

CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO LÁCTEO ATRAVÉS DA TECNOLOGIA DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS

C. Baldasso¹, T. Barros¹, I. C. Tessaro¹

¹Laboratório de Separação por Membranas

Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
R. Eng. Luis Englert, s/n. Campus Central. CEP: 90040-040 - Porto Alegre - RS – Brasil
Telefone: (xx-51) 3308-3089 – Fax: (xx-51)3308-3983 – Email: cbaldasso@gmail.com

RESUMO – O soro lácteo, produzido indiretamente pela indústria de laticínios durante a fabricação de queijos e caseína, pode conferir como matéria-prima novas potencialidades à tecnologia alimentar devido às propriedades funcionais e nutricionais das suas proteínas. A tecnologia de separação por membranas, especialmente a ultrafiltração (UF), vem sendo empregada para obter concentrados protéicos a partir do soro, pois este processo permite a concentração seletiva das proteínas em relação aos outros componentes de natureza não protéica. Dentro deste contexto, os objetivos deste trabalho são concentrar e purificar as proteínas do soro utilizando a UF associada à diafiltração (DF). Duas estratégias foram testadas com o intuito de obter o concentrado protéico com maior grau de pureza, variando o fator de concentração volumétrico (FC); o volume e o número de DFs. Os resultados obtidos indicaram que o processo é adequado para obtenção de concentrados protéicos, podendo chegar a uma pureza protéica de 70 % em base seca.

PALAVRAS-CHAVE: soro lácteo; proteínas; concentração, purificação, ultrafiltração.

ABSTRACT – Whey is the liquid byproduct produced by the dairy industry during the manufacture of cheeses and casein. As a raw material it can provide in the food technology new potentialities due to the functional and nutritional properties of its proteins. Membrane technology, especially ultrafiltration (UF), has been used in the dairy industries to produce whey protein concentrates, because this technology allows the selective concentration of the proteins in relation to the other components. In this context the objective of this work is to concentrate and to purify the whey proteins, using the UF associate with discontinuous diafiltration (DF). Two strategies have been tested by changing the volumetric concentration factor (FC), and the volume and the number of DF. The results have shown that the UF process is adequate for production of protein concentrates; in the best experimental strategy, the protein concentrate obtained had 70 % protein, dry basis

KEYWORDS: whey; protein; concentration, purify, ultrafiltration.

1. INTRODUÇÃO

O soro lácteo é a porção aquosa do leite que se separa do coágulo durante a fabricação convencional de queijos ou da caseína. É um subproduto de importância relevante na indústria de laticínios, tendo em vista o volume produzido e sua composição nutricional; 10 litros de leite produzem cerca de 1 quilograma de queijo e 9 litros de soro; neste volume encontram-se cerca da metade dos sólidos do leite, sobretudo lactose, proteínas solúveis e sais minerais.

Estima-se que a produção mundial de soro seja de 180 a 190 milhões de toneladas por ano. Apenas metade deste total é processada em produtos alimentícios retornando a alimentação animal ou humana, ou ainda para a produção de medicamentos e outros produtos. A outra metade é eliminada como efluente em sistemas hídricos ou como adubo diretamente no solo. Quando incorporado às águas residuais dos laticínios, sem tratamento, o soro constitui a principal fonte poluidora do meio ambiente gerada por esse setor, a carga poluente, representada pela Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) pode chegar a 60.000 mg.O₂.L⁻¹; valor cerca de 100 vezes maior que o de um esgoto doméstico (Richards, 2002).

Vários processos têm sido desenvolvidos no sentido de permitir a concentração seletiva das proteínas em relação aos outros componentes de natureza não protéica. Isto se deve ao fato de o soro não ser uma fonte equilibrada de nutrientes, contendo um elevado teor de lactose quando comparado ao de proteína, e, desta forma, não evidencia as propriedades protéicas.

Concentrados protéicos de soro (CP) têm uma vasta aplicação na indústria alimentar, pelos benefícios que podem conferir aos alimentos. As proteínas do soro possuem valor

nutricional elevado, conferido pelo alto teor de aminoácidos essenciais, destacando-se no conteúdo em sulfurados (Wit, 1998). Além das propriedades nutricionais, as proteínas do soro possuem propriedades funcionais e tecnológicas versáteis quando utilizadas como ingredientes em produtos alimentícios, principalmente por sua elevada solubilidade, capacidade de gelificação, absorção de água e emulsificação (Sgarbieri, 1996). Devido à maior especificidade do produto a nível funcional e ao excelente valor nutritivo do mesmo o valor comercial de um concentrado protéico é de 3 a 40 vezes maior que o do soro em pó.

O método convencional de concentração de soro tipicamente utilizado é a evaporação térmica. As principais desvantagens deste método são o elevado consumo energético e o elevado teor de sais e lactose no produto concentrado.

A ultrafiltração (UF) se apresenta como um método alternativo bastante atraente, uma vez que não faz uso do calor e não envolve mudança de fase, o que torna o processo de concentração mais econômico. A UF é um Processo de Separação por Membranas (PSM) tipicamente usada para reter macromoléculas; vem sendo empregada na indústria de laticínios na recuperação e no fracionamento de componentes do leite. A UF permite uma variação na relação de concentração entre os vários componentes do soro, devido à retenção seletiva de proteína e da permeação da lactose, sais minerais, água e compostos de baixa massa molar (Brans, 2006).

Para a produção de CP com alto teor de proteína utiliza-se a diafiltração (DF); segundo Ebersold & Zydney (2004), o modo DF é empregado para separações de proteína para eliminar problemas de associação em concentrações altas no produto retido, gerando alta purificação e ao mesmo tempo bons fatores de rendimento. Este processo promove a

produção de um CP mais puro, pois remove sais e lactose que são permeáveis à membrana.

O desenvolvimento de tecnologias capazes de solucionar o problema do soro de queijo pode trazer benefícios econômicos e ambientais, pois o soro é considerado uma importante fonte de proteína a ser utilizada para consumo, assim, justificam-se estudos sobre a possibilidade de utilizá-lo comercialmente. Dentro deste contexto, os objetivos deste trabalho são concentrar e purificar as proteínas do soro lácteo através da UF associada à DF procurando eliminar do concentrado os componentes de baixa massa molar (sais e lactose) e, assim, obter um produto com elevado teor protéico. Com este intuito foram testadas estratégias variando o volume e o número de DF, e ainda modificando o fator de concentração volumétrico (FC, razão entre o volume inicial da solução e o volume de retido).

2. MATERIAS E MÉTODOS

Nesta seção são apresentados os materiais utilizados na realização dos experimentos; os métodos analíticos para análise das amostras e a metodologia experimental para a realização dos experimentos de concentração e purificação das proteínas do soro.

2.1 Materiais

O soro de queijo em pó utilizado neste trabalho foi doado pela Eleva Alimentos (Teutônia, RS), proveniente da fabricação do queijo Mussarela com um teor de sólidos totais de aproximadamente 6 %.

Para a realização dos experimentos, o soro foi reconstituído dissolvendo manualmente o soro em pó em água destilada em pH neutro e temperatura de 50 °C. O volume inicial de soro

a ser ultrafiltrado foi de aproximadamente 30 L (29,6 L de água e 1,86 kg de soro em pó). As concentrações médias iniciais e o percentual em base seca de lactose, proteína e sais foram iguais a 42 g.L⁻¹ (72,4 %); 9 g.L⁻¹ (15,6 %) e 7 g.L⁻¹ (12 %) respectivamente; a quantidade de gordura foi considerada desprezível.

A membrana usada no processo de UF para concentração do soro foi a UF-6001, é feita de polietersulfona em módulo espiral, fabricada pela KOCH MEMBRANE SYSTEMS. Possui massa molar de corte de 10 kDa, espaçador de alimentação de 80 mil (milésimo de polegada) e área de permeação de 0,28 m².

2.2 Equipamento de UF

Os experimentos foram realizados em uma planta piloto WGM-KOCH PROTOSEP IV, apresentada esquematicamente na Figura 1.

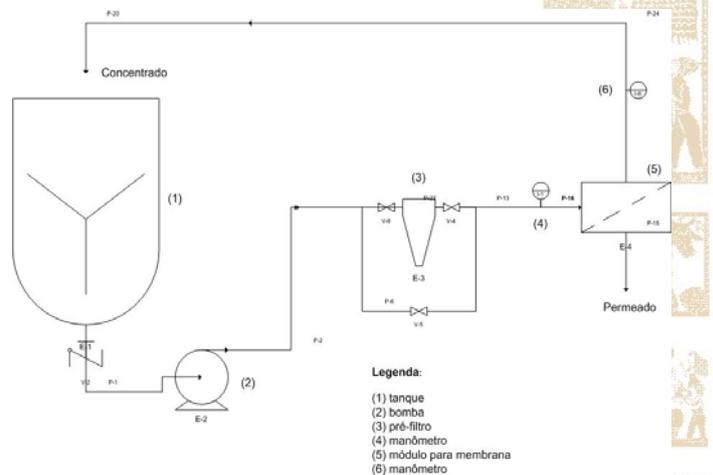


Figura 1 - Esquema da unidade de membranas utilizada para realização dos experimentos.

A unidade de UF possui os seguintes equipamentos, de acordo com a Figura 1:

- tanque de alimentação (1), encamisado de aço inoxidável, com volume de 75 L, fabricado pela SULINOX. O tanque possui um agitador e um sistema de controle de

temperatura que opera na faixa de temperatura de 25 a 150 °C;

- bomba pneumática (2) tipo diafragma, modelo VERSAMATIC VM.50, opera com ar comprimido que passa pelo sistema composto por um Kit FLR (filtro, lubrificador e regulador de ar);
- pré-filtro de cartucho (3), fabricado pela CUNO, constituído de uma carcaça de PVC e elemento filtrante de polipropileno com tamanho médio de poro de 1µm;
- carcaça para módulo da membrana espiral (5), com 30 cm de comprimento e 5,8 cm de diâmetro, feito em de aço inoxidável 316;
- manômetros (4) e (6) de aço inoxidável 316, que estão instalados num tê Sanitech com uma câmara com diafragma, que evita contato do manômetro com o fluido de processo. Os manômetros possuem escala de 0 a 10,5 bar.

2.3 Métodos Analíticos

As características das amostras do concentrado e do permeado dos processos de concentração e purificação foram analisados quanto aos seguintes parâmetros: concentrações de proteína, de lactose, teor de sólidos totais, condutividade elétrica e pH.

A determinação do teor de sólidos totais foi realizada através da técnica gravimétrica de acordo como método apresentado em LANARA (1981). A concentração de lactose foi determinada através do método do ácido dinitrossalicílico (DNS, segundo Miller, 1959). A concentração de proteína foi determinada através do método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). As análises de pH foram realizadas com o pHmetro Digimed - DM20. A medida da condutividade elétrica foi realizada com o

condutivímetro Digimed - DM31, com eletrodo modelo DMC-010M.

2.4 Procedimento Experimental

Primeiramente foram realizados experimentos medindo o fluxo permeado em diferentes pressões transmembrana (ΔP) com água e, posteriormente, com soro.

Nos primeiros dez minutos, o sistema operou em reciclo total, isto é, as correntes de permeado e concentrado retornam para o tanque de alimentação, para homogeneizar a solução e para o sistema entrar em equilíbrio térmico: após, somente a corrente concentrada retornou ao tanque. A cada meia hora de operação foram coletadas, simultaneamente, amostras das correntes de permeado e de concentrado.

A pressão transmembrana foi mantida em 2 bar e a vazão da corrente de alimentação do soro de queijo foi de aproximadamente 840 L.h⁻¹, condições determinadas em trabalhos anteriores (Boschi, 2006). A temperatura do soro foi mantida constante em 50 °C, tendo em vista a temperatura de saída do soro do processo de fabricação do queijo (~60 °C) e a temperatura máxima admissível para a membrana (~55 °C).

Em todos os experimentos, medidas de fluxo de água foram realizadas antes e após a filtração com o soro para verificar a formação de *fouling* na membrana.

Duas estratégias diferentes foram realizadas para verificar quais condições permitiriam uma maior purificação das proteínas, as quais estão descritas a seguir.

- Experimento 1 - a solução inicial foi concentrada até um volume final de 6 L no tanque de alimentação (FC=5); a, seguir cinco DF foram realizadas: as duas primeiras

(DF1 e DF2) com 6 L cada e mais três (DF3, DF4 e DF5) com 3 L cada;

- Experimento 2 - a solução de soro foi concentrada até um volume final de 5 L (FC=6). Em seguida realizaram-se quatro DF: a DF1 e a DF2 de 5 L, a DF4 e a DF5 de 2,5 L.

Vale ressaltar que entre a etapa de concentração e as DFs não foi realizado enxágüe nem limpeza da membrana, isto é, o processo foi contínuo.

Um procedimento de limpeza química foi realizado ao final de cada experimento para restituir as características de fluxo e retenção da membrana e prevenir o desenvolvimento de microrganismos no sistema. A limpeza consistiu nas seguintes etapas: enxágüe com água destilada, limpeza alcalina, limpeza cloro alcalina e limpeza ácida. Estas etapas foram realizadas sempre respeitando os limites de pH e temperatura da membrana.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção são apresentados os principais resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho.

A Figura 2 apresenta o fluxo permeado da água pura e do soro em função da pressão transmembrana; observa-se que o fluxo de água aumentou linearmente com a pressão transmembrana. Além disso, para as mesmas condições operacionais ocorreu uma diferença significativa nos fluxos permeados do soro e da água. Esse mesmo comportamento foi encontrado por Rektor & Vatai (2004), Atra *et al.* (2005) e Butylina *et al.* (2006) em seus trabalhos, isto é, os fluxos da solução do soro eram mais baixos do que os fluxos da água pura em todas as pressões; possíveis causas para este

fluxo mais baixo incluem a interações entre a membrana e a solução, efeitos de viscosidade cinemática e difusividade mássica.

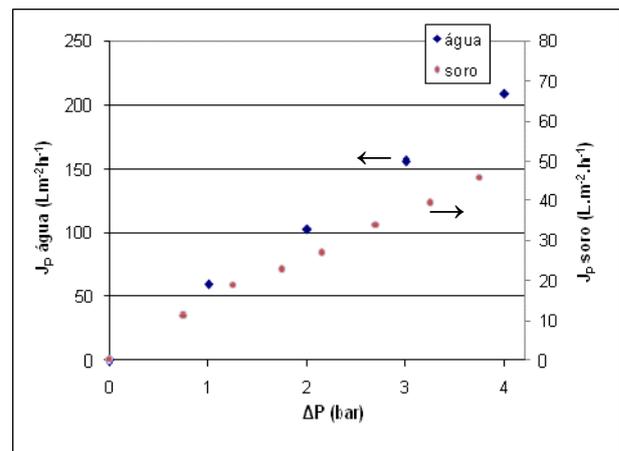


Figura 2 - Fluxo de água e de soro vs pressão transmembrana para a membrana UF-6001, T=50 °C, vazão de alimentação média de 840 L.h⁻¹.

O fluxo permeado do soro menor do que o fluxo de água evidencia que o efeito de polarização por concentração é bastante significativo para o soro na concentração inicial e este efeito tende a se agravar à medida que o soro vai sendo concentrado. Neste caso pode-se afirmar que o aumento de fluxo é limitado pelo aumento da camada polarizada, isto é, o aumento de pressão transmembrana é contra balanceado pelo aumento da resistência total.

Nos gráficos o início da UF é identificado por UFi, e o final por Uff. As diafiltrações são identificadas por DF e pela etapa que correspondem (1, 2, 3, 4 ou 5).

A Figura 3 apresenta uma comparação entre os dois experimentos de concentração realizados, através do percentual de proteína em base seca em função da etapa do processo. O percentual mássico inicial de proteína para ambos os experimentos é cerca de 15 %. Em geral o que se observa é que para o Experimento com maior FC foram obtidos percentuais protéicos ligeiramente maiores ao final da UF;

esta diferença é acentuada com as DFs, sendo expressivo tanto para as DFs de volume maior, quanto para as de menor volume. Para o Experimento 2 ao final das DFs atingiu-se 71 % de proteína enquanto para o Experimento 1 o percentual atingido foi de 62 %.

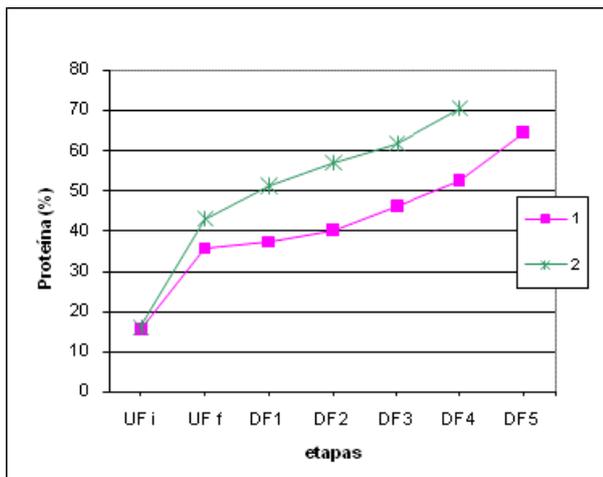


Figura 3 - Percentual protéico no concentrado (base seca) vs etapas do processo para os experimentos 1 e 2, membrana UF-6001, T=50 °C, ΔP=2 bar, vazão de alimentação média de 840 L.h⁻¹.

A Figura 4 apresenta o percentual mássico de lactose, em base seca, no concentrado em função das etapas do processo.

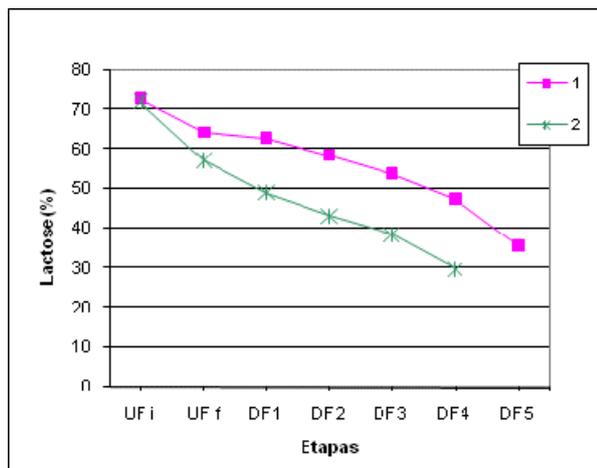


Figura 4 - Percentual de lactose no concentrado (base seca) vs etapas do processo para os Experimentos 1 e 2, membrana UF-6001, T=50 °C, ΔP=2 bar, vazão de alimentação média de 840 L.h⁻¹.

No início dos experimentos o percentual mássico (base seca) de lactose é de 72 %; ao final da UF, este percentual cai para 64 e 57 %, para o Experimento 1 e 2, respectivamente. Durante as diafiltrações estes percentuais vão sendo reduzidos chegando a 37 % para o Experimento 1 e 29 % para o Experimento 2.

Em relação ao teor salino, as amostras iniciais possuíam inicialmente 12 % de sais, em base seca. Para os dois experimentos o processo mostra-se eficiente na remoção de sais, sendo que ao final da UF, o percentual se aproxima de zero, mostrando que boa parte do sal havia sido removida do concentrado protéico.

Verificou-se que as DFs de volumes menores são bastante efetivas na remoção de sais e lactose, para o Experimento 2, por exemplo, houve uma grande redução da concentração dos outros elementos, em relação à quantidade de proteína, nas últimas duas DFs de 2,5 L.

Percebe-se que no Experimento 2 os resultados de concentração protéica são melhores do que os obtidos para o Experimento 1. Vale ressaltar que no Experimento 2 o concentrado da UF, antes da DF, foi de 5 L, e esta diminuição de volume implicou em uma maior concentração protéica final e em um menor volume de água para a etapa de DF. Para o Experimento 1 utilizou-se 21 L de água para a etapa de DF, enquanto que para o Experimento 2 foram utilizados 15 L de água nas DFs e o percentual protéico atingido foi superior.

Os resultados encontrados estão de acordo com os apresentados na literatura; Zydney (1998), Butylina *et al.* (2006), Rektor & Vatai (2004) realizaram trabalhos mostrando que os componentes de baixa massa molar (lactose e sais) permeiam preferencialmente as membranas de UF, as quais retêm as moléculas de proteína.

O pH não sofreu alterações significativas durante todo o processo, as amostras de concentrado e permeado permaneceram com pH entre 6,2 e 6,4; este comportamento é um bom indicativo de que a solução não foi degradada durante o tempo do experimento.

A medida da condutividade elétrica permaneceu praticamente a mesma para o permeado e o concentrado durante toda a etapa de UF, pois a membrana não é seletiva para os sais, que são os compostos que mais contribuem para a condutividade elétrica; durante a etapa de DF a condutividade elétrica do concentrado e do permeado foi decaindo após a adição da água destilada (efeito de diluição).

A Figura 5 mostra o comportamento do fluxo permeado de soro em função do fator de concentração volumétrico para a etapa de UF do Experimento 2, que resultou na melhor purificação protéica.

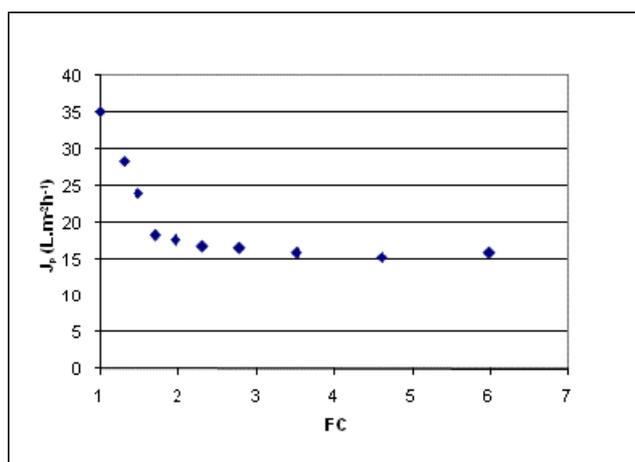


Figura 5 - Fluxo permeado vs fator de concentração volumétrico para Experimento 2 na etapa de UF, membrana UF-6001, T=50 °C, P=2 bar, vazão de alimentação média de 840 L.h⁻¹.

Observa-se que o fluxo permeado diminui à medida que o fator de concentração aumenta. O fator de concentração volumétrico

máximo alcançado de 6 foi em função das limitações da unidade experimental. Este fator poderia ainda ser aumentado visto que o fluxo permeado não apresenta uma tendência a diminuir.

Os dados da Figura 5 confirmam o que alguns autores já haviam observado. Segundo Smith (2003), geralmente o fluxo permeado diminui com o aumento do FC. Segundo Rektor & Vatai (2004) e Bacchin *et al.* (2006) quanto mais concentrada a solução de alimentação, menor o fluxo permeado; isso se deve à pressão osmótica mais elevada e ao maior acúmulo de moléculas do soluto na camada polarizada, aumentando sua espessura e, por conseqüência, sua resistência à permeação. Segundo Atra *et al.* (2005), em fatores de concentração mais elevados há um depósito maior e mais denso da camada que reduz o fluxo permeado até que ele alcance a condição de estado estacionário.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho, puderam-se obter as conclusões listadas a seguir.

- Para as mesmas condições operacionais, ocorre uma diferença significativa nos fluxos permeados do soro e da água; o fluxo de água é maior que o fluxo permeado de soro.
- O aumento de fluxo é limitado pelo aumento da camada polarizada, isto é, o aumento de pressão transmembrana é contra balanceado pelo aumento da resistência total.
- Quanto maior o FC na etapa de concentração melhores são os resultados de purificação protéica obtidos. Para o Experimento 2 com FC igual a 6 após as DFs atingiu-se 71 % em massa de proteína (base seca).

- Na etapa de DF, a quantidade de lactose no concentrado diminui significativamente: para o Experimento 1 ao final das DFs atingiu-se 37 %, enquanto, que para o Experimento 2 o teor de lactose atingido foi de 29 %, em base seca.
- Para os dois experimentos de concentração, o processo mostra-se eficiente na remoção de sais, ao final da UF o percentual se aproxima de zero, ou seja, praticamente todo o sal foi removido do concentrado.
- A DF é bastante eficiente quando realizada com pequenos volumes e em um número maior de vezes.
- Diminuir o volume de concentrado de 6 para 5 L, antes das DFs, implicou em uma maior concentração protéica final e em um menor volume de água para a etapa de DF.
- As medidas de pH e condutividade elétrica evidenciam que a solução não foi degradada durante o experimento.
- O fluxo permeado de soro diminui com o aumento do FC devido à pressão osmótica mais elevada e ao maior acúmulo de moléculas do soluto na camada polarizada, que aumentam a resistência à permeação.

5. REFERÊNCIA

ATRA, R.; VATAI, G.; BEKASSY-MOLNAR, E.; BALINT A. Investigation of ultra and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. *J. of Food Eng.*, v. 67, p. 325-332, 2005.

BACCHIN, P.; AIMAR, P.; FIELD, R.W. Critical and sustainable fluxes: Theory, experiments and applications. *J. Memb. Sci.*, v. 281, p. 42-69, 2006.

BOSCHI, J.R. *Concentração e purificação das proteínas do soro de queijo por UF*. Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia Química, UFRGS, Brasil, 2006.

BRANS, G. *Design of membrane systems for fractionation of particles suspensions*. PhD Thesis, Wageningen University, Netherlands, 2006.

BUTYLINA, S.; LUQUE, S.; NYSTROMA, M. Fractionation of whey-derived peptides using a combination of UF and NF. *J.Memb. Sci.*, v. 280, p. 418-426, 2006.

EBERSOLD, M.F.; ZYDNEY, A.L. The effect of membrane properties on the separation of protein charge variants using UF. *J. Memb. Sci.*, v. 243, p. 379-388, 2004.

LANARA-Laboratório Nacional de Referência Animal, Ministério da Agricultura *Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes – II Métodos físicos e químicos*. Portaria 001/81 de 07/10/81.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R.J. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v.193, p.265-275, 1951.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, v. 31, p. 426-428, 1959.

REKTOR, A., VATAI, G., Membrane filtration of Mozzarella whey. *Desal.*, v.162, p. 279-286, 2004.

RICHARDS, N.S.P.S. Soro Lácteo – Perspectivas Industriais e Proteção ao Meio Ambiente. *Food Ingred.*, n. 17, p. 20-27, 2002.

SGARBIERI, V.C. *Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações*. São Paulo: Editora Varela; 1996.

SMITH, G. *Dairy Processing – Improving quality*. New York: CRC Press, 2003.

WIT, J.N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products, *J. Dairy Sci.*, v.81, p.597-608, 1998.

ZYDNEY, A.L. Protein separations using membrane filtration: new opportunities for whey fractionation. *Int. Dairy J.*, v.8, p. 243-250, 1998.

