soybean lipoxygenases. **Biochem. Biophys. Acta.** Amsterdam, 1973.
- SANZ, L.C.; PÉREZ, A.G.; OLIÁS, J.M. La lipoxigenasa en el reino vegetal. I. Propiedades. Información, vol 4, fasc.4, 1991.
- SELL, A.M. Técnicas imunológicas na análise genética das lipoxigenases LOX-1 e LOX-2 em soja. Viçosa, UFV, Imp. Univer., 1988. 65p (Dissertação de mestrado).
- SESSA, D.J.; HONIG, D.H.; RACKIS, J.J. Lipid oxidation in full-fat and defatted soybean flakes as related to soybean flavor. **Cereal Chem.** Sant Paul, 46: 675-86, 1969.
- SIEDOW, J.N. Plant lipoxygenase: structure and function. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 42:145-88, 1991.
- SILVA, F.B.; OLIVEIRA, M.G.A.; BATISTA, R.B.; PIRES, C.V.; XAVIER, L.P.; PIOVESAN, N.D.; OLIVEIRA, J.A.; JOSÉ, I.C.; MOREIRA, M.A. Função fisiológica de lipoxigenases de folhas de soja submetidas ao ataque de lagarta (*anticarsia gemmatilis hubner*). **Arq. Inst. Biol.** São Paulo. 69(1): 67-74, 2002.
- SLAPPENDEL, S.; VELDINK, G.A.; Vliegenthart, J.F.G. AASA, R.; MALMSTROM, B.G. EPR spectroscopy of soybean lipoxygenase-1: description and quantification of the high spin Fé(III) signals. **Biochem. Biophys. Acta.** Amsterdam, 667:77-86, 1981.
- SOBREIRO, L.G. Estudo da estabilidade da Lipoxigenase de soja: Aplicação de alta pressão hidrostática no processamento tecnológico. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro 2001, 100p. (Tese de Doutorado).
- STO. ANGELO, A.J.; HUCK, J.C.; ORY, R.L. Role of lipoxygenase and lipid oxidation in quality of oil seeds. **J. Agric. Food Chem.** Easton, 27:29, 1979.
- SUDA, I.; HAJIKA, M.; NISHIBA, Y.; FURUTA, S.; IGITA, K. Simple and rapid method for the selective detection of individual lipoxygenase isozymes in soybean seeds. **J. Agric. Food Chem.** Easton, 43: 742-747, 1995.
- SUMNER, R.J. Lipid oxidase studies. A method for the determination of lipoxidase activity. **Anal Chem.**, 15:14-15, 1943.
- TANGWONGCHAI, R.; LEDWARD, D.A.; AMES, J.M. Effect of high-pressure treatment on lipoxygenase activity. **J. Agric. Food Chem.** Easton, 48(7): 2896-2902, 2000.
- TAKAMURA, H.; KITAMURA, K.; KITO, M. Inhibition by lipoxygenase-3 of n-hexanal generation in soybeans. **FEBS**, 292(1,2): 42-44, 1991.

TAVARES, J.Q.T. Avaliação da redução da atividade das isoenzimas lipoxigenases na geração F₄ de linhagens de soja IAC-8 com germoplasma -LOX-1, -LOX-2 e -LOX-3. Campinas. UNICAMP, 1991. 103p (Dissertação de mestrado).

THANH, V. H.; SHIBASAKI, K. Major proteins of soybean seeds-straightforward fractionation and their characterization. **J. of Agric. Food Chem.** Easton, 24(6): 1117-21, 1976.

VELDINK, G. A.; VLIEGENTHART, J.F.G. Lipoxygenases, non-heme iron-containing enzymes. Advances in Inorganic Biochemistry, vol VI, ed G.L. Eichorn. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1984, 139-61p. (Citados por ROBINSON, 1994).

VERNOOY-GERRITSEN, M.; LEUNISSEN, J.L.M.; VELDINK, G.A.; VICK, B.A.; ZIMMERMAN, D.C. Oxidative system for modification of fatty acids: the lipoxygenase pathway, In: P.K. Stumpf (Ed), The Biochemistry of Plants: A comprehensive Treatise, vol 9, Academic Press, Orlando, FL, USA, 1987, 53-90p. (Citados por MOHAMMADI, 2003).

VLIEGENTHART, J.F.G. Intracellular localization of lipoxygenase-1 and 2 in germination soybean seeds by indirect labeling with protein A-colloidal gold complexes. **Plant Physiol.**, 76:1070 -79, 1984.

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.** Easton, 27(3):623-26, 1979.

WILKENS, W.F.; LINS, F.M. Gas chromatographic and mass spectral analyses of soybean milk volatiles **J. Agric. Food Chem.** Easton, 18(3): 333-35, 1970.

WOLF, W.J. Lipoxygenase and flavor of soybean protein products. **J. Agr. Food Chem.** Easton, 23(2): 136-41, 1975.

WOLF, W. J.; COWAN, J.C. Soybeans as a Food Source. **CRC Press** , Boca Raton, FL, 1975.

WU, Z.; ROBINSON, D.S.; HUGHES, R.K.. CASEY, R.; HARDY, D.; WEST, S.I. Cooxidation of catalyzed by soybean and recombinat pea lipoxygenases. **Am. Chem. Soc.**, 1999.

YAMADA, L.T.P.; BARCELOS, M.F.P.; SOUSA, R.V.; LIMA, A.L. Composição química e conteúdo de ferro solúvel em soja [Glycine max (L.) Merrill]. **Ciência e Agrotecnologia.**, Lavras, 27(2): 2003.

