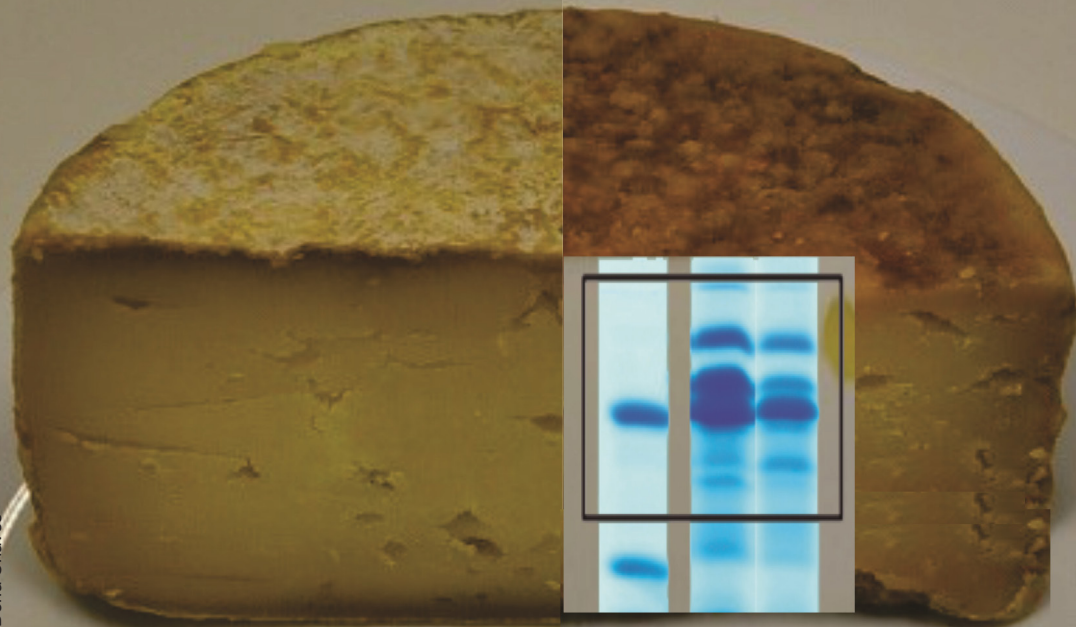


Foto: Ana Carolina Sampaio Doria Chaves

COMUNICADO
TÉCNICO

238

Rio de Janeiro, RJ
Setembro, 2019**Embrapa**

Método de Eletroforese de Proteínas TRIS/TRICINA Modificado para Identificação da Hidrólise das Caseínas ao Longo da Maturação de Queijos

Tatiana de Lima Azevedo¹
Juliana de Oliveira Carneiro²
Marília Penteado Stephan³
Alexsandro Araújo dos Santos⁴
Ana Carolina Sampaio Doria Chaves⁵

Método de Eletroforese de Proteínas TRIS/TRICINA Modificado para Identificação da Hidrólise das Caseínas ao Longo da Maturação de Queijos¹

¹ Licenciada em Química, especialista em Ciências Ambientais, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

² Engenheira de Alimentos, doutoranda da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

³ Farmacêutica, doutora em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

⁴ Técnico em Alimentos, assistente da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

⁵ Engenheira de Alimentos, doutora em Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Introdução

Durante a maturação do queijo ocorrem simultaneamente várias reações físicas, químicas e bioquímicas. Inicialmente ocorre a hidrólise do açúcar e pode também haver hidrólise de gordura (lipólise) e de proteína (proteólise). A proteólise afeta o sabor e a textura dos queijos ao longo da maturação, e as condições em que ela ocorre têm influência direta na qualidade e nas características sensoriais do queijo. A duração da maturação pode variar de alguns dias até mais de dois anos, dependendo do tipo de queijo e de quanto valor quer se agregar ao produto final.

O objetivo deste trabalho foi apresentar a técnica de eletroforese TRIS/TRICINA modificada pela inclusão

da etapa de retirada da gordura das amostras de queijo que era um grande interferente nesta análise. A modificação da técnica tornou possível a obtenção de géis com bandas bem definidas, claras e, conseqüentemente, de fácil interpretação.

Preparo das amostras

Para ilustrar a técnica modificada, foram analisadas amostras de queijo minas artesanal do Serro com 17 e 60 dias de maturação, produzidos e maturados em uma propriedade rural (na sala de maturação) no município do Serro, Minas Gerais conforme preconiza a legislação vigente. A Figura 1 apresenta os queijos analisados com 17 dias e 60 dias de maturação.



Figura 1. Queijo minas artesanal do Serro com 17 dias (a) e 60 dias (b) de maturação.

Utilização da técnica TRIS/TRICINA

As amostras foram trituradas e congeladas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. As amostras congeladas foram liofilizadas por 24 horas em liofilizador (Marca LioTop, modelo L101 ou similar). Para extração da proteína, pesou-se 2 mg de queijo liofilizado em um tubo e dissolveu-se em 1 mL de solução tampão (pH 6,8 contendo 4% SDS, 12% glicerol, 2% mercaptoetanol e 0,01% Coomassie blue G250). O tubo foi mantido sob agitação por 1 hora em temperatura ambiente.

A retirada de gordura foi realizada da seguinte forma: a amostra dissolvida

em solução tampão foi mantida sob refrigeração (4°C) por 24 horas, centrifugada em temperatura ambiente por 1 min a 5433 g. Com o auxílio de um pipetador automático, foi retirada da amostra a proteína desengordurada da fase intermediária, entre o precipitado sólido (depositado no fundo do tubo) e o sobrenadante com a gordura do queijo (na parte superior do tubo).

Utilizando a técnica TRIS/TRICINA sem a modificação, ou seja, sem a separação da gordura, não foi possível observar bandas de proteínas claras no gel de eletroforese. A corrida ficou distorcida em função da elevada quantidade de gordura presente, dificultando a interpretação dos resultados.

Na eletroforese foi utilizado um sistema da marca Bio-Rad (ou equivalente) e a preparação dos géis foi realizada de acordo com o proposto por Schägger e Jagow (1987). No método eletroforético foram utilizados três géis com as seguintes concentrações de acrilamida: i) 16,5% para o gel de separação, (ii) 10% para espaçamento e (iii) 4% para aplicação da amostra. Foi aplicado 30 μL de cada amostra e a corrida do gel ocorreu sob uma tensão de 15 V por 15 horas e com 85 mA por 6 horas segundo Stephan et al. (2013). No gel foi aplicado também um padrão da marca Bio-Rad com as seguintes proteínas (em kDa): triose-fosfato isomerase (26,625), mioglobina (16,950), α -lactalbumina (14,437), aprotinina (6,512), insulina β -oxidada (3,496) e bacitracina (1,423).

Ao final da corrida, o gel foi colocado sob agitação em solução fixadora com metanol 50% e ácido acético 10% por 1 hora. Subsequentemente, o gel foi lavado com água destilada e submerso em uma solução corante de azul de Coomassie G250 0,025% e de ácido acético 10% por 2 horas. Para descolorir o gel utilizou-se uma solução de ácido acético 10%, e o mesmo foi mantido

imerso sob agitação nesta solução por 2 horas. A solução foi trocada a cada 30 min, com quatro repetições. O gel foi lavado com água destilada e digitalizado no Scanner (marca GE, modelo Image Scanner III ou similar).

Na Figura 2 pode ser observado o fluxograma com as principais etapas da técnica de eletroforese TRIS/TRICINA modificada.

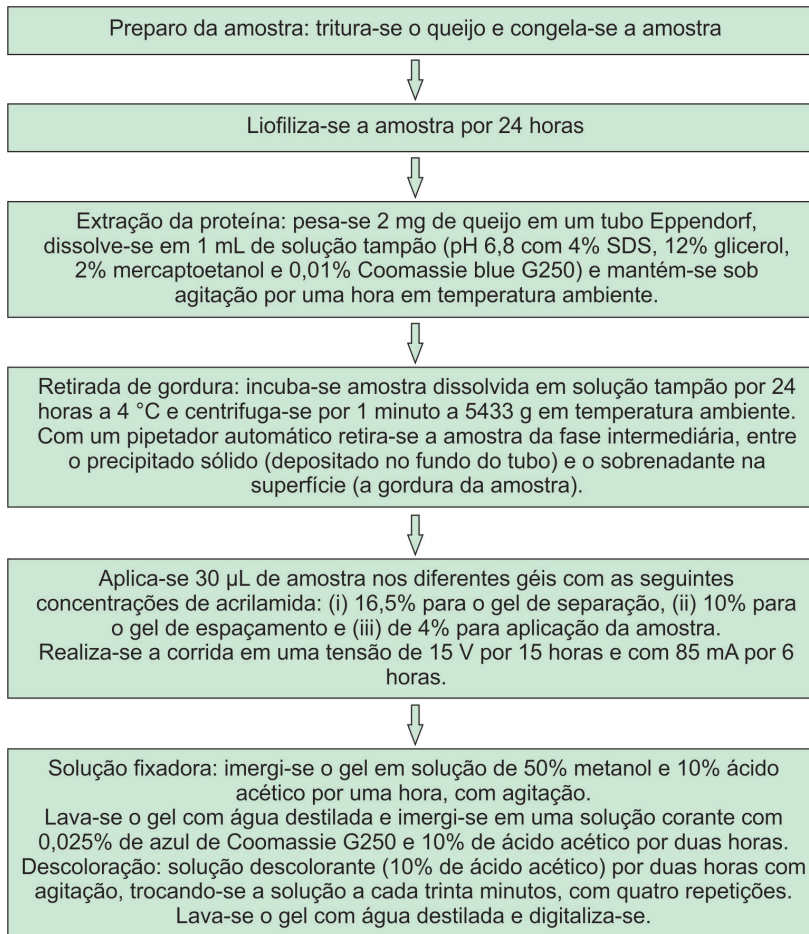


Figura 2. Fluxograma da técnica de eletroforese TRIS-TRICINA modificada.

Na Figura 3 pode ser observado o gel com as amostras de queijo sem a modificação, ou seja, sem a etapa de retirada da gordura. Neste gel foi possível observar as distorções e a falta de nitidez das bandas em função do elevado conteúdo de gordura das amostras (variando de 20 a 30% de gordura), em especial na faixa entre 26,6 e 6,5 kDa. Na região de 6,5 até 1,4 kDa as bandas encontram-se totalmente indefinidas, o que indicou a necessidade de ajuste do método.

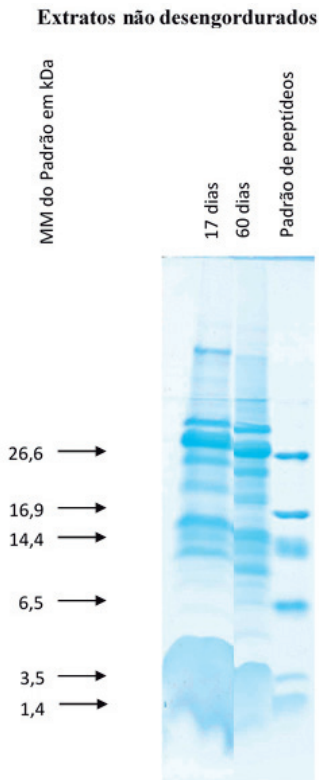


Figura 3. Perfil eletroforético do gel com as amostras de queijo com 17 e 60 dias de maturação sem a etapa de retirada da gordura.

Foi realizada a modificação no preparo das amostras, incluindo-se a etapa de desengorduramento. A eficácia da modificação da técnica, isto é, da inclusão da etapa de desengorduramento, pode ser facilmente visualizada na Figura 4, na qual foi possível observar claramente a melhora do perfil proteico das amostras de queijo com os diferentes tempos de maturação (17 e 60 dias). Com esta modificação foi possível observar bandas bem definidas, claras e um gel sem distorções. Existe uma grande diferença entre os géis com e sem a etapa de retirada da gordura.

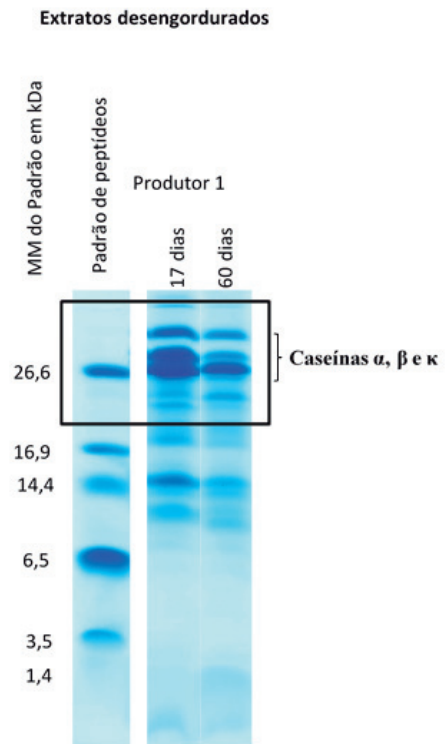


Figura 4. Perfil eletroforético do gel das amostras de queijo desengorduradas com 17 e 60 dias de maturação.

Considerações Finais

A técnica de eletroforese TRIS/TRICINA modificada foi eficiente na identificação das diferentes frações de proteína (com bandas claras e sem distorções). Por esta técnica é possível observar a formação de peptídeos de diferentes tamanhos ao longo da maturação.

A etapa de retirada da gordura possibilitou a clara visualização das bandas de caseínas e/ou peptídeos. Essa técnica pode ser utilizada como uma ferramenta para monitorar o nível de proteólise dos queijos ao longo da maturação.

Referências

SCHÄGGER, H.; JAGOW, G. V. Tricine-Sodium dodecyl-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the ranger from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, p. 368-379, 1987.

STEPHAN, M. P.; AZEVEDO, T. de L.; MELLINGER-SILVA, C.; SANTOS, A. A. dos; FURTADO, A. A. L.; PONTES, S. M. **Implantação do método de eletroforese tris-tricina visando à identificação de peptídeos em croquete de CMS de tilápia**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2013. 4 p. (Embrapa Agroindústria de Alimentos. Comunicado técnico, 197).

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria de Alimentos
Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
23020-470, Rio de Janeiro, RJ
Fone: (0xx21) 3622-9600
Fax: (0xx21) 3622-9713
www.embrapa.br/agroindustria-de-alimentos
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

Publicação digitalizada (2019)



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



Comitê Local de Publicações e Editoração da Embrapa Agroindústria de Alimentos

Presidente
Esdras Sundfeld

Secretária-executiva
Virginia Martins da Matta

Membros
André Luis do Nascimento Gomes, Celma Rivanda Machado de Araujo, Daniela De Grandi Castro Freitas de Sá, Elizabete Alves de Almeida Soares, Janice Ribeiro Lima, Janine Passos Lima da Silva, Leda Maria Fortes Gottschalk, Marcos de Oliveira Moulin, Melicia Cintia Galdeano, Otniel Freitas Silva e Rogério Germani

Supervisão editorial
Daniela De Grandi Castro Freitas de Sá

Revisão de texto
Marianna Ramos dos Anjos

Normalização bibliográfica
Elizabete Alves de Almeida Soares

Tratamento das ilustrações
André Luis do Nascimento Gomes

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
André Luis do Nascimento Gomes

Foto da capa
Ana Carolina Sampaio Dória Chaves