

Produção de proteína microparticulada híbrida a base de proteína do soro de leite e proteína de ervilha variando pH e ácido durante a fabricação

Production of hybrid microparticulated protein based on whey protein and pea protein. varying pH and acid during manufacturing

Paola F. Lazzarini¹. Igor L. de Paula¹. Júlia M. P. M. Vitral¹. Alan W. Pombo³. Juliana C. da Costa². Ítalo T. Perrone². Luiz Fernando C. de Oliveira¹ e Rodrigo Stephani¹

¹ Departamento de Química – Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). 36036-330. Juiz de Fora. MG. Brasil. limaygor1996@gmail.com. julia.matos@estudante.ufjf.br. paolalazzarini@ice.ufjf.br. caroline-barroso@hotmail.com. luiz.oliveira@ufjf.br. rodrigostephani@gmail.com

² Departamento de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). 36036-330. Juiz de Fora. MG. Brasil. carolinanevescunha@gmail.com. jufarmaciauufjf@yahoo.com.br. italotulerperrone@gmail.com

³ INOVALEITE. Departamento de Química dos Alimentos – Universidade Federal de Viçosa (UFV). 36570-900. Viçosa. MG. Brasil. awolfschoon@gmail.com

Resumo

O processo de microparticulação de proteínas do soro do leite (WPC) é uma técnica utilizada em indústrias alimentícias com intenção de aumentar o teor de proteína ou reduzir o teor de gordura em alimentos. Essas proteínas sofrem desnaturação e o tamanho de partículas dos agregados formados é controlado a fim de evitar danos sensoriais ou reológicos no produto. Foram desenvolvidas proteínas microparticuladas a base WPC (controle) e de WPC com proteína de ervilha (híbrida) variando o pH (4,0; 5,5 e 6,7) e o ácido (lático e clorídrico) utilizados. O tamanho médio de partículas e a porcentagem de desnaturação proteica foram analisados mostrando que o pH é um fator muito mais crucial para a microparticulação que o ácido utilizado. Ainda, conclui-se que a microparticulação em pH 5,5 implica em uma maior taxa de desnaturação e uma distribuição média de tamanho partículas abaixo de 20 µm, como desejado.

Palavras-chave: WPC; proteína de ervilha; microparticulação.

Introdução

A utilização de proteínas do soro (WPC) na fabricação de alimentos vem ganhando destaque nos últimos anos, seja para aumentar o teor de proteína ou substituir gordura nos alimentos. Com essa adição os produtos podem sofrer modificações sensoriais e reológicas. A retirada da gordura, por exemplo, pode acarretar em problemas de textura, estabilidade, sabor e aparência dos alimentos. Uma forma de utilizar essas proteínas envolve a aplicação do processo de microparticulação, visto que as proteínas microparticuladas estão desnaturadas, evitando que o produto apresente características indesejadas, como separação de fases ou precipitação, e garantindo características próximas as da gordura. O tamanho ideal das partículas seria abaixo de 20 µm já que acima deste valor já é possível sentir uma percepção arenosa no paladar (ÇAKIR-FULLER, 2015; TORRES et al., 2011).

Existe uma grande abordagem em torno das proteínas do soro do leite e elas são comumente utilizadas, no entanto, as proteínas vegetais vem ganhando destaque na indústria, mas são poucos os trabalhos relatando o processo de microparticulação envolvendo proteínas vegetais ou proteínas híbridas, ou seja, com uma mistura de WPC e proteínas vegetais (ÇAKIR-FULLER, 2015; DISSANAYAKE; LIYANAARACHCHI; VASILJEVIC, 2012).

As proteínas microparticuladas são produzidas a partir da desnaturação das proteínas por tratamento térmico com cisalhamento simultâneo e/ou posterior. Vários fatores são essenciais para o processo de microparticulação, sendo eles: pH, tipo de tratamento térmico, concentração proteica e

salina, e controle da taxa de cisalhamento (SAMPSON; COOKE, 1992; TORO-SIERRA; SCHUMANN; KULOZIK, 2013).

O objetivo do trabalho foi desenvolver uma metodologia para produção de proteínas microparticuladas a partir de WPC (controle) e WPC com proteína de ervilha (híbrida) fazendo uso de dois ácidos e três pHs, além de analisar o tamanho das partículas e quantificar as frações proteicas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina por HPLC a fim de identificar quais as melhores condições para produção dos microparticulados.

Material e Métodos

A microparticulação foi realizada utilizando dois tipos de proteína WPC80% e proteína de ervilha, sendo o controle apenas WPC80% e a proteína híbrida uma mistura de WPC80% adicionada de proteína de ervilha (híbrida). Os microparticulados foram produzidos em três diferentes valores de pH (4,0; 5,5 e 6,7). O pH foi ajustado com dois diferentes ácidos (ácido clorídrico e ácido láctico), e quando necessário foi utilizado hidróxido de sódio 50% (m.v⁻¹). Foram produzidos um total de 12 produtos e em triplicata (Figura 1).

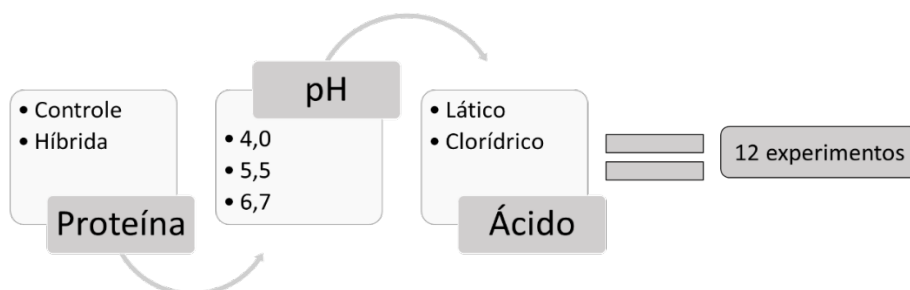
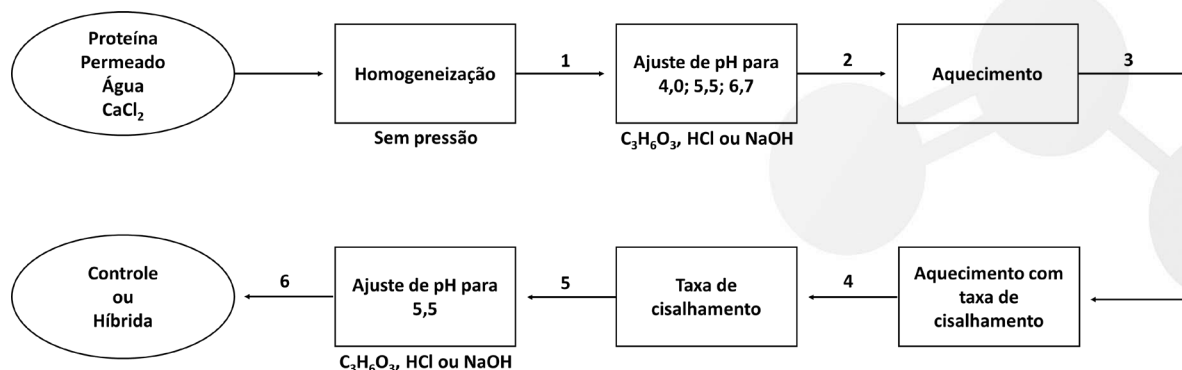


Figura 1: Esquema de produção de proteínas microparticuladas. Fonte: Elaborado por autores (2023).

A mistura de aproximadamente 10% sólidos e 5% proteína contendo WPC80% ou WPC80% com proteína de ervilha, permeado de soro de leite, água deionizada e cloreto de cálcio foi homogeneizada sem pressão para garantir uma melhor reconstituição do pó. Foi feito o ajuste de pH para 4,0; 5,5 ou 6,7 com ácido clorídrico, ácido láctico ou hidróxido de sódio (se necessário). A solução foi aquecida até determinada temperatura, seguido da aplicação de uma taxa de cisalhamento. Cessado o tratamento térmico, aplicou-se um segundo cisalhamento, e ao fim deste, o pH foi ajustado para 5,5.



Fluxograma 1: Processo de fabricação dos microparticulados. Fonte: Elaborado por autores (2023).

A caracterização das amostras foi feita através da determinação do tamanho de partículas (realizada em um analisador de tamanho de partículas por difração a laser LS 13 320 (Beckman Coulter), acoplado ao módulo líquido Aqueous liquid module (Beckman Coulter), e da porcentagem de

desnaturação proteica de α -lactoalbumina (α -lac) e β -lactoglobulina (β -lg) (em um HPLC Waters modelo 1525 com detector UV-Vis (PDA) com bomba binária).

Resultados e Discussão

Para as proteínas microparticuladas controle e híbrida produzidas foram realizadas duas análises, sendo elas tamanho de partícula e quantificação de α -lac e β -lg.

As amostras para análise de tamanho de partícula foram coletadas em cada estágio do processo de microparticulação, numeradas de 1 a 6, como apresentado no fluxograma 1. Essa análise tem como objetivo identificar qual era o tamanho médio da distribuição de partículas e a porcentagem delas que se encontravam abaixo de 20 μ m.

Tamanho de partículas – Controle

Inicialmente, foi comparada a influência da variação do pH na distribuição do tamanho de partículas do produto controle (Figura 2 - Controle), onde foi feita a comparação entre o pH e o Dv_{50} (distribuição média de partículas) em cada etapa da microparticulação e entre o pH e o percentual de partículas com tamanho <20 μ m, afim de entender a interferência pH no tamanho das partículas antes, durante e após o processo de microparticulação.

Observou-se que para ambos os ácidos utilizados, após o tratamento térmico, o tamanho médio das partículas aumentou, porém quanto menor o pH, menor também o tamanho das partículas, indicando que o pH modifica o tamanho dos agregados formados durante o aquecimento, o que pode estar atrelado a porcentagem de desnaturação das proteínas durante essa etapa. Com a aplicação do cisalhamento, o tamanho médio reduziu. Ao fim do processo de microparticulação, os três tratamentos mostraram diferenças estatísticas entre si, e em pH 4,0 foi onde ocorreu menor tamanho médio.

Ao analisar o percentual de partículas com tamanho <20 μ m, ainda na Figura 1, o tratamento térmico garantiu aproximadamente 25% das partículas abaixo do valor limite para todos os tratamentos, o que reforça os dados de tamanho de partículas médio. Ao fim da microparticulação, o produto em pH 4,0 foi o que apresentou a maior porcentagem de partículas abaixo de <20 μ m. Dessa forma, para o controle analisando apenas o efeito do pH no processo de microparticulação é possível afirmar que os produtos em pH 4,0 foram melhores que os produtos em pH 5,5 e 6,7.

Avaliando agora a interferência do tipo de ácido usado na microparticulação, observa-se que a utilização do ácido clorídrico no produto em pH 4,0 resultou em um tamanho de partículas menor que o com ácido láctico. Já em pH 5,5 foi identificado o efeito contrário, e em pH 6,7 os dois tratamentos foram considerados iguais estatisticamente. Ao analisar o percentual das partículas com tamanho <20 μ m em pH 6,7 ambos os tratamentos foram iguais, já nos outros dois valores de pH apresentaram poucas diferenças estatísticas, o que pode indicar que o tipo de ácido não interfere na microparticulação e sim nos agregados.

Tamanho de partículas - Híbrida

Observando a influência do pH na distribuição do tamanho de partículas do produto híbrido (Figura 2 – Híbrida), foi realizada igualmente ao produto controle, uma comparação entre o pH e o Dv_{50} em todas as etapas da microparticulação e entre o pH e o percentual de partículas com tamanho <20 μ m.

Com o ajuste do pH, o produto em pH 6,7 foi diferente estatisticamente dos demais. Com o aquecimento dos produtos ocorreu uma diferença na distribuição, onde o tratamento em pH 5,5 ficou apresentou um maior tamanho, indicando a formação de agregados maiores. Após taxa de cisalhamento e o ajuste de pH para 5,5, o tamanho médio final das partículas eram próximos entre si e abaixo dos 20 μ m, o que resulta em uma microparticulação efetiva para qualquer dos pHs utilizados. A respeito da porcentagem de partículas abaixo de 20 μ m, os maiores valores eram em pH 4,0 e 5,5.

Passando para o produto feito com ácido láctico, é possível observar a mesma correlação nas amostras após o aquecimento, indicando que o pH auxilia na modulação dos agregados formados. Ao fim do processo, os tratamentos nos pH 5,5 e pH 6,7 eram diferentes estatisticamente entre si. Além disso, é notável que os tratamentos com maior porcentagem abaixo de 20 μ m foram em pH 4,0 e 5,5.

Para as proteínas híbridas, analisando apenas o efeito do pH no processo de microparticulação é possível afirmar que os produtos em pH 4,0 e 5,5 foram melhores que o produto em pH 6,7.

Avaliando por fim o efeito do ácido no processo de microparticulação, o percentual de partículas com tamanho menor que 20 μm foi igual no final do processo tanto para ambos os ácidos utilizados.

Para o pH 5,5, ocorreu uma diferença estatística durante o aquecimento e esse efeito foi percebido no final da microparticulação, além de o ácido clorídrico ter gerado partículas menores que o ácido láctico, ele também apresentou um percentual de partícula <20 μm maior.

Por fim, o tratamento em pH 6,7 foi semelhante ao tratamento em pH 5,5, tanto para a distribuição média do tamanho de partículas quanto para o percentual de partículas <20 μm . Embora exista uma diferença estatística pela variação de ácido, ambos os produtos ficaram com tamanho médio abaixo de <20 μm indicando que o ácido não difere no processo de microparticulação.

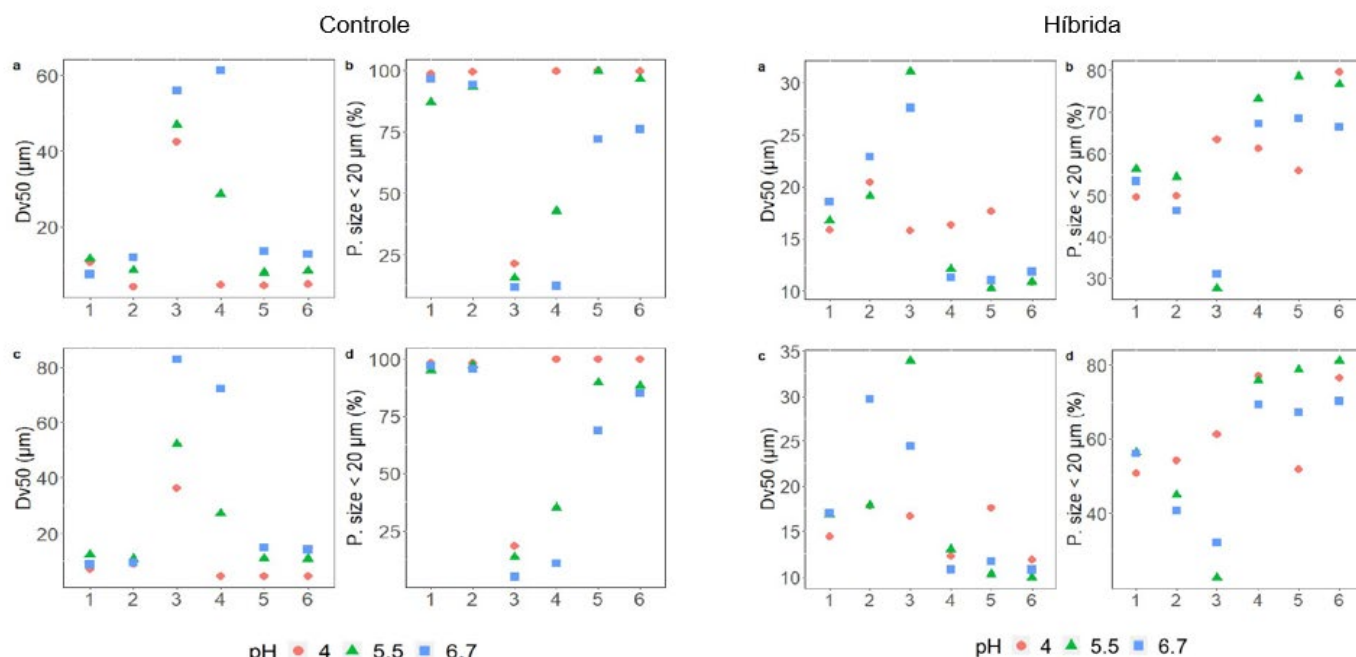


Figura 2: Distribuição de tamanho de partículas para os produtos controle e híbrido em ácido clorídrico (a e b) e em ácido láctico em (c e d).

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Legenda: amostras – 1 = após homogeneização; 2 = ajuste de pH; 3 = aquecimento; 4 = aquecimento com cisalhamento; 5 = cisalhamento; 6 = após ajuste de pH para 5,5.

Quantificação α -lac e β -lg nas amostras microparticuladas produzidas

Para as amostras microparticuladas produzidas foi realizada a quantificação das duas frações das proteínas do soro do leite antes e após o processo de microparticulação. Com essa quantificação foi possível calcular a porcentagem de desnaturação das frações proteicas (Tabela 1) com a finalidade de saber qual combinação de pH e ácido gerou a maior taxa de desnaturação.

Para as amostras controle, o α -lac nos produtos em pH 4,0 apresentaram uma desnaturação de aproximadamente 62% com ácido láctico, aproximadamente 76% com ácido clorídrico, e para os outros quatro tratamentos essa porcentagem foi superior a 99% (considerando o limite de quantificação). O β -lg apresentou uma desnaturação proteica próxima para todos os tratamentos. Assim, entende-se que a escolha do melhor método seria em pHs variando de 5,5 e 6,7, independente do ácido escolhido. Porém, vale ressaltar que para a escolha de qual o melhor método de produção, devem ser levados em conta os tamanhos de partícula obtidos para cada um dos 12 experimentos.

Para o produto híbrido, foram observados os mesmos padrões já relatados para as proteínas comerciais e para o controle produzido, que existe maior concentração de β -lg à α -lac e uma redução destas após a microparticulação. A taxa de desnaturação para o α -lac foi de aproximadamente 76%

para os dois tratamentos em pH 4,0 e para os produtos nos outros pHs foi superior a 99% assim como no produto controle. Para a β -lg, a taxa de desnaturação foi próxima para todos os tratamentos. A escolha do método deve ser feita de forma análoga aos produtos controle, uma vez que os resultados apresentaram o mesmo padrão.

Tabela 1: Porcentagem de desnaturação de α -lac e β -lg das amostras controle (C) e híbrida (H).

Amostras	α -lac - C	β -lg - C	α -lac - H	β -lg - H
pH 4 e ácido láctico	62,33 $\pm$ 2,23	96,42 $\pm$ 0,82	76,73 $\pm$ 7,69	96,63 $\pm$ 0,65
pH 5,5 e ácido láctico	>99	95,46 $\pm$ 1,13	>99	95,92 $\pm$ 1,04
pH 6,7 e ácido láctico	>99	94,05 $\pm$ 2,42	>99	97,00 $\pm$ 0,71
pH 4 e ácido clorídrico	76,73 $\pm$ 7,69	96,72 $\pm$ 0,27	76,55 $\pm$ 7,54	97,40 $\pm$ 0,39
pH 5,5 e ácido clorídrico	>99	95,21 $\pm$ 0,19	>99	95,86 $\pm$ 0,51
pH 6,7 e ácido clorídrico	>99	94,85 $\pm$ 1,55	>99	97,81 $\pm$ 0,05

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Conclusão

Foram produzidas proteínas microparticuladas apenas com WPC (controle) e WPC com ervilha (híbrida). Analisando o tamanho de partículas e a porcentagem de desnaturação de cada um dos tratamentos é possível concluir que as melhores condições para produção dos microparticulados é em pH 5,5 utilizando qualquer um dos dois ácidos, uma vez que a desnaturação proteica é maior que 99% para as duas frações e o tamanho médio de partículas é menor que 20 μ m.

Referências Bibliográficas

- ÇAKIR-FULLER, Esra. Enhanced heat stability of high protein emulsion systems provided by microparticulated whey proteins. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 47, p. 41–50, 2015. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.01.003.
- DISSANAYAKE, Muditha; LIYANAARACHCHI, S.; VASILJEVIC, Todor. Functional properties of whey proteins microparticulated at low pH. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 4, p. 1667-1679, 2012.
- SAMPSON, H. A.; COOKE, S. The antigenicity and allergenicity of microparticulated proteins: Simplex®. **Clinical and Experimental Allergy**, [S. l.], v. 22, n. 10, p. 963–969, 1992.
- TORRES, Isabel Celigueta; JANHØJ, Thomas; MIKKELSEN, Bente Østergaard; IPSEN, Richard. Effect of microparticulated whey protein with varying content of denatured protein on the rheological and sensory characteristics of low-fat yoghurt. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 21, n. 9, p. 645–655, 2011.
- TORO-SIERRA, José; SCHUMANN, Jens; KULOZIK, Ulrich. Impact of spray-drying conditions on the particle size of microparticulated whey protein fractions. **Dairy Science and Technology**, [S. l.], v. 93, n. 4–5, p. 487–503, 2013.

Autor (a) a ser contatado: Paola Fazollo Lazzarini, Departamento de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Rua José Lourenço Kelmer, s/n - São Pedro, Juiz de Fora - MG, 36036-900, paolalazzarini@ice.ufjf.br