

EFEITO DA ELIMINAÇÃO GENÉTICA DE LIPOXIGENASES E DE POLIPEPTÍDEOS DE RESERVA NA QUALIDADE DA PROTEÍNA DE SOJA¹

Marley Marico Utumi², Everaldo Gonçalves de Barros³, Maria Goreti de Almeida Oliveira⁴, Carlos Siqueyuki Sedyama⁵ e Maurílio Alves Moreira⁶

Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 36571-000

RESUMO - Objetivando verificar o efeito da eliminação genética de lipoxigenases (LOX) e dos polipeptídeos de reserva α' e G4 na qualidade da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] para a agroindústria, realizaram-se cruzamentos entre os genótipos UFV 91.751 (que não apresenta as isoenzimas LOX 2 e LOX 3), Keburi (que não apresenta a subunidade α') e PBTN (que não apresenta as três isoenzimas lipoxigenases e a subunidade G4). Selecionaram-se sementes F₂ sem as três LOX, com presença ou ausência de α' e G4, que a seguir foram plantadas em casa de vegetação. Nas sementes dessas linhagens selecionadas, de seus progenitores e da variedade Cristalina foram analisados os teores de proteína total, de lipídio, de aminoácidos, de ácidos graxos e das subunidades componentes das proteínas de reserva, além da produção de hexanal. A eliminação genética de lipoxigenases e das subunidades α' e G4 não promoveu redução nos teores de proteína total, determinado pelo método de Kjeldhal, ou das proteínas de reserva 7S e 11S das sementes de soja, estimados por densitometria de géis SDS-PAGE, desenvolvidos com proteínas totais extraídas das sementes de soja. A eliminação genética de lipoxigenases de sementes promoveu redução drástica na produção de hexanal, um dos principais compostos responsáveis pelos sabores característicos de produtos protéicos derivados de soja, o que é um indicativo da melhoria de sabor para consumo humano nos genótipos sem lipoxigenases nas sementes. Observou-se diminuição do teor de metionina com a eliminação genética de α' . Esses dados podem ser explicados pelo aumento verificado na síntese de subunidades de β -conglucina com menores teores de metionina (α e β). Por outro lado, observou-se aumento do teor de metionina na proteína da soja com a eliminação genética da subunidade G4. Esses resultados também foram justificados pela observação de uma maior síntese nestes genótipos de subunidades componentes de glicina (G1, G2 e G3) com maiores conteúdos de metionina.

Termos adicionais para indexação: aminoácidos, ácidos graxo, *Glycine max*, lipídios, lipoxigenases, melhoramento, proteínas de reserva.

EFFECT OF GENETIC ELIMINATION OF LIPOXYGENASES AND STORAGE PROTEIN SUBUNITS ON SOYBEAN PROTEIN QUALITY

ABSTRACT - To study the effects of the genetic elimination of seed lipoxigenases (LOX) and of the storage protein subunits α' and G4 on the quality of soybeans [*Glycine max* (L.) Merrill], crosses were made between line UFV 91.751 (LOX 2 and 3 - less) with Keburi (α' - less) and PBTN (a line devoid of all seed lipoxigenases and the G4 subunit). Selected F₂ seeds lacking LOX with and without α' and G4

¹ Trabalho recebido em 30/04/1998 e aceito em 10/06/1998.

² Eng. Agrônoma, D.Sc., Embrapa Rondônia. Caixa Postal 405. Vilhena - RO 78995-000.

³ Professor Titular, PhD, Depto de Biologia Geral - BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 36571-000

⁴ Professora Adjunto, D.Sc., Depto de Bioquímica e Biologia Molecular - BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 36571-000

⁵ Professor Titular, PhD, Depto de Fitotecnia - BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 36571-000

⁶ Professor Titular, PhD, Depto de Bioquímica e Biologia Molecular - BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 36571-000

subunits were sown in the greenhouse. Seeds derived from F₂ plants, from their progenitors and from the Cristalina cultivar were analyzed for protein, lipids, amino acids, fatty acids and storage protein subunit contents, and hexanal production. Genetic elimination of LOX, α' and G4 subunits did not promote reduction of the seed protein content as determined by the Kjeldhal method or, of the content of the seed storage proteins 7S and 11S, estimated by scanning SDS-PAGE gels of the crude soybean seed extracts. Genetic elimination of LOX did promote a large reduction of hexanal production, one of the principal compounds related to the grassy-beany taste of soybean protein based products. Genetic elimination of α' subunit is associated with reduction of methionine content of the soybean protein. These data could be explained by the higher synthesis of the lower methionine content subunits (α and β) of the soybean storage protein β -conglycinin. On the other hand, the genetic elimination of G4 subunit is related to the improvement of methionine content of the soybean protein. This observation could also be explained by the preferential synthesis of the higher methionine content subunits (G1, G2 and G3) of glycinin, one of the major storage protein found in soybean seeds.

Additional index terms: aminoacid composition, beany flavor, breeding, fatty acid composition, *Glycine max*, lipoxigenases, storage proteins.

INTRODUÇÃO

Em geral, o consumo de produtos protéicos derivados da soja é pequeno, devido à presença de sabores característicos ("beany flavor") e teores reduzidos de aminoácidos sulfurados. Tem-se atribuído à atividade da enzima lipoxigenase (EC 1.13.11.12) o desenvolvimento do "beany flavor" em produtos protéicos de soja (Rackis *et al.*, 1979).

Lipoxigenases catalisam a hidroperoxidação de ácidos graxos poli-insaturados que apresentam na sua estrutura o grupo 1,4-cis, cis-pentadieno, produzindo hidroperóxidos que, por reações subseqüentes, geram compostos carbonílicos de cadeia curta constituintes do "beany flavor" (Wolf, 1975). Tratamentos térmicos visando a inativação de lipoxigenases antes ou durante o processamento industrial da soja e extração dos compostos responsáveis pelo "beany flavor" com solventes orgânicos em produtos derivados apresentam-se dispendiosos e não satisfatórios (Wolf, 1975; Kinsella, 1979; Kitamura *et al.*, 1983).

Em sementes de soja geralmente são encontradas três isoenzimas de lipoxigenase, denominadas lipoxigenase 1 (LOX 1), lipoxigenase 2 (LOX 2) e lipoxigenase 3 (LOX 3) (Axelrod *et al.*, 1981). Entretanto, encontram-se no germoplasma mundial de soja genótipos com ausência de LOX 1 (PI 133226 e PI 48251) (Hildebrand & Hymowitz, 1981), de LOX 2 (PI 86023) (Kitamura, 1984) e de LOX 3 (Wasenatsu & Ichigowase) (Kitamura *et al.*, 1983). Linhagens com ausência de LOX 1, LOX 2, LOX 3, LOX 1 e 3, LOX 2 e 3

foram obtidas por retrocruzamentos com variedades comerciais (Kitamura *et al.*, 1985; Davies & Nielsen, 1987; Moreira *et al.*, 1993). Apesar da estreita ligação entre os genes que codificam LOX 1 e 2, tratamentos de populações F₂ de cruzamentos entre linhagem sem LOX 1 e 3 com linhagem sem LOX 2 e 3, com radiações gama, permitiram a obtenção e seleção de materiais genéticos com ausência de LOX 1 e 2 e com ausência completa de lipoxigenases em suas sementes (Hajika *et al.*, 1991).

As proteínas de soja constituem cerca de 35 a 45% da matéria seca da semente. As proteínas de reserva, glicinina (11S) e β -conglycinina (7S), representam em torno de 70% da proteína do grão de soja (Hill & Breidenbach, 1974). Os polipeptídeos constituintes da glicinina e β -conglycinina diferem em seus conteúdos de metionina (Moreira *et al.*, 1979; Coates *et al.*, 1985).

A glicinina apresenta massa molecular de aproximadamente 350 KDa, sendo constituída por polipeptídeos de caráter ácido e de caráter básico. Foram isolados desta proteína seis polipeptídeos ácidos (A1a, A1b, A2, A3, A4 e A5) e cinco básicos (B1a, B1b, B2, B3 e B4), que se encontram associados de modo específico, por meio de ligações bissulfídricas, entre um ácido e um básico, formando as subunidades A1aB2, A1bB1b, A2B1a, A3B4 e A5B3 (Moreira *et al.*, 1979, 1981). O polipeptídeo A4 está associado ao B3, por meio de ligações não covalentes, formando a subunidade A5A4B3 (Staswick *et al.*, 1981). Atualmente, essas subunidades são denominadas G1 (A1aB2), G2 (A1bB1b), G3 (A2B1b), G4 (A5A4B3) e G5 (A3B4) e seus genes *Gy1*, *Gy2*, *Gy3*, *Gy4* e *Gy5*. Os polipeptídeos A1a, A1b, A2, B1 e B2 possuem de três a seis vezes mais metionina que A3, A4, A5, B3 e B4 (Moreira *et al.*, 1979). Em glicinina têm sido observadas variações na composição polipeptídica, como mutantes naturais com ausência do complexo G4 (Fontes & Moreira, 1984).

A β -conglycinina é uma glicoproteína com massa molecular estimada em 150-170 KDa e possui três subunidades, α' , α e β , sendo codificadas pelos genes *Cgy1*, *Cgy2* e *Cgy3*, respectivamente (Thanh & Shibasaki, 1977). As subunidades α e α' possuem dois e três resíduos de metionina, respectivamente, e a subunidade β não possui esse aminoácido (Coates *et al.*, 1985). Existe polimorfismo genético na composição polipeptídica de β -conglycinina, tendo sido identificado genótipo com ausência de α' (Kitamura *et al.*, 1984). Recentemente foi demonstrado que a proteína *Gly m* Bd 30K, principal fator alergênico da soja, liga-se, especificamente, às subunidades α' e α da β -conglycinina por meio de ligações bissulfídricas, durante o preparo de extratos hidrossolúveis de soja, tornando, portanto, desejável o desenvolvimento de genótipos de soja contendo menores teores dessas subunidades (Samoto *et al.*, 1996).

Este trabalho teve como objetivo eliminar geneticamente as isoenzimas lipoxigenases e as subunidades protéicas α' e G4 das sementes de soja, bem como verificar o efeito dessa eliminação genética na qualidade protéica e no sabor de sementes de linhagens de soja.

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais genéticos

Neste trabalho foram utilizadas duas linhagens de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) - UFV 91.751 e Paranaíba Triplo Nulo (PBTN) e uma variedade denominada Keburi.

A linhagem UFV 91.751 apresenta ausência das isoenzimas LOX 2 e 3, é heterogênea para presença de G4 e apresenta α' ($Lx_1Lx_1Lx_2Lx_2Lx_3Lx_3Gy_4Gy_4Cgy_1Cgy_1$), enquanto PBTN apresenta ausência completa de lipoxigenases e G4 e possui α' ($Lx_1Lx_1Lx_2Lx_2Lx_3Lx_3Gy_4Gy_4Cgy_1Cgy_1$). Ambas as linhagens são resultantes de cruzamentos entre variedades comerciais brasileiras e genótipos sem LOX, do Programa de Melhoramento da Qualidade e do Sabor da Soja em desenvolvimento na Universidade Federal de Viçosa. A variedade Keburi apresenta ausência da subunidade α' ($Lx_1Lx_1Lx_2Lx_2Lx_3Lx_3Gy_4Gy_4Cgy_1Cgy_1$).

Inicialmente foram realizados cruzamentos entre 'UFV 91.751' (progenitor feminino) e 'Keburi' (progenitor masculino), com o objetivo de obter um genótipo com ausência da isoenzima LOX 3 e da subunidade α' . A efetividade dos cruzamentos foi verificada pelo teste de co-oxidação do β -caroteno (Kikuchi & Kitamura, 1987). As sementes F_1 , provenientes dos cruzamentos, foram colocadas em germinador a 27°C, no claro. Após 72 h, as plântulas foram transplantadas para vasos com 2,8 l de substrato solo:areia:esterco bovino (3:1:1, v:v:v) e permitiu-se a autofecundação em casa de vegetação. As sementes F_2 , obtidas foram submetidas a análises não destrutivas de detecção de LOX 2 e LOX 3 (testes colorimétricos) e da subunidade protéica α' (eletroforese SDS-PAGE). Plantas F_2 , originadas de sementes que apresentaram ausência de LOX 3 e α' , foram cruzadas com a linhagem PBTN (progenitor feminino), objetivando obter genótipos com ausência de LOX, α' e G4. A efetividade dos cruzamentos foi monitorada por meio da presença de LOX 1, pelo teste de oxidação do iodeto (Hammond *et al.*, 1992). As sementes F_1 foram germinadas em germinador e transplantadas para casa de vegetação. Fragmentos das sementes F_2 foram analisadas para seleção daquelas com ausência completa de lipoxigenases (testes colorimétricos) e seleção de sementes com ausência de α' e de G4 (eletroforese SDS-PAGE). Sementes triplo-nulas com ausência de α' e/ou, G4 foram selecionadas na geração F_3 , oriundas de plantas F_2 com ausência de lipoxigenases que apresentaram as subunidades α' e, ou, G4.

Análises de lipoxigenases

Foram utilizados testes colorimétricos e não destrutivos para detecção de LOX 1, LOX 2 (Hammond *et al.*, 1992) e LOX 3 (Kikuchi & Kitamura, 1987), tomando-se uma pequena porção do cotilédone, do lado oposto ao eixo embrionário, de sementes F_1 , para confirmação dos cruzamentos, e de sementes F_2 , para seleção de indivíduos com ausência de lipoxigenases.

Análise das subunidades α' e G4

As proteínas de reserva de sementes de soja foram extraídas de fragmentos de cotilédones (de 10 a 15 mg) e separadas por eletroforese em gel de poliácridamida,

segundo Laemmli (1970). Para detectar a subunidade α' em sementes F_2 do cruzamento ('UFV 91.751' x 'Keburi'), utilizou-se tampão de extração Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo 2% de SDS. As proteínas foram separadas em gel contendo 10% de poliácridamida e 0,1% de SDS. A eletroforese foi desenvolvida a 80 volts durante 1,5 h, sendo as bandas protéicas reveladas com Coomassie Blue R-250.

Para detecção das subunidades α' e G4 nas sementes F_2 e F_3 com ausência de lipoxigenases, do cruzamento ['PBTN' x ('UFV 91.751' x 'Keburi')], foi utilizado tampão de extração Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo 0,2% de SDS, 10 mM de 2-mercaptoetanol e 6 M de uréia. O gel de separação continha 12% de poliácridamida, 5 M de uréia, Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8 e 0,1% de SDS. A eletroforese foi conduzida a 150 volts durante 4 h. As bandas protéicas foram visualizadas como descrito anteriormente.

Análise da concentração relativa das subunidades das proteínas de reserva

Nesses experimentos as subunidades das proteínas de reserva foram separadas em géis de poliácridamida em gradiente de 10 a 18% e de 4,42 a 5,45 M de uréia (Fontes *et al.*, 1984). As bandas protéicas foram evidenciadas como anteriormente descrito. A imagem do gel foi fotodocumentada em equipamento EagleEye II (Stratagene), e analisada com "software" One DScan (Scanalytics). Foram computadas, em quatro repetições, as densidades relativas de cada uma das bandas componentes das proteínas de reserva e estimadas as proporções de proteínas de reserva na proteína total. Também foram estimadas a relação entre as duas principais proteínas de reserva, glicinina e β -conglucina, e a proporção de polipeptídeos "GA" (subunidades G1, G2, G3 e o polipeptídeo B4 da subunidade G5 da glicinina) e "GB" (subunidade G4 e o polipeptídeo A3 da subunidade G5 da glicinina).

Determinação do teor de proteína total

Para análise da proteína total utilizou-se o método de Kjeldahl (Association of Official Analytical Chemists - AOAC, 1975), quantificando-se o nitrogênio total, que foi multiplicado pelo fator 6,25, para conversão do teor de nitrogênio em teor de proteína. Foram analisadas três repetições para cada genótipo, em amostras contendo cerca de 0,3 g de soja moída em moinho do tipo "Wiley" e passadas em peneira de 20 mesh.

Determinação do teor de lipídios

Os lipídios foram extraídos a frio, em extrator de Soxhlet, utilizando-se éter de petróleo durante 10 h. Os teores de lipídios foram obtidos pela diferença de peso dos balões de extração antes de iniciado o processo de extração e após secagem em estufa, até peso constante, segundo normas analíticas descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (1985). Foram analisadas três amostras de sementes moídas de cada genótipo, com cerca de 3 g.

Determinação da composição de ácidos graxos

A composição de ácidos graxos foi obtida por cromatografia gasosa (Bubeck *et al.*, 1989). Foi utilizado o óleo extraído a frio com éter de petróleo como

solvente, durante 4 h. Após eliminação do solvente com N₂, tomou-se alíquota de 2 µl de óleo, à qual foi adicionado 0,4 ml de metóxido de sódio 1 M, deixando-se reagir por cerca de 1 h, a 30°C, em banho-maria. Adicionou-se 1 ml de água destilada e 1 ml de hexano, deixando-se em repouso durante 1 h, no escuro. Retirou-se 0,25 ml do sobrenadante ao qual foi adicionado 0,75 ml de hexano, injetando-se a mistura em cromatógrafo a gás, modelo GC 17A (Shimadzu), equipado com integrador CR-7A. Foi utilizada uma coluna Carbowax (0,32 mm de diâmetro interno x 30 m de comprimento). As programações da coluna, do injetor e do detector foram isotérmicas a 225°C, 240°C e 280°C, respectivamente. O fluxo do gás de arraste foi de 1,1 ml/min. Efetuaram-se duas repetições por genótipo.

Determinação da composição de aminoácidos

De cada genótipo foram analisadas duas repetições de amostras de sementes de soja moídas em moinho do tipo "Wiley" e passadas em peneira de 100 mesh. A farinha obtida foi desengordurada em extrator de Soxhlet e liofilizada. Adicionalmente foram analisados os teores de proteína total e de umidade deste material, para permitir a expressão dos resultados em porcentagem de aminoácidos na proteína. Os aminoácidos foram analisados por cromatografia de troca iônica, após hidrólise ácida com HCl 6 N, por 22 h, a 110 °C (Spackman *et al.*, 1958), no Centro Interdepartamental de Química de Proteínas, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

Determinação de hexanal

Foi utilizada cromatografia gasosa por "head-space"; em cromatógrafo Shimadzu, modelo GC 14B, equipado com "head-space" modelo 2B e integrador CR-7A. Foram analisadas, em três repetições, amostras de sementes de 0,5 g, misturadas em 2 ml de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0, a 30°C, sendo mantidas a 45°C durante 15 min e, em seguida, injetadas em coluna Carbowax (0,53 mm de diâmetro interno x 25 m de comprimento). Nas condições das análises efetuadas, a temperatura inicial da coluna foi de 45°C, com acréscimos de 7°C/min até 70°C, mantendo-se a 70°C durante 5 min e, com acréscimos de 15°C até atingir a temperatura de 200°C. As temperaturas do injetor e detector de ionização de chama foram programadas para 150°C e 220°C, respectivamente. O fluxo do gás de arraste foi regulado para 5,8 ml/min.

Determinação do teor de umidade

O teor de umidade das sementes dos genótipos de soja foi determinado, em três repetições, por diferença de peso após secagem em estufa a 105°C, conforme normas analíticas descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (1985). Assim, os teores de proteína, lipídios e ácidos graxos foram expressos com base na matéria seca das sementes.

Análises estatísticas

Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados, e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância. Para a análise estatística dos dados obtidos, compararam-se as médias por meio do teste de Duncan,

a 5% de significância. Foram comparadas todas as médias de teores de proteína total, lipídios, aminoácidos, ácidos graxos e subunidades componentes das proteínas de reserva, e as de produção de hexanal.

Também, foram aplicados testes de qui-quadrado (χ^2) para confirmar a segregação mendeliana do fenótipo presença/ausência de LOX 1, 2 e 3 e das subunidades α' e G4, componentes das proteínas de reserva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sementes de soja, da geração F₂, obtidas a partir do cruzamento entre a linhagem UFV 91.751 e a variedade Keburi, foram selecionadas para ausência de LOX 3 e LOX 2 e 3. De um total de 379 sementes analisadas, 266 apresentaram LOX 3 e 113 possuíam esta isoenzima. Dentre estas 113 sementes, descartaram-se 5; e verificou-se que das 108 sementes com ausência de LOX 3, 76 possuíam LOX 2, enquanto 32 mostraram ausência desta isoenzima (Tabela 1).

Utilizou-se o teste de χ^2 para verificar o ajustamento das frequências observadas às proporções previstas de segregação mendeliana de 3:1 para herança monogênica.

Os altos valores de χ^2 obtidos e, portanto, baixos valores de nível de probabilidade verificados para as frequências observadas e esperadas para presença e ausência de LOX 2 e 3, nas sementes F₂ do cruzamento ('UFV 91.751' x 'Keburi'), provavelmente, ocorreram devido ao pequeno número de sementes disponíveis para análise e à atribuição de ausência de LOX às sementes cujos resultados foram duvidosos. Posteriormente foram realizadas análises para detecção de ausência de subunidades protéicas e evitaram-se descartes de sementes potencialmente sem LOX 2 e 3, o que provocaria diminuição no número de sementes. Além disso, foi considerado que o caráter ausência de LOX seria recuperado no cruzamento posterior com 'PBTN', que apresenta ausência completa de lipoxigenases em suas sementes.

TABELA 1 - Frequências observadas e esperadas (3:1) de sementes com e sem lipoxigenases 1, 2 e 3 nas gerações F₂ dos cruzamentos 'UFV 91.751' x 'Keburi' e 'PBTN' x ('UFV 91.751' x 'Keburi'); valor de χ^2 calculado e nível de probabilidade.

Genótipo*	Frequência		χ^2	Probabilidade
	observada	esperada		
'UFV 91.751' x 'Keburi'.				
Lx_3	266,00	284,25	4,6868	0,05 - 0,02
lx_3/lx_3	113,00	94,75		
$Lx_2/lx_3/lx_3$	76,00	81,00	1,2345	0,05 - 0,02
$lx_2/lx_2/lx_3/lx_3$	32,00	27,00		
'PBTN' x ('UFV 91.751' x 'Keburi').				
$Lx_1-Lx_2/lx_3/lx_3$	1.818,00	1.820,25	0,0482	0,90 - 0,80
$lx_1/lx_1/lx_2/lx_2/lx_3/lx_3$	612,00	606,75		

* LX - com lipoxigenase
lx/lx - sem lipoxigenase,
os números indicam o tipo de lipoxigenase

De um total de 2.430 sementes F_2 do cruzamento ['PBTN' x ('UFV 91.751' x 'Keburi')] foram selecionadas 1.818 que apresentavam LOX 1 e 612 com ausência desta isoenzima.

A estreita ligação entre os genes que codificam LOX 1 e LOX 2 foi útil no processo de seleção de sementes para a obtenção de linhagens sem lipoxigenases nas sementes (triplo-nulas). Durante a seleção para ausência de subunidades de proteína de reserva, por eletroforese em gel de poliácridamida, observou-se que das sementes F_2 do cruzamento ['PBTN' x ('UFV 91.751' x 'Keburi')] todas aquelas com ausência de LOX 1 apresentaram ausência simultânea de LOX 2.

Os resultados de segregação apresentados na Tabela 1 também indicam que a presença de cada isoenzima, LOX 1, 2 e 3, é condicionada por um gene simples e dominante, de acordo com os resultados encontrados na literatura (Kitamura *et al.*, 1985; Hajika *et al.*, 1991, 1992; Moreira *et al.*, 1993).

Por meio dos resultados da análise eletroforética das subunidades das proteínas de reserva das sementes F_2 dos cruzamentos ('UFV 91.751' x 'Keburi') e ['PBTN' x ('UFV 91.751' x 'Keburi')] foi possível identificar a herança das subunidades α' e G4, componentes das proteínas de reserva. De um total de 104 sementes F_2 originárias do cruzamento ('UFV 91.751' x 'Keburi') verificou-se que 82 apresentaram a subunidade α' e 22 não a apresentaram, enquanto de um total de 74 sementes F_2 verificaram-se 59 com a subunidade G4 e 15 sem G4 (Tabela 2).

Em relação às sementes F_2 do cruzamento ['PBTN' x ('UFV 91.751' x 'Keburi')], de um total de 361 sementes analisadas, verificou-se que 276 apresentaram a subunidade α' e 85 sementes não a apresentaram e, de um total de 229 sementes analisadas, 176 apresentaram a subunidade G4 e 53 apresentaram ausência desta

subunidade (Tabela 2). Dentre as 53 sementes triplo-nulas com ausência da subunidade G4, verificaram-se 15 com ausência e 38 com presença de α' , enquanto nas 176 sementes triplo-nulas apresentando a subunidade G4 verificaram-se 132 com presença da subunidade α' e 42 sem esta subunidade.

Os resultados evidenciados na Tabela 2 mostram que os genes que codificam as subunidades α' e G4 apresentam segregação mendeliana simples. Resultados similares já haviam sido relatados na literatura, com descrição de mutantes naturais com ausência de α' (Kitamura *et al.*, 1984) e ausência de G4 (Fontes & Moreira, 1984).

As sementes F_2 triplo-nulas do cruzamento ['PBTN' x ('UFV 91.751' x 'Keburi')] com presença de α' e/ou, G4 foram plantadas em casa de vegetação e pelo menos 12 sementes F_3 de cada planta foram analisadas em gel de poliácridamida para verificar se havia segregação para estas subunidades. Somente as sementes de plantas homozigotas foram utilizadas para as análises posteriores.

Os progenitores utilizados nos cruzamentos e linhagens triplo-nulas (KCPs) - com presença de α' e G4 (KCP 1), presença de α' e ausência de G4 (KCP 2), ausência de α' e presença de G4 (KCP 3) e ausência de α' e G4 (KCP 4) - derivadas destes cruzamentos foram plantados em casa de vegetação na mesma época, portanto em condições ambientais semelhantes durante o crescimento e desenvolvimento das plantas. Na colheita, as sementes foram agrupadas, formando os lotes de sementes para cada genótipo. Também foi plantada a variedade Cristalina como padrão de variedade comercial, por ser uma das mais cultivadas nas principais regiões produtoras do país e por ser um dos ancestrais da linhagem UFV 91.751.

Entre os genótipos analisados (Cristalina, Keburi, UFV 91.751, PBTN e as quatro linhagens KCPs), o teor de proteína total foi maior nos genótipos KCPs e na linhagem UFV 91.751. A variedade Cristalina apresentou o menor teor protéico e o maior teor de lipídio; enquanto o inverso ocorreu na linhagem UFV 91.751, que teve o maior teor de proteína e o menor de lipídio (Tabela 3).

TABELA 3 - Teores de proteína total e de lipídios e produção de hexanal (área do pico) em sementes de genótipos de soja.

Genótipo*	Proteína	Lipídio	Hexanal
	----- % -----		--- mv ---
Cristalina	32,72 c	23,55 a	497,00 a
Keburi	39,82 b	19,62 c	335,67 b
UFV 91.751	43,03 a	15,22 f	68,33 c
PBTN	38,51 bc	20,36 b	0,00 d
KCP 1 (c/ α' e c/G4)	42,61 a	17,96 e	0,00 d
KCP 2 (c/ α' e s/G4)	42,15 a	18,68 d	0,00 d
KCP 3 (c/ α' e c/G4)	38,94 bc	19,62 c	0,00 d
KCP 4 (c/ α' e s/G4)	42,23 a	18,15 e	0,00 d
Média	40,63	19,15	112,00
C.V. (%)	1,78	0,98	17,33

Médias, na coluna, com mesmas letras não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

TABELA 2 - Frequências observadas e esperadas (3:1) de sementes de soja com e sem as subunidades α' e G4 em sementes F_2 sem LOX 3 (lx_3/lx_3), dos cruzamentos 'UFV 91.751' x 'Keburi' e 'PBTN' x ('UFV 91.751' x 'Keburi'); valor de χ^2 calculado e nível de probabilidade.

Genótipo*	Frequência		χ^2	Probabilidade
	observada	esperada		
'UFV 91.751' x 'Keburi'				
$lx_3\ lx_3\ Cgy_1-$	82,00	78,00	0,4102	0,70 - 0,50
$lx_3\ lx_3\ cgy_1\ cgy_1$	22,00	26,00		
$lx_3\ lx_3\ Gy_4-$	59,00	55,50	0,4414	0,70 - 0,50
$lx_3\ lx_3\ gy_4\ gy_4$	15,00	18,50		
PBTN x ('UFV 91.751' x 'Keburi')				
$TN\ Cgy_1-..$	276,00	262,50	0,4072	0,70 - 0,50
$TN\ cgy_1\ cgy_1$	85,00	87,50		
$Tn\ Gy_4-$	176,00	171,75	0,4206	0,70 - 0,50
$Tn\ gy_4\ gy_4$	53,00	57,25		

* Cgy₁- - presença da subunidade α'
 cgy₁ cgy₁ - ausência da subunidade α'
 Gy₄- - presença da subunidade A5A4B3
 gy₄ gy₄ - ausência da subunidade A5A4B3

Comparando-se os dados de teor de proteína e teor de lipídio, verificou-se uma correlação negativa altamente significativa entre os teores de proteína e óleo ($r = -0,8345$).

Nas linhagens KCP triplo-nulas com ausência da subunidade G4 não se verificou diminuição no teor de proteína total das sementes (Tabela 3), devendo ter ocorrido compensação da eliminação genética de G4, pela síntese de outros polipeptídeos componentes das proteínas de reserva. Indicações anteriores deste fato foram relatadas por Fontes & Moreira (1984), no trabalho de avaliação de 44 genótipos de soja, dos quais 13 apresentavam ausência de G4, em que não foi possível relacionar a ausência ou presença de G4 com teor de proteína.

A eliminação genética de α' também parece não ter provocado alteração no teor de proteína (Tabela 3). De modo similar, propõe-se que a ausência desta subunidade seja compensada pela maior síntese de outros polipeptídeos.

Os teores de lipídios não foram alterados em função da eliminação genética de lipoxigenases e subunidades protéicas α' e G4 (Tabela 3).

Com a eliminação genética de lipoxigenases das sementes, houve diminuição significativa na quantidade de hexanal evoluído. Como pode ser observado na Tabela 3, as variedades Keburi e Cristalina, ambas contendo todas as lipoxigenases da semente, tiveram área de pico de hexanal entre 5 e 7 vezes maior que a linhagem UFV 91.751, que possui somente LOX 1. As linhagens PBTN e KCP, todas triplo-nulas, não produziram hexanal (Tabela 3). Na literatura existem relatos de diminuição na evolução de compostos derivados da atividade de LOX, em sementes de linhagens duplo-nulas com ausências de LOX 2 e 3 (Moreira *et al.*, 1993) e em sementes de linhagens triplo-nulas com ausência completa de lipoxigenases (Yukawa *et al.*, 1995; Furuta *et al.*, 1996). O efeito da eliminação genética de isoenzimas lipoxigenases de sementes de soja tem sido relacionado com a diminuição de produção de compostos responsáveis pelo sabor característico da soja em seus produtos protéicos derivados. A análise da evolução de hexanal, da produção de aldeídos totais ou de compostos carbonílicos totais em produtos de soja tem sido usada como indicativo da melhoria do sabor caracterís-

tico da soja. Nesse sentido, a evolução de hexanal em farinhas de soja é aceita pelos pesquisadores da área como indicador da presença de sabores característicos da soja, devido ao seu baixo valor "threshold", ou limiar de percepção sensorial (Wolf, 1975; Rackis *et al.*, 1979), além de terem sido verificadas boas correlações entre teor de hexanal e outros compostos responsáveis pelo "beany flavor" (Moreira *et al.*, 1993; Yukawa *et al.*, 1995; Furuta *et al.*, 1996).

Com relação à composição de ácidos graxos, foram verificadas variações dos teores dos ácidos palmítico, esteárico, oléico, linoléico e linolênico entre os genótipos analisados. A variedade Keburi apresentou o maior teor de ácido oléico e, conseqüentemente, teor mais reduzido de ácido linoléico; o inverso ocorreu com a variedade Cristalina. Verificou-se, também, que nas variedades Keburi e Cristalina ocorreram os menores teores de ácido palmítico; já a variedade Cristalina apresentou o maior teor de ácido linoléico (Tabela 4). No entanto, os teores verificados estão dentro da amplitude de variação encontrada na maioria das variedades comerciais brasileiras (Visentainer *et al.*, 1991).

Os maiores teores de aminoácidos encontrados por meio de cromatografia de troca iônica foram de glutâmico + glutamina, aspártico + asparagina, arginina, leucina e lisina em todos os genótipos analisados. Estes aminoácidos representaram mais que 50% da composição das proteínas das sementes (Tabela 5). Por outro lado, verificaram-se baixos teores de aminoácidos sulfurados (menos que 5%). Resultados semelhantes foram também encontrados por Grabau *et al.* (1986), Zarkadas *et al.* (1993) e Cabral *et al.* (1995) e expressam a composição típica da proteína de reserva de sementes de soja.

Todos os aminoácidos, exceto a isoleucina, apresentaram variações entre os genótipos analisados. Porém, a variação importante reside naqueles considerados essenciais para humanos e animais monogástricos (histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina), destacando-se, entre eles, o aminoácido metionina. O aminoácido cisteína, torna-se essencial quando o suprimento de metionina não é adequado (Mathews & Holde, 1990; Friedman, 1996).

TABELA 4 - Composição percentual de ácidos graxos na fração lipídica de sementes de genótipos de soja.

Genótipo*	Palmítico	Esteárico	Oléico	Linoléico	Linolênico
Cristalina	10,93 ef	3,04 b	20,30 e	58,92 a	6,82 f
Keburi	10,80 f	2,94 c	33,23 a	45,60 f	7,43 e
UFV 91.751	12,68 a	3,20 a	18,42 g	5,76 c	9,95 b
PBTN	11,19 de	2,93 c	20,60 cd	56,55 b	8,73 d
KCP1	11,64 bc	2,46 d	20,42 de	54,76 d	10,72 a
KCP2	11,46 cd	2,91 c	23,95 b	52,74 e	8,95 cd
KCP3	12,76 a	3,04 b	19,60 f	54,85 d	9,75 b
KCP4	11,85 b	3,08 b	20,78 c	55,05 d	9,23 c
Média	11,66	2,95	22,16	54,28	8,95
C. V. (%)	1,07	0,93	0,42	0,27	2,24

Médias, na coluna, com mesmas letras não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

TABELA 5 - Composição aminoacídica da proteína total de sementes de genótipos de soja (g/100 g de proteína).

Aminoácido	Cristalina	Keburi	UFV 91.751	PBTN	KCP 1	KCP 2	KCP 3	KCP 4	Média	C.V. (%)
Lys	7,60 a	7,69 a	6,12 d	6,49 d	6,72 cd	7,21 abc	7,47 ab	6,80 bcd	7,01	3,95
His	3,35 a	3,13 ab	2,55 e	2,69 de	2,94 bcd	3,02 bc	2,77 de	2,78 cde	2,90	3,45
Arg	9,14 a	9,41 a	7,33 c	7,46 c	8,41 b	9,21 a	8,21 b	9,14 a	8,54	2,89
Asp + Asn	11,85 de	12,46 cd	12,36 cd	11,60 e	13,38 ab	12,78 bc	13,77 a	12,18 cde	12,55	2,13
Thr	4,11 bc	4,67 a	4,05 bc	4,07 bc	4,44 abc	4,29 abc	4,49 ab	3,97 c	4,26	4,66
Ser	4,59 c	5,11 abc	4,89 bc	5,21 ab	5,62 a	5,11 abc	5,15 abc	4,80 bc	5,06	4,38
Glu + Gln	19,17 bc	18,27 c	18,81 c	19,28 bc	20,77 ab	21,05 a	21,46 a	19,25 bc	19,76	3,30
Pro	5,39 ab	5,53 ab	5,80 ab	5,50 ab	5,44 ab	6,05 a	5,27 b	5,44 ab	5,56	4,91
Gly	4,41 bc	4,32 bc	4,28 bc	4,63 bc	4,77 b	4,48 bc	5,30 a	4,15 c	4,54	4,26
Ala	4,66 bc	4,51 bc	4,50 bc	4,28 c	4,86 b	4,79 b	5,36 a	4,32 c	4,66	3,58
Cys	1,26 d	1,42 cd	1,31 cd	1,96 a	1,69 b	1,48 c	1,69 b	1,38 cd	1,52	4,73
Val	5,14 abc	4,86 bc	4,55 c	5,74 ab	4,75 bc	5,44 abc	6,19 a	4,70 bc	5,17	8,31
Met	1,03 d	1,50 c	1,98 b	2,34 a	1,83 b	1,96 b	1,66 c	1,89 b	1,77	4,02
Ile	4,99 a	5,49 a	4,55 a	5,84 a	4,51 a	4,92 a	3,35 a	4,85 a	4,81	3,07
Leu	8,62 bc	7,76 cd	7,61 d	9,58 a	8,07 cd	7,85 cd	9,12 ab	7,57 d	8,27	4,67
Tyr	3,74 bc	3,55 bc	3,48 bc	4,81 a	3,60 bc	3,42 bc	4,21 ab	3,26 c	3,76	9,19
Phe	5,57 bcd	5,01 d	5,48 cd	6,15 ab	5,59 bcd	5,62 bc	6,44 a	5,10 cd	5,62	4,25

Médias, na linha, com as mesmas letras não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Entre os genótipos analisados verificou-se que a variedade Cristalina, além de ter apresentado o menor teor de proteína total, também apresentou os menores teores de metionina e cisteína (Tabelas 5 e 6), enquanto a linhagem PBTN apresentou os maiores teores destes dois aminoácidos.

Entre os progenitores utilizados nos cruzamentos, PBTN apresentou o maior teor de metionina e cisteína e a linhagem UFV 91.751, teor de metionina intermediário entre Keburi e PBTN. Com relação ao aminoácido cisteína, não se verificou diferença entre os teores apresentados pelos progenitores Keburi e UFV 91.751 (Tabela 6).

No geral, os teores de metionina dos genótipos com presença de α' (PBTN, UFV 91.751, KCP 1, e KCP 2) foram maiores do que aqueles verificados nos genótipos com ausência de α' (Keburi, KCP 3 e KCP 4). Entre as linhagens KCP que possuem a subunidade G4 (KCP 1

e 3), diferindo apenas pela presença/ausência de α' , a linhagem KCP 3 apresentou menor concentração de metionina que KCP 1. Dessa forma, conclui-se que a eliminação genética de α' promove diminuição da concentração de metionina (Tabela 6).

Por outro lado, observa-se que os teores de metionina das linhagens KCP com presença de G4 (KCP 1 e KCP 3) foram menores que aqueles das linhagens com ausência de G4 (KCP 2 e KCP 4). O teor de metionina do genótipo KCP 3 (ausência de α' e presença de G4) foi o menor entre as linhagens. Conclui-se que a eliminação genética de α' e a manutenção de G4 estão associadas com a redução dos teores de metionina na proteína de sementes (Tabela 6).

O teor de cisteína foi menor nas linhagens sem G4 (KCP 2 e KCP 4) do que naquelas que apresentam G4 (KCP 1 e KCP 3). No entanto, a eliminação genética de α' não parece ter afetado o teor de cisteína, pois foram

TABELA 6 - Concentração de metionina e cisteína (g/100 g de proteína) em genótipos de soja.

Genótipo*	α'	G4	Metionina	Cisteína	Met + Cys
PBTN	Presente	Ausente	2,34 a	1,96 a	4,30 a
UFV 91.751	Presente	Heterogênea	1,98 a	1,31 cd	3,29 b
KCP 2	Presente	Ausente	1,96 b	1,48 c	3,43 b
KCP 4	Ausente	Ausente	1,89 b	1,38 cd	3,27 b
KCP 1	Presente	Presente	1,83 b	1,69 b	3,51 b
KCP 3	Ausente	Presente	1,66 c	1,69 b	3,34 b
Keburi	Ausente	Presente	1,50 c	1,42 cd	2,92 c
Cristalina	Presente	Presente	1,03 d	1,26 d	2,29 d
Média			1,77	1,52	3,30
C. V. (%)			4,01	4,73	3,94

Médias, nas colunas, com as mesmas letras não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

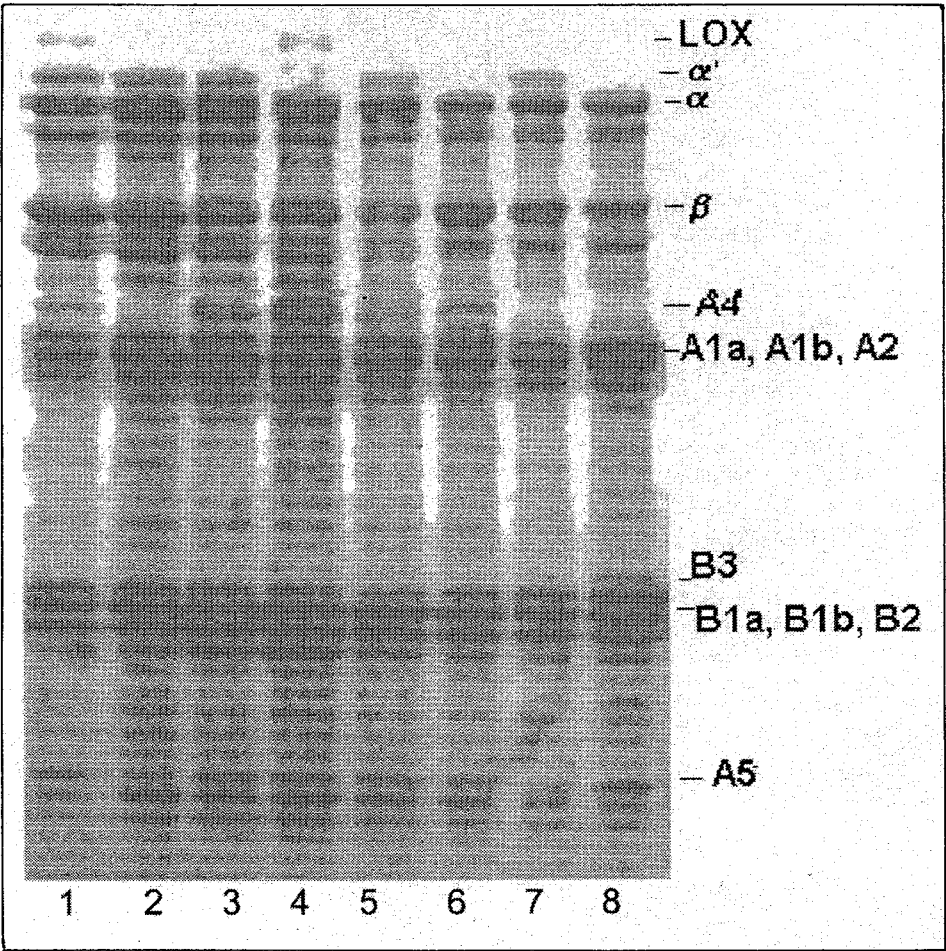


FIGURA 1 - Eletroforese, em gel de poliacrilamida com uréia, das subunidades das proteínas de reserva de sementes de soja dos genótipos (1) Cristalina, (2) PBTN, (3) UFV 91.751, (4) Keburi, (5) KCP 1, (6) KCP 3, (7) KCP 2 e (8) KCP 4 (em cada canaleta foram aplicados 125 µg de proteína).

TABELA 7 - Conteúdos relativos de proteína de reserva, β-conglicinina (7S), glicinina (11S), subunidades de glicinina (GA¹ e GB²), relação 7S/11S e relação GA/GB, obtidos por densitometria de gel.

Genótipo	Proteína	7S	11S	7S/11S	GA ¹	GB ²	GA/GB
Cristalina	68,85 a	42,88 a	57,12 c	0,76 a	70,35 c	29,65 a	2,37 d
UFV 91.751	72,45 a	29,69 bc	70,31 ab	0,42 bc	71,24 c	28,76 a	2,48 cd
PBTN	70,95 a	31,70 bc	68,30 ab	0,48 bc	90,35 a	9,65 c	9,37 a
Keburi	76,40 a	26,47 c	73,53 a	0,36 c	78,99 b	21,01 b	3,76 c
KCP 1	76,90 a	29,38 bc	70,62 ab	0,42 bc	77,85 b	22,15 b	3,51 c
KCP 2	73,18 a	32,54 b	67,46 b	0,49 bc	76,08 bc	23,92 ab	3,18 cd
KCP 3	73,33 a	30,59 bc	69,41 ab	0,44 bc	85,97 a	14,03 c	6,13 b
KCP 4	71,10 a	33,47 b	66,53 b	0,51 b	85,05 a	14,95 c	5,69 b
Média	72,89	32,09	67,91	0,48	79,48	20,52	4,6
C.V. (%)	11,00	10,71	5,06	16,34	4,87	18,85	12,36

¹: GA indica a soma dos conteúdos relativos das subunidades G1, G2 e G3 e do polipeptídeo B4 da subunidade G5.
²: GB indica a soma dos conteúdos relativos da subunidade G4 e do polipeptídeo A3 da subunidade G5.
Médias, nas colunas, com as mesmas letras não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

verificados teores semelhantes deste aminoácido entre as linhagens KCP sem α' (KCP 1 e KCP 2) e com α' (KCP 3 e KCP 4).

Pode-se observar na Tabela 6 que os teores dos aminoácidos metionina + cisteína não variaram entre as linhagens KCP, pois nas linhagens com maiores teores de metionina verificou-se menores teores de cisteína.

Por meio da análise de subunidades constituintes das proteínas de reserva, por densitometria do gel, verificou-se que o teor de proteínas de reserva (7S + 11S) representou cerca de 73% da proteína total e não variou entre os genótipos analisados (Tabela 7). Entretanto, foram observadas variações na proporção das proteínas de reserva, 7S (β -conglucina) e 11S (glicina), nos genótipos analisados (Tabela 7). A relação 7S/11S foi maior na variedade Cristalina (0,76), que apresentou o menor teor de metionina (1,03), e menor na variedade Keburi, enquanto nos outros genótipos verificaram-se relações 7S/11S similares e intermediárias entre as de Cristalina e Keburi. As relações 7S/11S observadas na proteína de reserva dos genótipos analisados, 0,76 na variedade Cristalina e cerca de 0,5 nos outros genótipos (Tabela 7), foram menores do que os valores publicados na literatura (Cho *et al.*, 1987). Menores relações 7S/11S são de interesse porque a proteína 11S possui propriedades funcionais, como capacidade de geleificação e firmeza do gel, superiores às da 7S (Nakamura *et al.*, 1986; Kohyama *et al.*, 1992, 1995), e também porque há maior potencial de alergenicidade (Samoto *et al.*, 1996) e maior capacidade de adsorção de compostos responsáveis pelo "off flavor" (O'Neill & Kinsella, 1987) associados à 7S. Entretanto, a relação 7S/11S, além de depender do genótipo, pode ser bastante afetada pelo ambiente, como verificado por Murphy & Resurreccion (1984) e Iwabuchi & Yamauchi (1987).

Entre as linhagens KCP com ausência das subunidades α' ou G4 não foram verificadas alterações nos teores das proteínas de reserva 7S e 11S, expressas pela relação 7S/11S. A eliminação genética de α' não promoveu diminuição nos teores de β -conglucina (Figura 1). A proteína de reserva β -conglucina é trimérica, composta por três subunidades principais (α' , α e β), que diferem em seu conteúdo de metionina. As subunidades α' , α e β apresentam três, dois e nenhum resíduo de metionina, respectivamente (Coates *et al.*, 1985). A diminuição no teor de metionina observada nas linhagens sem α' (KCP 3 e KCP 4) pode ser explicada pelo fato de ter ocorrido, por compensação, aumento na síntese e acúmulo da subunidade α , que possui menor teor de metionina, e da subunidade β , que não possui este aminoácido.

Na tentativa de explicar diferentes teores de metionina nas linhagens que apresentaram relações 7S/11S similares, determinaram-se os teores e as relações entre as subunidades de glicina com maiores conteúdos de metionina (GA) e as com menores conteúdos desse aminoácido (GB). Observa-se na Tabela 7 que a maioria dos genótipos que apresentaram maiores teores de metionina foram aqueles que também apresentaram maiores relações GA/GB, isto é, maior proporção de subunidades da proteína glicina com maiores conteúdos

de metionina.

Na estrutura da proteína glicina (hexâmero) são identificadas cinco subunidades denominadas G1, G2, G3, G4 e G5. As subunidades G1, G2 e G3 possuem 7, 7 e 8 resíduos de metionina, enquanto as subunidades G4 e G5 apresentam 2 e 1 resíduos de metionina, respectivamente (Moreira *et al.*, 1979, 1981; Nielsen *et al.*, 1981; Staswick *et al.*, 1981).

AGRADECIMENTOS

Trabalho financiado pelo Convênio FINEP/BID 64.96.0521.00. MMU foi beneficiária de uma bolsa de Doutorado do CNPq. Agradecemos ao Prof. Lewis Joel Greene do Centro Interdepartamental de Química de Proteínas da USP, Ribeirão Preto, SP, pelas análises de aminoácidos.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. Washington, D.C. 1975. 1.094p.
- AXELROD, B.; CHEESEBOURGH, T.M. & LAAKSO, S. Lipoxigenase from soybeans. **Methods in Enzymology**, 71: 441-451, 1981.
- BUBECK, D.M.; FEHR, W.R. & HAMMOND, E.G. Inheritance of palmitic and stearic acid mutants of soybean. **Crop Science**, 29:652-656, 1989.
- CABRAL, L.C.; SERNA-SAVIDAR, S.O.; TINKSLEY, A.M. & WEBER, C.W. Effects of dehulling, cooking and storage conditions on protein quality and digestibility of soybeans. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, 45:41-45, 1995.
- CHO, R.K.; IWAMOTO, M. & SAIO, K. Determination of 7S and 11S globulins in ground whole soybeans by near infrared reflectance spectroscopic analysis. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, 34:666-672, 1987.
- COATES, J.B.; MEDEIROS, J.S.; THANH, V.H. & NIELSEN, N.C. Characterization of the subunits of β -conglucinin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 243:184-194, 1985.
- DAVIES, C.S. & NIELSEN, N.C. Registration of soybean germplasm that lacks lipoxigenase isozymes. **Crop Science**, 27:370-371, 1987.
- FONTES, E.P.B. & MOREIRA, M.A. Variações genéticas na composição polipeptídica da proteína de soja. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, 27:319-328, 1984.
- FONTES, E.P.B.; MOREIRA, M.A.; DAVIES, C.S. & NIELSEN, N.C. Urea-elicited changes in relative electrophoretic mobility of certain glycinin and β -conglucinin subunits. **Plant Physiology**, 76:840-842, 1984.
- FRIEDMAN, M. Nutritional value of proteins from different food sources. A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44:6-29, 1996.
- FURUTA, S.; NISHIBA, Y.; HAJIKA, M.; IGITA, K. & SUDA, I. DETBA value and hexanal production with the combination of unsaturated fatty acids and extracts prepared from soybean seeds lacking two or three lipoxigenase isozymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44:236-239, 1996.
- GRABAU, L.J.; BLEVINS, D.G. & MINOR, H.C. Stem infusions enhanced methionine content of soybean storage protein. **Plant Physiology**, 82:1013-1018, 1986.
- HAJIKA, M.; IGITA, K. & KITAMURA, K. A line lacking all the seed lipoxigenase isozymes in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) induced by gamma-ray irradiation. **Japanese Journal of Breeding**, 41:507-509, 1991.
- HAJIKA, M.; KITAMURA, K.; IGITA, K. & NAKAZAWA, Y. Genetic relationships among the genes for lipoxigenase-1, -2 and -3 isozymes in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seed. **Japanese Journal of Breeding**, 42:787-792, 1992.
- HAMMOND, E.G.; DUVICK, D.N.; FEHR, W.R.; HILDEBRAND, D.F.; LACEFIELD, E.C. & PFEIFFER, T.W. Rapid screening techniques

- for lipoxygenases in soybean seeds. **Crop Science**, 32:820-821, 1992.
- HILDEBRAND, D.F. & HYMOWITZ, T. Two soybean genotypes lacking lipoxygenase-1. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 49:33-35, 1981.
- HILL, J.E. & BREIDENBACH, R.W. Proteins of soybean seeds. **Plant Physiology**, 53:742-746, 1974.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz, Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed., São Paulo. 1985. v.1, 533p.
- IWABUCHI, S. & YAMAUCHI, F.M. Determination of glycinin and β -conglycinin in soybean proteins by immunological methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 35:200-205, 1987.
- KIKUCHI, A. & KITAMURA, K. Simple and rapid carotene bleaching tests for the detection of lipoxygenase isozymes in soybean seeds. **Japanese Journal of Breeding**, 37:10-16, 1987.
- KINSELLA, J.E. Functional properties of soy proteins. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 56:242-258, 1979.
- KITAMURA, K. Biochemical characterization of lipoxygenase lacking mutants, L-1-less, L-2-less, and L-3-less soybeans. **Agricultural and Biological Chemistry**, 48:2339-2346, 1984.
- KITAMURA, K.; 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.
- KITAMURA, K.; DAVIES, C.S. & NIELSEN, N.C. Inheritance of alleles for Cgy1 and Gy4 storage protein genes in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, 68: 253-257, 1984.
- KITAMURA, K.; KUMAGAI, A. & KIKUCHI, A. Inheritance of lipoxygenase-2 and genetic relationship among genes for lipoxygenase-1, -2 and -3 isozymes in soybean seeds. **Japanese Journal of Breeding**, 35:413-420, 1985.
- KOHYAMA, K.; MURATA, M.; TANI, F.; SANO, Y. & DOI, E. Effects of protein composition on gelation of mixtures containing soybean 7 S and 11 S globulins. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 59:240-245, 1995.
- KOHYAMA, K.; YOSHIDA, M. & NISHINARI, K. Rheological study on gelation of soybean 11S protein by glucono- δ -lactone. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 40:740-744, 1992.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227:680-685, 1970.
- MATHEWS, C.K. & HOLDE, K.E. **Biochemistry**. The Benjamin/Cummings Publ. 1990. 1257p.
- MOREIRA, M.A.; HERMODSON, M.A.; LARKINS, B.A. & NIELSEN, N.C. Partial characterization of the acidic and basic poly peptides of glycinin. **Journal of Biological Chemistry**, 254:9921-9926, 1979.
- MOREIRA, M.A.; HERMODSON, M.A.; LARKINS, B.A. & NIELSEN, N.C. Comparison of the primary structure of the acidic polypeptides of glycinin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 210:636-642, 1981.
- MOREIRA, M.A.; TAVARES, S.R.; RAMOS, V. & BARROS, E.G. Hexanal production and TBA number are reduced in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] seeds lacking lipoxygenase isozymes 2 and 3. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 41:103-106, 1993.
- MURPHY, P.A. & RESURRECCION, A.P. Varietal and environmental differences in soybean glycinin and β -conglycinin content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 32:911-915, 1984.
- NAKAMURA, T.; UTSUMI, S. & MORI, T. Mechanism of heat-induced gelation and gel properties of soybean 7S globulin. **Agricultural and Biological Chemistry**, 50:1287-1293, 1986.
- NIELSEN, N.C.; MOREIRA, M.A.; STASWICK, P.; HERMODSON, M.A.; TUMER, N. & THANH, V.H. The structure of glycinin from soybeans. **Abhdg. Akad. Wiss. DDR** 5:73-91, 1981.
- O'NEILL, T.E. & KINSELLA, J.E. Flavor protein interaction characterization of 2-nonanone binding to isolated soy protein fractions. **Journal of Food Science**, 52:98-101, 1987.
- RACKIS, J.J.; SESSA, D.J. & HONIG, D.H. Flavor problems of vegetable food proteins. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 56:262-271, 1979.
- SAMOTO, M.; MIYAZAKI, C.; AKASAKA, T.; MORI, H. & KAWAMURA, Y. Specific binding of allergenic soybean protein Gly m Bd 3 K with α' - and α -subunits of conglycinin in soy milk. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 60:1006-1010, 1996.
- SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H. & MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in chromatography of amino acids. **Analytical Chemistry**, 30:190-206, 1958.
- STASWICK, P.E.; HERMODSON, M.A. & NIELSEN, N.C. Identification of the acidic and basic subunits complexes of glycinin. **Agricultural and Biological Chemistry**, 256:8752-8755, 1981.
- THANH, V.H. & SHIBASAKI, K. Beta-conglycinin from soybean proteins. Isolation and immunological and physicochemical properties of the monomeric forms. **Biochimica et Biophysica Acta**, 490:370-384, 1977.
- VISENTAINER, J.V.; LAGUILA, J.E.; MATSUSHITA, M. & SOUZA, N.E. Composição de ácidos graxos em diversas variedades de soja recomendadas para cultivo no Brasil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, 34:1-6, 1991.
- WOLF, W.J. Lipoxygenase and flavor of soybean protein products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 23:136-141, 1975.
- YUKAWA, N.; TAKAMURA, H.; KITAMURA, K. & MATOBA, T. Proportion of hexanal to total carbonyl compounds in soybean extracts. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 59:723-724, 1995.
- ZARKADAS, C.G.; YU, Z.; VOLDENG, H.D. & AMADO, A.M. Assessment of the protein quality of a new high-protein soybean cultivar by amino acid analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 41:616-623, 1993.