

Área: Engenharia de Alimentos

BIORREATOR A MEMBRANA PARA OBTENÇÃO DE UM HIDROLISADO PROTEICO DE SORO DE LEITE

**Kátia Joana Verdi*, Vandrê Barbosa Brião, Cristine Rodegheri, Eduardo L. Senger,
Mariana B. Camera**

*Laboratório de Operações Unitárias, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Alimentos,
Universidade Regional de Alimentos, Passo Fundo, RS*

**E-mail: katia.joanaa@gmail.com*

RESUMO – A hidrólise das proteínas do soro de leite melhora sua absorção e diminui seu poder alergênico. Neste trabalho um biorreator a membranas foi utilizado para promover a hidrólise de um concentrado proteico de soro de leite associada a filtração em membrana com tamanho de corte de 4000 Da para obtenção de peptídeos de menor peso molecular, com alto valor biológico. O processo foi operado de modo contínuo, enquanto o líquido do reator foi recalado até o módulo de filtração a corrente de rejeito reciclada para a alimentação. Foram realizadas determinações de concentração de proteína e caracterização de peso molecular dos peptídeos por eletroforese.

Palavras-chave: soro de leite, hidrólise enzimática, ultrafiltração.

1 INTRODUÇÃO

A produção de alimentos com características funcionais é uma demanda crescente do mercado consumidor, que tem demonstrado especial interesse em fontes proteicas para atletas e para suplementação. O aproveitamento das proteínas do soro de leite para a obtenção de hidrolisados proteicos – os peptídeos bioativos – é uma das alternativas para a produção de alimentos diferenciados e para a transformação do soro de leite em produtos de maior valor agregado.

A produção destes peptídeos é realizada por meio de hidrólise enzimática das proteínas do concentrado proteico de soro de leite, obtendo-se peptídeos de menor peso molecular que são mais facilmente absorvidos pelo organismo. Sabe-se também que o decréscimo no tamanho dos peptídeos tem relação direta com a imunogenicidade e proteínas e peptídeos de elevado peso molecular podem causar alergias. Portanto, a utilização de hidrolisados proteicos vem sendo destinada também a este grupo de indivíduos (AFONSO, 2008). As proteínas do soro contêm várias sequências de aminoácidos com propriedades bioativas e os peptídeos liberados na hidrólise são capazes de modular respostas fisiológicas no organismo animal. Muitos já foram isolados e caracterizados, tendo sido observadas atividades imunomoduladora, antimicrobiana, antiviral, antitumoral,

antiúlcera, anti-hipertensiva, anticoagulante, opióide, ergogênica, antiolesterolêmica e fatores de crescimento celular (BIASUTTI, 2006).

Dadas as comprovações científicas sobre o efeito dos biopeptídeos para a saúde, é necessário desenvolver processos mais eficientes e de menores custos para viabilizar o aproveitamento do soro de leite. Este projeto propõe o uso de biorreator a membrana, no qual a filtração de pequenos peptídeos (e retenção da enzima e de peptídeos de cadeia longa) pela membrana ocorre simultaneamente à hidrólise de proteínas, promovendo vantagens quando comparado à processos em batelada, como o reuso da enzima, a dispensabilidade de inativação da enzima ao fim da hidrólise e a produção de um hidrolisado com peso molecular uniforme devido a escolha do corte da membrana (PEREA, 1996; CHEISON, 2006; CHEISON, 2007b).

É sabido que o comprimento da cadeia peptídica influencia na taxa de absorção de proteínas. Por isso, um dos principais critérios de caracterização de um hidrolisado é sua distribuição quanto ao tamanho dos peptídeos. A massa molecular mínima para que um peptídeo apresente alergenicidade é de 3000 a 5000 Da (AFONSO, 2008; LI-JUN, 2008). Neste trabalho a membrana terá corte de 4000 Da e a caracterização do hidrolisado quanto ao seu peso molecular será feita por eletroforese.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Permeabilidade da membrana

Uma membrana plana de ultrafiltração com peso molecular de corte de 4000 Da, fabricada pela Osmonics G.E, foi utilizada. Após iniciada a filtração, o volume da corrente de rejeito foi simultaneamente reciclado para a corrente de alimentação e a corrente de permeado foi separada e pesada em balança para medição da permeabilidade ou fluxo da membrana de acordo com Brião e Tavares (2012), utilizando pressão 1,5 bar.

2.2 Hidrólise e filtração do hidrolisado

O processo de hidrólise foi realizado utilizando-se CPS reconstituído em água destilada com objetivo de padronização da concentração final de proteína de 8%. A enzima utilizada foi a Alcalase 2.4 L FG do laboratório Novozymes. A solução foi mantida a 50°C e o pH foi mantido entre 8,0 e 8,5 através da adição de hidróxido de potássio (KOH). Após a padronização da solução, adicionou-se enzima (2,2% de enzima em relação a massa seca proteína) e deu-se início a contagem de tempo.

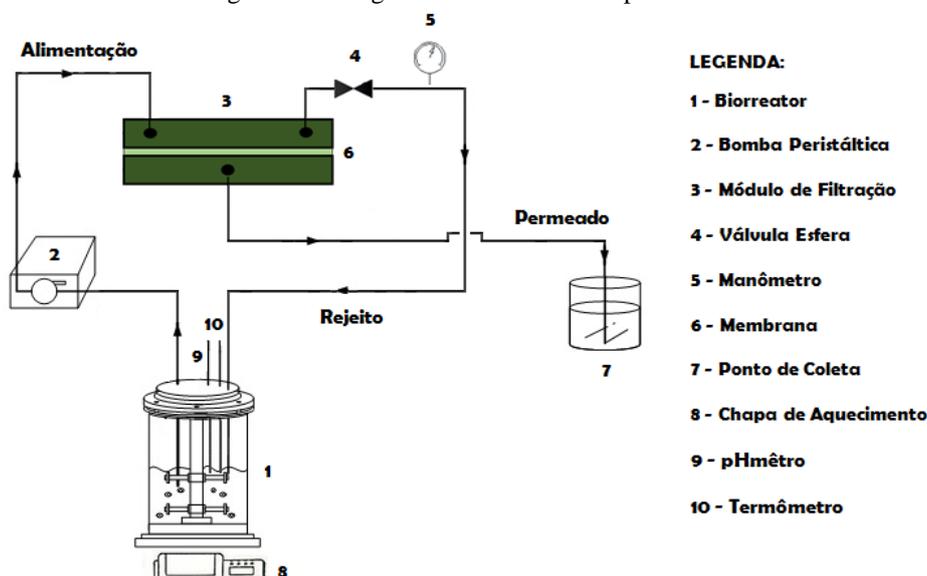
O tanque de alimentação utilizado foi um béquer de vidro com capacidade de 1 L. A corrente de rejeito foi reciclada ao tanque de alimentação para recirculação da batelada. A corrente de permeado foi separada para medição de fluxo e posterior caracterização. Amostras foram coletadas com maior frequência no início do processo e posteriormente a cada 30 minutos, seguiram para inativação em banho à 85°C por 15 minutos e então foram analisadas quanto ao seu conteúdo proteico de acordo com o Método de Lowry. A Figura 1 mostra o fluxograma das correntes de processo.

2.3 Eletroforese

A identificação do peso molecular dos peptídeos foi realizada pelo método de eletroforese. Foi utilizado um gel de poliacrilamida que serviu de suporte para a migração das moléculas em cada faixa de tamanho correspondente. Este gel foi distribuído nas cavidades do equipamento de eletroforese, para depois receber a

amostra a ser analisada. Após esta etapa, o equipamento foi fechado e aplicado campo elétrico de 160 V por 90 minutos. As moléculas foram então distribuídas pela extensão do gel e separadas em função de sua massa. Para facilitar a visualização de separação das proteínas foi utilizado corante coomassie blue.

Figura 1. Fluxograma das correntes de processo.



3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 2 permite comparar a concentração de proteína na corrente de alimentação de CPS hidrolisado e não hidrolisado. Há uma diminuição na concentração de proteínas no experimento hidrolisado ao longo tempo, o que era esperado visto que as cadeias peptídicas hidrolisadas que possuíam tamanho igual ao menor ao tamanho de corte da membrana de ultrafiltração passaram da corrente de alimentação para a corrente de permeado. O aumento observado na concentração proteica no experimento sem hidrólise pode ser explicado pelo fato de que a ultrafiltração, isoladamente, tem o efeito de concentração de proteínas, enviando a água e sais minerais contidos no soro de leite para a corrente de permeado.

A concentração das proteínas na corrente de permeado pode ser vista na Figura 3. Em relação ao experimento não hidrolisado, a concentração de proteína no permeado aumenta inicialmente, pois no primeiro momento a maior parte dos peptídeos presentes na amostra permeia a membrana. Percebe-se concentração maior no início da operação e posterior declínio da mesma, que pode ser explicado pelo aumento da rejeição da membrana. A concentração de proteína no permeado hidrolisado aumentou constantemente ao longo do tempo, devido ao aumento na concentração de peptídeos de menor peso molecular oriundos da hidrólise.

Figura 2. Comparativo das concentrações de proteína na alimentação da filtração com e sem hidrólise.

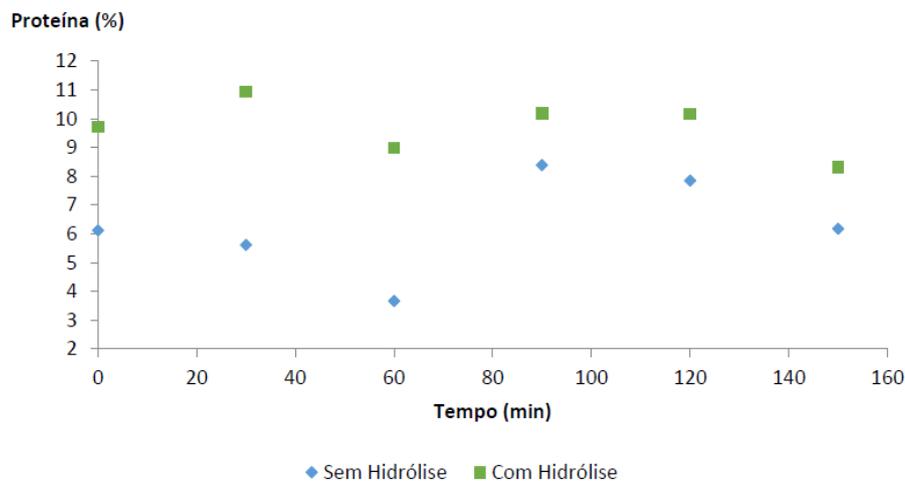
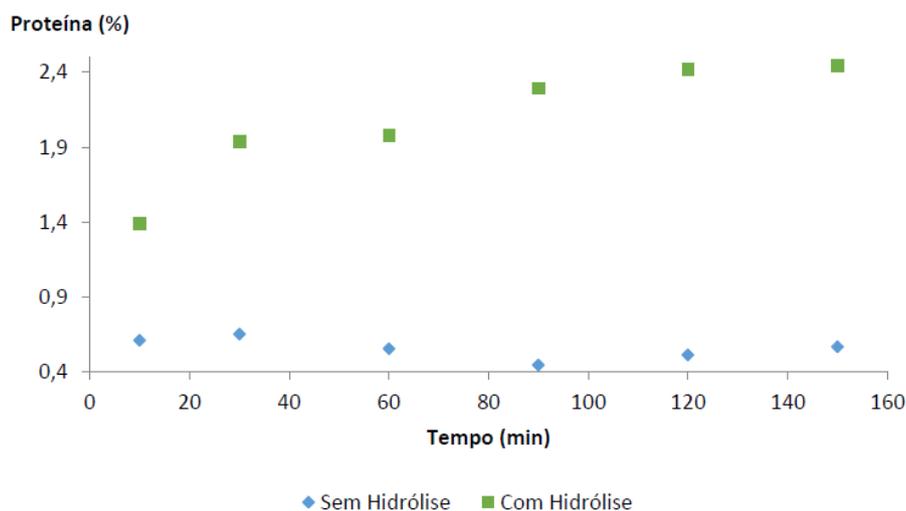


Figura 3. Concentrações de proteína no permeado da filtração com e sem hidrólise.



Através da figura 4, nota-se o fluxo de permeado inicial maior, mas com o passar do tempo a membrana tende à colmatar, reduzindo o fluxo de forma drástica a partir da 3ª hora de filtração. De fato, o principal problema percebido em técnicas de separação por membranas é o efeito da colmatação, devido ao depósito e acumulação de partículas na superfície da membrana e à cristalização e precipitação de pequenas moléculas nos poros da membrana, o qual também reflete em mudanças na seletividade da membrana e diminui a produtividade geral do processo (ARGÜELLO et al., 2002; CHERYAN, 1998). Quando soluções lácteas são filtradas, uma das principais contribuições à colmatação é a adsorção de proteínas na superfície e poros da membrana (Argüello et al., 2002). O entendimento de como este fenômeno ocorre assiste na predição do fluxo de permeado e, consequentemente, auxilia na avaliação econômica do processo.

Na figura 5 pode-se comparar a rejeição da membrana em relação às soluções com hidrólise, que tende à diminuir com o tempo, consequência da atividade enzimática sobre as cadeias; e sem hidrólise, que teve valor médio de 90% com leve aumento a partir do tempo de 90 minutos, atribuído a possível colmatação interna da membrana.

Figura 4. Fluxo do permeado hidrolisado.

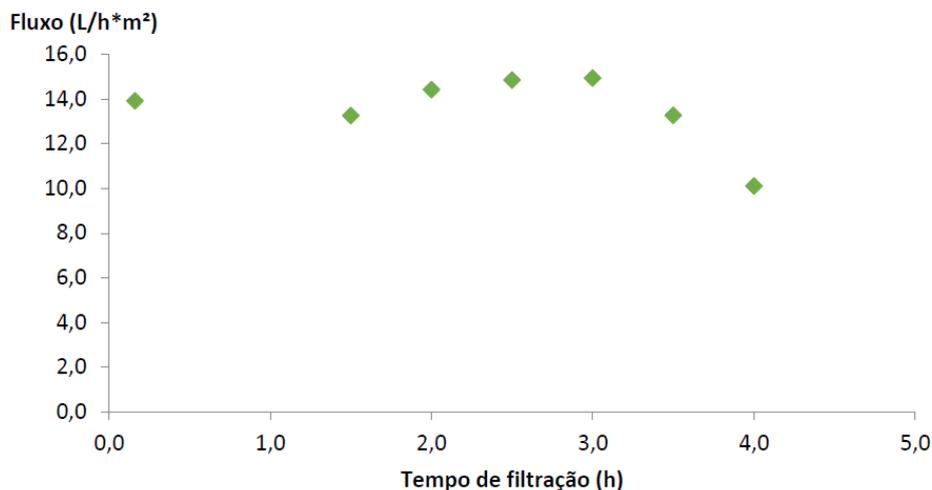
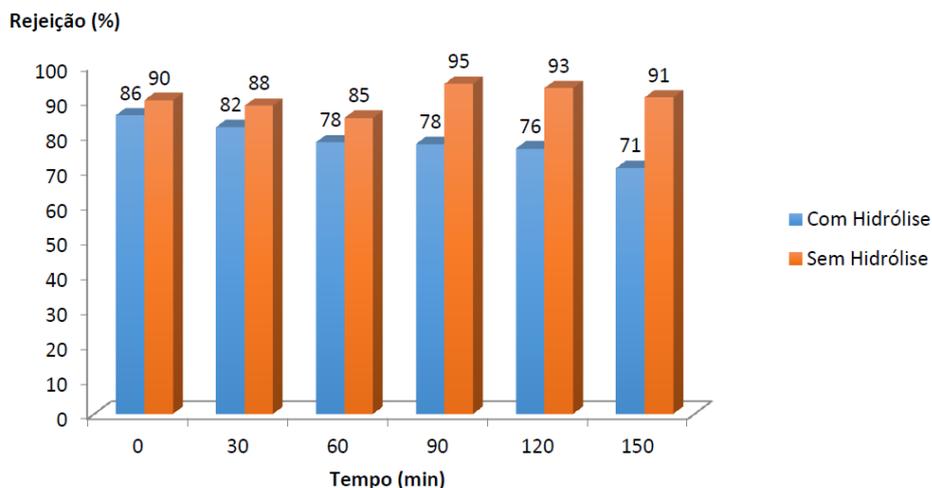
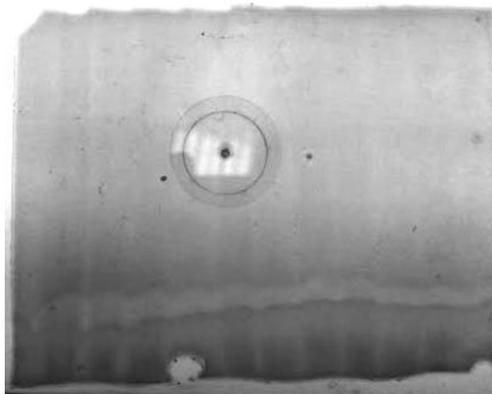


Figura 5. Rejeição da membrana em função do tempo.



A análise de eletroforese não possibilitou a identificação do tamanho de cadeia dos peptídeos formados, no entanto, houve bandas mais escuras no início do gel, mostrando presença de peptídeos menores, conforme apresenta a Figura 6.

Figura 6. Análise de Eletroforese: Bandas formadas em gel.



4 CONCLUSÃO

O processo estudado foi produtivo até atingir 4 horas de filtração, quando houve decréscimo de fluxo e aumento do teor proteico na corrente de permeado – o qual iniciou com 1,38% e finalizou com 2,44%, confirmando a obtenção da hidrólise enzimática de proteínas, reaproveitamento da enzima e passagem de peptídeos hidrolisados pela membrana, consequência da união de dois processos.

Os resultados da análise de eletroforese não permitiram conclusões definitivas, porém a identificação dos produtos hidrolisados permeados são dados necessários para a confirmação da melhoria nas propriedades da amostra.

6 REFERÊNCIAS

- AFONSO, W. O. **Obtenção de hidrolisado enzimático do concentrado proteico do soro de leite com elevado teor de di-tripeptídeos para utilização em nutrição clínica.** Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG, 2008, 88 p.
- ARGGÜELLO, M., ÁLVAREZ, S., RIERA, F., ÁLVAREZ, R. Enzymatic cleaning of inorganic ultrafiltration membranes fouled by whey proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 1951-1958, 2002.
- BIASUTTI, E. A. **Otimização das condições da hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite para obter elevado teor de oligopeptídeos: utilização da subtilisina e da pancreatina.** Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG, 2006, 88p.
- BRIÃO, V. B., TAVARES, C. R. G. - Pore blocking mechanism for the recovery of milk solids from dairy wastewater by ultrafiltration. **Brazilian Journal of Chemical Engineering** Vol. 29, No. 02, pp. 393 - 407, April - June, 2012.
- CHEISON, S. C.; WANG, Z.; XU, Y. Hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane reactor: characterization for the fate of the enzyme by multivariate data analysis. **Journal of Membrane Science**, v. 286, p. 322-332, 2006.
- CHEISON, S. C.; WANG, Z.; XU, S. Preparation of whey protein hydrolysates using a single- and two-stage enzymatic membrane reactor and their immunological and antioxidant properties: characterization by multivariate data analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 3896- 3904, 2007b.
- CHERYAN, M. , LANCASTER, P. **Ultrafiltration and microfiltration handbook.** Technomic Publishing Company, 1998.
- LI-JUN, A.; CHUAN-HE, Z.; ZHENG, Z. Analyzing molecular weight distribution of whey protein hydrolysates. **Food and Bioproducts Processing**, v. 86, p. 1-6, 2008.
- PEREA, A.; UNAI, U. Continuous hydrolysis of whey proteins in a membrane recycle reactor. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 18, p. 29-34, 1996.