

Imobilização da pancreatina em carvão ativado e em alumina para o preparo de hidrolisados de soro de leite

Viviane Dias Medeiros Silva, Letícia Missagia De Marco, Fernanda Meneghello Delvivo, José Virgílio Coelho e Marialice Pinto Coelho Silvestre*

Laboratório de Bromatologia, Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: malice@farmacia.ufmg.br

RESUMO. Tendo como objetivo a redução de custos do processo de fabricação de hidrolisados protéicos, estudou-se neste trabalho a imobilização da pancreatina, por adsorção, em carvão ativado e em alumina. Para isso, foram testadas diferentes condições de imobilização (30, 60 e 90min a 25°C, e 12h a 5°C). Para verificar a taxa de imobilização, determinou-se indiretamente a enzima não adsorvida nos suportes. Ao se utilizar o carvão ativado, não foi observada diferença significativa entre as condições testadas, tendo-se obtido 100% de imobilização enzimática. Para a alumina, a melhor condição foi a de 90min, na qual se obteve 37% de imobilização. A medida do grau de exposição da fenilalanina, pela espectrofotometria derivada segunda, foi empregada para a determinação da estabilidade operacional da enzima, tendo sido mostrado que a imobilização em carvão ativado e em alumina permitiu a reutilização da pancreatina por até 5 vezes e 2 vezes, respectivamente.

Palavras-chave: pancreatina, imobilização enzimática, carvão ativado, alumina, estabilidade operacional.

ABSTRACT. Immobilization of pancreatin in activated carbon and in alumina for preparing whey hydrolysates. Immobilization of pancreatin in activated carbon and in alumina was studied for producing protein hydrolysates, in order to reduce the process costs. Different immobilization conditions were tested (30, 60 and 90min at 25°C, and 12h at 5°C). For estimating the immobilization rate the amount of the non-adsorbed enzyme on the supports was indirectly determined. When activated carbon was used, no significant difference was observed among the tested conditions, obtaining 100% of enzymatic immobilization. In case of alumina, the best condition showed to be the 90min treatment which produced 37% of immobilization. The evaluation of the degree of exposition of phenylalanine, by second derivative spectrophotometry, was used for the determination of the enzyme operational stability, and showed that the immobilization in activated carbon and in alumina allowed the reusability of the pancreatin for 5 times and 2 times, respectively.

Key words: pancreatin, enzymatic immobilization, activated carbon, alumina, operational stability.

Introdução

As proteínas estão entre os principais constituintes do alimento. Elas podem ser modificadas enzimaticamente para melhorar suas propriedades nutricionais e funcionais e isso é responsabilidade de um grupo de enzimas hidrolíticas, as proteases ou enzimas proteolíticas. Estas enzimas têm importância particular na ciência de alimentos e são usadas extensivamente na indústria de alimentos (Whitaker, 1994; Huang *et al.*, 1995), especialmente no preparo de hidrolisados protéicos com diversas finalidades dietéticas (Boza *et al.*, 1995; Netto e Galeazzi, 1998; Clemente, 2000; Morato *et al.*, 2000; Lopes *et al.*, 2002a,b; Carreira *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2004).

Hidrolisados protéicos apresentam propriedades que os tornam atrativos como fonte de proteína na nutrição humana, sendo fisiologicamente melhores do que as proteínas intactas, uma vez que os oligopeptídeos, principalmente di- e tripeptídeos, são melhores absorvidos pelo organismo e apresentam melhor balanço de aminoácidos quando comparados a misturas de aminoácidos livres (Smith *et al.*, 1975; Grimble *et al.*, 1986; Ziegler *et al.*, 1990; Shimamura *et al.*, 1999). Além disto, as soluções de hidrolisados protéicos contendo di- e tripeptídeos têm uma osmolalidade menor do que as soluções de aminoácidos livres e, por isto, são melhor toleradas por indivíduos com dificuldade de absorção (Furst *et al.*, 1990; Gonzáles-Tello *et al.*, 1994). Também, a

imunogenicidade de hidrolisados protéicos é menor do que a apresentada por proteínas e peptídeos de elevado peso molecular (Takase *et al.*, 1979). Assim, hidrolisados protéicos são muito utilizados na alimentação de pessoas que apresentam dificuldades na absorção de proteínas, como idosos e crianças com diarreia, com fibrose cística (Smithers e Bradford, 1991; Aubes-Dufau *et al.*, 1995), com necessidade aumentada de proteínas, como os atletas (Frøkjær, 1994) e com desordens na metabolização de aminoácidos, como os fenilcetonúricos (Clemente, 2000).

Dentre as diversas fontes protéicas que podem ser utilizadas no preparo de hidrolisados protéicos, a caseína é a escolhida na maioria dos casos (Lopez-Bajonero *et al.*, 1991; Outinen *et al.*, 1996; Shimamura *et al.*, 1999). Entretanto, no Brasil, essa proteína normalmente é importada, o que eleva os custos de produção. Assim, fontes protéicas alternativas devem ser investigadas, tais como o soro de leite, que constitui o mais importante subproduto da indústria de laticínios, sendo considerado um grande poluente ambiental (Barros *et al.*, 2001; Lamas *et al.*, 2001).

A pancreatina, um complexo enzimático obtido do pâncreas, é constituída principalmente pela tripsina, quimotripsina e carboxipeptidases A e B (Yamamoto, 1975). A distribuição dos peptídeos e aminoácidos livres presentes nos hidrolisados depende da especificidade dessas enzimas proteolíticas. A fonte, bovina ou suína, assim como os métodos de purificação usados, influenciam a composição e a estabilidade dessas preparações enzimáticas (Mullally *et al.*, 1994). Como as proteases apresentam elevado custo, especialmente aquelas com alto grau de pureza, é necessário desenvolver estratégias que produzirão estabilidade estrutural e funcional das enzimas, além de reduzir os custos operacionais na indústria (Barros *et al.*, 2003). Uma forma de atingir esses objetivos é através da imobilização enzimática, que consiste em aprisionar ou ligar a enzima em uma fase diferenciada (suporte) que, mesmo estando separada, mantém contato com as moléculas do substrato em solução (Trevan, 1990). Proteases podem ser imobilizadas sem maiores perdas da atividade catalítica, podendo reter essa atividade por um maior tempo que as enzimas livres (Vanková *et al.*, 2001; Barros *et al.*, 2003).

Vários métodos de imobilizar enzimas são conhecidos. Os mais usados são a inclusão (em géis, membranas semipermeáveis ou vesículas), a adsorção (via interações hidrofóbicas e iônicas) e a ligação covalente. A imobilização por adsorção é o

método mais simples e é certamente o que oferece as condições experimentais mais suaves para obter o complexo enzima-suporte. Por causa dos tipos de forças envolvidas na adsorção de enzimas em sólidos, parâmetros como pH, força iônica e temperatura devem ser controlados. Também, a natureza da enzima e do suporte influencia a quantidade adsorvida e a atividade do complexo formado (Zoungrana *et al.*, 1997). As características desejáveis a um suporte são grande área superficial, boa estabilidade química, mecânica e térmica, hidrofiliabilidade e insolubilidade (Hsieh *et al.*, 2002).

A alumina é amplamente usada como suporte hidrofílico para adsorção de enzimas devido ao seu baixo custo, disponibilidade, estabilidade em ampla faixa de pH, superfície química e versatilidade na configuração (Dinnella *et al.*, 1997). O carvão ativado é um suporte hidrofóbico com uma ampla área superficial e sua estrutura contém diversos grupos funcionais. Sua ativação se dá por dois métodos: a pirólise (carbonização) e a ativação química (Matisová e Skrabáková, 1995; Cuno, 2002). Os principais mecanismos de ligação no carvão dependem do tipo de processo de ativação. Assim, quando o carvão é ativado por pirólise, haverá apenas interações hidrofóbicas, enquanto que ao sofrer a ativação química, outros tipos de ligação entrarão em jogo, como a complexação por transferência de carga, a ligação de hidrogênio, a troca de cátion e outras interações específicas. A superfície do carvão ativado possui alta capacidade de adsorção, mas é muito heterogênea (Matisová e Skrabáková, 1995).

A quantidade de enzima imobilizada é, geralmente, determinada pelo decréscimo do teor protéico após o contato da solução enzimática com o suporte (Nakanishi *et al.*, 2001). A concentração protéica pode ser determinada por várias técnicas, dentre elas pode-se citar o método de Lowry *et al.* (1951) e de Bradford (1976).

O estudo da estabilidade operacional da enzima imobilizada, que permite avaliar a manutenção da sua atividade ao longo de repetidas utilizações, apresenta grande importância, principalmente quando o interesse estiver voltado para sua aplicação em escala industrial. Uma forma comum de determinar a estabilidade operacional consiste em quantificar a atividade residual da enzima após cada utilização (Zhuang e Butterfield, 1992; Lin *et al.*, 2002).

Com a hidrólise enzimática, resíduos de aminoácidos são expostos, sendo que o grau de exposição pode ser avaliado pela espectrofotometria derivada segunda (EDS), uma vez que, como demonstrado por Silvestre *et al.* (1993), a intensidade

dos picos negativos, no espectro de derivada segunda de proteínas e peptídeos, está relacionada com a exposição dos aminoácidos aromáticos, sendo tanto maior quanto mais próximo o grupamento aromático estiver da posição C- ou N-terminal.

O presente trabalho teve como objetivos imobilizar a pancreatina, por adsorção, em carvão ativado e em alumina; determinar a taxa de imobilização enzimática e avaliar a estabilidade operacional da pancreatina imobilizada.

Material e métodos

A pancreatina suína (P-1500), o carvão ativado (20-60 mesh não tratado, granulado), a alumina (Tipo A-5) e os aminoácidos L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano foram adquiridos da Sigma Chemical (St. Louis, MO, EUA). O soro de leite em pó foi fornecido pela Prolácteos Indústria e Comércio Ltda (Contagem, Estado de Minas Gerais, Brasil). Os demais reagentes foram de grau analítico.

Imobilização da pancreatina

A pancreatina foi imobilizada por adsorção a dois suportes: carvão ativado (CA) e alumina (AL). Para isto, foram colocados em um béquer 10 g do suporte e 50 mL de solução enzimática a 0,1% (p/v) em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,5. Deixou-se em contato por 30min, 60min e 90min, a 25°C, e por 12h a 5°C. Centrifugou-se a 11.000 x g por 20min, a 25°C (Centrífuga Jouan, modelo BR4i, França). Foram preparados brancos, utilizando tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,5, no lugar da solução enzimática, nas mesmas condições.

Determinação da taxa de imobilização enzimática

Os complexos enzima/suporte foram filtrados em papel de filtro quantitativo a vácuo (Aspirador Diapump, Fanem, modelo 089-A, São Paulo, Brasil). Os filtrados foram recolhidos, assim como as águas de lavagem (três porções de 50,0 mL de água destilada) para a determinação da proteína que não foi adsorvida aos suportes. Para isto, foi utilizado o método de Lowry *et al.* (1951) modificado por Hartree (1972), usando albumina sérica bovina como padrão. O mesmo método foi utilizado para a determinação do teor protéico da solução enzimática a 0,1%. A quantidade de proteína ligada foi determinada indiretamente pela diferença entre a quantidade de proteína adicionada e a quantidade de proteína presente no filtrado e nas soluções de lavagem após a imobilização. Para se encontrar a taxa de imobilização enzimática, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de enzima imobilizada} = \frac{\text{quantidade da enzima imobilizada (g)}}{\text{quantidade da enzima adicionada (g)}} \times 100 \quad (1)$$

Determinação da estabilidade operacional da pancreatina imobilizada

Para se avaliar a manutenção da atividade catalítica da enzima imobilizada nos dois suportes, estabelecendo a sua capacidade de reutilização, empregou-se a medida do grau de exposição da fenilalanina nos hidrolisados, através da Espectrofotometria Derivada Segunda. O grau de exposição corresponde ao teor da Phe exposta pela hidrólise enzimática.

Inicialmente, a pancreatina foi imobilizada, como descrito no item anterior, sendo utilizada na avaliação da eficiência a condição que levou à maior taxa de imobilização.

Em seguida, preparou-se uma solução de soro de leite em pó a 10% (p/v) em tampão fosfato 0,01 mol/L, pH 7,5. A 20 mL desta solução foi adicionado o complexo enzima/suporte para obter a relação enzima:substrato de 1%. Esta suspensão foi agitada por uma hora em agitador magnético (Fisatom, São Paulo, Brasil), a 25°C e a uma velocidade suficiente para manter o complexo em suspensão. Em seguida, centrifugou-se a 11.000 x g por 20min a 25°C, e filtrou-se em papel de filtro quantitativo, a vácuo. Os complexos enzima/suporte retidos no filtro foram lavados com três porções de 5,0 mL de água destilada, e reutilizados em hidrólises sucessivas, obtendo-se vinte hidrolisados. Após a liofilização (Liofilizador Free Zone, modelo 77500, Labconco, Kansas City, MI, EUA), os hidrolisados das 1ª, 2ª, 5ª, 10ª, 15ª e 20ª utilizações da enzima imobilizada foram submetidos à determinação do grau de exposição por espectrofotometria derivada segunda.

Determinação do grau de exposição por espectrofotometria derivada segunda

Para a determinação do grau de exposição pela espectrofotometria derivada segunda, preparou-se, inicialmente, uma curva padrão de fenilalanina (Phe) na presença de tirosina (Tyr) e triptofano (Trp). Para tal, soluções estoque dos aminoácidos aromáticos, Phe, Tyr e Trp, foram preparadas em tampão fosfato de sódio 0,01 mol/L (pH 6,0), nas concentrações de $6,05 \times 10^{-4}$ mol/L; $5,52 \times 10^{-4}$ mol/L e $4,90 \times 10^{-4}$ mol/L, respectivamente. Em seguida, pipetou-se 10 mL de cada uma destas soluções para um erlenmeyer de 50 mL, sendo a mistura homogeneizada por agitação. A partir desta solução foram preparadas, por diluições sucessivas, soluções contendo Phe em concentrações variando de 0,067 a $2,018 \times 10^{-4}$ mol/L. Estas soluções foram, então, submetidas às

leituras de absorvância na faixa de 250 a 280 nm (espectrofotômetro CECIL modelo CE2041, Buck Scientific, Inglaterra). Os espectros de derivada segunda foram traçados em computador com o software GRAMS-UV (Galactic Industries Corporation, Salem, NH, EUA), acoplado ao espectrofotômetro (espectrofotômetro CECIL modelo CE2041, Buck Scientific, Inglaterra). Para se traçar a curva padrão foram selecionados a área e a altura do terceiro (c) e do quarto (d) picos (Figura 1), sendo escolhida a que apresentou o maior coeficiente de determinação (R^2).

Para medir o grau de exposição nas amostras, primeiramente, os hidrolisados liofilizados das 1^a, 2^a, 5^a, 10^a, 15^a e 20^a utilizações da enzima imobilizada foram dissolvidos em água purificada, na concentração de 0,8 g/100 mL. Em seguida, ajustou-se o pH dessas amostras para 6,0 com solução de fosfato de sódio monobásico 1 mol/L. Traçaram-se os espectros dos hidrolisados, na mesma faixa de comprimento de onda da curva padrão. Posteriormente, calculou-se a derivada segunda e mediram-se os valores de área ou altura dos picos escolhidos acima, para encontrar a concentração de Phe pela equação da reta.

Análise estatística

Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA fator único) e o Teste de Duncan com 5% de probabilidade. A análise de regressão foi utilizada para a determinação da curva padrão (Pimentel-Gomes, 2000)

Resultados e discussão

Taxa de imobilização da pancreatina

Observa-se na Tabela 1 que o tipo de suporte empregado influenciou a taxa de imobilização, sendo bem superior para o carvão ativado (CA) (96% a 100%) em comparação com a alumina (AL) (8% a 37%), para todas as condições testadas.

Tabela 1. Taxa de imobilização da pancreatina.

Condições de imobilização	Suportes de imobilização	
	Carvão ativado Imobilização (%)	Alumina Imobilização (%)
30 min / 25°C	100 ^{a1}	17 ^{b2}
60 min / 25°C	96 ^{a1}	11 ^{b2}
90 min / 25°C	96 ^{a1}	37 ^{a2}
12 h / 5°C	99 ^{a1}	8 ^{c2}

Os resultados representam a média das triplicatas. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de um mesmo suporte para diferentes condições de imobilização. Médias indicadas por números iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação entre diferentes suportes submetidos ao mesmo tratamento.

Este resultado poderia ser explicado pelo fato de

que, segundo Nakanishi *et al.* (2001), proteínas com elevada estabilidade estrutural (proteínas “hard”), adsorvem mais facilmente em suportes hidrofóbicos, como é o caso do carvão ativado do que em hidrofílicos (alumina). A pancreatina poderia, pelo menos em parte, se enquadrar neste tipo de proteína, pois um dos seus principais componentes, a quimotripsina, é considerada uma proteína “hard” (Nakanishi *et al.*, 2001).

Nota-se, ainda, nesta mesma tabela que quando se utilizou o CA como suporte, não houve diferença significativa entre as taxas de imobilização para todas as condições testadas. Assim sendo, a condição de 30min (a 25°C) para o CA foi a escolhida para a avaliação da eficiência da hidrólise, por ser a mais vantajosa do ponto de vista econômico. Ao se utilizar AL, a condição escolhida foi a de 90min (a 25°C), uma vez que proporcionou a maior taxa de imobilização.

Não foram encontrados na literatura relatos sobre a imobilização da pancreatina em suportes sólidos. Nos estudos que tratam sobre imobilização enzimática, foram utilizadas, separadamente, as enzimas que compõem a pancreatina: tripsina, quimotripsina e carboxipeptidases A e B. Em um desses estudos, a tripsina foi imobilizada no polímero Eudragit S-100, por adsorção, obtendo-se 99% de enzima ligada nas concentrações de 2 – 4% do polímero (Sardar *et al.*, 1997), resultado muito superior ao apresentado no presente trabalho ao imobilizar a pancreatina em AL. Vanková *et al.* (2001) imobilizaram a α -quimotripsina de pâncreas bovino em diferentes suportes contendo resíduos de sacarídeos, e a melhor taxa de imobilização, que foi de 30%, foi obtida com o copolímero α -galactosil-poliacrilamida, valor esse superior ao obtido nesse estudo com a pancreatina imobilizada em AL, para a maioria das condições testadas. Com a carboxipeptidase A imobilizada em polietileno tereftalato, Vértesi *et al.* (1999) obtiveram 70% de imobilização, resultado este inferior ao obtido nesse trabalho com o CA.

Espectrofotometria derivada segunda: espectros e curva padrão

A curva padrão de Phe escolhida refere-se a que foi traçada empregando-se a área do pico “c” (Figura 1), pois esta apresentou o maior coeficiente de determinação (R^2) quando comparado à altura. Constatou-se, também, que a regressão linear para Phe foi altamente significativa ($p < 0,01$). A equação da reta e o coeficiente de determinação obtidos foram os seguintes: $y = 3,0077x + 0,7587$ e $R^2 = 0,9576$. Outros autores também relataram resultados

semelhantes ao relacionarem a área e/ou altura do pico de adsorção de Phe, em mistura de Tyr e Trp, com a concentração de Phe (Zhao *et al.*, 1996; Ichikawa e Terada, 1977). O mesmo resultado foi observado em estudos anteriormente realizados no mesmo laboratório onde foi realizado o presente trabalho (Barbosa *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2002a; Morais *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2004). No entanto, alguns autores encontraram números de picos negativos, no espectro de Phe, diferentes aos deste estudo (Ichikawa e Terada, 1977; Miclo, 1995). Segundo Levillain e Fompeydie (1986), esta variação no espectro da Phe poderia estar associada às diferenças nas formas utilizadas do aminoácido padrão (livre ou N-acetil éster), na aparelhagem empregada, em especial o espectrofotômetro e o software, como também no tipo de solvente e valores de pH.

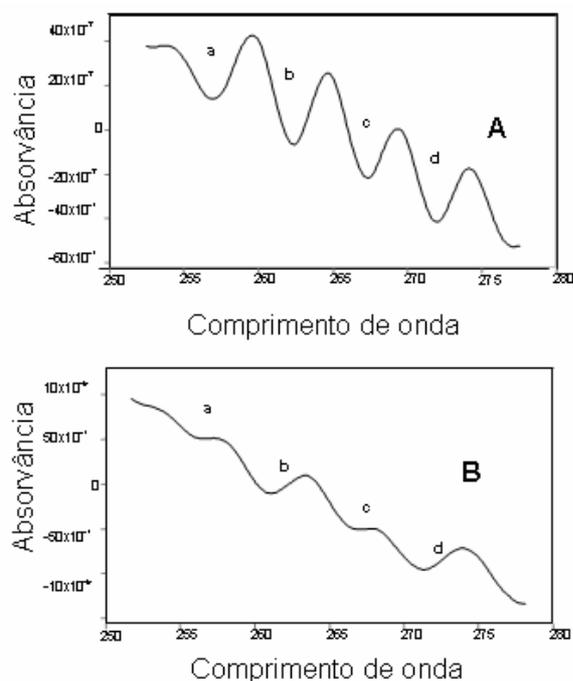


Figura 1. Espectros de derivada segunda. (A) da Phe em pH 6,0, na presença de Tyr e de Trp; (B) do hidrolisado H2 em pH 6,0.

Observa-se, ainda, na Figura 1 que o espectro do hidrolisado H2 assemelha-se ao da Phe padrão, com quatro picos negativos situados em comprimentos de onda similares, representados pelas letras “a”, “b”, “c” e “d”. Ichikawa e Terada (1979) também relataram esta semelhança entre os espectros de aminoácidos padrões e o de proteína, ao empregar a EDS para determinar a quantidade de resíduos de Phe em diversas proteínas desnaturadas ou nativas. Resultados similares já haviam sido obtidos no mesmo laboratório onde foi realizado o presente

trabalho, ao estudar os espectros de absorvância e de derivada segunda de hidrolisados enzimáticos de caseína (Barbosa *et al.*, 2002), assim como de leite em pó desnatado (Lopes *et al.*, 2002a; Soares *et al.*, 2004).

Estabilidade operacional da pancreatina imobilizada

Os dados de Tabela 2 indicam que não houve diferença significativa entre os valores de grau de exposição (GE) da fenilalanina, ao se utilizar a pancreatina imobilizada em CA por 1, 2 e 5 vezes, o que indica que seria possível utilizar esta enzima, nestas condições, por pelo menos 5 vezes e, ainda, na 20ª utilização a enzima apresentou 65% de sua atividade inicial.

Tabela 2. Estabilidade operacional da pancreatina imobilizada em carvão ativado e em alumina.

Número de vezes de utilização da enzima imobilizada	Suportes de imobilização			
	Carvão ativado		Alumina	
	GE	Atividade catalítica (%)	GE	Atividade catalítica (%)
1	59 ^{a/2}	100	176 ^{a/1}	100
2	59 ^{a/2}	100	180 ^{a/1}	100
5	62 ^{a/2}	100	143 ^{b/1}	82
10	50 ^{b/2}	83	153 ^{b/1}	82
15	36 ^{c/2}	65	142 ^{b/1}	82
20	42 ^{c/2}	65	119 ^{c/1}	67

GE = Grau de exposição de Phe, em mg Phe / 100 g de hidrolisado. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação entre diferentes hidrólises utilizando um mesmo complexo enzima/suporte. Médias indicadas por números iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação entre os dois complexos enzima/suporte em um mesmo número de utilização da enzima imobilizada.

Deve-se ressaltar que, embora Whitaker (1996) afirme que as enzimas imobilizadas podem ser reutilizadas até atingir 50% da sua atividade inicial, no presente trabalho a enzima foi considerada adequada enquanto manteve sua atividade máxima, uma vez que, no preparo de formulações dietoterápicas destinadas à alimentação de fenilcetonúricos, é importante a manutenção do grau de hidrólise, de forma a se garantir alto grau de remoção de fenilalanina.

Com relação à imobilização em AL, o mesmo ocorreu até duas vezes, sendo que na 20ª utilização a enzima apresentou 67% de sua atividade inicial. Estes resultados revelam ligeira superioridade do CA em relação a AL.

Estes resultados evidenciam a importância da imobilização enzimática do ponto de vista econômico, podendo contribuir para a redução dos custos do processamento, principalmente quando o interesse estiver voltado para a utilização de enzimas em escala industrial.

No único trabalho encontrado na literatura abordando a estabilidade operacional de uma das enzimas presentes na pancreatina, os relatos sobre os resultados obtidos são bastante vagos. Assim, Nouaimi *et al.* (2001) descreveram que a tripsina,

imobilizada em lã de poliéster utilizando a albumina sérica bovina como espaçador, manteve sua atividade quase constante por uma semana. Entretanto, os autores não mencionaram o número de vezes, neste período, que a enzima foi utilizada.

Conclusão

Dentre as condições testadas para a imobilização da pancreatina em alumina, a que empregou 90min de contato, a 25°C, foi a mais favorável (37% de imobilização). Entretanto, para o carvão ativado, não houve diferença significativa entre as condições testadas, tendo sido imobilizada a totalidade da enzima adicionada (96-100%). A imobilização em CA permitiu a reutilização da enzima por pelo menos 5 vezes, enquanto que com a AL o máximo atingido foi de pelo menos 2 vezes.

Agradecimentos

Este trabalho contou com o apoio financeiro das agências Fapemig, Capes e Cnpq nas formas de auxílio à pesquisa e bolsas de Mestrado e de Iniciação Científica.

Referências

- AUBES-DUFAU, I. *et al.* Production of peptic hemoglobin hydrolysates: bitterness demonstration and characterization. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, D.C., v. 43, p. 1982-1988, 1995.
- BARBOSA, C.M.S. *et al.* Padronização de método analítico para avaliação do grau de exposição da fenilalanina em hidrolisados de caseína, por espectrofotometria derivada segunda. *Rev. Bras. Cienc. Farmac.*, São Paulo, v. 38, p. 113-119, 2002.
- BARROS, R.M. *et al.* Quantitative studies on the enzymatic hydrolysis of milk proteins brought about by cardosins precipitated by ammonium sulfate. *Enz. Microb. Technol.*, Stoneham, v. 29, p. 541-547, 2001.
- BARROS, R.M. *et al.* Hydrolysis of α -lactalbumin by cardosin A immobilized on highly activated supports. *Enz. Microb. Technol.*, Stoneham, v. 33, p. 908-916, 2003.
- BOZA, J.J. *et al.* Nutritional and antigenic characterization of an enzymatic whey protein hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, D.C., v. 43, p. 872-875, 1995.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation on microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, San Diego, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CARREIRA, R.L. *et al.* otimização da hidrólise da caseína para elevar o teor de pequenos peptídeos: emprego da pepsina. *Cienc. Agrotecnol.*, Lavras, v. 27, p. 625-634, 2003.
- CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.*, Cambridge, v. 11, p. 254-262, 2000.

CUNO. Zeta Carbon: Activated carbon filter cartridges. [mensagem pessoal]. Mensagem enviada por: <<http://www.cuno.com>> em 11 ago. 2002.

DINNELLA, C. *et al.* Pectolytic enzymes co-immobilization on γ -alumina spheres via organophosphate compounds. *Process Biochem.*, Edinburgh, v. 32, p. 715-722, 1997.

FRØKJAER, S. Use of hydrolysates for protein supplementation. *Food Technol.*, Chicago, v. 48, p. 86-88, 1994.

FURST, P. *et al.* Dipeptides in clinical nutrition. *Proc. Nutr. Soc.*, New York, v. 49, p. 343-359, 1990.

GONZÁLEZ-TELLO, P. *et al.* Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular - weight range. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, v. 44, p. 529-532, 1994.

GRIMBLE, G.K. *et al.* Effect of peptide chain length on amino acids and nitrogen absorption from two lactalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin. Sci.*, London, v. 71, p. 65-69, 1986.

HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, San Diego, v. 45, p. 422-427, 1972.

HSIEH, Y.L. *et al.* Functional fibers for immobilization of biomolecules. National Textile Center Annual Report: M02-CD05; Novembro, 2002. Disponível em: <<http://www.ntcresearch.org/pdf-rpts/AnRp02/M02-CD05-A2.pdf>>. Acesso em: 06 out. 2003.

HUANG, X.L. *et al.* Immobilization of biotinylated transglutaminase by bioselective adsorption to immobilized avidin and characterization of the immobilized activity. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, D.C., v. 43, p. 895-901, 1995.

ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Second derivative spectrophotometry as an effective tool for examining phenylalanine residues in proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.494, p.267-270, 1977.

ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Estimation of state and amount of phenylalanine residues in proteins by second derivative spectrophotometry. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 580, p. 120-128, 1979.

LAMAS, E.M. *et al.* Hydrolysis of whey proteins by proteases extracted from *Cynara cardunculus* and immobilized onto highly activated supports. *Enz. Microb. Technol.*, Stoneham, v. 28, p. 642-652, 2001.

LEVILLAIN, P.; FOMPEYDIE, D. Spectrophotométrique dérivée: intérêt, limites et applications. *Analysis*, Oxford, v. 14, p. 1-20, 1986.

LIN, H. *et al.* Preparation of chitosan oligomers by immobilized papain. *Enz. Microb. Technol.*, Stoneham, v. 31, p.588-592, 2002.

LOPEZ-BAJONERO, L.J. *et al.* Enzymatic production of a low-phenylalanine product from skim milk powder and caseinate. *J. Food Sci.*, Chicago, v. 56, p. 938-942, 1991.

LOPES, D.C.F. *et al.* Uso do carvão ativado para retirada de fenilalanina de hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado para fenilcetonúricos. *Rev. Bras. Nutr. Clín.*, São Paulo, v. 17, p. 130-136, 2002a.

- LOPES, D.C.F. *et al.* Hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado como fonte de oligopeptídeos para formulações dietéticas. *Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. = J. Braz. Soc. Food Nutr.*, São Paulo, v. 24, p. 51-70, 2002b.
- LOWRY, O.H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MATISOVÁ, E.; ŠKRABÁKOVÁ, S. Carbon sorbents and their utilization for the preconcentration of organic pollutants in environmental samples. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 707, p. 145-179, 1995.
- MICLO, L. *et al.* Determination of the ratios of the aromatic amino acids residues by first- or second-derivative UV spectrometry for a simple characterization of peptides. *Int. J. Pep. Prot. Res.*, Haguenau, v. 46, p. 186-192, 1995.
- MORAIS H.A. *et al.* Caracterização do perfil peptídico e de aminoácidos em hidrolisados de caseína. *Arch. Lat. Am. Nutr.*, Caracas, v. 52, p. 77 - 83, 2002.
- MORATO, A.F. *et al.* Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. *J. Food Comp. Anal.*, Rome, v. 13, p. 843-857, 2000.
- MULLALLY, M.M. *et al.* Proteolytic and peptidolytic activities in coercial pancreatic protease preparations and their relationship to some whey protein hydrolysate characteristics. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, D.C., v. 42, p. 2973-2981, 1994.
- NAKANISHI, K. *et al.* On the adsorption od proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *J. Biosc. Bioeng.*, Tóquio, v.9 1, p. 233-244, 2001.
- NETTO, F.M.; GALEAZZI, M.A.M. Pruduction and characterization of enzymatic hydrolysate from soy protein isolate. *Lebensm. Wiss. Technol.*, Zürich, v. 31, p. 624-631, 1998.
- NOUAIMI, M. *et al.* Immobilization of tripsin on polyester fleece via different spacers. *Enz. Microb. Technol.*, Stoneham, v. 29, p. 567-574, 2001.
- OUTINEN, M.T. *et al.* Method for removing phenylalanine from proteinaceous compositions, a product obtained and use thereof. *Patents Us* 5547687. 1996.
- PIMENTEL-GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. 14. ed. Piracicaba: Nobel, 2000.
- SARDAR, M. *et al.* Noncovalent immobilization of enzymes on na enteric polymer eudragit s-100. *Enz. Microb. Technol.*, Stoneham, v. 20, p. 361-367, 1997.
- SHIMAMURA, S. *et al.* *Peptide mixture and products thereof*. Morinaga Milk Industry Co., Ltd., Tokio, Japan, Patents US 5952193, A23C 21/02; A23C 21/04; A23C 21/06; A61K 38/01. 14/04/1997; 14/09/1999.
- SILVESTRE, M.P.C. *et al.* Application of UV absorpction and second-derivate spectrophotometry for analysing casein hidrolysates. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v. 282, p. 603-612, 1993.
- SMITH, I. *et al.* Comparison of an amino acid mixture and protein hydrolysates in treatment of infants with phenylketonuria. *Arch. Dis. Child.*, Stanford, v. 50, p. 864-870, 1975.
- SMITHERS, G.; BRADFORD, R.S. *New casein products: fresh opportunities for the dairy industry, food res. Quart.*, Stanford, v. 51, p. 92-98, 1991.
- SOARES, R.D.L. *et al.* Formulações dietéticas para fenilcetonúria à base de hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado. *Cienc. Tecnol. Alim.*, Campinas, 2004 (no prelo).
- TAKASE, M. *et al.* Antigenicity of casein enzymatic hydrolysate. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v. 62, p. 1570-1576, 1979.
- TREVAN, M.D. Aplicaciones de los enzimas. In: TREVAN, M.D. *et al.* (Ed.). *Biocología: principios biológicos*. Zaragoza: Acribia, 1990.
- VAŇKOVÁ, H. *et al.* Reversed-phase high-performance liquid chromatography of peptides of porcine pepsin prepared by the use of various forms of immobilized α -chymotrypsin. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 753, p. 37-43, 2001.
- VÉRTESEI, A. *et al.* preparation, characterization and application of immobilized carboxypeptidase a. *Enz. Microb. Technol.*, Stoneham, v. 25, p. 73-79, 1999.
- WHITAKER, J. R. *Principles of enzymology for the food science*. 2. ed. California: Marcel Dekker, 1994.
- YAMAMOTO, A. Proteolytic enzymes. In: REED, G. (Ed.). *Enzimes in food processing*. 2. ed. London: Academic Press, 1975.
- ZHAO, Q. *et al.* Reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with second-order derivative spectroscopy for the quantitation of aromatic amino acids in peptides: application to hemorphins. *J. Chromatog. A*, Amsterdam, v. 723, p. 35-41, 1996.
- ZHUANG, P.; BUTTERFIELD, D.A. Structural and enzymatic characterizations of papain immobilized onto vinyl alcohol/ vinyl butyral copolymer membrane. *J. Memb. Sci.*, Atlanta, v. 66, p. 247-257, 1992.
- ZIEGLER, F. *et al.* Efficiency of enteral nitrogen support in surgical patients: small peptides and non-degraded proteins. *Gut.*, London, v. 31, p. 1277-1283, 1990.
- ZOUNGRANA, T. *et al.* Structure, stability, and activity of adsorbed enzymes. *J. Coll. Interf. Sci.*, Chicago, v. 190, p. 437-448, 1997.

Received on October 13, 2004.

Accepted on September 22, 2005.