República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112013022251-4 B1

(22) Data do Depósito: 05/03/2012

(45) Data de Concessão: 31/03/2020

(54) Título: MÉTODO PARA ISOLAR OSTEOPONTINA UTILIZANDO ALIMENTOS CONTENDO CMP OU ESPÉCIES DE CASEÍNA

(51) Int.Cl.: C07K 1/18; C07K 14/47; C07K 14/52.

(30) Prioridade Unionista: 03/03/2011 EP 11156826.7; 03/03/2011 US 61/448,775.

(73) Titular(es): ARLA FOODS AMBA.

(72) Inventor(es): HANS BERTELSEN; PETER LANGBORG WEJSE; TRINE TRÚGVASON.

(86) Pedido PCT: PCT EP2012053748 de 05/03/2012

(87) Publicação PCT: WO 2012/117119 de 07/09/2012

(85) Data do Início da Fase Nacional: 30/08/2013

(57) Resumo: MÉTODO PARA ISOLAR OSTEOPONTINA DE UM ALIMENTO DERIVADO DO LEITE A presente invenção se refere a um método para isolar osteopontina de um alimento derivado 5 do leite contendo caseíno-macropeptídeo e/ou beta-caseína livre, como, por exemplo, um alimento a base de soro do leite ou soro doce. Particularmente, o presente método envolve o uso de uma janela estreita de pH e condutância específica do alimento derivado do leite, o que provou, de maneira surpreendente, prover um isolamento bastante eficiente da osteopontina de alimentos quimicamente complexos.

MÉTODO PARA ISOLAR OSTEOPONTINA DE UM ALIMENTO DERIVADO DO LEITE

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere a um método para isolar osteopontina de um alimento derivado do leite, por exemplo, um alimento a base de soro do leite ou soro doce. Particularmente, o presente método envolve o uso de uma janela estreita de pH e condutância específica do alimento derivado do leite, o que provou, de maneira surpreendente, prover um isolamento bastante eficiente da osteopontina de alimentos quimicamente complexos.

HISTÓRICO

A osteopontina é uma proteína de ligação de cálcio, rica em ácido siálico, altamente fosforilada, ácida. Osteopontina contém aprox. 28 mols de fosfatos ligados por mol de osteopontina e liga aprox. 50 mols de Ca por mol de osteopontina.

A Osteopontina (OPN) é uma proteína bioativa, multifuncional que é implicada em numerosos processos biológicos, como remodelamento ósseo, inibição de calcificação ectópica e adesão e migração celulares, assim como diversas funções imunes. A osteopontina tem propriedades semelhantes à citocina e é um fator importante na iniciação de respostas imunes de T auxiliar 1. A osteopontina está presente na maioria dos tecidos e fluidos corporais, com as mais altas concentrações sendo encontradas no leite. Suportando uma função inibitória da OPN na calcificação ectópica, um modelo *in vivo* utilizando camundongos com deficiência de OPN apresentou calcificação diminuída mediante a adição exógena da proteína. Além disso, a OPN é envolvida na defesa do trato urinário contra a formação de cálculos renais, pois a OPN pode inibir o crescimento e a agregação de cristais de oxalato de cálcio monoidratados.

A função biológica da OPN no leite não é clara; entretanto, pode-se fazer hipótese de diversas funções. Relatou-se que a osteopontina é envolvida no desenvolvimento e diferenciação da glândula mamária, e altos níveis da expressão da OPN são observados na glândula mamária no início da lactação. Além disso, a natureza altamente aniônica da proteína pode permitir que a OPN forme complexos solúveis com íons de cálcio e, com isso, iniba a cristalização de cálcio não intencional e precipitação no leite.

Na literatura científica, a osteopontina é tipicamente purificada do osso ou leite e está tipicamente presente no leite bovino em uma concentração de 20 mg/L. No leite, a osteopontina é uma proteína do soro, mas também pode, em alguma medida, associar-se a micelas de caseína, dependendo do nível de Ca^{2+}. O soro ácido é a matéria-prima preferida para a produção industrial de osteopontina. Quando o soro ácido é formado, acredita-se que a osteopontina deixe as micelas de caseína, conforme Ca^{2+} vaza na fase de soro. Esse aspecto torna o soro ácido uma fonte direta de osteopontina. Pelo mesmo motivo, o soro doce tem um conteúdo de osteopontina levemente menor. Além disso, o soro doce contém caseíno-macropeptídeo (CMP) da clivagem enzimática da kappa-caseína. CMP tem muitas semelhanças bioquímicas com a osteopontina - ambas são glicoproteínas pequenas, flexíveis, ácidas, fosforiladas. Por esse motivo, acredita-se que CMP e osteopontina sejam bastante semelhantes em suas ligações a resinas de troca de íon, o que impõe um problema em purificar a osteopontina de uma matéria-prima contendo CMP. Outro aspecto é a degradação provável da osteopontina pelas enzimas proteolíticas utilizadas para fazer queijo. Esses três aspectos podem ter resultado em essa matéria prima evitar a purificação de osteopontina, tanto para produção industrial como para a pesquisa científica.

TÉCNICA ANTERIOR

O documento WO 02/28413 A1 descreve um método de produção de uma composição contendo osteopontina de matérias-primas, como leite e soro ácido, por meio de troca de ânion de pH baixo. No documento WO 02/28413 A1, enfatiza-se que nem a matéria-prima do processo nem o produto resultante podem conter cGMP, que é um tipo de CMP que é conhecido por se ligar a trocadores de ânion e que poderia inibir a ligação de osteopontina.

O documento WO 01/149741 A2 descreve um processo em que a osteopontina é purificada de um material de leite ao misturar o material de leite com cálcio solúvel e ajustar o pH da mistura para precipitar seletivamente os outros componentes de proteína do soro, enquanto mantém a osteopontina na solução.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Os presentes inventores descobriram que, de maneira surpreendente e contrária aos prejuízos encontrados na técnica anterior, a osteopontina pode ser isolada por troca de ânion em alta produção e alta pureza de alimentos derivados do leite complexos, apesar da presença de proteínas competidoras do alimento. Os presentes inventores descobriram que a condutância específica do alimento é particularmente importante para a produção e pureza da osteopontina e identificaram uma janela ideal da condutância específica para o isolamento da osteopontina dos alimentos derivados do leite.

Assim, um aspecto da invenção refere-se a um método para isolar osteopontina de um alimento derivado do leite, o método compreendendo as etapas de:

a) provisão de um alimento derivado do leite compreendendo osteopontina, o dito alimento derivado do leite tendo um pH na variação de pH 3,6-6,5 em 25 graus C e uma

condutância específica na variação de 4-10 mS/cm em 25 graus C,

b) sujeição do dito alimento derivado do leite à cromatografia de troca de ânion, que inclui o contato do alimento derivado do leite com um meio de troca de ânion,

c) opcionalmente, lavagem do meio de troca de ânion, e

d) recuperação da proteína ligada ao meio de troca de ânion, obtendo, com isso, uma composição compreendendo osteopontina isolada.

A presente invenção pode, por exemplo, se referir a um método para isolar osteopontina de um alimento derivado do leite, o método compreendendo as etapas de:

a) provisão de um alimento derivado do leite compreendendo osteopontina, o dito alimento derivado do leite tendo um pH na variação de pH 3,6-6,5 em 25 graus C e uma condutância específica na variação de 4-10 mS/cm em 25 graus C,

e em que o dito alimento derivado do leite, além disso, compreende

- caseíno-macropeptídeo em uma quantidade de pelo menos 1% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite, ou

- alfa-caseína livre e beta-caseína livre,

b) sujeição do dito alimento derivado do leite à cromatografia de troca de ânion, que inclui o contato do alimento derivado do leite com um meio de troca de ânion,

c) opcionalmente, lavagem do meio de troca de ânion, e

d) recuperação da proteína ligada ao meio de troca de ânion, obtendo, com isso, uma composição compreendendo osteopontina isolada.

Assim, em algumas realizações preferidas da

invenção, o método para isolar osteopontina de um alimento derivado do leite compreende as etapas de:

a) provisão de um alimento derivado do leite compreendendo osteopontina, o dito alimento derivado do leite tendo um pH na variação de pH 3,6-6,5 em 25 graus C e uma condutância específica na variação de 4-10 mS/cm em 25 graus C,

e em que o dito alimento derivado do leite , além disso, compreende caseíno-macropeptídeo em uma quantidade de pelo menos 1% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite,

b) sujeição do dito alimento derivado do leite à cromatografia de troca de ânion, que inclui o contato do alimento derivado do leite com um meio de troca de ânion,

c) opcionalmente, lavagem do meio de troca de ânion, e

d) recuperação da proteína ligada ao meio de troca de ânion, obtendo, com isso, uma composição compreendendo osteopontina isolada.

Em outras realizações preferidas da invenção, o método para isolar osteopontina de um alimento derivado do leite compreende as etapas de:

a) provisão de um alimento derivado do leite compreendendo osteopontina, o dito alimento derivado do leite tendo um pH na variação de pH 3,6-6,5 em 25 graus C e uma condutância específica na variação de 4-10 mS/cm em 25 graus C, e em que o dito alimento derivado do leite,além disso, compreende alfa-caseína livre e beta-caseína livre,

b) sujeição do dito alimento derivado do leite à cromatografia de troca de ânion, que inclui o contato do alimento derivado do leite com um meio de troca de ânion,

c) opcionalmente, lavagem do meio de troca de ânion, e

d) recuperação da proteína ligada ao meio de troca de ânion, obtendo, com isso, uma composição compreendendo osteopontina isolada.

Nas realizações preferidas adicionais da invenção, o método para isolar osteopontina de um alimento derivado do leite compreende as etapas de:

a) provisão de um alimento derivado do leite compreendendo osteopontina, o dito alimento derivado do leite tendo um pH na variação de pH 3,6-6,5 em 25 graus C e uma condutância específica na variação de 4-10 mS/cm em 25 graus C,

e em que o dito alimento derivado do leite, além disso, compreende

- caseíno-macropeptídeo em uma quantidade de pelo menos 1% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite, e

- alfa-caseína livre e beta-caseína livre,

b) sujeição do dito alimento derivado do leite à cromatografia de troca de ânion, que inclui o contato do alimento derivado do leite com um meio de troca de ânion,

c) opcionalmente, lavagem do meio de troca de ânion, e

d) recuperação da proteína ligada ao meio de troca de ânion, obtendo, com isso, uma composição compreendendo osteopontina isolada.

Além das vantagens mencionadas acima, o presente método permite um uso mais eficiente em termos de custo do meio de troca de ânion e uma produção maior de osteopontina por kg do meio de troca de ânion.

Outra vantagem do presente método é uma produção aprimorada de osteopontina por ciclo de troca de ânion, conforme demonstrado no Exemplo 5.

A "condutância específica" (algumas vezes,

mencionada como "condutividade específica") de uma solução aquosa é uma medida da capacidade de a solução conduzir eletricidade. A condutância específica pode ser, por exemplo, determinada ao medir a resistência AC da solução entre dois eletrodos e o resultado é tipicamente dado na unidade miliSiemens por cm (mS/cm). A medição da condutância específica pode ser, por exemplo, medida de acordo com o Método Nº 120.1 da EPA (Agência de Proteção Ambiental dos EUA).

Ainda, um aspecto da invenção refere-se à composição contendo osteopontina obtida pelo presente método.

Um aspecto adicional da invenção refere-se a uma composição contendo osteopontina como tal.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1. O efeito do pH do alimento derivado do soro doce na pureza e produção de osteopontina em uma condutância específica de 5,5 mS/cm,

Figura 2. O efeito da condutância específica do alimento derivado do soro doce na pureza e produção de osteopontina em pH 4,3, e

Figura 3. A influência da condutância específica do alimento derivado do soro ácido na pureza e produção da OPN em pH 4,3.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Conforme mencionado, um aspecto da invenção refere-se a um método para isolar a osteopontina de um alimento derivado do leite, o método compreendendo as etapas de:

a) provisão de um alimento derivado do leite compreendendo osteopontina, o dito alimento derivado do leite tendo um pH na variação de pH 3,6-6,5 em 25 graus C e uma condutância específica na variação de 4-10 mS/cm em 25 graus C, e

em que o dito alimento derivado do leite, além

disso, compreende

- caseíno-macropeptídeo em uma quantidade de pelo menos 1% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite, ou

- alfa-caseína livre e beta-caseína livre,

b) sujeição do dito alimento derivado do leite à cromatografia de troca de ânion, que inclui o contato do alimento derivado do leite com um meio de troca de ânion,

c) opcionalmente, lavagem do meio de troca de ânion, e

d) recuperação da proteína ligada ao meio de troca de ânion, obtendo, com isso, uma composição compreendendo osteopontina isolada.

As etapas do método são tipicamente realizadas em sequência, por exemplo, etapas a), b), c) e d). Entretanto, em algumas realizações da invenção, a etapa c) do método é omitida e, nesse caso, o método compreende as etapas a), b), e d).

No contexto da presente invenção, o termo "isolar osteopontina" refere-se a enriquecer a osteopontina a uma porcentagem de peso de pelo menos 70% (p/p), preferencialmente, pelo menos 80% (p/p) e, ainda mais preferencialmente, pelo menos 90% (p/p) em relação ao peso total da proteína recuperada do meio de troca de ânion durante etapa d). O isolamento da osteopontina pode, por exemplo, envolver o enriquecimento da osteopontina para uma porcentagem de peso de pelo menos 95% (p/p), como pelo menos 97% (p/p) em relação ao peso total da proteína recuperada do meio de troca de ânion durante a etapa d).

O método é particularmente útil para aprimorar o enriquecimento seletivo da osteopontina de um alimento derivado do leite compreendendo proteína adicional tendo um ponto isoelétrico (pI) < 5,0, por exemplo, alimentos

derivados do leite que contêm CMP. O termo "enriquecimento seletivo" deve ser entendido como o crescimento da proporção molar entre a osteopontina e a quantidade total de outras proteínas do alimento derivado do leite.

O ponto isoelétrico de uma proteína é preferencialmente determinado pela focalização isoelétrica em 25 graus C.

No contexto da presente invenção, o termo "alimento derivado do leite" refere-se ao alimento líquido que entra em contado com o meio de troca de ânion.

O alimento derivado do leite é derivado do leite de uma ou mais fontes de mamífero, por exemplo, leite de humano, vaca, ovelha, cabra, búfala, camelo, lhama, cavalo e/ou veado. Em algumas realizações preferidas da invenção, o alimento derivado do leite é derivado do leite bovino.

No contexto da presente invenção, os termos "alimento derivado do leite", "alimento derivado do soro doce", "alimento derivado do soro ácido" e "alimento derivado do soro do leite" referem-se a alimentos em que pelo menos 50% (p/p) da proteína total origina do leite, soro doce, soro ácido ou soro do leite, respectivamente. Em algumas realizações preferidas da invenção, pelo menos 90% (p/p) e preferencialmente, tudo de maneira substancial, da proteína total do alimento derivado do leite origina de um leite, soro doce, soro ácido ou soro do leite.

No contexto da presente invenção, o termo "leite" refere-se ao líquido obtido das glândulas mamárias dos mamíferos, durante a lactação. O termo "leite" deve ser interpretado amplamente e abrange tanto o leite natural, ou seja, o líquido obtido diretamente das glândulas mamárias, e produtos de leite padronizados, como, por exemplo, leite desnatado ou leite integral, no qual a concentração da gordura do leite foi reduzida em relação ao leite natural,

original.

Soro é um termo coletivo que se refere ao subproduto aquoso que é produzido durante a fabricação de queijo ou caseína do leite.

No contexto da presente invenção, o termo "soro doce" se refere ao soro que é obtido durante a coagulação do leite com base em coalho, o que acontece, por exemplo, durante a produção do queijo prato.

No contexto da presente invenção, o termo "soro ácido" se refere ao soro que é obtido durante a acidificação química ou biológica do leite, o que ocorre, por exemplo, durante a produção de queijo fresco ou coalhada ou na produção de caseína/caseinatos.

No contexto da presente invenção, o termo "soro do leite", que também é conhecido como "soro", "soro natural" ou "lactoserum", se refere a leite do qual a gordura do leite e micelas de caseína foram removidas. Entretanto, o soro do leite contém tipicamente algumas espécies de caseína livre, que foram dissociadas das micelas de caseína naturais antes de as micelas serem removidas. O soro do leite pode ser, por exemplo, produzido por microfiltração de um leite desnatado, através de um filtro ou membrana tendo um tamanho de poro de aprox. 0,1 micrômetro e coleta do permeado resultante como o soro do leite. O soro do leite pode ser produzido de acordo com Evans *et al*.

Conforme será entendido, o leite, soro doce, soro ácido ou soro do leite podem ser sujeitos a diversas etapas de processo para preparar o alimento derivado do leite.

O processamento do leite ou de produtos relacionados ao leite envolve tipicamente um ou mais processos de tratamento de calor, como uma pasteurização (por exemplo, 72 graus C por 15 seg.) ou uma alta pasteurização (por exemplo, 85 graus C por 20 seg.).

De maneira alternativa ou adicional, o processamento pode envolver uma ou mais etapas de filtração. A microfiltração pode ser utilizada para remover microorganismos ou, alternativamente, para concentrar caseína. A ultrafiltração ou nanofiltração podem, por exemplo, ser utilizadas para concentrar a proteína do soro ou a proteína do soro do leite.

De maneira alternativa ou adicional, o processamento pode envolver uma ou mais etapas de centrifugação, por exemplo, para separar gordura do leite desnatado e/ou separar microorganismos do leite.

De maneira alternativa ou adicional, o processamento pode envolver uma ou mais etapas de evaporação para remover a água e, assim, concentrar a matéria seca, como proteínas e/ou minerais.

O processamento também pode compreender um ou mais ajustes do pH. A acidificação pode ser, por exemplo, utilizada para coagular a caseína e o ajuste do pH pode ser, além disso, importante quando o processamento envolver cromatografia de troca de íon.

Em algumas realizações da invenção, o alimento derivado do leite compreende um ou mais fluxos de processo da produção de outras frações da proteína do leite, como soja filtrada, tratada por calor ou soja pobre em alfa-lactalbumina e/ou beta-lactoglobulina.

Em algumas realizações preferidas da invenção, o alimento derivado do leite compreende ou até consiste essencialmente em um alimento derivado do soro do leite. O alimento derivado do leite pode ser, por exemplo, um soro do leite e, preferencialmente, um concentrado de proteína do soro do leite, por exemplo, na forma do retentado obtido pela ultrafiltração do soro do leite.

O conteúdo de osteopontina no alimento derivado do

leite depende do tipo de alimento específico. Em algumas realizações da invenção, o alimento derivado do leite compreende osteopontina em uma quantidade na variação de 0,01-20% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite. Por exemplo, o alimento derivado do leite pode compreender osteopontina em uma quantidade na variação de 0,05-5% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite. O alimento derivado do leite pode, por exemplo, compreender osteopontina em uma quantidade na variação de 0,1-2% (p/p).

Alternativamente, o alimento derivado do leite pode compreender osteopontina em uma quantidade na variação de 0,1-1% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite.

No contexto da presente invenção, um produto, componente, método ou etapa do método que é declarado por "consistir essencialmente em" um ou mais subcomponentes ou uma ou mais atividades consiste no um ou mais subcomponentes mencionados especificamente ou a uma ou mais atividades mencionadas especificamente, mas também pode incluir um ou mais subcomponentes ou atividades não especificados, adicionais que não afetam de maneira material na(s) característica(s) básica(s) e inovadora(s) da presente invenção.

Conforme mencionado acima, o presente método é particularmente efetivo para isolar a osteopontina de alimentos complexos, ou seja, alimentos que contêm entidades moleculares que interferem no isolamento da osteopontina, como proteínas tendo um pI menor que 5,0. Descobriu-se que essas proteínas competem com a osteopontina para os grupos funcionais do meio de troca de ânion.

Exemplos de proteínas tendo um pI < 5,0 são alfa-lactalbumina, peptona proteose-3, peptona proteose-5, e

peptona proteose-8, e peptídeos derivados da caseína, como caseíno-macropeptídeo e/ou caseíno-fosfopeptídeos. Assim, a proteína adicional pode compreender uma ou mais proteínas do grupo que consiste em alfa-lactalbumina, peptona proteose-3, peptona proteose-5 e peptona proteose-8, peptídeo derivado da caseína, caseíno-macropeptídeo, caseíno-fosfopeptídeo, e combinação destes. Alfa-caseína livre e beta-caseína livre são outros exemplos de proteínas tendo um valor de pI < 5,0.

Em algumas realizações da invenção, o alimento derivado do leite compreende uma quantidade de proteína adicional tendo um pI < 5,0, de pelo menos 0,1% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite. Por exemplo, o alimento derivado do leite pode compreender uma quantidade de proteína adicional tendo um pI < 5,0, de pelo menos 0,5% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite.

Alternativamente, o alimento derivado do leite pode compreender uma quantidade de proteína adicional tendo um pI < 5,0 de pelo menos 2% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite. Conforme será entendido, a proteína adicional tendo um pI < 5,0 não inclui osteopontina, mas inclui tipicamente um ou mais outras proteínas tendo um pI na variação especificada.

Em outras realizações da invenção, o alimento derivado do leite compreende uma quantidade de proteína adicional tendo um pI < 5,0, na variação de 0,1-50% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite. Por exemplo, o alimento derivado do leite pode compreender uma quantidade de proteína adicional tendo um pI < 5,0, na variação de 0,5-40% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite. Alternativamente, o alimento derivado do leite pode compreender uma quantidade de proteína adicional tendo um pI

< 5,0, na variação de 2-25% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite.

O alimento derivado do leite pode, por exemplo, compreender uma quantidade de proteína adicional tendo um pI < 5,0, na variação de 0,1-20% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite. Por exemplo, o alimento derivado do leite pode compreender uma quantidade de proteína adicional tendo um pI < 5,0, na variação de 0,3-15% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite. Alternativamente, o alimento derivado do leite pode compreender uma quantidade de proteína adicional tendo um pI < 5,0, na variação de 0,5-10% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite.

Nas realizações adicionais da invenção, o alimento derivado do leite compreende uma quantidade de proteína adicional tendo um pI < 5,0, na variação de 1-50% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite. Por exemplo, o alimento derivado do leite pode compreender uma quantidade de proteína adicional tendo um pI < 5,0, na variação de 10-45% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite. Alternativamente, o alimento derivado do leite pode compreender uma quantidade de proteína adicional tendo um pI < 5,0, na variação de 15-40% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite.

Em algumas realizações preferidas da invenção, a proteína adicional tendo um pI < 5,0, tem um pI < 4,5, e preferencialmente, um pI < 4.0.

No contexto da presente invenção, o termo "proteína" engloba tanto grandes de polipeptídeos, cadeias de polipeptídeo único e peptídeos, como di ou tripeptídeos. Quimicamente, as proteínas são polímeros compreendendo

aminoácidos diferentes e/ou idênticos, ligados pelas denominadas ligações de peptídeo.

Em algumas realizações preferidas da invenção, o alimento derivado do leite, além disso, compreende caseíno-macropeptídeo (CMP).

No contexto da presente invenção, o termo "CMP" ou "caseíno-macropeptídeo" se refere a uma proteína pequena, que é liberada de kappa-caseína, mediante a exposição a enzimas de coalho. CMP engloba tanto variantes glicosiladas como uma variante não glicosilada da proteína. As variantes glicosiladas da proteína são, algumas vezes, mencionadas como caseíno-glicomacropeptídeo (cGMP).

Em outras realizações preferidas da invenção, o alimento derivado do leite compreende ou até consiste essencialmente em alimento derivado do soro doce. O alimento derivado do leite pode ser, por exemplo, soro doce, e preferencialmente, concentrado de proteína do soro doce, por exemplo, na forma do retentado obtido pela ultrafiltração do soro doce.

Em algumas realizações da invenção, o alimento derivado do leite pode compreender ou até consiste essencialmente em um alimento derivado do soro ácido. O alimento derivado do leite pode ser, por exemplo, um soro ácido e, preferencialmente, um concentrado de proteína do soro ácido, por exemplo, na forma do retentado obtido pela ultrafiltração do soro ácido.

No contexto da presente invenção, os termos "concentrado de proteína do soro do leite", "concentrado de proteína do soro doce", ou "concentrado de proteína do soro ácido" se referem a uma composição aquosa que contém pelo menos 80% (p/p) da proteína total que estava presente no soro do leite, soro doce ou soro ácido originais, respectivamente, e que tem um conteúdo de proteína total de pelo menos 25%

(p/p) em relação ao peso seco da composição aquosa.

Entretanto, em outras realizações da invenção, o alimento derivado do leite não é um alimento derivado do soro ácido.

Nas realizações preferidas da invenção, o alimento derivado do leite, por exemplo, um alimento derivado do soro doce, compreende CMP em uma quantidade de pelo menos 1% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite. Por exemplo, o alimento derivado do leite, por exemplo, um alimento derivado do soro doce, pode compreender CMP em uma quantidade de pelo menos 5% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite, preferencialmente, pelo menos 10% (p/p) e, ainda mais preferencialmente, pelo menos 15% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite.

Em algumas realizações da invenção, o alimento derivado do leite, por exemplo, um alimento derivado do soro doce, compreende CMP em uma quantidade na variação de 1-40% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite. Por exemplo, o alimento derivado do leite, por exemplo, um alimento derivado do soro doce, pode compreender CMP em uma quantidade na variação de 5-35% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite, preferencialmente, na variação de 10-30% (p/p) e, ainda mais preferencialmente, na variação de 15-25% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite.

Os presentes inventores observaram que, de maneira surpreendente, um precipitado é formado durante o presente processo, quando o alimento tem base em soro do leite ou um concentrado deste. O precipitado causa problemas durante o processo de troca de ânion e reduz sua robustez.

Os inventores investigaram o precipitado e

encontram indicações de que ele contém espécies de caseína precipitadas, que estavam presentes na forma dissolvida, como beta-caseína livre ou alfa-caseína livre.

No contexto da presente invenção, os termos "beta-caseína livre" ou "alfa-caseína livre" se refere a moléculas de beta-caseína ou moléculas de alfa-caseína que não são ligadas a micelas de caseína nativas dos produtos de leite. Essa beta-caseína livre ou alfa-caseína livre inclui moléculas isoladas, dissolvidas de beta-caseína ou alfa-caseína ou pequenos agregados de alfa-caseína e/ou beta-caseína. Moléculas isoladas de beta-caseína são, por exemplo, conhecidas por formar pequenas micelas de beta-caseína, o que também é um exemplo de beta-caseína livre.

Assim, em algumas realizações preferidas da invenção, o alimento derivado do leite, além disso, compreende alfa-caseína livre e beta-caseína livre. Alfa-caseína livre e beta-caseína livre estão tipicamente presentes no alimento derivado do soro do leite.

Os inventores descobriram que esse problema de precipitação pode ser solucionado ao remover o precipitado dos alimentos derivados do leite antes da troca de ânion. Assim, em algumas realizações preferidas da invenção, a etapa a) do método envolve a remoção do precipitado do líquido acidificado que deve formar o alimento derivado do leite. Essa remoção pode envolver, por exemplo, centrifugação ou filtração do líquido acidificado.

Outra solução ao problema do precipitado é utilizar um pH do alimento no qual a precipitação é limitada ou, mesmo, ausente, por exemplo, na variação de pH 5,0-6,5.

O alimento derivado do leite pode ter, portanto, um pH na variação de 5,0-6,5 e, preferencialmente, na variação de pH 5,0-6,0.

Ao realizar a troca de ânion nessa variação de pH,

além disso, é sugerido utilizar uma temperatura de alimento/processo acima de 15 graus C, como 20-40 graus C. Nessa variação de temperatura, a beta-caseína dissolvida forma pequenas micelas de beta-caseína, para não ser confundida com micelas de caseína nativas do leite, e essas micelas de beta-caseína parecem interferir menos no processo de troca de ânion do que moléculas de beta-caseína isoladas.

A temperatura do alimento derivado do leite e o material de troca de ânion durante a etapa b) pode, portanto, ser na variação de 15-40 graus C e, preferencialmente, na variação de 20-38 graus C.

O alimento derivado do leite pode, por exemplo, compreender uma quantidade total de alfa-caseína livre e beta-caseína livre de pelo menos 0,5% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite. Por exemplo, o alimento derivado do leite pode compreender uma quantidade total de alfa-caseína livre e beta-caseína livre de pelo menos 2% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite. O alimento derivado do leite pode, por exemplo, compreender uma quantidade total de alfa-caseína livre e beta-caseína livre de pelo menos 10% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite.

Em algumas realizações da invenção, o alimento derivado do leite compreende uma quantidade total de alfa-caseína livre e beta-caseína livre em uma quantidade na variação de 0,5-40% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite. Por exemplo, o alimento derivado do leite pode compreender uma quantidade total de alfa-caseína livre e beta-caseína livre em uma quantidade na variação de 2-20% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite. O alimento derivado do leite pode, por exemplo, compreender uma

quantidade total de alfa-caseína livre e beta-caseína livre em uma quantidade na variação de 5-15% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite.

Em algumas realizações da invenção, o alimento derivado do leite compreende alfa-lactalbumina em uma quantidade de pelo menos 1% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite. Por exemplo, o alimento derivado do leite pode compreender alfa-lactalbumina em uma quantidade de pelo menos 10% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite, preferencialmente, pelo menos 20% (p/p) e, ainda mais preferencialmente, pelo menos 30% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite.

Em algumas realizações da invenção, o alimento derivado do leite compreende alfa-lactalbumina em uma quantidade na variação de 1-50% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite. Por exemplo, o alimento derivado do leite pode compreender alfa-lactalbumina em uma quantidade na variação de 5-40% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite, preferencialmente, na variação de 10-35% (p/p) e, ainda mais preferencialmente, na variação de 12-30% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite.

Em algumas realizações da invenção, o alimento derivado do leite compreende beta-lactoglobulina em uma quantidade de pelo menos 1% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite. Por exemplo, o alimento derivado do leite pode compreender beta-lactoglobulina em uma quantidade de pelo menos 15% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite, preferencialmente, pelo menos 30% (p/p) e, ainda mais preferencialmente, pelo menos 40% (p/p) em relação à

quantidade total de proteína do alimento derivado do leite.

Em algumas realizações da invenção, o alimento derivado do leite compreende beta-lactoglobulina em uma quantidade na variação de 1-70% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite. Por exemplo, o alimento derivado do leite pode compreender beta-lactoglobulina em uma quantidade na variação de 10-65% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite, preferencialmente, na variação de 20-60% (p/p) e, ainda mais preferencialmente, na variação de 35-55% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite.

Caseínas são conhecidas por precipitar em valores de pH de ou abaixo de cerca de 4,6. Em algumas realizações da invenção; portanto, é preferido que o alimento derivado do leite tendo um pH na variação de cerca de 3,6-4,6 tenha uma concentração de caseína relativamente baixa, como, no máximo, 1% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite.

Em algumas realizações da invenção, o alimento derivado do leite compreende, no máximo, 0,1% de caseína (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite. Pode ser ainda preferido que o alimento derivado do leite compreenda, no máximo, 0,01% de caseína (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite.

Em algumas realizações preferidas da invenção, o alimento derivado do leite compreende uma quantidade total de proteína na variação de 6-250 g/L do alimento derivado do leite. Por exemplo, o alimento derivado do leite pode compreender uma quantidade total de proteína na variação de 50-150 g/L do alimento derivado do leite. Pode ser ainda preferido que o alimento derivado do leite compreenda uma

quantidade total de proteína na variação de 75-125 g/L do alimento derivado do leite.

Alternativamente, o alimento derivado do leite pode compreender uma quantidade total de proteína na variação de 50-250 g/L do alimento derivado do leite. Por exemplo, o alimento derivado do leite pode compreender uma quantidade total de proteína na variação de 50-150 g/L do alimento derivado do leite. Pode ser ainda preferido que o alimento derivado do leite compreenda uma quantidade total de proteína na variação de 75-150 g/L do alimento derivado do leite.

Também pode ser preferido que o alimento derivado do leite possa compreender uma quantidade total de proteína na variação de 75-250 g/L do alimento derivado do leite.

Em algumas realizações preferidas da invenção, o alimento derivado do leite compreende uma quantidade total de proteína de pelo menos 6 g/L do alimento derivado do leite. Por exemplo, o alimento derivado do leite pode compreender uma quantidade total de proteína de pelo menos 50 g/L do alimento derivado do leite. Pode ser ainda preferido que o alimento derivado do leite compreenda uma quantidade total de proteína de pelo menos 75 g/L do alimento derivado do leite.

Em algumas realizações preferidas da invenção, o alimento derivado do leite tem um pH na variação de pH 3,8-6,0 em 25 graus C. Preferencialmente, o pH do alimento derivado do leite em 25 graus C está na variação de pH 4,0-5,5. Ainda mais preferencialmente, o pH do alimento derivado do leite em 25 graus C está na variação de pH 4,2-5,0, como, por exemplo pH 4,3-4,5.

A condutância específica desejada do alimento derivado do leite pode ser, por exemplo, obtida ao:

- concentrar o alimento derivado do leite pela remoção parcial de água e/ou adição de sal(is), o que resulta em uma condutância específica aumentada, ou

- dessalinizar o alimento derivado do leite pela remoção do(s) sal(is) e/ou adição de água, o que resulta em uma condutância específica reduzida.

As técnicas para remover água e/ou sal(is) de um líquido aquoso são bem conhecidas ao técnico no assunto.

Em algumas realizações preferidas da invenção, o alimento derivado do leite tem uma condutância específica na variação de 4,5-9,0 mS/cm em 25 graus C. Por exemplo, a condutância específica do alimento derivado do leite pode estar na variação de 5,0-8,0 mS/cm em 25 graus C. Em algumas realizações preferidas da invenção, pode ser ainda mais preferível que a condutância específica do alimento derivado do leite esteja na variação de 5,5-7,0 mS/cm em 25 graus C.

O alimento derivado do leite pode ter, por exemplo, uma condutância específica na variação de 4-7 mS/cm em 25 graus C. Alternativamente, o alimento derivado do leite pode ter uma condutância específica na variação de 7-10 mS/cm em 25 graus C. Alternativamente, o alimento derivado do leite pode ter uma condutância específica na variação de 5-8 mS/cm em 25 graus C.

Em algumas realizações preferidas da invenção, o alimento derivado do leite tem uma condutância específica na variação de 4-7 mS/cm em 25 graus C e um pH na variação de pH 3,6-5,0 em 25 graus C.

Em outras realizações preferidas da invenção, o alimento derivado do leite tem uma condutância específica na variação de 7-10 mS/cm em 25 graus C e um pH na variação de pH 5,0-6,5 em 25 graus C.

Nas realizações preferidas adicionais da invenção, o alimento derivado do leite tem uma condutância específica na variação de 5-8 mS/cm em 25 graus C e um pH na variação de pH 4.0-5.5 em 25 graus C.

Por exemplo, o alimento derivado do leite pode ter

uma condutância específica na variação de 5-6 mS/cm em 25 graus C e um pH na variação de pH 4,2-5,0 em 25 graus C.

Em algumas realizações da invenção, o alimento derivado do leite tem um pH na variação de 3,6 a 6,5 e,

- se o pH estiver na variação de 3,6-5,0, a condutância específica é

pelo menos 4 mS/cm e

no máximo $cond._{max}$= 1,38 mS/cm*pH + 1,03 mS/cm e,

- se o pH estiver na variação de 5-6,5, a condutância específica é

pelo menos $cond._{min}$ = 1,33 mS/cm *pH – 2,67 mS/cm, e

no máximo $cond._{max}$= 1,38 mS/cm*pH + 1,03 mS/cm.

Assim, se o pH de um alimento dessas realizações for, por exemplo, pH 6,0, a condutância específica é

pelo menos $cond._{min}$ = 1,33 mS/cm *6,0 – 2,67 mS/cm = 5,3 mS/cm, e

no máximo $cond._{max}$= 1,38 mS/cm*6,0 + 1,03 mS/cm = 9,3 mS/cm.

Por exemplo, o alimento derivado do leite pode ter um pH na variação de 3,6 a 5,0 e uma condutância específica de

pelo menos 4 mS/cm e

no máximo $cond._{max}$= 1,38 mS/cm*pH + 1,03 mS/cm.

Alternativamente, o alimento derivado do leite pode ter um pH na variação de 5,0 a 6,5 e uma condutância específica de

pelo menos pelo menos $cond._{min}$ = 1,33 mS/cm *pH – 2,67 mS/cm e

no máximo $cond._{max}$= 1,38 mS/cm*pH + 1,03 mS/cm.

As condutividades e valores de pH específicos são medidos em alimentos tendo uma temperatura de 25 graus C, a menos que seja declarado de outra forma.

Em algumas realizações da invenção, o meio de troca

de ânion compreende uma fase sólida e um ou mais grupos catiônicos.

Preferencialmente, pelo menos alguns dos grupos catiônicos são afixados à superfície da fase sólida e/ou à superfície de poros que são accessíveis através da superfície da fase sólida.

Em algumas realizações da invenção, a fase sólida do meio de troca de ânion compreende um ou mais componentes selecionados do grupo que consiste em uma pluralidade de partículas, um filtro e uma membrana.

A fase sólida pode, por exemplo, compreender ou até consistir essencialmente em polissacarídeo. Polissacarídeos de ligação cruzada são particularmente preferidos. Exemplos de polissacarídeos úteis são celulose, agarose e/ou dextrano.

Alternativamente, a fase sólida pode compreender ou até consistir essencialmente em um polímero não de carboidrato. Exemplos de polímeros não de carboidrato úteis são metacrilato, poliestireno e/ou estireno-divinilbenzeno.

Em algumas realizações preferidas da invenção, os grupos catiônicos compreendem ou até consistem essencialmente em grupos amino. Os grupos amino terciário são particularmente preferidos e resultam em grupos de amônia quaternária sob condições de pH adequadas. Os grupos de amônia quaternária provêem fortes características de troca de ânion ao meio de troca de ânion.

De maneira alternativa ou adicional, os grupos catiônicos podem compreender um ou mais grupos amino primário ou secundário. Uma quantidade substancial de grupos amino primário ou secundário provê tipicamente o meio de troca de ânion de características fracas de troca de ânion.

A carga de proteína ideal por ciclo depende do projeto do sistema de cromatografia de troca de ânion e as características do meio de troca de ânion.

As condições do processo durante a cromatografia de troca de ânion, incluindo pressão, vazão etc., dependem da implementação real do processo, o equipamento utilizado e o meio de troca de ânion utilizado.

A temperatura do alimento derivado do leite durante etapa b) é tipicamente baixa, de maneira suficiente, para evitar crescimento microbiano e dano por calor da proteína e do meio de troca de ânion, mas suficientemente alta para prover uma viscosidade aceitável.

Em algumas realizações da invenção, a temperatura do alimento derivado do leite durante a etapa b) é na variação de 2-40 graus C. Preferencialmente, a temperatura do alimento derivado do leite durante etapa b) é na variação de 4-20 graus C e, ainda mais preferencialmente, na variação de 6-12 graus C.

Mais detalhes referentes à cromatografia de troca de ânion e sua implementação industrial podem ser encontrados em *Scopes*, que é aqui incorporado por referência para todos os objetivos.

Em algumas realizações preferidas da invenção, o método da invenção compreende uma etapa c) de lavagem do meio de troca de ânion com uma solução de lavagem após o contato dele com o alimento derivado do leite. Soluções de lavagem úteis são tipicamente soluções de pH neutro e as aquosas, ácidas, fracas capazes de remover moléculas ligadas frouxamente do meio de troca de ânion. Pode-se, por exemplo, utilizar água desmineralizada ou uma solução aquosa de pH neutro de cloreto de sódio, por exemplo, 0,1 M de NaCl, como líquido de lavagem.

Em outras realizações preferidas da invenção, o método da presente invenção não contém a etapa c).

A etapa d) da presente invenção envolve a recuperação da osteopontina ligada ao meio de troca de ânion.

A recuperação é tipicamente realizada ao contatar o meio de troca de ânion com um eluente e coletar o eluato resultante, ou seja, o eluente mais as moléculas liberadas do meio de troca de ânion.

Normalmente, o eluente é uma solução aquosa tendo uma potência de íon e/ou pH suficientes para liberar a osteopontina ligada do meio de troca de ânion.

Exemplos de eluentes úteis são soluções aquosas de 1,0 M, de pH neutro de sais, como NaCl, $CaCl_2$, KCl, $MgCl_2$ ou uma combinação destes.

A composição recuperada pode ser sujeita a etapas de processo adicionais, por exemplo, para desmineralizar e concentrar a composição e, subsequentemente, transformá-la em um pó.

Assim, em algumas realizações preferidas da invenção, a composição recuperada é, além disso, sujeita a uma ou mais etapas de processo selecionadas do grupo que consiste em concentração, diafiltração, evaporação de solvente, secagem por pulverização, e substituição de cátions ligados à proteína.

Por exemplo, a composição recuperada pode ser sujeita a uma etapa de concentração.

Alternativamente ou, além disso, a composição recuperada pode ser sujeita a uma etapa de diafiltração.

Alternativamente ou, além disso, a composição recuperada pode ser sujeita a uma etapa de evaporação.

Alternativamente ou, além disso, a composição recuperada pode ser sujeita a uma etapa de secagem por pulverização.

Em uma realização preferida da invenção, a composição recuperada é sujeita às seguintes etapas:

i) concentração, por exemplo, pela ultrafiltração,

ii) diafiltração, por exemplo, em relação à água,

iii) opcionalmente, outra etapa de concentração, por exemplo, por evaporação,

iv) substituição de cátion ao contatar a composição aquosa da etapa ii) ou iii) com um sal de cálcio solúvel em água, por exemplo, $CaCl_2$,

v) pasteurização, e

vi) secagem por pulverização para converter a composição pasteurizada em um pó.

O presente método pode ser implementado tanto como um processo por lote ou como um processo por semi-lote. O processo por semi-lote pode ser, por exemplo, implementado ao operar uma primeira e uma segunda coluna de troca de ânion e realizar a etapa b) na primeira coluna de troca de ânion, enquanto realiza as etapas c) e/ou d) na segunda coluna de troca de ânion e vice-versa.

Assim, em algumas realizações preferidas da invenção, o método para isolar osteopontina de um alimento derivado do leite compreende as etapas de:

a) provisão de um alimento derivado do leite compreendendo osteopontina, o dito alimento derivado do leite é um concentrado de proteína do soro doce, o dito alimento derivado do leite tendo um pH na variação de pH 3,6-6,5 em 25 graus C e uma condutância específica na variação de 4-10 mS/cm em 25 graus C, e em que o dito alimento derivado do leite, além disso, compreende caseíno-macropeptídeo em uma quantidade de pelo menos 1% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite,

b) sujeição do dito alimento derivado do leite à cromatografia de troca de ânion, que inclui o contato do alimento derivado do leite com um meio de troca de ânion,

c) opcionalmente, lavagem do meio de troca de ânion, e

d) recuperação da proteína ligada ao meio de troca

de ânion, obtendo, com isso, a composição compreendendo osteopontina isolada.

Em outras realizações preferidas da invenção, o método para isolar osteopontina de um alimento derivado do leite compreende as etapas de:

a) provisão de um alimento derivado do leite compreendendo osteopontina, o dito alimento do leite é um concentrado de proteína do soro do leite, o dito alimento derivado do leite tendo um pH na variação de pH 3,6-6,5 em 25 graus C e uma condutância específica na variação de 4-10 mS/cm em 25 graus C, e em que o dito alimento derivado do leite, além disso, compreende alfa-caseína livre e beta-caseína livre,

b) sujeição do dito alimento derivado do leite à cromatografia de troca de ânion, que inclui o contato do alimento derivado do leite com um meio de troca de ânion,

c) opcionalmente, lavagem do meio de troca de ânion, e

d) recuperação da proteína ligada ao meio de troca de ânion, obtendo, com isso, uma composição compreendendo osteopontina isolada.

Ainda, um aspecto da invenção se refere a uma composição contendo osteopontina capaz de ser obtida pelo método aqui descrito.

A presente invenção foi descrita acima com referência às realizações específicas. Entretanto, outras realizações diferentes das descritas acima são igualmente possíveis dentro do escopo da invenção. Os diferentes aspectos e etapas das diversas realizações e aspectos da invenção podem ser combinados de outra forma do que as aqui descritas, a menos que seja declarado de outra forma.

EXEMPLOS

Exemplo 1. Enriquecimento de osteopontina do

concentrado de soro doce, de condutância controlada

Protocolo

Os experimentos de purificação a seguir foram conduzidos em equipamento de Cromatografia Líquida de Proteína Rápida (FPLC), equipado com o pacote de *BigBeads* de Q-Sefarose, de resina de troca de ânion forte em uma coluna de 13,3 mL (170 mm x 10 mm). O fluxo foi mantido em 3,33 ml/min ao longo de todo o carregamento, lavagem e eluição em todos os experimentos. A matéria-prima foi um isolado de proteína de soro doce, e 70 g de proteína total foram carregadas na coluna durante cada experimento. O conteúdo de CMP na matéria-prima foi analisado. As amostras da matéria-prima foi diluída a uma concentração de proteína final de 10 % p/v, doravante pH (pH 3,0-5,7, em 4,7 mS/cm) e condutância específica (2,3-10,3 mS/cm em pH 4,3) foram ajustado pela adição de HCL e NaCl, respectivamente. As proteínas não ligadas foram lavadas da coluna por 3 volumes de solução de leito de 100 mM NaCl, pH 5,0. Subsequentemente, as proteínas ligadas foram eluídas pela passagem da solução de 1 M de NaCl, pH 5,0 através da coluna, até que nenhuma proteína fosse detectada no eluato.

Para cada amostra de eluato, os conteúdos de osteopontina (OPN), CMP e proteína total foram analisados utilizando as seguintes técnicas.

Determinação da proteína total

O conteúdo de proteína total do eluato foi medido por digestão Kjeldahl padrão, conforme descrito em Cohen.

Quantificação de opn pelo método hplc

Princípio analítico:

A amostra foi filtrada através de um filtro de 0,22 pm e sujeita a HPLC com coluna MonoQ HR 5/5 (1ml), Pharmacia e detecção em 280 nm. A concentração da amostra foi calculada pelo método padrão externo (comparação com a área de pico do

padrão com o conteúdo de OPN conhecido). É um pré-requisito para esse procedimento analítico que as amostras compreendam OPN relativamente pura, por exemplo, conforme determinado por SDS-PAGE (Laemmli, 1970), devido à baixa especificidade do método.

Reagentes: OPN padrão, água Milli Q, grau de HPLC, NaCl, Merck, Tris HCl, Sigma

Tampão A: 10 mM de NaCl, 20mM de Tris HCl, pH 8,0

Tampão B: 0,8 M de NaCl, 20mM de Tris HCl, pH 8,0

Uma curva de calibração padrão foi feita de 5 padrões na variação de concentração de 1-10 mg/ml de OPN padrão no tampão A. Todos os padrões foram filtrados por filtros de 0,22 µm antes do carregamento na coluna.

Amostragem e pré-tratamento:

As amostras para análise foram diluídas com água Milli Q, grau de HPLC, se elas estivessem fora da variação da curva de calibração padrão. A diluição, em alguns casos, também foi necessária para permitir a ligação de OPN à resina de troca de ânion, se estivesse presente muito NaCl do eluente. Uma quantidade equivalente a 25 µL de 1-10 mg/mL de OPN foi injetada para análise. As amostras foram filtradas através de filtros de 0,22 µm antes a injeção ao HPLC.

Condições de HPLC: Fluxo 1 ml/min, volume de injeção de 25 µL, gradiente: 0-3 min. 0% B, 3-17 min 0-60% B, 17-30 min 60-100% B, 30-33 min 100% B, 33-34 min 100-0% B, 34-40 min 0% B.

Cálculo e expressão dos resultados:

A concentração de OPN em cada amostra foi calculada por referência à curva padrão e ao observar as diluições empregadas.

A pureza foi calculada pela proporção entre OPN e proteína total, utilizando o fator Jones específico de OPN de 7,17, como a maioria ou toda a proteína determinada pela

digestão Kjeldahl, no atual contexto, foi a OPN.

Quantificação de proteínas de soro mais importantes por hplc

A quantificação de separação da proteína do soro mais importante, alfa-lactalbumina, β-lactoglobulina e CMP (caseino-glicomacropeptídeo) por cromatografia de permeação de gel.

A cromatografia de permeação de gel foi conduzida utilizando 2 colunas de TSKge3000PWxl (7,8 mm x 30 cm) conectadas em série com a pré-coluna PWxl (6 mm 4 cm) afixada (Tosohass, Japão).

A solução padrão para a calibração do sistema consistiu em: 225 mg de CMP; 225 mg de alfa-lactalbumina e 50 mg de β-lactoglobulina dissolvidos em 0,02 M de tampão de fosfato 7,5 de 500,0 ml.

Pré-tratamento de amostras: As amostras de pó foram dissolvidas no tampão de fosfato em 1 mg/ml e deixadas durante a noite para solubilização. Alternativamente, as amostras líquidas foram diluídas com o tampão de fosfato para obter um conteúdo de aprox. 0,1% de proteína. Se o conteúdo de proteína estivesse abaixo de 0,1%, a amostra foi medida não diluída. Todas as amostras foram filtradas através de filtros de 0,22 µm, antes da injeção na coluna.

Cálculo e expressão de resultados:

A porcentagem de proteína individual na amostra foi calculada de acordo com

$$\frac{A \times 0,1 \times F}{B}$$, onde

A = área medida na amostra

0.1= fator de conversão para 0,1% de solução

F = fator de diluição (100.000/peso de amostra em mg)

B = área calculada de proteína individual em 0,1%

de solução padrão

Resultados

Conteúdo de CMP

O conteúdo de CMP na matéria-prima de soro doce foi 20,1%, mas CMP foi indetectável, de maneira surpreendente, nas composições de OPN enriquecidas do Exemplo 1.

O efeito do pH do alimento na pureza e produção de osteopontina:

A primeira série de experimentos com variação do valor de pH do alimento aplicado, apresentada na Figura 1, apresentou que a produção de OPN (mg de OPN de 70 g da proteína total no alimento) aumenta conforme o pH aumenta de pH 3 para aprox. pH 4,3. A alta produção é mantida quando o pH for aumentado além de pH 4,3. A pureza de OPN nas preparações de OPN obtidas é muito alta em valores de pH baixos, mas quando o pH é aumentado acima de aprox. pH 4,5, a pureza diminui lentamente, mas é ainda aceitável até aprox. pH 6,5. Entretanto, a melhor produção de OPN de alta pureza é obtida na janela de pH 3,8-5,5, e particularmente na variação de pH 4,3-4,5.

O efeito da condutância específica do alimento na pureza e produção de osteopontina: Os resultados da série de experimentos com condutância específica variante são apresentados na Figura 2. Em condutância específica baixa, a produção é alta, enquanto a pureza é baixa. Com o aumento da condutância específica, a pureza aumenta e atinge 100% em aprox. 5,5 mS/cm. Quando a condutância específica for aumentada mais, a pureza permanece alta, enquanto a produção de OPN começa a reduzir quando a condutância específica exceder aprox. 10 mS/cm. Entretanto, a melhor produção de OPN de alta pureza parece ser obtida na variação de condutância específica de 4,5-9,0 mS/cm e, particularmente, na variação 5-8 mS/cm.

Discussão/conclusão

Efeito do pH:

É visto da Figura 1 que um valor de pH abaixo de aprox. pH 3,6, a OPN está diminuindo sua carga e, com isso, está diminuindo sua ligação aos grupos catiônicos da resina. Nos valores de pH acima de aprox. pH 4,5, a pureza de OPN começa a diminuir conforme outras proteínas do alimento se tornam negativamente carregadas e começam a se ligar à resina. Assim, identificamos uma janela de valores de pH ideais na variação de pH 3,6-6,5 para isolar OPN de alta pureza e com alta produção mesmo se o alimento contiver uma grande quantidade de CMP. Na preparação de OPN resultante, CMP não é detectável.

Efeito de condutância específica:

É visto da Figura 2 que, em uma condutância específica abaixo de aprox. 4 mS/cm, a pureza de OPN é decrescente, uma vez que outras proteínas podem se ligar à resina. Em condutâncias específicas acima de aprox. 6 mS/cm, a ligação de OPN à resina se torna mais fraca e a produção diminui lentamente, mas é aceitável até uma condutância específica de aprox. 10 mS/cm. Portanto, identificamos uma variação estreita de aprox. 4-10 mS/cm para ser ideal para a produção de OPN. Nessa variação estreita, OPN pode ser isolada em alta produção e com alta pureza, mesmo de uma matéria-prima que contém aprox. 20% de CMP.

Foram realizados diversos experimentos adicionais que exploram a janela de pH/condutância específica reivindicada em alimentos com base em soro doce, e os experimentos adicionais confirmam as conclusões mencionadas acima.

Exemplo 2 enriquecimento de osteopontina de concentrado de soro ácido, de condutância controlada

O experimento de purificação a seguir foi conduzido

em equipamento de FPLC, semelhante ao Exemplo 1. A matéria-prima; entretanto, foi concentrado de soro ácido tendo um conteúdo de proteína total de 10% (p/p) e aprox. 70 g de proteína total foi carregada na coluna.

O soro ácido concentrado foi diluído em diferentes graus, dando origem a condutividades específicas na variação de 2,5 a 10 mS/cm. A OPN e a proteína total foram medidas no alimento e no eluato pelos métodos descritos no Exemplo 1. O pH foi ajustado para 4,3 pela adição de HCL e a matéria-prima aplicada à coluna de troca de ânion. As proteínas não ligadas foram lavadas da coluna por 3 volumes de base de 0,1 M de NaCl e as proteínas ligadas foram,subsequentemente, eluídas pela passagem de 1 M de solução de NaCl através da coluna, até que não fosse detectada mais proteína no eluato.

A influência da condutância específica na pureza e produção de OPN durante o enriquecimento de OPN do soro ácido concentrado é apresentada na Figura 3.

Os dados na Figura 3 apresentam um enriquecimento de OPN do soro ácido pelo procedimento descrito. Como no Exemplo 1, quando o soro doce foi utilizado como matéria-prima, observou-se novamente que a baixa condutância específica no alimento aumenta a produção em sacrifício da pureza do produto. Entretanto, como os alimentos derivados do soro ácido não contêm grandes quantidades de CMP, o efeito não é tão prejudicial ao enriquecimento de OPN quanto no caso no qual o alimento é derivado do soro doce. O alimento derivado do soro ácido não contém componentes secundários, cuja ligação pode ser minimizada pelas mesmas configurações de parâmetro que as empregadas para evitar a ligação de CMP. Portanto, pode ser observado que a variação ideal estreita de isolamento de OPN, identificada no Exemplo 1, se aplica ao isolamento de OPN do soro ácido também.

Realizamos diversos experimentos adicionais que

exploram a janela de pH/condutância específica reivindicada em alimentos a base de soro ácido e os experimentos adicionais confirmam as descobertas mencionadas acima.

Exemplo 3 enriquecimento de osteopontina do concentrado de soro do leite, de condutância controlada

De acordo com os exemplos anteriores, o soro do leite pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de OPN pelo método revelado. O soro do leite foi produzido por microfiltração (tamanho de poro de filtro de aprox. 0,1 mícron) de leite desnatado em 24 graus, de modo a remover a caseína micelar. Amostras de soro do leite foram, após isso, ajustadas para pH 4,3 ou pH 4,7 por HCL e diafiltradas para obter condutâncias específicas na variação de 4-10 mS/cm e um conteúdo de proteína total de aprox. 5% ou 10% (p/p). Subsequentemente, OPN foi enriquecida das amostras de soro do leite modificadas por troca de ânion em aprox. 5 graus C, conforme descrito no exemplo 1.

Resultados e observações

Os estudos realizados demonstraram que alimentos derivados do soro do leite também podem ser utilizados no presente processo.

De maneira surpreendente, foi observada precipitação não identificada durante o processo, resultando em obstrução ou contaminação do material de troca de ânion após alguns ciclos de troca de ânion. O problema de precipitação foi solucionado pela filtração do soro do leite acidificado através do papel de filtro antes da troca de ânion. Foram observadas indicações de que o precipitado seja relacionado à espécie de caseína dissolvida, como alfa-caseína livre e beta-caseína livre que permaneceram no soro do leite quando as micelas de caseína naturais foram removidas.

Discussão/conclusão

O soro do leite é produzido por microfiltração do leite desnatado, de modo a remover caseínas, enquanto o soro doce e o ácido são esgotados de caseína por precipitação de caseínas pela reação de coalho ou ácida, respectivamente. Com isso, todas as três categorias de alimentos derivados do leite são essencialmente livres de caseína micelar, o que interferiria nos procedimentos de cromatografia de troca de ânion, devido à precipitação e floculação de caseínas.

Observamos indicações de que caseínas dissolvidas causam problemas durante a troca de ânion. Esse problema pode ser solucionado ao filtrar os alimentos derivados do leite antes da troca de ânion, utilizando, por exemplo, um microfiltro.

Alternativamente, a etapa de troca de ânion pode ser realizada em um pH no qual a precipitação seja limitada ou mesmo ausente, por exemplo, na variação de pH 5,0-6,5. Ao realizar a troca de ânion nessa variação de pH, além disso, é sugerido utilizar uma temperatura de alimento /processo acima de 15 graus C, como 20-40 graus C. Nessa variação de temperatura, beta-caseína dissolvida forma pequenas micelas de beta-caseína, que não devem ser confundidas com micelas de caseína nativas, e essas micelas de beta-caseína interferem menos no processo de troca de ânion que as moléculas de beta-caseína isoladas.

Exemplo 4 enriquecimento de osteopontina do concentrado do soro doce sem condutância controlada

O experimento de purificação a seguir foi conduzido em equipamento de FPLC, semelhante ao Exemplo 1. A matéria-prima foi isolado de soro doce e aprox. 1 g de proteína total foi carregada na coluna. Antes de carregar à coluna, o soro doce foi concentrado pela ultrafiltração, diafiltrado após a adição de um volume igual de água e, por fim, diluído novamente por um volume igual de água. A condutância

específica resultante foi 2,1 mS/cm. CMP e proteína total foram medidos no alimento e no eluato pelos métodos descritos no Exemplo 1. A quantidade de OPN não pode ser medida devido às proteínas indeferirem tanto no alimento como no eluato. Os dados de OPN na Tabela 1 são estimados de produções conhecidas nos experimentos do Exemplo 1.

O pH foi ajustado para 4,3 pela adição de HCL e a matéria-prima aplicada à coluna de troca de ânion. As proteínas não ligadas foram lavadas da coluna por 3 volumes de base de água e as proteínas ligadas foram, após isso, eluídas pela passagem de 1 M de solução de NaCl através da coluna, até que não fosse mais detectada proteína no eluato.

TABELA 1. RESULTADOS DA TROCA DE ÂNION DE SORO DOCE DE CONDUTÂNCIA BAIXA

	Matéria-prima	Eluato
Proteína total, mg	979	192
OPN, mg	2,9	2,8
Pureza de OPN, %	0,3	1,5
GMP, mg	193	186
Pureza de GMP, %	19,7	97

Discussão/conclusão:

Os dados na Tabela 1 apresentam um enriquecimento de proteínas do soro ácido pelo procedimento descrito. Entretanto, a OPN é somente enriquecida a uma extensão menor, pois constitui uma fração menor de proteínas do soro ácido no alimento. Como, por exemplo, CMP também está se ligando à resina e está presente no alimento em uma alta concentração, essa proteína assume uma grande quantidade da capacidade de ligação da resina. Portanto, esse procedimento não é satisfatório para a produção de OPN.

Exemplo 5 comparação e conclusão (comparando exemplo 1 com o exemplo 4)

Algumas características dos processos nos Exemplos 1 e 4 são comparadas na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2. Características do Exemplo 1 e 4

	Exemplo 1	Exemplo 4
pH	4,3	4,3
Condutância específica, mS/cm	6,0	2,1
Carga de proteína por ml de resina, g/ml	5,26	0,074
OPN estimada de proteína na matéria-prima, %	0,3	0,3
Vezes de enriquecimento de OPN	333	5
Pureza de OPN no eluato, %	100	1,5

Conclusão

Conforme resumido na Tabela 2, o método do Exemplo 1 é muito mais específico para enriquecer OPN que o método do Exemplo 4. Portanto, muito mais proteína pode ser carregada à coluna por ciclo e a produção de OPN por ciclo é muito maior com o método do Exemplo 1. Esse método resulta em OPN praticamente pura, enquanto CMP domina o produto do Exemplo 4.

REFERÊNCIAS

Cohen Julius B. Cohen, Practical Organic Chemistry, 1910

Evans et al. Evans et al., "Comparison of composition, sensory, and volatile components of thirty-four percent whey protein and milk serum protein concentrates", J. Dairy Sci. 92 :4773-4791, 2009

Scopes Protein Purification: Principles and Practice; Robert K. Scopes; 3rd edition, Springer Verlag New York, Inc., ISBN 0-387-94072-3

WO 02/28413 Al

WO 01/149741 A2

WO 99/33415 A1

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO PARA ISOLAR OSTEOPONTINA DE UM ALIMENTO DERIVADO DO LEITE, sendo o método caracterizado por compreender as etapas de:

a) prover um alimento derivado do leite compreendendo osteopontina, o dito alimento derivado do leite tendo um pH na faixa de pH 3,6-6,5 em 25 °C e uma condutância específica na faixa de 4-10 mS/cm em 25 °C,

e em que o dito alimento derivado do leite, além disso, compreende

- caseíno-macropeptídeo em uma quantidade de pelo menos 1% (p/p) em relação à quantidade total da proteína do alimento derivado do leite,

b) submeter o dito alimento derivado do leite à cromatografia de troca aniônica, que inclui o contato do alimento derivado do leite com um meio de troca aniônica,

c) opcionalmente, lavar o meio de troca aniônica, e

d) recuperar a proteína ligada ao meio de troca aniônica, obtendo, com isso, uma composição compreendendo osteopontina isolada.

2. MÉTODO, de acordo com reivindicação 1, caracterizado por o alimento derivado do leite compreender CMP em uma quantidade na faixa de 1-40% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite.

3. MÉTODO, de acordo com reivindicação 1 ou 2, caracterizado por o alimento derivado do leite compreender CMP em uma quantidade de pelo menos 5% (p/p).

4. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por o alimento derivado do leite compreender além disso proteína adicional tendo um ponto isoelétrico (pI) < 5,0.

5. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por o alimento

derivado do leite compreender um alimento derivado do soro do leite.

6. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por o alimento derivado do leite compreender um alimento derivado do soro doce.

7. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por o alimento derivado do leite ter um pH na faixa de 5,0-6,5.

8. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1-6, caracterizado por o alimento derivado do leite ter um pH na faixa de pH 3,8-5,5 em 25 °C.

9. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por a etapa a) de prover o alimento derivado do leite envolver a remoção de precipitado de um líquido acidificado que deve formar o alimento derivado do leite.

10. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por o alimento derivado do leite compreender alfa-lactalbumina em uma quantidade de pelo menos 1% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite.

11. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por o alimento derivado do leite compreender beta-lactoglobulina em uma quantidade de pelo menos 1% (p/p) em relação à quantidade total de proteína do alimento derivado do leite.

12. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por o alimento derivado do leite compreender uma quantidade total de proteína na faixa de 6-250 g/L do alimento derivado do leite.

13. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por o alimento

derivado do leite ter uma condutância específica na faixa de 4,5-9,0 mS/cm em 25 °C.

14. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1-12, caracterizado por o alimento derivado do leite ter uma condutância específica na faixa de 4-7 mS/cm em 25 °C.

15. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1-12, caracterizado por o alimento derivado do leite ter uma condutância específica na faixa de 7-10 mS/cm em 25 °C.

16. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por a composição recuperada, além disso, ser submetida a uma ou mais da(s) etapa(s) de processo selecionada(s) a partir do grupo consistindo de concentração, diafiltração, evaporação do solvente, secagem por aspersão, e substituição de cátions ligados à proteína.

Fig. 1

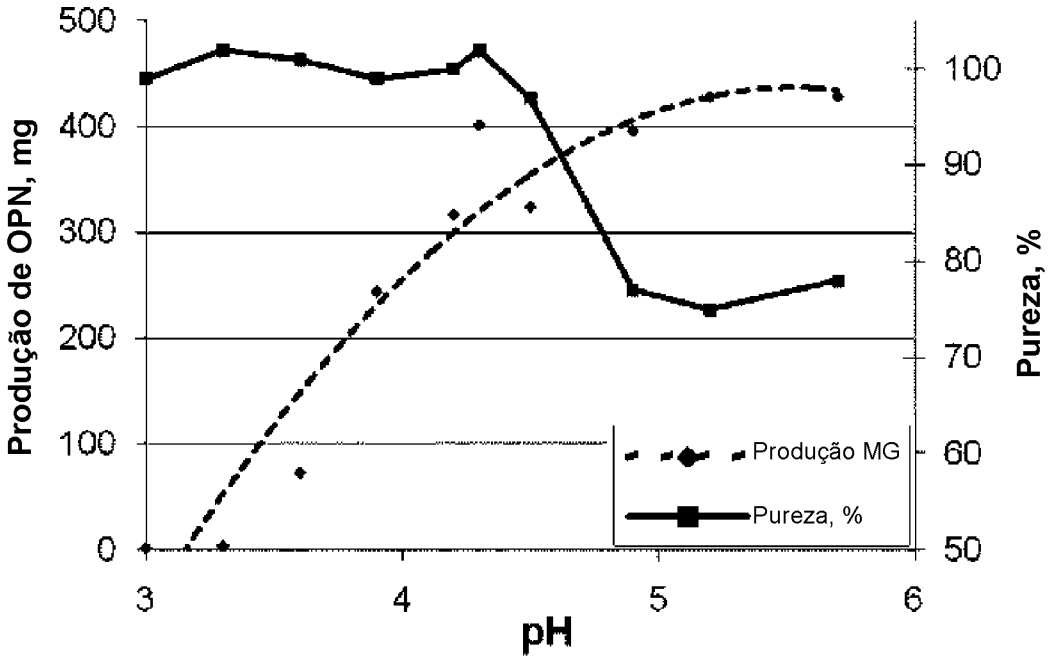

Produção de OPN, mg
500
400
300
200
100
0
3
4
5
6
pH
100
90
80
70
60
50
Pureza, %
Produção MG
Pureza, %

Fig. 2

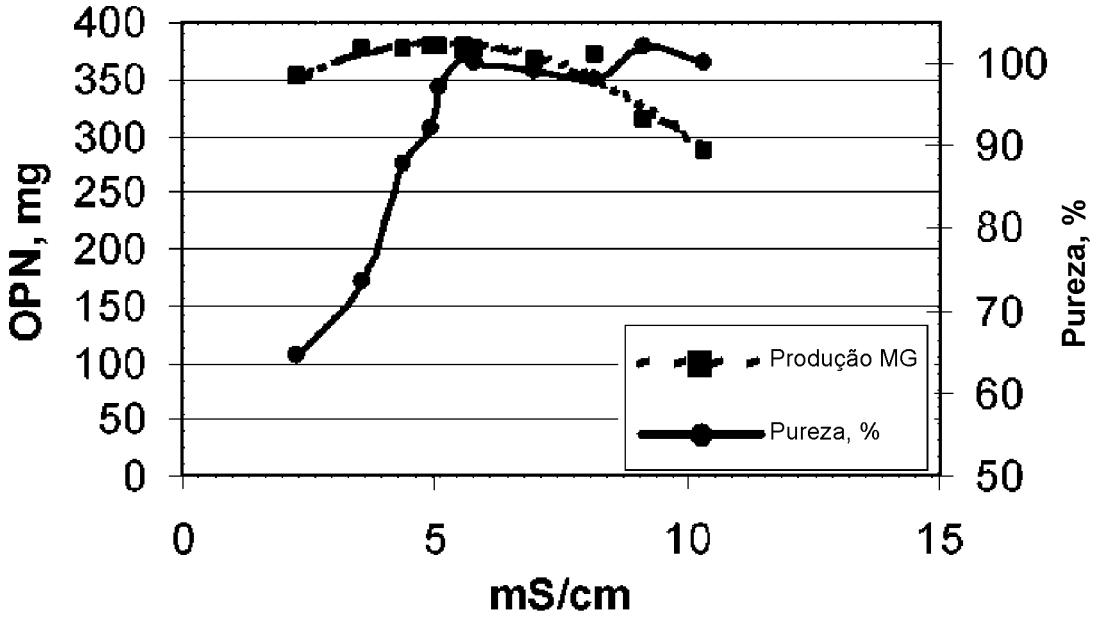
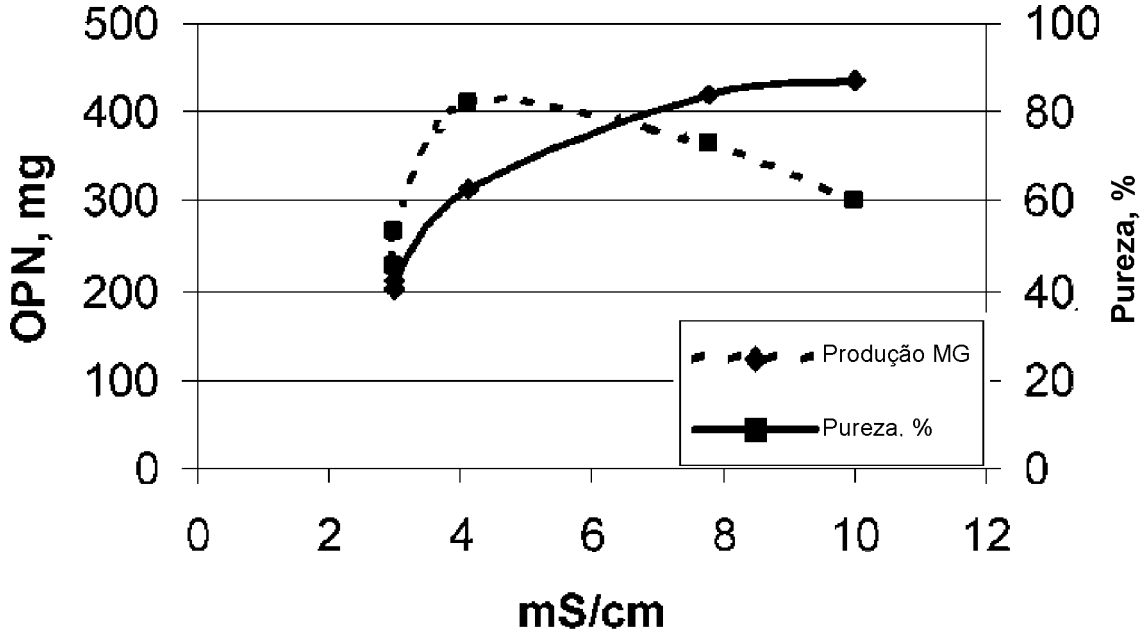

OPN, mg
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
5
10
15
mS/cm
100
90
80
70
60
50
Pureza, %
Produção MG
Pureza, %

Fig. 3


500
400
300
200
100
0
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
OPN, mg
Pureza, %
mS/cm
Produção MG
Pureza. %