

Valorização do Soro do Leite pela Obtenção de Péptidos Bioativos

Dissertação de Mestrado

Tiago Machado de Paiva

Mestrado em
Ciências Biomédicas



Valorização do Soro do Leite pela Obtenção de Péptidos Bioativos

Tese de Mestrado

Tiago Machado de Paiva

Orientadores

Professor Doutor Nelson José Oliveira Simões

Doutor Duarte Nuno Toubarro Tiago

Tese de Mestrado submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas



Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Professor Doutor Nelson Simões e coorientador Doutor Duarte Toubarro pelo apoio, paciência, confiança, atenção, compreensão, oportunidade e acima de tudo amizade desenvolvida ao longo do meu percurso universitário.

Agradeço ao técnico Pedro Mântua e a todos os colegas do laboratório pela ajuda, convivência, momentos de descontração, apoio e amizade.

Agradeço ao Professor Doutor José Batista pela sua colaboração e disponibilidade.

Agradeço aos meus pais e à minha família por todo apoio, confiança e carinho que sempre tiveram para comigo ao longo da minha vida.

Índice

Lista de Tabelas	5
Lista de Figuras.....	6
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	10
Resumo	11
Abstract.....	12
1) Introdução.....	13
2) Revisão da literatura	14
2.1) Soro do leite.....	14
2.2) Proteínas do soro do leite.....	16
2.2.1) Lactoglobulina	17
2.2.2) α -Lactoalbumina.....	19
2.3) Características do soro como efluente	21
2.4) Obtenção de concentrados proteicos de soro.....	22
2.5) Péptidos Bioativos	24
2.5.1) Obtenção de péptidos bioativos.....	25
2.5.2) Proteases úteis na produção de péptidos bioativos	26
2.5.3) Atividade Antitrombótica.....	26
2.5.4) Atividade Antibacteriana.....	27
2.5.5) Atividade Antioxidante.....	28
3) Material e métodos	30
3.1) Isolados utilizados.	30
3.2) Ensaio da otimização da produção da enzima dos isolados	30
3.3) Produção de Enzima	31
3.4) Atividade pela Azoalbumina	31
3.5) Obtenção de proteínas do soro.....	32
3.6) Digestão das proteínas do Soro	32
3.7) Fracionamento das proteínas do soro	33
3.7.1) Cromatografia de Exclusão molecular	33
3.7.1.1) FPLC – Coluna Superdex 75	33
3.7.1.2) FPLC – Coluna Superdex Peptide	33
3.7.2) Cromatografia de Troca Iônica.....	33
3.7.2.1) FPLC – Coluna MonoQ.....	33
3.7.3) Cromatografia de Fase Reversa.....	33

3.7.3.1) HPLC – Coluna C18.....	33
3.8) Preparação e concentração das frações cromatográficas	34
3.9) Ensaio funcionais	34
3.9.1) Atividade Antibacteriana	34
3.9.2) Atividade Antioxidante.....	34
3.9.2.1) DPPH.....	34
3.9.2.2) ABTS	35
3.9.3) Atividade Antitrombotica	35
3.9.3.1) Ensaio da euglobulina.....	35
3.10) Eletroforese.....	36
3.10.1) SDS-PAGE	36
3.10.2) Zimograma.....	37
3) Resultados.....	37
3.1) Ensaio de Otimização da produção de enzima.....	37
3.2) Comparação das proteínas do soro do leite	39
3.3) Estudo dos hidrolisados obtidos pelos 3 isolados.....	41
3.3.1) Hidrolisado obtido pelo extrato enzimático do isolado s3B.....	41
3.3.2) Hidrolisado obtido pelo extrato enzimático do isolado s10B.....	44
3.3.3) Hidrolisado obtido pelo extrato enzimático do isolado s102A.....	47
3.4) Atividades funcionais	50
3.4.1) Determinação de atividades antibacteriana em hidrolisados de proteína do soro de leite	50
3.4.2) Atividades Antioxidante em hidrolisados de proteína do soro de leite	52
3.4.2.1) No digerido obtido com o isolado s3B	53
3.4.2.2) No digerido obtido com o isolado s10B	55
3.4.2.3) No digerido obtido com o isolado s102A.....	56
3.4.3) Atividade anticoagulante e anti-trombolítica em hidrolisados de proteína do soro	57
3.4.3.1) No digerido obtido com o isolado s3B	58
3.4.3.2) No digerido obtido com o isolado s10B	60
3.4.3.3) No digerido obtido com o isolado s102A.....	61
3.5) Purificação parcial dos péptidos com atividade anticoagulante	64
3.6) Análise HPLC das frações ativas parcialmente purificadas	68
4) Discussão	71
5) Conclusão	74

6) Referências Bibliográficas..... 74

Lista de Tabelas

Tabela 1: Composição do soro ácido e doce em percentagem (p/p) (Rodrigues, 2001).	15
Tabela 2: Composição em aminoácidos da proteína do soro seco (Mizubuti, 1994)	15
Tabela 3: Composição dos produtos do soro do leite (Silva, 2009)	22
Tabela 5: Resumo da atividade anticoagulante da fração com maior atividade (fração #3).	63
Tabela 6: Percentagem de inibição das frações testadas da superdex 75.	65
Tabela 7: Percentagem de inibição das frações testadas da superdex peptide.....	66
Tabela 8: Percentagem de inibição das frações testadas da MonoQ.	67
Tabela 9: Fator de purificação obtido para a fração peptídica com atividade anticoagulante.	68

Lista de Figuras

Figura 1: Representação da estrutura esquemática tridimensional β -Lg (Cayot & Lorient, 1998).	18
Figura 2: Variação da conformação da β -lactoglobulina em função do pH (Rodrigues, 2001).	18
Figura 3: Representação da estrutura esquemática tridimensional α -Lac (Cayot & Lorient, 1998) ...	20
Figura 4: Diagrama geral do aproveitamento do soro (Torres, 2005).	23
Figura 5: Ótimo de atividade da enzima produzida pelos isolados s3B, s10B e s102A em diferentes condições de cultura. PE) meio mínimo salino; PE / Prot) meio mínimo suplementado com PSL; Imob) inoculo bacteriano imobilizado em meio cultura PE; Imob / Prot) inoculo bacteriano imobilizado em meio PE suplementado com PSL. As barras de erro foram determinadas pelos valores de 3 réplicas biológicas.	38
Figura 6: Análise SDS-PAGE (A) e Zimograma (B) do sobrenadante do meio de cultura obtido com cada um dos isolados utilizados. A massa dos marcadores moleculares está identificada em kDa. ...	39
Figura 7: Cromatograma correspondente à separação cromatográfica numa coluna Superdex 75 da proteína do soro de leite comercial. A determinação dos pesos moleculares (kDa), foi feita com base no volume de eluição cromatográfica.	40
Figura 8: Cromatograma correspondentes à separação cromatográfica numa coluna Superdex 75 da proteína nativa. A determinação dos pesos moleculares (kDa), foi feita com base no volume de eluição cromatográfica.	40
Figura 9: SDS-PAGE das proteínas do soro nativas e proteínas do soro comercial testadas.	41
PSN) proteínas do soro nativas; PSC) proteínas do soro comercial	41
Figura 10: Cromatograma correspondente à separação cromatográfica em coluna Superdex 75 do hidrolisado de 1 mg de proteína comercial com o extrato enzimático do isolado s3B. A determinação dos pesos moleculares (kDa), foi feita com base no volume de eluição cromatográfica.	42
Figura 11: Cromatograma correspondentes à separação cromatográfica numa coluna Superdex 75 do hidrolisado de 2 mg de proteína comercial com o extrato enzimático do isolado s3B. A determinação dos pesos moleculares (kDa), foi feita com base no volume de eluição cromatográfica.	43
Figura 12: Cromatograma correspondentes à separação cromatográfica numa coluna Superdex 75 do hidrolisado de 2 mg de proteína nativa com o extrato enzimático do isolado s3B. A determinação dos pesos moleculares (kDa), foi feita com base no volume de eluição cromatográfica.	44
Figura 13: Comparação dos cromatogramas da Superdex 75 das digestões realizadas pelo isolado s3B.	44
Figura 14: Cromatograma correspondentes à separação cromatográfica numa coluna Superdex 75 de 1 mg proteína comercial digerida com o extrato enzimático do isolado s10B. A determinação dos pesos moleculares (kDa) apresentado, foi feito com base no volume de eluição cromatográfica.	45
Figura 15: Cromatograma correspondentes à separação cromatográfica numa coluna Superdex 75 de 2 mg proteína comercial digerida com o extrato enzimático do isolado s10B. A determinação dos pesos moleculares (kDa) apresentado, foi feito com base no volume de eluição cromatográfica.	46

Figura 16: Cromatograma correspondentes à separação cromatográfica numa coluna Superdex 75 de 2 mg proteína nativa digerida com o extrato enzimático do isolado s10B. A determinação dos pesos moleculares (kDa) apresentado, foi feito com base no volume de eluição cromatográfica.	47
Figura 17: Comparação dos cromatogramas da Superdex 75 das digestões realizadas pelo isolado s10B.	47
PSC) Proteína do Soro Comercial.....	47
Figura 18: Cromatograma correspondentes à separação cromatográfica numa coluna Superdex 75 de mg proteína comercial digerida com o extrato enzimático do isolado s102A. A determinação dos pesos moleculares (kDa) apresentado, foi feito com base no volume de eluição cromatográfica.	48
Figura 19: Cromatograma correspondentes à separação cromatográfica numa coluna Superdex 75 de 2 mg proteína comercial digerida com o extrato enzimático do isolado s102A. A determinação dos pesos moleculares (kDa) apresentado, foi feito com base no volume de eluição cromatográfica.....	49
Figura 20: Cromatograma correspondentes à separação cromatográfica numa coluna Superdex 75 de 2 mg proteína nativa digerida com o extrato enzimático do isolado s102A. A determinação dos pesos moleculares (kDa) apresentado, foi feito com base no volume de eluição cromatográfica.	49
Figura 21: Comparação dos cromatogramas da Superdex 75 das digestões realizadas pelo isolado s102A. (PSC) Proteínas do Soro Comercial; (PSN) Proteínas do Soro Nativa.....	50
Figura 22: Ensaio de atividade antibacteriana em <i>E. coli</i> (DSM498) de diferentes frações dos 3 isolados (fracionados por Superdex 75), s3b, s10b e s102a, da digestão de 1 mg de proteína comercial.	51
Figura 23: Ensaio de atividade antibacteriana em <i>E. coli</i> (DSM498) de diferentes frações dos 3 isolados (fracionados por Superdex 75), s3b, s10b e s102a, da digestão de 2 mg de proteína comercial.	51
Figura 24: Ensaio de atividade antibacteriana em <i>M. luteus</i> DSM20036 de diferentes frações dos 3 isolados (fracionado por Superdex 75), s3b, s10b e s102a, da digestão de 1 mg de proteína comercial.	52
Figura 25: Ensaio de atividade antibacteriana em <i>M. luteus</i> DSM20036 de diferentes frações dos 3 isolados (fracionados por Superdex 75), s3b, s10b e s102a, da digestão de 2 mg de proteína comercial.	52
Figura 26: Atividade antioxidante das frações cromatográficas do hidrolisado s3B determinadas pelo método do ABTS. Perfil cromatográfico e atividade antioxidante obtido com proteína comercial (A) e com proteína nativa (B). As barras de erro correspondem ao desvio padrão de 3 réplicas independentes.	54
Figura 27: Ação dose-dependente da atividade antioxidante da fração (#4), maior atividade, obtida com isolado s3B, a diferentes concentrações.....	54
Figura 28: Atividade antioxidante das frações cromatográficas do hidrolisado s10B determinadas pelo método do ABTS. Perfil cromatográfico e atividade antioxidante obtido com proteína comercial (A) e com proteína nativa (B). As barras de erro correspondem ao desvio padrão de 3 réplicas independentes.	55
Figura 29: Ação dose-dependente da atividade antioxidante da fração (#4), maior atividade, obtida com isolado s10B, a diferentes concentrações.....	56

Figura 30: Atividade antioxidante das frações cromatográficas do hidrolisado s102A determinadas pelo método do ABTS. Perfil cromatográfico e atividade antioxidante obtido com (A) proteína comercial e (B) proteína nativa. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de 3 réplicas independentes para a proteína comercial e 2 réplicas independentes para a proteína nativa.	57
Figura 31: Ação dose-dependente da atividade antioxidante da fração (#4), maior atividade, obtida com isolado s102A, a diferentes concentrações.	57
Figura 32: Ensaio da euglobulina para as proteínas do soro comercial e nativa sem hidrolise. O controle foi realizado com H ₂ O MilliQ; PSC) proteína comercial; PSN) proteína nativa.	58
Figura 33: Teste da atividade anticoagulante pelo ensaio da euglobulina para o isolado s3B. As frações são resultantes da digestão das proteínas do soro comercial fracionados pela cromatografia (Superdex 75). À direita - concentração de proteína das diferentes frações (280 nm) utilizados no ensaio.....	59
Figura 34: Teste da atividade anti-trombolítica pelo ensaio da euglobulina para o isolado s3B. As frações são resultantes da digestão das proteínas do soro comercial fracionadas pela cromatografia (Superdex 75).....	59
Figura 35: Teste da atividade anti-trombolítica pelo ensaio da euglobulina para o isolado s3B. As frações são resultantes da digestão das proteínas nativas fracionadas pela cromatografia (Superdex 75).	60
Figura 36: Teste da atividade anticoagulante pelo ensaio da euglobulina para o isolado s10B. As frações são resultantes da digestão das proteínas do soro comercial fracionados pela cromatografia (Superdex 75). Tabela com a concentração de proteína das diferentes frações (280 nm) utilizados no ensaio.	60
Figura 37: Teste da atividade anti-trombolítica pelo ensaio da euglobulina para o isolado s10B. As frações são resultantes da digestão das proteínas do soro comercial fracionados pela cromatografia (Superdex 75).....	61
Figura 38: Teste da atividade anti-trombolítica pelo ensaio da euglobulina para o isolado s10B. As frações são resultantes da digestão das proteínas nativas fracionados pela cromatografia (Superdex 75).	61
Figura 39: Teste da atividade anticoagulante pelo ensaio da euglobulina para o isolado s102A. As frações são resultantes da digestão das proteínas do soro comercial fracionados pela cromatografia (Superdex 75). À direita - concentração de proteína das diferentes frações (280 nm) utilizados no ensaio.	62
Figura 40: Teste da atividade anti-trombolítica pelo ensaio da euglobulina para o isolado s102A. As frações são resultantes da digestão das proteínas do soro comercial fracionados pela cromatografia (Superdex 75).....	62
Figura 41: Teste da atividade anti-trombolítica pelo ensaio da euglobulina para o isolado s102A. As frações são resultantes da digestão das proteínas nativas fracionados pela cromatografia (Superdex 75).	63
Figura 42: Ação anticoagulante dose-dependente. Atividade anticoagulante da fração (#3) da hidrolise da proteína nativa (2º digestão da PSN, figura 23) com maior atividade obtida do hidrolisado s102A, a diferentes concentrações.	64

Figura 43: Fracionamento do hidrolisado S102A em superdex 75 (gráfico de cima) e teste da atividade antitrombótica das frações obtidas (gráfico de baixo).	65
Figura 44: Fracionamento da hidrolise das proteínas do soro de leite nativa por Superdex Péptide testando as frações com atividade antitrombótica pelo ensaio da euglobulina.....	66
Figura 45: Fracionamento da hidrolise das proteínas do soro de leite nativa por MonoQ testando as frações com atividade antitrombótica pelo ensaio da euglobulina.	67
Figura 46: Ação anticoagulante dose-dependente. Atividade anticoagulante da fração (M3) com maior atividade obtida da cromatografia (MonoQ), a diferentes concentrações.	68
Figura 47: Análise analítica por HPCL de fase reversa (C18) da fração M2 a 220nm resultante da MonoQ.....	69
Figura 48: Análise analítica por HPCL de fase reversa (C18) da fração M3 a 220nm resultante da MonoQ.....	70
Figura 49: Análise analítica por HPCL de fase reversa (C18) a 220nm do tampão realizado na cromatografia MonoQ.....	70

Lista de Abreviaturas e Siglas

β -Lg -	β -lactoglobulina
α -Lac -	α -Lactoalbumina
BCAA -	Aminoácidos de cadeia ramificada
BSA -	Albumina de soro bovino
PSC -	Proteínas do Soro do leite Comercial
PSN -	Proteínas do Soro do leite Nativa
PSL -	Proteínas do Soro do leite
WPI -	Isolados Proteicos do Soro
FPLC -	Cromatografia Líquida da Proteína Rápida
LB -	Caldo Nutritivo
DBO -	Demanda Bioquímica de Oxigénio
Ig -	Imunoglobulinas
DF -	Diafiltração
UF -	Ultrafiltração

Resumo

As proteínas do soro do leite são uma fonte de péptidos bioativos capazes de modular respostas fisiológicas no organismo. A melhor forma de obter estes péptidos bioativos é através da hidrólise enzimática. Neste estudo selecionou-se 3 bactérias produtoras de serina proteases (2 *Bacillus cereus*, isolados s3B e s10B; 1 *B. mycooides*, isolado s102A), pertencentes ao banco de bactérias da Universidade dos Açores. Os extratos enzimáticos dos isolados foram produzidos em meio mínimo salino e meio mínimo suplementado com proteína do soro do leite, utilizando bactérias em suspensão e bactérias imobilizadas. Os extratos enzimáticos produzidos foram usados para hidrolisar as proteínas do soro do leite comercial e proteínas diretamente separadas do soro do leite de uma indústria local produtora de queijo (UNILEITE). Esses hidrolisados foram fracionados por exclusão molecular (Superdex 75) num sistema de FPLC e testados para atividade antibacteriana, antioxidante e antitrombótica. Foi identificada a atividade antibacteriana contra *Micrococcus luteus* numa fração de 4 a 10.5 kDa do isolado s10B, obtendo-se um halo de 2 mm com 69.4 µg de proteína. Usou-se os testes DPPH e ABTS para testar a atividade antioxidante. Os hidrolisados obtidos com os 3 isolados produziram uma fração peptídica de 1.2 kDa com atividade antioxidante superior a 70% a uma concentração de 25 µg/ml de proteína. O IC50 da fração obtida com as enzimas dos isolados s3B, s10B e s102A foi calculado em 18.85, 18.35 e 15.44 µg/ml, respetivamente. A atividade inibidora da lise do coágulo foi obtida pela medição do retardamento do tempo de lise da euglobulina. Todos os hidrolisados das proteínas do soro do leite testados produziram atividade inibidora da trombólise. A maior atividade foi obtida na fração peptídica de 3.5 e 10.7 kDa do hidrolisado obtido com o isolado s102A, com retardamento superior a 3 horas na lise do coágulo, em comparação com controlo. A atividade inibidora da coagulação foi medida também pelo ensaio da euglobulina. Neste teste, a mesma fração do isolado s102A (3.5 e 10.7 kDa) apresentou uma atividade inibitória da formação de coágulo com um IC50 de 27.75 e depois de parcialmente purificada por troca iónica, apresentou um IC50 de 7.91 µg/ml.

As atividades identificadas no presente trabalho têm grande potencial de aplicação Biotecnológica. Os péptidos antimicrobianos e antioxidantes poderão ser incorporados em alimentos, para aumentar o seu tempo de prateleira, e os péptidos com atividade anticoagulante poderão ser utilizados como suplemento alimentar ou no fabrico de alimentos funcionais.

Abstract

Whey proteins are a source of bioactive peptides able to modulate physiological responses in the body. The best way to get these bioactive peptides by enzymatic hydrolysis. In this study, we selected 3 serine protease-producing bacteria (2 *Bacillus cereus*, isolated s3B and s10B; 1 *b. mycooides*, isolated s102A), belonging to the bacteria at the University of the Azores. The enzymatic extracts of the isolates were produced in minimal saline medium and minimal medium supplemented with whey protein, using suspended bacteria and immobilized bacteria. The enzymatic extracts produced were used to hydrolyze commercial whey proteins and proteins directly separated from whey from a local cheese-making industry (UNILEITE). These hydrolysates were fractionated by molecular exclusion (Superdex 75) a FPLC system and tested for antimicrobial activity, antioxidant and Antithrombotic. It was identified the antibacterial activity against *Micrococcus luteus* at a fraction of the 4 to 10.5 isolate s10B kDa, with a halo of 2 mm with 69.4 µg of protein. It used the DPPH test and ABTS to test the antioxidant activity. The hydrolysates obtained with the 3 isolates produced a peptide fraction of 1.2 kDa with antioxidant activity greater than 70% at a concentration of 25 µg/ml of protein. The IC₅₀ of the fraction obtained with the enzymes of the s3B, s10B and s102A isolates was calculated at 18.85, 18.35 and 15.44 µg/ml, respectively. The inhibitory activity of clot Lysis was obtained by measuring the time delay of lysis of euglobulin. All hydrolyzed whey proteins tested produced inhibitory activity of thrombolysis. The highest activity was obtained in the peptide fraction of 3.5 and 10.7 kDa of the hydrolysate obtained with isolated s102A, exceeding 3 hours delay in lysis of the clot, compared with control. Coagulation inhibitor activity was measured by the euglobulin assay. In this test, the same fraction of isolated s102A (3.5 and 10.7 kDa) presented an inhibitory activity of clot formation with an IC₅₀ of 27.75 and after partially purified by ion exchange, presented an IC₅₀ of 7.91 µg/ml.

The activities identified in this study have great potential to Biotechnology application. Antimicrobial peptides and antioxidants could be incorporated in food, to increase the time of your shelf, and peptides with Anticoagulant activity can be used as a food supplement or in the manufacture of functional foods.