



## CONCENTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DAS PROTEÍNAS MAJORITÁRIAS DO SORO DE QUEIJO UTILIZANDO A TECNOLOGIA DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS

Camila Baldasso<sup>1</sup>, Tatiana Barros<sup>1</sup>, Isabel Cristina Tessaro<sup>1</sup>, Lígia Damasceno Ferreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Separação por Membranas

Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

R. Eng. Luis Englert, s/n. Campus Central. CEP: 90040-040 - Porto Alegre - RS - BRASIL,

E-MAIL: cbaldasso@gmail.com, tati\_cbarros@yahoo.com.br, isabel@enq.ufrgs.br, ligia@enq.ufrgs.br

**Palavras Chaves:** membranas, soro de queijo, proteínas, concentração, fracionamento.

**Resumo:** O soro de queijo, apesar de ser considerado um subproduto da indústria de laticínios, possui elevado valor nutritivo uma vez que retém a maior parte dos componentes do leite; 10 litros de leite produzem cerca de 1 quilograma de queijo e 9 litros de soro. Como matéria-prima, o soro, pode conferir à tecnologia alimentar novas potencialidades devido às propriedades nutricionais e funcionais das suas proteínas. O objetivo do trabalho é concentrar as proteínas do soro de leite e após, separá-las em duas frações: uma concentrada em  $\beta$ -lactoglobulina e a outra em  $\alpha$ -lactalbumina. A etapa de concentração foi realizada, utilizando membranas de ultrafiltração (UF) com massa molar de corte de 10 kDa e o processo foi operado no modo batelada associado com a diafiltração, permitindo uma maior remoção de sais e lactose, conduzindo simultaneamente a uma maior concentração e pureza das proteínas no retido. Na etapa de fracionamento o concentrado protéico obtido foi tratado por diferentes processos de separação com membranas a fim de separar as proteínas majoritárias. Na segunda etapa a massa molar das proteínas foi considerada para a seleção das técnicas de separação por membranas: a ultrafiltração (membranas com MMC de 20 e 70 kDa) e a microfiltração (membrana com tamanho de poro nominal de 0,1  $\mu$ m). A eficiência de cada processo foi avaliada pela determinação da concentração de cada proteína nas correntes de permeado e de concentrado.

### 1 Introdução

O soro de queijo apesar de ser um subproduto da indústria de laticínios, possui um elevado valor nutritivo uma vez que retém a maior parte dos componentes do leite; 90% do volume de leite, utilizado para fabricação de queijo, sai do processo na forma de soro.

O soro é o líquido de cor amarelada que permanece em solução após a precipitação das caseínas (formação de coalho) durante a fabricação do queijo. O soro é composto de 94 a 95 % de água, os sólidos do soro são essencialmente lactose (3,8 –

4,2 %), proteínas (0,8 – 1,0 %) e minerais (0,7- 0,8 %) (Jelen, 1992).

As tecnologias de processamento de soro têm crescido exponencialmente nos últimos 10 anos devido ao desenvolvimento dos processos de separação com membranas e dos métodos de troca iônica, bem como a um melhor entendimento do valor nutritivo do soro como matéria-prima (Huffman, 1996).

Os 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



## VI-OKTOBER FÓRUM – PPGEQ

22, 23 E 24 DE OUTUBRO DE 2007

não ser uma fonte equilibrada de nutrientes, contendo um elevado teor de lactose e uma baixa concentração de proteínas e cinzas, desta forma não é possível evidenciar nenhuma das propriedades funcionais das proteínas.

Desde 1981, a ultrafiltração (UF) se tornou a técnica mais utilizada para recuperar as proteínas solúveis do soro. O desenvolvimento de membranas robustas, sintéticas e laváveis, bem como a melhoria dos processos contínuos pelo uso de multietapas, recicladas e diafiltração (DF), foram fatores significativos para o sucesso deste processo (Brans *et al.*, 2004)

Para ser considerado um concentrado protéico é necessário que o produto contenha mais de 25% de proteína em base seca, enquanto que os isolados protéicos devem ter mais de 90% de proteína (Mathews, 1984). Os concentrados protéicos de soro têm uma vasta aplicação na indústria alimentar, pela funcionalidade que podem conferir aos alimentos (Huffman, 1996). Além disso, o valor comercial de um concentrado protéico é 3 a 10 vezes maior que o do soro em pó, devido à maior especificidade do produto a nível funcional e ao excelente valor nutritivo do mesmo (Mangino, 1992).

As proteínas do soro possuem valor nutricional elevado, conferido pela presença de alto teor de aminoácidos essenciais, destacando-se no conteúdo em sulfurados. (Wit, 1998; Neves, 2001). 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 & Pacheco, 1999).

A fração protéica do soro contém:  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg),  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -La), albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas (Ig), glicomacropéptidos e alguns polipeptídeos resultantes da proteólise das caseínas por enzimas do leite (Fox, 1998).

As proteínas de interesse neste trabalho são a  $\beta$ -Lg e a  $\alpha$ -La. Segundo Fox (1998), a  $\beta$ -Lg é a mais abundante das proteínas do soro ( $2,7 \text{ g.L}^{-1}$ ), seu ponto isoelétrico é 5,2, sua massa molar é de 18,3 kDa quando está na forma de um monômero, porém sua conformação depende do pH. Para valores de pH compreendidos entre 5,20 e 6,70 e à temperatura ambiente, a  $\beta$ -Lg existe como um dímero estável, com uma massa molar de 36,7 kDa. Entre pH 3,50 e 5,20, os dímeros associam-se para

formar um octômero de 147 kDa. Para valores de pH inferiores a 3,50 e superiores a 8,6 a molécula de proteína desnatura e então se encontra na forma de monômero (Wit, 1998).

A  $\alpha$ -La é a segunda proteína em maior concentração no soro ( $1,2 \text{ g.L}^{-1}$ ), sua massa molar é de 14,15 kDa, e seu ponto isoelétrico é de 4,2 – 4,8. Tem uma estrutura secundária ordenada e uma estrutura terciária esférica e compacta (Fox, 1998).

Devido às propriedades funcionais, fisiológicas e biológicas específicas de cada uma das proteínas do soro, tem havido um crescente interesse no fracionamento das proteínas, pois muitas vezes estas características não se fazem notar nos concentrados protéicos de soro devido a interações com outros componentes. Por exemplo: a  $\beta$ -Lg tem maior capacidade de gelificação que a  $\alpha$ -La. Por outro lado, o leite humano não contém  $\beta$ -Lg (é a proteína do leite bovino que causa mais reações alérgicas), e por esse motivo a  $\alpha$ -La é mais adequada para a formulação de alimentos para lactentes, do que os concentrados protéicos do soro. Em vista disto, o interesse comercial na produção de proteínas de soro isoladas com propriedades funcionais e biológicas bem caracterizadas tem aumentado consideravelmente nos últimos anos (Zydney, 1998; Wit, 1998).

Cheang & Zydney (2004) mostraram que, através de um sistema de membranas e com modificações no pH e força iônica das soluções, é possível fracionar os constituintes protéicos do soro. Esta é uma técnica que poderá ter aplicação em larga escala.

O objetivo deste trabalho é concentrar e fracionar as proteínas majoritárias do soro de queijo utilizando processos de separação com membranas.

Na etapa de concentração utilizou-se membranas de UF e o sistema foi operado no modo batelada associado à DF, permitindo, desta forma, uma maior remoção de sais e lactose, conduzindo simultaneamente a uma maior concentração de proteínas no retido.

A etapa de fracionamento das proteínas consiste em processar o concentrado obtido utilizando outra técnica de separação por membranas (ultrafiltração – MMC 20 e 70 kDa, microfiltração – tamanho de poro nominal de 0,1  $\mu\text{m}$ ). Nesta etapa, propriedades como massa molar e ponto isoelétrico são características importantes que devem ser consideradas para realizar a separação. A partir dos produtos obtidos em cada uma das etapas, é necessário avaliar através de



métodos analíticos, as concentrações de proteína obtidas nas correntes de permeado e concentrado.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Soro de queijo

O soro de queijo em pó utilizado neste trabalho foi doado pela Elegê 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-se o soro em pó em água destilada.

Na etapa de concentração do soro o volume inicial a ser ultrafiltrado foi de aproximadamente 30 L (1,86 kg de soro em pó). As concentrações iniciais de lactose e de proteína foram iguais a  $42 \text{ g.L}^{-1}$  e  $9,5 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente, tomando a massa específica do soro reconstituído como  $1,042 \text{ g.L}^{-1}$ . As quantidades de gorduras para fins de cálculos foram consideradas desprezíveis por apresentarem valores muito baixos. Dessa forma, considerou-se que o soro é constituído somente por proteínas, sais e lactose. Portanto, a concentração de sais no soro reconstituído foi determinada pela diferença da concentração de sólidos totais pelo somatório de proteínas e lactose correspondendo a  $7,22 \text{ g.L}^{-1}$  de sais.

### 2.2 Equipamento de UF

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

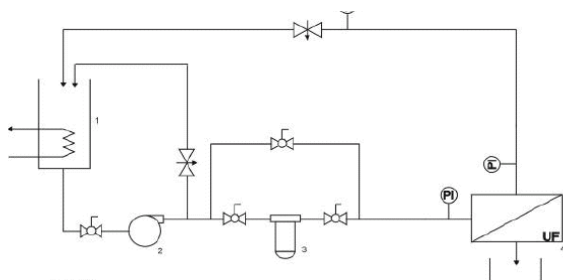


Figura 1: Esquema da unidade de membranas utilizada para realização dos experimentos.

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

- tanque de alimentação (1); dois tanques foram usados dependendo do volume de soro a ser tratado:
  - ✓ concentração - tanque de alimentação

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  $150^{\circ}\text{C}$ ;

- ✓ fracionamento - tanque de alimentação de aço inox com capacidade de 12 L, com uma serpentina de aquecimento ligada a um banho termostático, marca Lauda, o qual possui controle analógico de temperatura;
- 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  $1\mu\text{m}$ ;
- carcaça para módulo da membrana (4), três módulos diferentes foram usados, dependendo da membrana requerida para o processo:
  - ✓ concentração - módulo em espiral, com 30 cm de comprimento e 5,8 cm de diâmetro, feito em de aço inoxidável 316;
  - ✓ fracionamento - módulo de membrana plana, construído de aço inox, permite a instalação de membranas com área útil de  $61 \text{ cm}^2$ ;
  - ✓ fracionamento - módulo para membrana cerâmica cilíndrica com 25 cm de comprimento, 10 e 25 mm de diâmetro interno e externo, respectivamente, feito em aço inox 340.
- manômetros (P1) 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 Membranas de UF e MF

A membrana usada no processo de UF para concentração do soro é feita de polietersulfona em módulo espiral, fabricada pela KOCH MEMBRANE SYSTEMS. Possui MMC de 10 kDa, espaçador de alimentação de 80 mil (milésimo de polegada) e área de permeação de  $0,28 \text{ m}^2$ .

Para o processo de fracionamento das proteínas as membranas testadas encontram-se na Tabela 1.



**Tabela 1:** Características das membranas de UF e MF utilizadas para separação das proteínas.

Membrana	Geometria	Material	Área de permeação (m <sup>2</sup> )	Tamanho de poro/ MMC
MF-6001	Espiral	Polieter-sulfona	0,22	0,1 µm
VCWP	Plana	NI	6,10 x 10 <sup>-3</sup>	0,1 µm
HN06	Plana	NI	6,10 x 10 <sup>-3</sup>	20 kDa
RZ04	Plana	NI	6,10 x 10 <sup>-3</sup>	70 kDa

Legenda: NI - não informado pelo fabricante.

## 2.4 Métodos analíticos

As características das amostras do concentrado e do permeado dos processos de concentração e separação 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, modelo DM20. A medida da condutividade elétrica foi realizada com o condutímetro DIGIMED DM-31, com eletrodo modelo DMC-010M. A fim de identificar os tipos de proteína predominantes no permeado e no concentrado foi utilizada a técnica de eletroforese em gel SDS-page de poliacrilamida na concentração de 15 % (Maniatis *et al.*, 1989). O equipamento utilizado para a eletroforese foi o Mini- PROTEAN 3<sup>®</sup> Cell, Bio-Rad; o sistema foi operado a 100 V e 30 A.

## 2.5 Procedimento experimental

### 2.5.1 Concentração e purificação das proteínas

A solução de soro foi colocada no tanque de alimentação da unidade e homogeneizada. O fluxo permeado foi medido em sete pressões transmembrana diferentes para verificar o comportamento do fluxo com o aumento da pressão transmembrana.

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<sup>-1</sup>, 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).

Nos primeiros dez minutos, o sistema opera 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 retorna ao tanque.

A cada meia hora de operação foram coletadas, simultaneamente, amostras das correntes de permeado e de concentrado em frascos de vidro âmbar. Medidas diretas de fluxo permeado foram realizadas a cada 15 minutos.

Dois experimentos diferentes foram realizados para verificar quais condições permitiriam uma maior purificação das proteínas, os quais estão descritos a seguir.

No Experimento 1 a solução inicial foi concentrada até um volume final de 6 L no tanque de alimentação (FC~5). A seguir cinco DFs foram realizadas: a DF1 e a DF2 de 6 L e a DF3, a DF4 e a DF5 de 3 L.

No Experimento 2 a solução de soro foi concentrada até um volume final de 5 L (FC=6). Em seguida realizaram-se quatro DFs: a DF1 e a DF2 de 5 L e 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.

### 2.5.2 Fracionamento das proteínas

Depois de concentradas as proteínas de soro eram separadas em alíquotas de 2 L, para a realização dos experimentos com membranas de UF e de MF, em módulos plano, espiral e tubular, com tamanho de poro nominal ou MMC adequados para a separação. Quando o módulo utilizado era o espiral, devido a maior taxa de permeado, o volume inicial de concentrado protéico usado foi de 6 L no tanque de alimentação.

Todas as membranas testadas para a separação de proteínas foram compactadas, e caracterizadas em relação ao fluxo permeado de água e de soro em no mínimo quatro pressões



transmembrana. Os experimentos de separação das proteínas foram realizados conforme o descrito a seguir.

#### Membrana MF-6001, módulo espiral

Um volume inicial de 6 L de concentrado protéico, obtido nas etapas anteriores, foi adicionado ao tanque de alimentação (12 L), aquecido a 40 °C. A temperatura foi reduzida, porque em concentrados protéicos, a temperaturas próximas a 55 °C, existe uma tendência das moléculas de  $\alpha$ -La polimerizarem com as moléculas de  $\beta$ -Lg (Fox, 1998). O pH da solução foi ajustado para 4,6 (pH onde a  $\beta$ -lg forma octômero) com a adição de uma solução 20 % de ácido cítrico. O volume inicial de 6 L foi reduzido a 3 L, e em seguida quatro DFs de 3 L foram realizadas com água destilada pré-aquecida a 40 °C, acidificada ao pH de 4,6 através da solução de ácido cítrico. A vazão de alimentação foi mantida em 700 L.h<sup>-1</sup>. A pressão transmembrana utilizada para a separação foi de 1,75 bar, pressão onde o fluxo limite não foi atingido, e segundo Brans *et al.* (2004), a melhor região para realizar a purificação.

#### Membranas VCWP, RZO4 e HN06, módulo plano

Dois litros de concentrado protéico obtido na primeira etapa foram usados em cada processo. Para as membranas VCWP e RZO4 o concentrado foi aquecido a 40 °C, e acidificado ao pH de 4,6. Para a HN06, optou-se por realizar o experimento a temperatura ambiente, porque nesta temperatura os dímeros são mais estáveis. Nesta membrana não foi necessário adicionar ácido, já que a solução se encontrava no pH onde os dímeros são formados (6,3). A separação foi realizada com uma vazão de alimentação de 620 L.h<sup>-1</sup>, e pressão transmembrana de 1,75 bar. A solução recirculou pelo sistema durante 20 minutos em modo de reciclo total, para garantir homogeneidade na concentração e equilíbrio de temperatura então, a corrente de permeado foi retirada do sistema, e, após 30 minutos amostras de permeado e concentrado foram coletadas. Não foi possível reduzir o volume inicial à metade ou realizar DFs devido a limitações do equipamento tais como: volume insuficiente no tanque de alimentação, área de membrana pequena, conduzindo a uma taxa de permeado muito baixa. Para estas membranas foi analisado apenas o fluxo permeado e a retenção.

### 2.5.3 Medidas do fluxo de água

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.

### 2.5.4 Limpeza

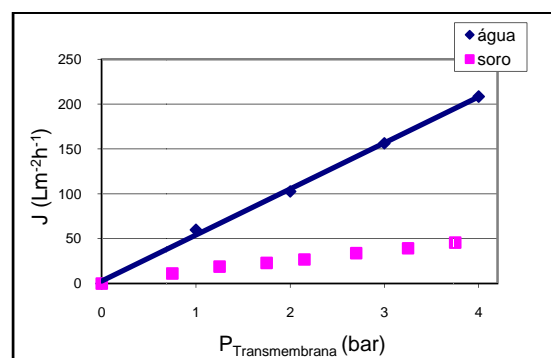
Um procedimento de limpeza foi utilizado para restituir as características de fluxo e retenção da membrana e prevenir o desenvolvimento de microrganismos no sistema. A limpeza química foi realizada ao final de cada experimento, e consistiu nas seguintes etapas: enxágüe com água destilada, limpeza alcalina, limpeza cloro alcalina (somente no caso das membranas poliméricas), limpeza ácida. Estas etapas foram realizadas sempre respeitando a limitação de pH e temperatura da membrana, conforme recomendações do fabricante

## 3. Resultados e discussão

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

### 3.1 Concentração e purificação das proteínas do soro

A Figura 2 apresenta o fluxo permeado da água pura e do soro de queijo em função da pressão transmembrana. Observa-se que o fluxo permeado do soro é muito menor do que o fluxo de água pura; isto 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.



**Figura 2:** Fluxo permeado versus pressão transmembrana para água pura e para o soro de queijo nos experimentos com a membrana de UF de 10kDa.

A Figura 3 apresenta uma comparação entre os dois experimentos de concentração realizados. Analisando os resultados apresentados no gráfico, observa-se que a concentração de





proteínas aumenta ao longo do experimento de permeação. Não foi detectada a presença de proteína, no permeado, para ambos os experimentos, indicando que a retenção protéica foi de 100 %.

O percentual mássico inicial de proteína para os dois experimentos é o mesmo e igual a 15 %, ao final da UF, este valor atinge 25 e 29 %, para os experimentos 1 e 2, respectivamente.

Para o experimento 1, ao final da DF1 chegou-se a 30 % de proteína. Ao final da DF2 e DF3 o concentrado atingiu 36 e 40,5 % de proteína, respectivamente. Ao final da DF4 o percentual mássico de proteína atingiu 48 % de proteína e na quinta DF, com 17 g.L<sup>-1</sup> de proteína e 15 g.L<sup>-1</sup> de lactose atingiu-se 53 % de proteína. A concentração final de sais foi inferior a 1 g.L<sup>-1</sup>.

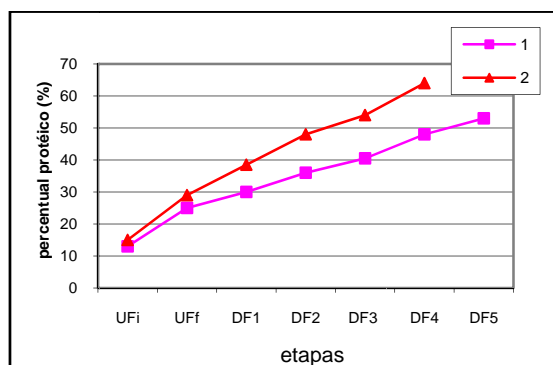


Figura 3: Percentual protéico, em base seca, obtido no final de cada etapa para os experimentos 1 e 2.

No Experimento 2 após as DF1, DF2 e DF3, alcançou-se 38,5, 48 e 55 % de proteína, respectivamente. Ao final do experimento (DF4) com 28,7 g.L<sup>-1</sup> de proteína e 15 g.L<sup>-1</sup> de lactose o percentual protéico chegou a 64 % em base seca; a concentração de sais também ficou inferior a 1 g.L<sup>-1</sup>.

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 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 e obteve-se um concentrado protéico com 53% em base seca; enquanto que para o Experimento 2 foram utilizados 15 L de água e o percentual protéico foi de 64% em base seca.

Ainda, para o Experimento 2, percebe-se, que houve uma grande redução da concentração dos outros elementos, em relação à quantidade de proteína, nas últimas duas DFs de 2,5 L.

Para efeito ilustrativo, são apresentados os gráficos para o Experimento 2, já que os resultados para o Experimento apresentam o mesmo comportamento, apenas atingindo concentrações finais diferentes.

A Figura 4 apresenta o fluxo permeado de soro em função do tempo para o Experimento 2. Observa-se que o fluxo diminui com o tempo de operação, o fluxo permeado inicia em 35 L.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> e após os primeiros 80 minutos vai diminuindo até atingir 18 L.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>, e assim permanece até os 170 minutos, quando decai para aproximadamente 15 L.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> e se mantém assim até o final da UF (~280 minutos). A queda inicial mais acentuada foi devida à formação da camada de polarização por concentração e ao *fouling*; o decaimento final se deve ao aumento da concentração e conseqüentemente às mudanças nas propriedades da solução, tais como massa específica e viscosidade. Vale ressaltar que a redução de fluxo permeado é um dos fatores limitantes do processo, do ponto de vista operacional.

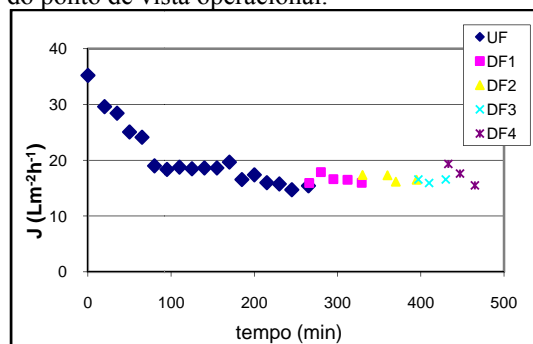


Figura 4: Fluxo permeado vs tempo para a etapa de concentração e purificação das proteínas do experimento 2.

Nas DFs o fluxo permeado ficou abaixo do fluxo inicial da UF, devido ao *fouling* já formado na etapa de concentração das proteínas, e, após diminuiu com o tempo. No momento em que iniciamos as DFs o fluxo permeado aumenta para cerca de 20 L.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>, devido ao efeito de diluição, e ao final da DF volta para os 15 L.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> obtidos no final da etapa de concentração.

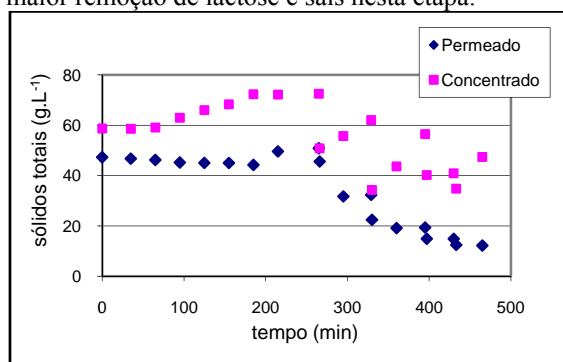
A condutividade elétrica permaneceu praticamente igual para o permeado e o concentrado durante toda a etapa de UF, pois a membrana não é seletiva para os sais, que são os



compostos que mais contribuem para a condutividade elétrica; durante a etapa de DF a condutividade elétrica foi decaindo após cada adição da água destilada.

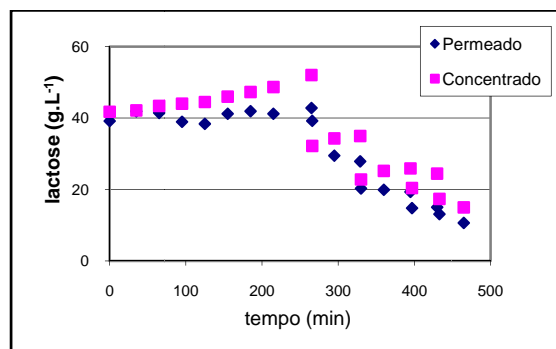
O pH não sofreu alterações significativas durante todo o processo. O pH das amostras de concentrado e permeado permaneceu em 6,4 durante todo tempo do experimento baixando ligeiramente para 6,3 nos últimos minutos; este comportamento foi um bom indicativo de que a solução não foi degradada durante o tempo do experimento.

Em relação ao teor de sólidos totais no concentrado, observa-se, na Figura 5, que houve um aumento na corrente de concentrado de todas as etapas devido principalmente ao aumento de concentração de proteína. Já no permeado a quantidade de sólidos totais permanece praticamente constante durante toda a etapa de UF baixando significativamente nas DFs, devido à maior remoção de lactose e sais nesta etapa.



**Figura 5:** Variação dos sólidos totais vs tempo para o concentrado e o permeado na etapa de concentração das proteínas do Experimento 2.

A variação da concentração de lactose em função do tempo pode ser observada na Figura 6. No permeado, durante a etapa de UF, a concentração de lactose permanece praticamente constante em 40 g.L<sup>-1</sup>. A concentração de lactose no retido inicia com 40 g.L<sup>-1</sup> e atinge 50 g.L<sup>-1</sup> ao final da etapa de UF. Quando é iniciada a DF a concentração de lactose diminui significativamente no retido e no permeado. Ao final das quatro DF a concentração de lactose no retido atinge 15 g.L<sup>-1</sup>.



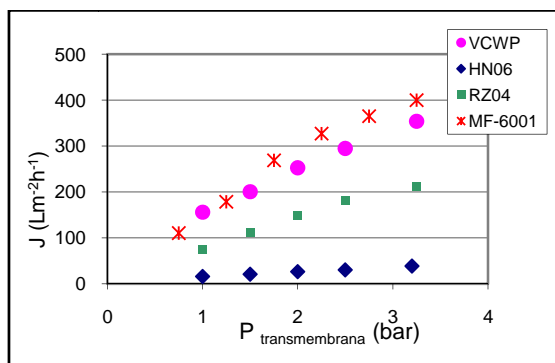
**Figura 6:** Concentração de lactose vs tempo para o concentrado e o permeado na etapa de concentração e purificação das proteínas do Experimento 2.

Os resultados encontrados estão de acordo com os encontrados na teoria, segundo Zydney (1998) os componentes de baixa massa molar (lactose e sais) permeiam preferencialmente as membranas de ultrafiltração, as quais retêm as moléculas de proteína.

### 3.2 Fracionamento das proteínas do soro

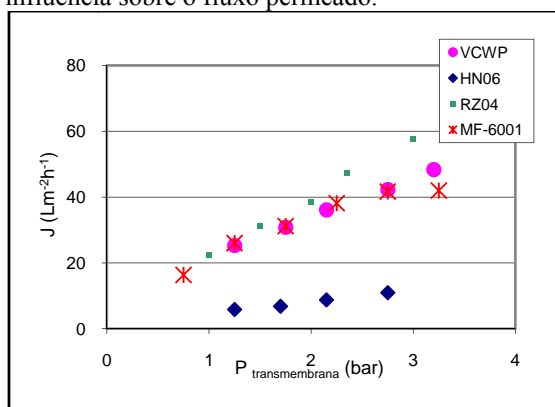
A primeira etapa da separação consistiu em medir os fluxos de água e do concentrado protéico nas membranas. A Figura 7 apresenta o fluxo permeado da água em função da pressão transmembrana para as membranas utilizadas na separação das proteínas. Na Figura 8 é possível observar o comportamento do fluxo de soro concentrado em função da pressão transmembrana. Observa-se que o fluxo de concentrado protéico é menor do que o fluxo de água pura para todas as pressões e para todas as membranas.

Os fluxos de água para a MF-6001 em módulo espiral e VCWP em módulo plano foram semelhantes, e isto poderia ser esperado já que as duas membranas são de MF com tamanho de poro nominal de 0,1  $\mu\text{m}$ , apresentando diferenças na geometria do módulo e no material. A RZ04 apresentou fluxos permeados de água intermediários entre as membranas de MF e a HN06.



**Figura 7:** Fluxo permeado de água vs pressão transmembrana para a membrana de MF-6001, VCWP, HN06 e RZ04 utilizadas para fracionamento protéico.

Os fluxos permeados de concentrado protéico foram semelhantes para as membranas RZ04, MF-6001 e VCWP, sendo ligeiramente maior para a primeira, em pressões mais elevadas. A HN06 apresentou os menores fluxos permeados. Pode-se perceber a partir destes resultados, que apesar das membranas de MF apresentarem MMC maior que a RZ04, para esta o fluxo permeado atingido foi relativamente elevado, ainda mais quando comparado com a membrana HN06. Estes resultados mostram que além da geometria do módulo, do tamanho de poro nominal ou MMC outros fatores como o material da membrana, a distribuição dos tamanhos de poros, a porosidade e a espessura da membrana exercem uma grande influência sobre o fluxo permeado.



**Figura 8:** Fluxo permeado de soro vs pressão transmembrana para a membrana de MF-6001, VCWP, HN06 e RZ04 utilizadas para separação das proteínas.

As diferenças de fluxo de água se devem exclusivamente às características da membrana enquanto que as diferenças no fluxo de soro são influenciadas também pelas interações entre o soro e a membrana; fenômenos como adsorção e bloqueio de poros são o resultado destas interações.

Na Tabela 4, os resultados, de

concentração de proteína e lactose para as amostras da corrente de permeado e de retido para os experimentos de separação para as quatro membranas testadas, são apresentados. Para o caso da membrana de MF-6001, optou-se por mostrar os resultados das etapas, já que neste caso, conseguiu-se realizar DFs e é importante monitorar como se comportam as variações de proteína.

**Tabela 4:** Concentração de proteína e lactose, obtida nas correntes de permeado e concentrado, para as membranas: MF-6001, MF-VCWP, UF-HN06 e UF-RZ04.

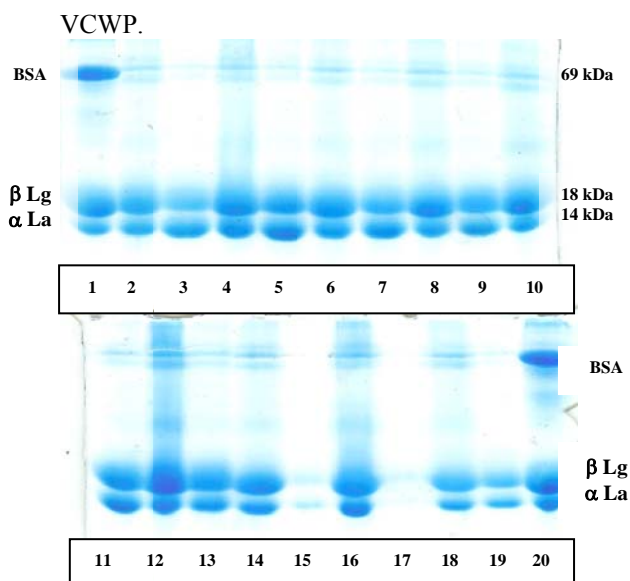
Membrana	Amostra	Proteína (g.L <sup>-1</sup> )	Lactose (g.L <sup>-1</sup> )	
MF - 6001	soro inicial	21,3	17,4	
	MP1	7,6	12,3	
	MC2	22,3	19,6	
	MP2	6,8	3,5	
	DF1C	22,0	18,0	
	DF1P	6,6	9,3	
	DF2C	19,8	11,6	
	DF2P	7,3	7,0	
	DF3C	18,2	9,4	
	DF3P	4,8	5,0	
MF - VCWP	VCWPC	30,7	17,7	
	VCWPP	5,5	7,6	
	UF - HN06	HN06C	30,8	17,7
		HN06P	0,4	13,4
UF - RZ04	RZ04C	30,8	17,7	
	RZ04P	1,4	15,9	

Podemos observar na Tabela 4, que houve uma retenção parcial de proteína e lactose na MF-6001 e na VCWP. No final das DFs, as concentrações de lactose ficaram semelhantes para as amostras de permeado e concentrado da MF-6001. As membranas RZ04 e HN06 retiveram praticamente toda proteína, enquanto que para a lactose a retenção foi baixa.

A Figura 9 mostra fotografias dos géis de eletroforese feitos para analisar as diferentes proteínas para as amostras de concentrado e permeado para as quatro membranas testadas no processo de fracionamento. As canaletas 1 e 20 correspondem ao padrão, formado por 50 µg das proteínas BSA, βLg e αLa em cada banda correspondente, conforme pode ser visto na figura.

As canaletas 2 a 13 mostram as amostras obtidas na MF-6001, mostrando as etapas da MF e DF. As canaletas 14 e 15 correspondem à membrana HN06; as 16 e 17 à RZ04 e as 18 e 19 à





**Figura 9:** Fotografias dos géis de eletroforese para as amostras de concentrado e permeado para as membranas testadas para fracionamento das proteínas.

**Legenda:** (1) e (20) padrão; (2) MC1, (3) MP1, (4) MC2, (5) MP2, (6) DF1C, (7) DF1P, (8) DF2C, (9) DF2P, (10) DF3C, (11) DF3P, (12) DF4C, (13) DF4P; (14) HN06C, (15) HN06P; (16) RZ04C, (17) RZ04P; (18) VCWPC, (19) VCWPP.

Todas as amostras foram dissolvidas em tampão na proporção de 2:1, e foram realizadas diluições para que todas as canaletas tivessem a mesma quantidade de proteína, ou seja, em cada canaleta existe uma quantidade total de 50 µg. Por isso, em um primeiro momento, em alguns casos, tem-se a impressão de que as concentrações das duas proteínas estão iguais, porém analisando cuidadosamente observa-se que as quantidades estão variando.

#### 4. Conclusões

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

- ✓ para todas as membranas o fluxo de água foi maior que o fluxo permeado de soro;
- ✓ quanto maior a pressão transmembrana, maior o fluxo permeado;
- ✓ o fluxo permeado diminui com o tempo de operação devido à formação da camada de polarização por concentração e *fouling*;
- ✓ na etapa de DF diminui-se significativamente a quantidade de lactose e sais no concentrado;

- ✓ os melhores resultados para a concentração protéica são obtidos para o maior FC: para o Experimento 1 com FC igual a 5 após as DFs atingiu-se 53% em massa de proteína (base seca); enquanto que para o Experimento 2 com FC igual a 6 após as DFs o percentual mássico de proteína em base seca foi de 64%;
- ✓ aumentando o número, e conseqüentemente o volume de DFs para o FC igual a 5, a concentração protéica não se iguala à obtida com o FC igual a 6;
- ✓ na etapa de fracionamento das proteínas, para as membranas testadas, observou-se que o fluxo permeado do concentrado protéico foi semelhante para as membranas de MF e para a RZ04; a medida que a pressão transmembrana aumentou o fluxo permeado da RZ04 foi maior.
- ✓ características das membranas como material, distribuição de tamanhos de poros, porosidade, espessura têm uma grande influência sobre o fluxo permeado;
- ✓ as interações soro – membrana influenciam o fluxo permeado; os resultados da eletroforese indicaram que parte da proteína β-Lg passou para o permeado o que pode indicar que nem todas as moléculas estão se agrupando, de acordo com informações obtidas na literatura.

Na próxima etapa experimental serão realizadas as análises que permitem identificar a densidade da banda, e conseqüentemente, a concentração de cada uma das proteínas em cada corrente.

A formação de dímeros e octômeros da β-Lg será confirmada através de experimentos com filtração gel.

#### 5. Bibliografia

- BOSCHI J.R., Concentração e purificação das proteínas do soro de queijo por ultrafiltração. Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2006.
- BRANS G., Schroen C.G.P.H., van der Sman R.G.M., Boom R.M. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges, *Journal of Membrane Science*, v. 243, p. 263–272, 2004.
- CHEANG B., ZYDNEY A.L., A two-stage ultrafiltration process for fractionation of whey protein isolate, *Journal of Membrane Science*



## VI-OKTOBER FÓRUM – PPGEQ

22, 23 E 24 DE OUTUBRO DE 2007

- v.231, p.159–167, 2004.
- FOX, P.F., Dairy Chemistry and Biochemistry. London: Thomson Science, 1998.
- HUFFMAN, L.M. Processing whey protein for use as a food ingredient. Food Technology, v. 50, n.2, p. 49-52, 1996
- JELLEN, P. Whey cheeses and beverages. Whey and Lactose Processing, Zadow eds., Elsevier Applied Science, 1992.
- LANARA, Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes – II Métodos físicos e químicos, LANARA - Laboratório Nacional de Referência Animal, Ministério da Agricultura – Secretaria de Defesa Agropecuária, Portaria 001/81 de 07/10/81.
- LOWRY O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R.J., J. Biol. Chem., v.193, p.265-275, 1951.
- MANIATIS, T., Fritsch E. F., Sambrook, J. Molecular Cloning – A Laboratory Manual. Second Edition, v. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- MANGINO, M. E. Properties of whey protein concentrates Whey and Lactose Processing, Zadow eds., Elsevier Applied Science, 1992.
- MATHEWS, M.E. Whey protein recovery processes and Products. Journal of Dairy Science, v. 67, p. 2680-2692, 1984.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, v. 31, n. 3, p. 426 - 428, 1959.
- NEVES, B.S. Aproveitamento de subprodutos da indústria de laticínios. In: Embrapa Gado De Leite. Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil: qualidade e segurança alimentar, p.97-108, 2001.
- SGARBIERI, V.C.; PACHECO, M.T.B. Alimentos funcionais fisiológicos. Brazilian Journal of Food Technology, v.2, p.7-19, 1999.
- WIT, J.N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products, Journal of Dairy Science, v.81, p.597-608, 1998.
- ZYDNEY, A. L., Protein separations using membrane filtration: new opportunities for whey fractionation, International Dairy Journal, v.8, p. 243-250, 1998.