

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA LIPOXIGENASE EM LINHAGENS DE SOJA (1)

HAIKO ENOK SAWAZAKI (2), JOÃO PAULO FEIJÃO TEIXEIRA (2, 4)
e MANOEL ALBINO COELHO DE MIRANDA (3, 4)

RESUMO

Com o fim de verificar os melhores métodos para identificação de mutantes de soja para a enzima lipoxigenase e a possível correlação entre atividade enzimática e teor de ácido linolênico, foram analisadas sementes do cultivar IAC-8 e das linhagens A-5 (de baixo teor de ácido linolênico), PI 408251 (mutante menos L₁), PI 86023 (mutante menos L₂), Tohoko nº 74 (mutante menos L₃), e as da geração F₂ do cruzamento do 'IAC-8' com as linhagens mutantes (menos L₁, menos L₂ e menos L₃), quanto aos teores de ácido linolênico, atividade de lipoxigenase e ocorrência de genótipos com ausência de isoenzima de lipoxigenase. A quantificação da atividade enzimática foi realizada por método colorimétrico e a detecção das isoenzimas de lipoxigenase, por focalização isoeletrica. O teor de óleo foi determinado gravimetricamente e o de ácidos graxos, por cromatografia em fase gasosa de seus ésteres metílicos. A determinação da atividade enzimática forneceu boa indicação para identificação final das isoenzimas por focalização isoeletrica, permitindo o emprego desse método para a escolha de linhagens em programa de melhoramento genético visando a maior estabilidade do óleo de soja. Para o material estudado, não se encontrou correlação entre atividade enzimática e teor de ácido linolênico.

Termos de indexação: soja, *Glycine max* (L.) (Merrill), lipoxigenase, ácido linolênico.

(1) Recebido para publicação em

(2) Seção de Fitoquímica, Instituto Agronômico (IAC), Caixa Postal 28, 13001 Campinas (SP).

(3) Seção de Leguminosas, IAC.

(4) Com bolsa de suplementação do CNPq.

1. INTRODUÇÃO

Fatores antinutricionais da soja, como inibidores de tripsina e quimotripsina, fatores bociogênicos e hemaglutininas, são inativados por tratamento térmico em umidade adequada, de forma a ser efetivo e a não diminuir muito a solubilidade da proteína. A desnaturação térmica influi nas propriedades físicas de gelificação, texturização ou fibrilação da proteína. O tratamento térmico excessivo empobrece o valor nutritivo, diminuindo os teores de aminoácidos sulfurados sensíveis ao calor e a disponibilidade da lisina: com a hidrólise dos carboidratos, ocorre o aumento do nível dos açúcares redutores, que reagem com os grupos α -amino da lisina na reação de Maillard.

A ativação da enzima lipoxigenase, pelo aumento da umidade necessária para a efetividade do tratamento térmico, origina a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados com o sistema pentadieno, principalmente o ácido linolênico, desenvolvendo sabor e odor desagradáveis (MUSTAKAS et al., 1969, e SESSA et al., 1969).

MATTICK & HAND (1969) isolaram 80 compostos voláteis que acharam ser o resultado da atividade da lipoxigenase, identificando 40, sendo grande a concentração de n-hexanal e n-hexanol. Identificaram entre estes o principal causador do sabor desagradável, semelhante ao "green-beany", que não está presente na soja crua, mas se desenvolve imediatamente após maceração do grão, devido à autooxidação do óleo de soja.

Métodos utilizados para a melhoria das características organolépticas, como o tratamento térmico, extração com solventes orgânicos, utilização, segundo CHIBA et al. (1979), da enzima aldeído-desidrogenase (que catalisa a conversão irreversível dos aldeídos em seus ácidos correspondentes), têm sido estudados.

Em relação ao óleo, os "off flavors" podem ser removidos por processos de refinação, mas os componentes de degradação do odor e sabor permanecem, causando o desenvolvimento do gosto desagradável, sendo necessária a hidrogenação para aumentar a estabilidade do óleo.

A literatura relata a existência de isoenzimas de lipoxigenase em soja, por gel eletroforese de disco, com coloração específica das bandas enzimaticamente ativas (GUSS et al., 1967, 1968).

CHRISTOPHER et al. (1970) isolaram uma isoenzima, distinta da lipoxigenase tipo 1, anteriormente conhecida como a dos ácidos graxos. Devido à especificidade de substrato sobre uma faixa de pH, relataram ser a enzima tipo 2 a responsável pela lipoxigenase dos triglicerídeos, corroborando KOCH et al. (1958).

CHRISTOPHER et al. (1972) isolaram uma terceira isoenzima da lipoxigenase de soja, distinta das lipoxigenases 1 e 2. Relataram os pontos isoelétricos de 5,68 para a 1; 6,25 para a 2 e 6,15 para a 3. As lipoxigenases 1 e 2 apresenta-

ram pH ótimo, respectivamente 9,5 e 6,5. A tipo 3 mostrou atividade na faixa de pH 4,5 a aproximadamente 9,0.

KITAMURA (1984) identificou três linhagens mutantes de soja que não apresentaram as bandas das isoenzimas da lipoxigenase, a menos L_1 , a menos L_2 e a menos L_3 , por método gel eletroforese com dodecilsulfato de sódio (SDS).

VERHUE & FRANCKE (1972) e FUNK et al. (1985), através de focalização isoeétrica e coloração específica das bandas com atividade enzimática, resolveram as duas classes principais de isoenzimas (tipos 1 e 2).

Os alelos nulos lx_1 , lx_3 e lx_2 foram identificados para as proteínas L_1 , L_3 e L_2 por HILDEBRAND & HYMOWITZ (1982), KITAMURA et al. (1983) e DAVIES & NIELSEN (1986). Esses autores identificaram os genótipos duplos recessivos lx_1lx_1 , lx_3lx_3 e lx_2lx_2 e a ligação dos genes das proteínas L_1 e L_2 .

Sendo possível a diminuição da atividade da lipoxigenase pela incorporação dos genes mutantes recessivos, procurou-se pesquisar, neste trabalho, os melhores métodos para a identificação do nível e tipo de atividade enzimática, assim como sua correlação quanto aos teores do ácido linolênico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se as sementes de soja *Glycine max* (L.) Merrill, dos cultivares IAC-8 (comercial) e das linhagens A-5 (de Illinois, de baixo teor de ácido linolênico, HAMMOND & FEHR, 1983), PI 408251 (mutante menos L_1), PI 86023 (mutante menos L_2) e Tohoko nº 74 (mutante menos L_3), da colheita de setembro de 1985, e as sementes da geração F_2 do cruzamento do 'IAC-8' com os mutantes menos L_1 , menos L_2 e menos L_3 , da colheita de março de 1986.

O substrato empregado foi extraído do óleo de sementes de *Manihot castingae* Ule contendo 85% de ácido linolêico.

Para diferenciação dos cultivares realizaram-se as seguintes análises quantitativas e qualitativas: (a) extração de lipídios por hexano em Soxhlet (TRIEBOLD & AURAND, 1963); (b) ácidos graxos, esterificados de acordo com HARTMAN & LAGO (1973), por cromatografia em fase gasosa, utilizando coluna de vidro 6' X 1/8" com fase líquida DEGS 10%, suporte Chromosorb WAW, 60/80 mesh, sob temperatura de 180°C; (c) lipoxigenase, pelo método do tiocianato de KOCH et al. (1958) modificado, que mede a formação de hidroperóxidos; (d) proteína solúvel, pelo método de LOWRY et al. (1951); (e) gel eletroforese com SDS, de KITAMURA (1984); (f) focalização isoeétrica com coloração enzimática (VERHUE & FRANCKE, 1972, e FUNK et al., 1985).

2.1. Extração de lipoxigenase

Moeram-se os grãos até obtenção de farinha com granulometria de 20 malhas, que foi guardada a 4°C. Na farinha desengordurada pelo método de

Soxhlet, efetuou-se a extração de lipoxigenase pela homogeneização em tampão tris-HCl pH 7,0, 0,05M, com dez minutos de ultra-som por três vezes e centrifugação a 10.000 rpm por dez minutos a 4°C. Utilizou-se a relação 1:10 ou 1:100 (grama de amostra/mililitro de tampão) para a análise qualitativa ou quantitativa.

Manteve-se o extrato enzimático a 4°C, utilizando-se pipetas capilares para evitar aderência da enzima às paredes de vidro dos recipientes (ALLEN, 1968).

2.2. Modificação do método do tiocianato

a) Reação enzimática

Pouco antes de se efetuar a reação enzimática, diluiu-se o extrato enzimático de 20 a 40 vezes, pois, uma vez diluída, a atividade é mais facilmente perdida (DILLARD et al., 1961). A solução estoque do substrato foi constituída de 0,01g de ácido linoléico.ml⁻¹ de etanol.

Efetuu-se a reação enzimática, misturando-se, em tubos de ensaio, 0,2ml de extrato enzimático diluído com 0,2 ml de solução de substrato diluído (1:10) em tampão tris-HCl 0,2M, pH 8,4 ou 7,0, com ou sem 0,05mM Ca²⁺. A reação foi interrompida aos cinco minutos pela adição de 3 ml de álcool etílico.

b) Reação de coloração dos hidroperóxidos

Adicionou-se ao tubo com reação enzimática interrompida 0,1 ml HCl 20% (v/v) e 0,05 ml de solução Fe²⁺ 0,1%. Agitou-se e, após 30 segundos, acrescentou-se 0,1 ml de tiocianato de amônio 10%. Decorridos 5–15 minutos fez-se a leitura, a 480 nm. A solução estoque de Fe²⁺ consistiu em 5% de sulfato ferroso amoniacal em HCl 3% (v/v).

2.3. Determinação qualitativa

Para a determinação do perfil eletroforético das isoenzimas da lipoxigenase L₁, L₂ e L₃, utilizou-se o método SDS-PAGE de KITAMURA (1984) e o de focalização isoelétrica como se segue. A extração foi realizada com tampão pH 7,0, 0,05M (1:10), com extração dos peptatos de cálcio, de acordo com FUNK et al. (1985). O gel de 13 x 11 x 0,1cm, consistiu em 7% de acrilamida, 0,2% de N-N-metileno-bis-acrilamida, 0,05% tetrametiletlenodiamina, 1% de anfolitos (0,53% de pH 4,0–6,5, 0,27% de pH 4,5–9,0 e 0,20% de pH 3,0–10,0), 0,0003% de riboflavina e 0,0033% de persulfato de amônia. Os compartimentos do ânodo (inferior) e cátodo (superior) foram preenchidos com H₃PO₄ 0,1M e NaOH 0,2M. A coloração das bandas para lipoxigenase, de acordo com VERHUE & FRANCKE (1972), foi feita pela imersão do gel em meio contendo 0,1% (p/v) σ -dianisidina, 0,1% (p/v) ácido linoléico e 10% (v/v) etanol em tampão NaPi pH 7,0 0,1M. Para proteína, pela imersão em meio contendo 0,05% de Coomassie blue e 0,1% de CuSO₄ em ácido acético-etanol-H₂O (RIGHETTI & DRYSDALE, 1974).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, determinou-se a atividade da lipoxigenase da amostra IAC-8 pelo método do tiocianato, verificando-se que para ocorrer quase toda a reação enzimática do extrato de 1000 μg (1:10) de amostra, são necessários 4 minutos e 0,713 μmol do substrato ácido linoléico, em um volume de 0,4 ml.

Realizadas as reações dos extratos correspondentes a 1.000 μg das amostras IAC-8, menos L_1 , menos L_2 e menos L_3 , por 5 minutos, em volume de 0,4 ml, observou-se a atividade máxima quando a concentração do substrato variou de 0,178 a 0,267 mM. O 'IAC-8' teve maior atividade enzimática, requerendo mais substrato, enquanto a menos L_1 , de menor atividade, sofreu maior inibição com o aumento do substrato (Figura 1). Os valores de K_M , considerando-se apenas as concentrações iniciais do substrato, foram de 0,024, 0,044, 0,032 e 0,030 mM, indicando que o 'IAC-8' teve reação mais rápida, seguido pelo menos L_3 , menos L_2 e menos L_1 .

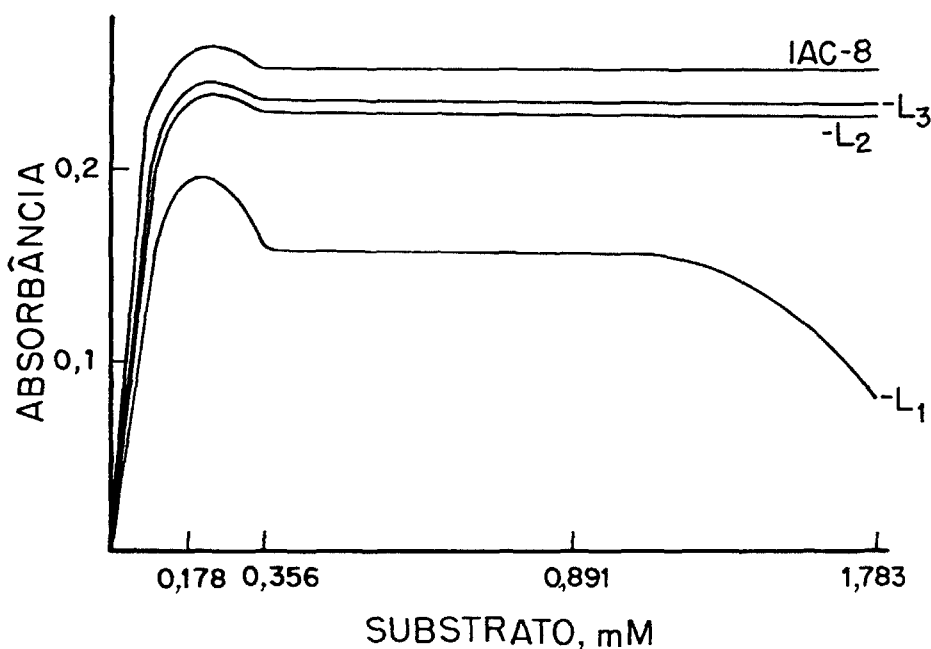


FIGURA 1. Relação entre velocidade de reação de lipoxigenase e concentração de substrato.

Em vista de os resultados das reações dos extratos enzimáticos de 1.000 µg de amostra com 1,783 mM de substrato quase não determinarem diferenças entre os cultivares, procurou-se determinar a quantidade de amostra necessária para se obter a caracterização das amostras, cujos resultados em atividade específica estão no quadro 1.

A leitura da atividade enzimática em absorbância, correlacionada com o conteúdo protéico do extrato enzimático, obtido de acordo com LOWRY et al. (1951), é apresentada como a atividade específica (AE):

$$AE = \frac{100 \times \text{absorbância enzima}}{\text{absorbância protéica}}$$

Verificou-se que, a partir do extrato de 60 µg de amostra, ocorreu maior diferença entre o cultivar IAC-8 e as linhagens.

Nesse caso, a extração foi feita na razão de 1:100.

Pelo quadro 2, verifica-se que a quantidade de ácidos graxos insaturados, seja com duas (linoléico), seja com três (linolênico) ligações duplas, não pareceu correlacionar negativamente com a atividade enzimática, ou seja, para menor atividade não ocorreu maior quantidade do ácido linolênico. A linhagem A-5 revelou baixo índice de ácido linolênico, embora a atividade enzimática não fosse muito inferior à do IAC-8.

O quadro 3 apresenta os resultados, em absorbância, das análises de lipoxigenases no pH 8,4 e no pH 7,0 com e sem Ca²⁺, das amostras da geração F₂ do cruzamento 'IAC-8' X mutante identificadas como mutantes por focalização isoelétrica.

QUADRO 1. Atividade específica (AE) do extrato enzimático (ou de lipoxigenase) de quantidades variáveis de amostras na reação com 1,783 mM de substrato, pH 8,4 0,05 mM Ca²⁺, volume total 0,4 ml

Cultivar	Amostra (µg)					
	400	250	100	80	60	40
PI 408251 (- L ₁)	22	9	3	18	12	10
PI 86023 (- L ₂)	41	109	69	126	188	126
Tohoko nº 74 (- L ₃)	41	109	69	126	189	126
A-5	39	102	112	206	225	170
IAC-8	44	111	114	207	259	258

QUADRO 2. Variação nos teores de óleo e de ácidos graxos de grãos de soja

Cultivar	Óleo	Ácidos graxos				
		Palmitico	Estearico	Oléico	Linoléico	Linolênico
	%			%		
PI 408251 (- L ₁)	17,56	13,71	1,42	17,93	58,67	8,26
PI 86023 (- L ₂)	17,86	16,64	1,35	25,83	49,39	6,80
Tohoko nº 74 (- L ₃)	14,30	13,53	1,20	18,68	57,92	8,66
A-5	20,69	12,85	1,31	44,55	38,89	2,40
IAC-8	20,20	14,18	1,47	23,63	52,43	8,29

QUADRO 3. Níveis da lipoxigenase (em absorvância)

Cultivar	pH 8,4	pH 7,0	
		Com Ca ²⁺	Sem Ca ²⁺
IAC-8	0,300	0,292	0,284
- L ₂	0,252	0,108	0,108
IAC-8 X - L ₂	0,268	0,143	0,137
IAC-8 X - L ₂	0,244	0,125	0,108
IAC-8 X - L ₂	0,167	0,086	0,092
IAC-8 X - L ₂	0,222	0,086	0,086
- L ₃	0,256	0,284	0,237
IAC-8 X - L ₃	0,284	0,310	0,237
IAC-8 X - L ₃	0,194	0,284	0,208
IAC-8 X - L ₃	0,237	0,301	0,260
IAC-8 X - L ₃	0,268	0,310	0,260
IAC-8 X - L ₃	0,174	0,310	0,260
IAC-8 X - L ₃	0,222	0,284	0,229
- L ₁	0,032	0,187	0,174

Segundo KOCH (1968), o íon Ca²⁺ estimula a lipoxigenase. CHRISTOPHER et al. (1972), porém, relatam que o íon Ca²⁺ estimula a atividade da lipoxigenase L₂ a pH 7,0 e inibe a da L₃ em condições similares.

Como ocorreu o estímulo do íon Ca^{2+} na atividade da lipoxigenase L_2 , a atividade do mutante menos L_3 é menor em pH 7,0 sem Ca^{2+} do que com Ca^{2+} . Como a atividade da lipoxigenase L_2 é maior no pH 7,0, o mutante menos L_2 tem menor atividade no pH 7,0 em relação ao 8,4.

O perfil das isoenzimas por SDS-PAGE foi de difícil identificação, tendo-se preferido o método de focalização isoelétrica para a identificação dos mutantes, como se vê na figura 2, que apresenta as bandas isoelétricas do cultivar IAC-8 e das linhagens Tohoko nº 74, PI 86023 e PI 408251: metade do gel (segmento I) foi colorido para proteína (RIGHETTI & DRYSDALE, 1974) e metade (segmento II) para lipoxigenase (VERHUE & FRANCKE, 1972): a mutante menos L_3 apresentou fracas as bandas A, B e C; a mutante menos L_2 , a banda E forte no lugar da D, e a mutante menos L_1 , fracas as bandas A, D e E.

De acordo com os resultados do presente trabalho, as análises quantitativas da atividade de lipoxigenase forneceram uma indicação do tipo de cultivar, facilitando a identificação final do mutante por focalização isoelétrica, uma vez que este último método necessita ser realizado só nas amostras com identificação quantitativa positiva.

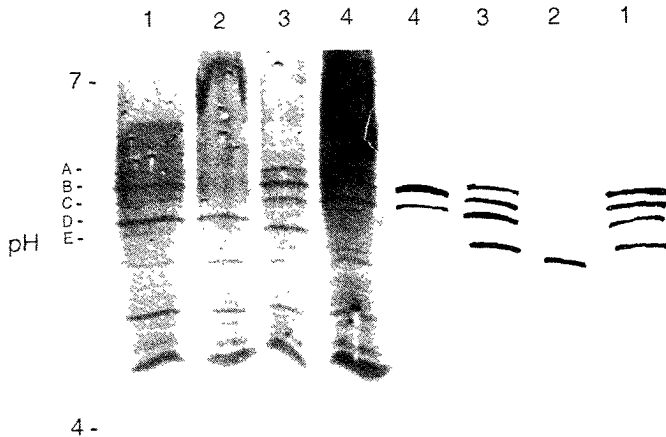


FIGURA 2. Resolução das isoenzimas de lipoxigenase de extratos de sementes de soja por focalização isoelétrica: 1: 'IAC-8'; 2: Tohoko nº 74; 3: PI 86023; 4: PI 408251. I: Coloração protéica. II: Coloração enzimática.

SUMMARY

LIPOXYGENASE ACTIVITY IN SOYBEAN LINES

Seed of soybeans, *Glycine max* L. (Merrill), cultivar IAC-8 and lines A-5, low linolenic acid content, PI 408251, lacking L₁ mutant, PI 86023, lacking L₂ mutant, Tohoko n^o 74, lacking L₃ mutant, and F₂ population from the crosses between IAC-8 and mutant lines (lacking L₁, L₂ and L₃) were analysed for linolenic acid content, lipoxygenase activity and identification of mutant lines lacking L₁, L₂ or L₃ isoenzymes. The purpose was to evaluate methods to identify mutants lines of soybean for lipoxygenase and to verify a possible correlation between enzymatic activity and linolenic acid content. The enzymatic activity was estimated quantitatively by a colorimetric method and lipoxygenase isoenzymes detection by isoelectric focusing. The oil seed content was determined by gravimetry and the fatty acids content by gas liquid chromatography of their methyl esters. The lipoxygenase activity data was good to indicate mutant lines for the final identification using isoelectric focusing. It permits the use of this method for choosing lines in breeding program to obtain a good soybean oil stability. It was not observed correlation, in the material studied, between enzymatic activity and linolenic acid content.

Index terms: soybeans, *Glycine max* (L.) (Merrill), lipoxygenase, linolenic acid.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, J.C. Soybean lipoxygenase. 1. Purification, and the effect of organic solvents upon the kinetics of the reaction. *European Journal Biochemistry*, **4**:201-208, 1968.
- CHIBA, H.; TAKAHASHI, N. & SASAKI, R. Enzymatic improvement of food flavor. II. Removal of beany flavor from soybean products by aldehyde dehydrogenase. *Agricultural and Biological Chemistry*, **43**:1883-1889, 1979.
- CHRISTOPHER, J.; PISTORIUS, E. & AXELROB, B. Isolation of an isozyme of soybean lipoxygenase. *Biochimica et Biophysica Acta*, **198**:12-19, 1970.
- ; PISTORIUS, E.K. & BERNARD, A. Isolation of a third isoenzyme of soybean lipoxygenase. *Biochimica et Biophysica Acta*, **284**:54-62, 1972.
- DAVIES, C.S. & NIELSEN, N.C. Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase-2 in soybean. *Crop Science*, **26**:460-463, 1986.
- DILLARD, M.G.; HENICK, A.S. & KOCH, R.B. Differences in reactivity of legume lipoxidases. *The Journal of Biological Chemistry*, **236**:37-40, 1961.
- FUNK, M.O.; WHITNEY, M.A.; HAUSKENECHT, E.C. & O'BRIEN, E.M. Resolution of the isoenzymes of soybean lipoxygenase using isoelectric focusing and chromatofocusing. *Analytical Biochemistry*, **146**:246-251, 1985.
- GUSS, P.L.; RICHARDSON, T. & STAHMANN, M.A. The oxidation-reduction enzymes of wheat. III. Isoenzymes of lipoxidase in wheat fractions and soybean. *Cereal Chemistry*, **44**:607-610, 1967.

- GUSS, P.L.; RICHARDSON, T. & STAHMANN, M.A. Oxidation of various lipid substrates with unfractionated soybean and wheat lipoxidase. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **45**:272-276, 1968.
- HAMMOND, E.G. & FEHR, W.R. Registration of A5 germplasm line of soybean. *Crop Science*, **23**:192, 1983.
- HARTMAN, L. & LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, **22**:475-477, 1973.
- HILDEBRAND, D.F. & HYMOWITZ, T. Inheritance of lipoxygenase-1 activity in soybean seeds. *Crop Science*, **22**:851-853, 1982.
- KITAMURA, K. Biochemical characterization of lipoxygenase lacking mutants, L-1-less, L-2-less, and L-3-less soybean. *Agricultural and Biological Chemistry*, **48**:2339-2346, 1984.
- ; DAVIES, C.S.; KAIZUMA, N. & NIELSEN, N.C. Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase-3 in soybean seeds. *Crop Science*, **23**:924-927, 1983.
- KOCH, R.B. Calcium ion activation of lipoxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **125**:303-307, 1968.
- ; STERN, B. & FERRARI, C.G. Linoleic acid and trilinolein as substrates for soybean lipoxidase (s). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **78**:165-179, 1958.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.C. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**:265-275, 1951.
- MATTICK, L.R. & HAND, D.B. Identification of a volatile component in soybean that contributes to the raw bean flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **17**:15-17, 1969.
- MUSTAKAS, G.C.; ALBRECHT, W.J.; MCGHEE, J.E.; BLACK, L.T.; BOOKWALTER, G.N. & GRIFFIN JUNIOR, E.L. Lipoxidase deactivation to improve stability, odor and flavor of full-fat soy flours. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **46**:623-626, 1969.
- RIGHETTI, P.G. & DRYSDALE, J.W. Isoelectric focusing in gels. *Journal of Chromatography*, **98**:271-321, 1974.
- SESSA, D.J.; HONIG, D.H. & RACKIS, J.J. Lipid oxidation in full-fat and defatted soybean flakes as related to soybean flavor. *Cereal Chemistry*, **46**:675-686, 1969.
- TRIEBOLD, H.O. & AURAND, L.N. Food composition and analysis. New York, Van Nostrand, 1963. 497p.
- VERHUE, W.M. & FRANCKE, A. The heterogeneity of soybean lipoxygenase. *Biochimica et Biophysica Acta*, **284**:43-53, 1972.