

# **Implantação de método de eletroforese SDS-PAGE para identificação da presença de grãos contendo lipoxigenase em extrato de soja**

Utilization of SDS-PAGE electrophoresis for identification of grains containing lipoxigenase in soymilk

**Marília P. Stephan<sup>1</sup>; Tatiana de L. Azevedo<sup>1</sup>; Ilana Felberg<sup>1</sup>; Caroline Mellinger-Silva<sup>1</sup>; Alexandro A. dos Santos<sup>1</sup>; Joana de N. Pereira<sup>2</sup>; David R. de Oliveira<sup>1</sup>; Mercedes Carrão-Panizzi<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas 29501, CEP 23020-470, Rio de Janeiro, RJ, [marilia.stephan@embrapa.br](mailto:marilia.stephan@embrapa.br); <sup>2</sup>Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ; <sup>3</sup>Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS

## **Abstract**

Soy products processed improperly have unpleasant taste and aroma to the Western population due to the presence of compounds formed during processing by the action of lipoxigenase. To solve or minimize this problem Embrapa developed soybean cultivars, which features the absence of lipoxigenases (LOX1, LOX2 and LOX3) in their grains. These isozymes migrate in electrophoresis in the range of 100 kDa. This study aimed to establish a methodology to identify the presence of soybeans grains containing LOX in soymilk. The extraction was performed by using lyophilized soymilk and 0.05M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer. The polyacrylamide gel was used in the concentration of 12% during a period of 7 hours and at 100V. It demonstrated the effectiveness of the electrophoresis as a method for the identification of soymilk prepared with grains with and without LOX.

**Keywords:** lipoxigenase, electrophoresis, methodology

## **Resumo**

Produtos de soja processados de maneira inadequada apresentam sabor e aroma desagradáveis ao paladar ocidental, resultantes da presença de compostos formados pela ação de enzimas lipoxigenases durante processamento dos grãos. Para resolver ou minimizar esse problema a Embrapa lançou cultivares, dentre as quais a BRS 213 e BRS 257, que apresentam ausência das lipoxigenases (LOX1, LOX2 e LOX3), isoenzimas que migram em eletroforese na faixa de 100 kDa. O objetivo deste trabalho foi implantar metodologia que permita identificar a presença de LOX em grãos e extrato de soja. Cinco cultivares (BRS 213, BRS 216, BRS 257, BRS 267 e BRS 284) e seus respectivos extratos foram avaliados neste estudo. As amostras foram solubilizadas em tampão Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,05M. A corrida em gel de poliácridamida a 12%, por 7h e a 100V. Comprovou-se a eficácia da eletroforese SDS-PAGE como metodologia para identificação de grãos e extrato com e sem LOX.

**Palavras-chave:** lipoxigenase, eletroforese, metodologia

## Introdução

Desde a década de 70, a eletroforese tem sido utilizada em pesquisas científicas, com destaque de aplicação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, com a finalidade de pesquisar fraudes. Diversos autores têm lançado mão dessa ferramenta, útil para detectar e quantificar a presença de ingredientes estranhos à composição de diversos produtos, como carnes e produtos lácteos (ABDEL-AZIZ *et al.*, 1997; STEPHAN, 2006). A eletroforese de proteínas também tem sido utilizada em trabalhos de avaliação da degradação e da oxidação proteica de produtos de origem animal, para avaliar a cura de produtos específicos, como presuntos de designação de origem controlada e, ainda, durante a aplicação de tratamento térmico (GIL; GUERRERO; SARRAGA, 1999; FRAZÃO; STEPHAN; FURTADO, 2005; LARREA *et al.*, 2006; XIA *et al.*, 2009). A aplicação desta técnica para identificação de proteínas de grão de soja também vem sendo empregada especialmente no que concerne a identificação da presença das três diferentes isoenzimas do tipo lipoxigenase (KITAMURA, 1984).

A soja é um alimento de valor nutricional já reconhecido por seu alto conteúdo proteico e o elevado índice de isoflavonas presentes em sua constituição. Porém, nem sempre os consumidores estão dispostos a consumir esta leguminosa por apresentar sabor desagradável. Para minimizar esse problema de aceitação, a Embrapa lançou cultivares especiais para alimentação humana. Estas cultivares são resultados de melhoramento genético obtido por meio de cruzamentos naturais. A BRS 213 e BRS 257 apresentam deficiência de expressão genética das três lipoxigenases, o que pode vir a evitar o desenvolvimento do sabor desagradável do grão. São três tipos de lipoxigenases (LOX1, LOX2 e LOX3) e estas são isoenzimas que migram em eletroforese na faixa de 100 kDa. Estas se caracterizam por catalisarem a reação de transformação dos ácidos linolêicos e linolênicos em compostos carbonílicos de cadeia curta, como aldeídos, álcoois, cetonas e hidrocarbonetos. Estes compostos associam-se as proteínas, conferindo sabor desagradável a seus derivados, limitando desta forma a popularização dos produtos a base de soja. Este trabalho teve como objetivo implantar uma metodologia de análise de soja por eletroforese SDS-PAGE que permita identificar a presença de grãos de soja contendo LOX em extrato de soja.

## Material e Métodos

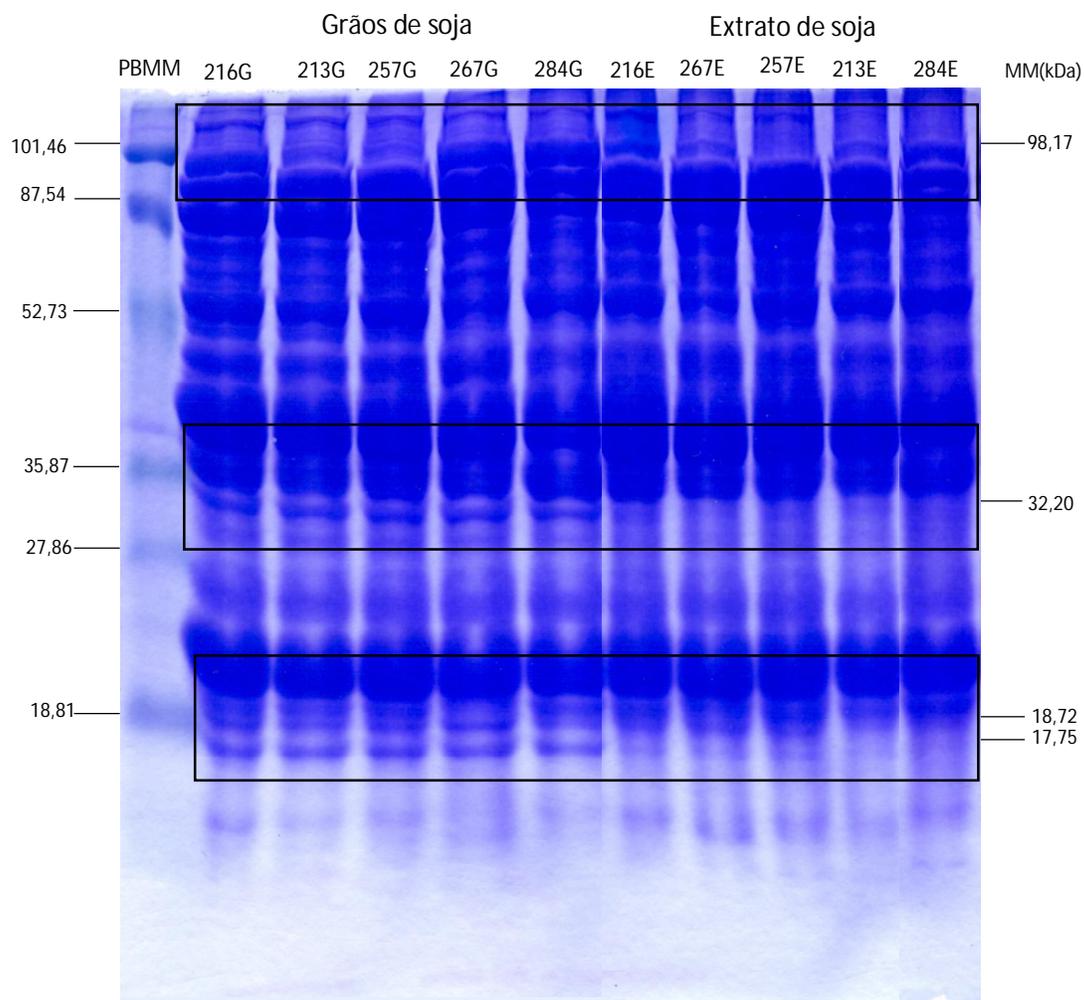
Para avaliação dos grãos de soja, estes foram descascados e moídos. Já os extratos foram elaborados conforme descrito por FELBERG e colaboradores (2009), cujos procedimentos envolvem o descascamento e cozimento dos grãos à ebulição em solução de bicarbonato de sódio, lavagem, drenagem e trituração com água à ebulição, centrifugação e tratamento térmico. Os extratos foram liofilizados para realização das análises. As amostras foram preparadas para aplicação em gel de eletroforese solubilizando-se 2mg em 1 ml de tampão carbonato ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,05 M, uréia 6 M, sacarose 12% e SDS 1%).

Foi utilizado para este estudo o sistema de eletroforese da marca Biorad e a metodologia de preparação dos géis descrita por LAEMMLI (1970). Para o gel de corrida foi utilizada acrilamida na concentração de 12% e no gel de aplicação na concentração de 4%. A corrida foi realizada durante 7h sob uma tensão de 100V.

Os marcadores de alto peso molecular foram obtidos a partir dos seguintes padrões de proteínas (em kDa): miosina 202,44;  $\beta$ -galactosidase 116,58; albumina de soro bovino 98,08 e ovalbumina 47,11. Os marcadores de baixo peso molecular foram obtidos a partir dos seguintes padrões de proteínas (em kDa): fosforilase B 101,46; albumina de soro bovino 87,54; ovalbumina 52,73; anidrase carbônica 35,87; inibidor de tripsina de soja 27,86 e lisozima 18,81. As proteínas dos géis foram coradas com o reagente de cor “coomassie blue R250”, durante uma noite, e descoradas com uma solução de metanol/ácido acético/água destilada (40: 10: 50) por 3h. As amostras foram analisadas em duplicata.

## **Resultados e Discussão**

Para o desenvolvimento da metodologia de identificação de LOX em extrato de soja foram utilizadas 5 diferentes cultivares: BRS 213, BRS 216, BRS 257, BRS 267 e BRS 284. Foram analisados os grãos de soja e seus respectivos extratos hidrossolúveis. Podemos observar (Figura1), o desaparecimento de três bandeamentos proteicos na faixa de 32,20; 18,72 e 17,79 kDa nas amostras de extratos de soja. Estas três proteínas estão presentes em todos os tipos de soja estudadas, com e sem LOX. Portanto, estas cadeias polipeptídicas não poderiam ser utilizadas como marcadores que indiquem a presença das isoenzimas das cultivares que foram modificadas. Porém, podem ser utilizadas para diferenciar o material “*in natura*” de uma amostra processada. Foi identificado em alguns perfis uma banda na faixa de 98,17kDa, referente as isoenzimas lipoxigenase (KITAMURA, 1984). Os grãos das cultivares BRS 216, BRS 267 e BRS 284 apresentaram esta banda com forte coloração devido a presença destas enzimas em sua constituição. Já o perfil dos grãos BRS 213 e BRS 257 não apresentaram esta banda. Assim, todos os extratos de soja obtidos a partir destes também não deveriam apresentar a banda referente às LOXs. A pequena intensidade de coloração identificada para a banda de 98,17kDa do extrato da cultivar BRS 213 pode ser oriunda de alguma hidrólise de cadeia polipeptídica de maior massa molecular (proveniente de uma outra enzima). O mesmo efeito não foi observado pelo grão da variedade BRS 257. Portanto, esta cultivar pode ser utilizada como modelo para implantação desta metodologia. Quando analisamos o perfil dos extratos obtidos das cultivares BRS 216, BRS 267 e BRS 284 a banda das lipoxigenases (98,17kDa) apresenta-se com uma coloração bem intensa, indicando a presença das enzimas no grão de origem. Portanto, apesar do processamento, e inativação da enzima, não há modificação da integridade proteica da LOX o que evidencia que este pode ser um método adequado para identificação molecular e análise rápida da origem de extratos de soja.



**Figura 1.** Eletroforese SDS-PAGE dos grãos de soja e seus respectivos extratos hidrossolúveis analisados

### Conclusão

O método utilizado foi eficiente para identificar a presença de lipoxigenase em extratos e grãos de soja. Os resultados comprovaram que as amostras de extratos que continham LOX tinham como origem grão de soja que apresenta estas isoenzimas. O método também permitiu a diferenciação do material *in natura* e processado. A cultivar BRS 257 serviu como modelo de implantação de metodologia de análise eletroforética de grãos com e sem LOX.

### Referências Bibliográficas

ABDEL-AZIZ, S.A.; ESMAIL, S.A.; HUSSEIN, L.; JANSSEN, F. **Chemical composition and levels of non-meat proteins in meat brands extended with soy protein concentrate.** Food Chemistry, v.60, n.3, p. 389-395, 1997.

FELBERG, I.; ANTONIASSI, R.; DELIZA R.; FREITAS S. C. DE; DELLA MODESTA, R. C. Soy and Brazil nut beverage: processing, composition, sensory, and color evaluation. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 29, n. 3, p. 609-617, jul./set. 2009.

FRAZÃO, A.S.; STEPHAN, M.P.; FURTADO, A.A.L. **Utilização de eletroforese (SDS-PAGE) para estudo de proteínas de tecido muscular de lula “in natura” e processada.** *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, v.23, n.2, p.311-328, 2005.

GIL, M.; GUERRERO, L.; SÁRRAGA, C. **The effect of meat quality, salt and ageing time on biochemical parameters of dry-cured Longissimus dorsi muscle.** *Meat Science*, v.51, n.4, p.329-337, 1999.

KITAMURA, k. **Biochemical characterization of lipoxygenase lacking mutants , L-1-less, L-2-less, and L-3-less soybeans.** *Agricultural Biological Chemistry*. 1984, 48, 2339-2346.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680-685, 1970

LARREA, V.; HERNANDO, I.; QUILES, A.; LLUCH, M.A.; PÉREZ-MUNUERA, I. **Changes in proteins during Teruel dry-cured ham processing.** *Meat Science*, v.74, n.3, p.586-593, 2006.

MACK, A. J; PERTERMAN, T.K, SIEDOW, J.N. **Lipoxygenase isozymes in higher plants: biochemical properties and physiological role.** *Isozymes: Curr.Top.Biol.Med.Res.* 1987, 13, 127-154.

SOUZA, E.M.T.; ARRUDA, S.F.; BRANDÃO, P.O.; SIQUEIRA, E.M.A. **Electrophoretic analysis to detect and quantify additional whey in milk and dairy beverages.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.20, n.3, p.314-317, 2000.

STEPHAN, M.P. **Estudos iniciais de utilização de eletroforese (SDS-PAGE) para avaliação de fraude em produtos comercializados como concentrado de soro de queijo.** *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.61, n.351, p.214-217, 2006.

VALLEJO-CORDOBA, B.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A.F.; MAZORRA-MANZANO, M.A.; RODRÍGUEZ-RAMÍREZ, R. Capillary electrophoresis for the analysis of meat authenticity. *Journal of Separation Science*, v.28, n.9-10, p.826-836, 2005.

WANG , J.; FUJIMOTO, K.; MIYAZAWA, T., ENDO, Y.; KITAMURA, K. **Sensitivities of lipoxygenase-lacking soybean seeds to accelerated aging and their chemiluminescence levels.** *Phytochemistry* 1990, 29, 3739-3742.

XIA, X.; KONG, B.; LIU, Q.; LIU, J. **Physicochemical change and protein oxidation in porcine longissimus dorsi as influenced by different freeze-thaw cycles.** *Meat Science*, v.83, n.2, p.239-245, 2009.