

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Soja
Ministério da Agricultura e Pecuária

ISSN 3085-9514

Eventos Técnicos & Científicos

5

Julho, 2025

Resumos expandidos 20ª Jornada Acadêmica da Embrapa Soja

30 de junho e 1º de julho de 2025
Londrina, PR

Embrapa Soja
Londrina, PR
2025

Embrapa Soja

Rod. Carlos João Strass, s/n
Acesso Orlando Amaral, Caixa postal
4006, CEP 86085-981, Distrito de
Warta, Londrina, PR
(43) 3371 6000
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações**Presidente**

Roberta Aparecida Carnevalli

Secretária-executiva

*Regina Maria Villas Bôas
de Campos Leite*

Membros

*Clara Beatriz Hoffmann-Campo,
Claudine Dinali Santos Seixas, Claudio
Guilherme Portela de Carvalho,
Fernando Augusto Henning, Leandro
Eugênio Cardamone Diniz, Liliane
Márcia Mertz-Henning, Maria Cristina
Neves de Oliveira e Norman Neumaier*

Organização da publicação

*Regina Maria Villas Bôas
de Campos Leite
Liliane Márcia Mertz-Henning
Kelly Catharin*

Normalização

Valéria de Fátima Cardoso

Capa

Vanessa Fuzinatto Dall'Agnol

Diagramação

*Vanessa Fuzinatto Dall'Agnol e
Marisa Yuri Horikawa*

Publicação digital: PDF**Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Soja

Jornada Acadêmica da Embrapa Soja (20. : 2025: Londrina, PR).

Resumos expandidos [da] XX Jornada Acadêmica da Embrapa Soja, Londrina, PR,
30 de junho e 1 de julho de 2025 – Londrina : Embrapa Soja, 2025.

PDF (153 p.) - (Eventos técnicos & científicos / Embrapa Soja, ISSN 3085-9514; 5)

1. Soja. 2. Pesquisa agrícola. I. Título. II. Série.

CDD (21. ed.) 630.2515

Inativação do KTI1 em soja por CRISPR-Cas9: Quantificação da inibição da tripsina

Matheus Monteiro Quilici⁽¹⁾, Rodrigo Thibes Hoshino⁽²⁾, Angela Maria Vieira da Silva⁽³⁾, Liliâne Marcia Mertz-Henning⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Estudante de Agronomia, Centro Universitário Filadélfia (UNIFIL), Bolsista PIBIC/CNPq, Londrina, PR. ⁽²⁾ Engenheiro-agrônomo, doutor, bolsista da Fundação de Apoio à Pesquisa e ao Desenvolvimento (FAPED), Londrina, PR. ⁽³⁾ Química, doutoranda em Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. ⁽⁴⁾ Engenheira-agrônoma, doutora, pesquisadora da Embrapa Soja, Londrina, PR.

Introdução

A soja (*Glycine max* Merrill.) é uma leguminosa de importância global, sendo o Brasil o maior produtor mundial. Apresenta elevado valor nutricional, composta por aproximadamente 40% de proteína, 20% de óleo e 30% de carboidratos (Choi et al., 2022; Padalkar et al., 2023). O grão de soja é utilizado em diversas finalidades, porém, devido ao seu alto teor proteico tem sido utilizada principalmente na alimentação animal.

Apesar de seus benefícios, a soja contém fatores antinutricionais, substâncias que afetam a conversão alimentar por diminuem o valor nutritivo do grão, além de poder causar alterações metabólicas se consumidas sem tratamento adequado (Liener, 1994). Entre os fatores antinutricionais da soja, os inibidores de tripsina e as lectinas são os mais importantes, representando, respectivamente, cerca de 6% e 10% do total de proteína da soja (Wiederstein et al., 2023).

O inibidor de tripsina Kunitz (KTI) destaca-se como o principal inibidor de protease presente na soja, constituindo cerca de 2 a 6% da proteína total. O consumo de grãos ou farelo de soja não tratados pode afetar significativamente o crescimento e o metabolismo basal de animais monogástricos. O KTI atua inibindo a ação de enzimas proteolíticas, como a tripsina, essenciais para a hidrólise de proteínas em aminoácidos absorvíveis. Essa inibição pode resultar na diminuição do crescimento animal em 30-50% e induzir a hipertrofia e hiperplasia pancreática devido à hipersecreção de enzimas (Liener, 1994, 1995).

Historicamente, a inativação dos inibidores de tripsina é realizada por tratamento térmico a temperaturas elevadas (90,5°C - 100°C),

frequentemente com presença de NaOH (Chen et al., 2014). Apesar de o KTI ser suscetível ao calor, ele ainda requer tempo mínimo de inativação (Okedigba et al., 2023). Contudo, esse método, não inativa completamente todos os inibidores, encarece o processo de produção do farelo, diminui a qualidade e solubilidade das proteínas, além de aumentar o custo energético em até 25% (Chang et al., 1987). Diante dessas limitações, o melhoramento genético tradicional buscou cultivares com mutações naturais (PI157740 - *KTI3* e PI 68679 - *KTI1*) (Gillman et al., 2015). No entanto, a combinação dessas características por cruzamento e retrocruzamento é um processo demorado e pode introduzir características indesejáveis (Wang et al., 2022).

Nesse cenário, a edição genômica via CRISPR-Cas9 pode ser uma alternativa promissora. Essa tecnologia permite mutações direcionadas para inativar genes específicos, como os do *KTI*, diretamente no genoma da planta, superando as desvantagens do melhoramento convencional (Wang et al., 2022). Embora estudos recentes já tenham demonstrado o silenciamento de *KTI1* e *KTI3* em cultivares modelo, ainda há uma lacuna de pesquisa em cultivares elites.

O objetivo deste trabalho foi avaliar um genótipo de soja elite editado por CRISPR-Cas9, com a inativação do gene *KTI1*, e quantificar a participação do gene na inibição da atividade da tripsina.

Material e Métodos

O evento editado de soja utilizado neste estudo foi obtido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja e apresenta o gene *KTI 1* silenciado. A variedade empregada como *background* genético foi a BRS 573.

A análise da atividade do inibidor de tripsina foi realizada por espectrofotometria, seguindo uma adaptação do método de Kakade et al. (1974). Este método baseia-se na determinação da atividade da tripsina contra o substrato N-benzoil-DL-arginina p-nitroanilida (BAPA). A inibição da tripsina pelo extrato da amostra de soja é quantificada pela redução da formação do produto p-nitroanilina, que é medida por absorbância a 410 nm. Durante todo o experimento, foram utilizados tripsina bovina, N-benzoil-DL-arginina p-nitroanilida (BAPA), Tris base (hidroximetil) amino-metano, cloreto de cálcio di-hidratado e água deionizada.

Preparo de soluções reagentes

Solução de BAPA: 40 mg de N-benzoil-DL-arginina p-nitroanilida (BAPA) hidrocloreto foram dissolvidas em 1 mL de dimetilsulfóxido e diluídos para 100 mL com tampão Tris (0,05 M, pH 8,2) contendo 0,02 M CaCl_2 , pré-aquecido a 37 °C. A solução de BAPA foi preparada diariamente e mantida a 37 °C durante o uso.

Solução de Tripsina: 4 mg de tripsina bovina (cristalina, livre de sais), precisamente pesados, foram dissolvidos em 200 mL de HCl 0,001 M. A solução foi armazenada sob refrigeração.

Tampão Tris: 6,05 g de Tris-(hidroximetil)aminometano e 2,94 g de CaCl_2 foram dissolvidos em 900 mL de água. O pH foi ajustado para 8,2, e o volume completado para 1 litro com água.

Preparo e desengorduramento das amostras

Quarenta gramas das amostras de soja (cultivar BRS 573 e BRS 573 editada KO-KT11) foram moídas em moinho refrigerado e transferido para Erlenmeyers de 250 mL, aos quais foram adicionados 250 mL de hexano. Os frascos foram selados com parafilme e submetidos à agitação em agitador magnético, na velocidade mínima, por 15 horas à temperatura ambiente. Após o período de agitação, as amostras foram filtradas a vácuo, e a farinha desengordurada foi peneirada em malha de 100 mesh para separação de partículas.

Extração proteica

As extrações foram realizadas em triplicata. Um grama da farinha desengordurada de cada amostra foi pesado e transferido para Erlenmeyers de 125 mL, seguido da adição de 50 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,01 N. As suspensões foram mantidas sob agitação na velocidade mínima por 3 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, o pH de cada suspensão foi ajustado para 9,2 utilizando HCl ou NaOH 1N. Em seguida, 2,0 mL da solução extraída foram pipetados para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água destilada, preparando a amostra para o ensaio.

Ensaio de inibição da tripsina in vitro

Reações foram preparadas em tubos de ensaio, sendo três para a amostra diluída da BRS 573, três para a BRS 573 editada, um tubo branco e um tubo padrão. Em cada tubo de amostra e padrão, adicio-

nou-se 2,0 mL da amostra diluída e 2,0 mL de solução de tripsina. As misturas foram agitadas e incubadas em banho-maria a 37 °C por 10 minutos. Após a incubação, 5,0 mL da solução de BAPA (previamente aquecida) foram adicionados. Os tubos foram novamente agitados e mantidos em banho-maria por mais 10 minutos.

Para interromper a reação, 1,0 mL de solução de ácido acético 30% foi adicionado a todos os tubos sob agitação. Simultaneamente, 2,0 mL de solução de tripsina foram adicionados apenas ao tubo branco. As amostras foram então filtradas utilizando papel de filtro Whatman nº 3, e o filtrado foi submetido à leitura da absorbância em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 410 nm.

Cálculo da atividade do inibidor de tripsina

A atividade do inibidor de tripsina (TI) foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{mg\ TI}{g} = \frac{(Ab\ padrão - Ab\ amostra) \times 2500}{38 \times massa\ amostra}$$

Análise estatística

As diferenças nos níveis da atividade do KTI (mg/g) entre as amostras de soja (BRS 573 e BRS 573 editada) foram submetidas a análise de variância (ANOVA), teste t de Student, e os resultados apresentados por BoxPlot com 95% de intervalo de confiança. As análises foram realizadas utilizando o software RStudio.

Resultados e Discussão

Os resultados da análise de inibição da tripsina demonstraram que a edição genética da cultivar de soja BRS 573 resultou em uma redução significativa nos níveis da atividade do KTI. O material editado apresentou uma redução média de 9,71% na atividade de inibição em comparação com a cultivar não editada. Essa diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) confirmado pelas análises de variância (ANOVA) e teste t de Student.

A redução da atividade de inibição do KTI1 é claramente observada pelos gráficos de boxplot e de médias com intervalo de confiança (IC95%) (Figura 1). Os gráficos mostram uma clara separação entre os grupos, indicando que a inativação do gene KTI1 via CRISPR-Cas9 impactou diretamente na atividade dessa proteína. Adicionalmente

ao gene *KTI1*, estamos gerando eventos editados dessa mesma cultivar, com silenciamento do gene *KTI3*, que é responsável pela maior parte da atividade de inibição de tripsina em soja. Posteriormente essas mutações poderão ser incorporadas por meio de hibridação controlada para a geração de mutantes com duplo nocaute dos genes *KTI1* e *KTI3*.

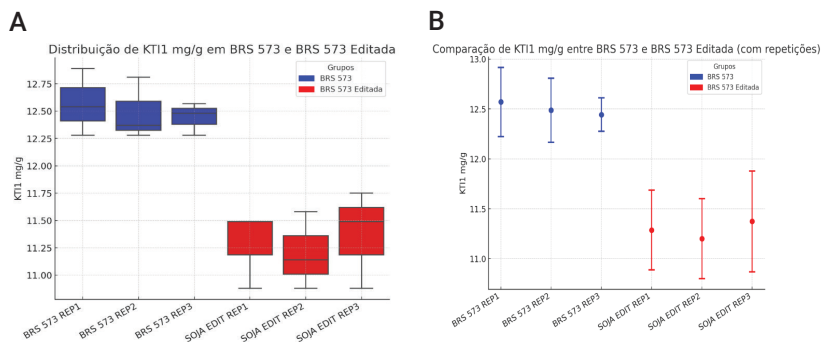


Figura 1. Comparação dos níveis da atividade do inibidor de tripsina KTI mg/g entre BRS 573 e BRS 573 Editada, em gráfico de caixa (boxplot) (A). Média dos valores para cada grupo, barras verticais indicam o intervalo de confiança de 95% (B).

Conclusão

A edição genômica por CRISPR-Cas9 inativou efetivamente o gene *KTI1* na soja, resultando em uma redução significativa na inibição da atividade da tripsina. Os resultados quantitativos validam a eficácia da edição para aprimorar o perfil nutricional da cultivar. Essa abordagem oferece um caminho promissor para o desenvolvimento de variedades de soja com maior valor nutricional para a alimentação animal.

Referências

- CHANG, C. J.; TANKSLEY JR, T. D.; KNABE, D. A.; ZEBROWSKA, T. Effects of different heat treatments during processing on nutrient digestibility of soybean meal in growing swine. **Journal of Animal Sciences**, v. 65, n. 5, p. 1273-1282, 1987.
- CHEN, Y.; XU, Z.; ZHANG, C.; KONG, X.; HUA, Y. Heat-induced inactivation mechanisms of Kunitz trypsin inhibitor and Bowman-Birk inhibitor in soy-milk processing. **Food Chemistry**, v. 154, p. 108-116, 2014.

CHOI, S. W.; LY, S.; LEE, J. H.; OH, H. S.; KYM, S. Y.; KIM, N. H.; CHUNG, J. I. Breeding of penta null soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] for five antinutritional and allergenic components of lipoxygenase, KTI, lectin, 7S α' subunit, and stachyose. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, article 910249, 2022.

GILLMAN, J. D.; KIM, W. S.; KRISHNAN, H. B. Identification of a new soybean Kunitz trypsin inhibitor mutation and its effect on Bowman-Birk protease inhibitor content in soybean seed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 5, p. 1352-1359, 2015.

KAKADE, M. L.; RACKIS, J. J.; MCGHEE, E. J.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative investigation. **Cereal Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 377-380, 1974.

LIENER, I. E. Implications of antinutritional components in soybean meal. **Animal Feed Science and Technology**, v. 48, n. 3-4, p. 199-209, 1994.

LIENER, I. E. Trypsin inhibitors and chymotrypsin inhibitors. In: LIENER, I. E. (ed.). **Toxic constituents of plant foodstuffs**. New York: Academic Press, 1995. p. 17-64.

OKEDIGBA, A. O.; ROSSO, M. L.; YU, D.; SHANG, C.; HUANG, H.; ZHANG, B.; CAPELLUTO, D. G. S. Comparative binding affinity analysis of soybean meal Bowman-Birk and Kunitz trypsin inhibitors in interactions with animal serine proteases. **ACS Food Science & Technology**, v. 3, n. 8, p. 1344-1352, 2023.

PADALKAR, G.; MANDLIK, R.; SUDHAKARAN, S.; VATS, S.; KUMAWAT, S.; KUMAR, V.; RANI, A.; RATNAPARKHE, M. B.; JADHAV, P.; BHAT, J. A.; DESHMUKH, R.; SHARMA, T. R.; SONAH, H. Necessity and challenges for exploration of nutritional potential of staple-food grade soybean. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 117, 105093, 2023.

WIEDERSTEIN, M.; BAUMGARTNER, S.; LAUTER, K. Soybean (*Glycine max*) allergens - A review on an outstanding plant food with allergenic potential. **ACS Food Science & Technology**, v. 3, n. 3, p. 363-378, 2023.