

# Utilización de dos soportes para la inmovilización de la papaína

*Use of two supports for immobilizing papain*

BIASUTTI<sup>1</sup> EAR, DE MARCO<sup>1</sup> LM, AFONSO<sup>1</sup> WO, SILVA<sup>1</sup> VDM, LOPES DCF, SILVESTRE<sup>1\*</sup> MPC

<sup>1</sup> Depto. de Alimentos/Fac. de Farmácia/UFMG- sala 3070-B3, Av. Antônio Carlos 6627- cep. 31270-901 – Belo Horizonte, MG, Brasil  
\*E-mail: malice@farmacia.ufmg.br

## RESUMEN

Con la intención de preparar suplementos dietéticos de bajo coste, se inmovilizó papaína en carbón activado (CA) y en alúmina, utilizando suero como fuente de proteínas hidrolizadas. Para determinar el índice de inmovilización se cuantificaron las enzimas no adsorbidas mediante el método de Lowry. Se analizó el efecto del tiempo de contacto y la temperatura, considerándose 30 min. a 25 °C como la condición óptima para inmovilizar la papaína en ambos soportes. El CA presentó unos índices de inmovilización muy superiores (entre 95% y 99%) a los de la AL (entre 4% y 13%). Para evaluar la capacidad de reutilización de la papaína se midió la actividad residual de la enzima después de haber sido utilizada hasta 20 veces. Para determinar la actividad de la enzima se cuantificó el índice de exposición de la fenilalanina mediante espectrofotometría de derivada segunda. En este caso, la AL presentó mejores resultados que el CA, ya que la actividad de la papaína seguía siendo la misma después de haber sido utilizada 15 y 5 veces, respectivamente.

PALABRAS CLAVE: Carbón activado. Alúmina. Tiempo de contacto. Estabilidad operativa. Inmovilización de papaína. Temperatura.

## ABSTRACT

*Papain was immobilized on activated carbon (AC) and on alumina (AL), with the aim of preparing low cost dietary supplements, using whey as hydrolysed protein source. The quantification of the non-adsorbed enzyme, using Lowry's method was used to determine the immobilization rate. The effect of the contact time and the temperature was tested, and 30 min at 25°C was considered the best condition for immobilizing papain in both supports. AC showed much higher immobilization rates (from 95% to 99%) than AL (from 4% to 13%). The reusability of papain was evaluated by measuring the residual activity of the enzyme after it has been used for up to 20 times. The quantification of exposure rate of phenylalanine by second derivative spectrophotometry was used to determine the enzyme activity. In this case, AL showed better results than AC, since the activity of papain remained unchanged after 15 and 5 times, respectively.*

KEYWORDS: Activated carbon. Alumina. Contact time. Operational stability. Papain immobilization. Temperature.

Fecha de recepción: 14-11-06

Fecha de aceptación: 22-01-07

## INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha prestado considerable atención a la preparación de enzimas inmovilizadas, y se han desarrollado diversos soportes y técnicas de inmovilización. En este sentido, se han explorado numerosos enfoques para la preparación de enzimas inmovilizadas, debido a que presentan diversas ventajas sobre las enzimas en solución no digerible<sup>1</sup>. Por tanto, la inmovilización facilita la recuperación y reutilización de las enzimas<sup>2</sup>. De hecho, en producción a gran escala, el proceso sería más económico si se pudiera reutilizar la enzima, por ejemplo, mediante inmovilización<sup>3,4</sup>. Además, estos sistemas pueden incrementar la estabilidad de las enzimas en tratamientos térmicos y niveles extremos de pH<sup>5</sup>.

Asimismo, una elevada concentración e incluso distribución de la enzima, mejorando su estabilidad operativa, ya ha sido mencionada por Moreno y Sinisterra (1994)<sup>6</sup> como aspecto positivo de la inmovilización de enzimas en soportes sólidos, especialmente en usos industriales y clínicos. Según Kiliñç *et al.* (2002)<sup>7</sup>, la inmovilización aporta estabilidad a las proteínas, al restringir el movimiento de la molécula de proteína ligándola a un cuerpo inerte mediante enlaces químicos. De esta forma, los diversos dominios se mantienen en la orientación correcta para conservar la actividad al menos durante un largo período de tiempo, en comparación con las enzimas en solución libre.

La inmovilización de las enzimas se ha efectuado mediante atrapamiento, interacción iónica, formación compleja con metal, enlace covalente, encapsulación y adsorción en superficies hidrofóbicas o hidrofílicas<sup>8</sup>. Entre estos métodos, la adsorción ha sido considerado el más simple y económico<sup>9</sup>. Además, la inmovilización de enzimas mediante adsorción tiene la ventaja de ofrecer mayores posibilidades de aplicación y perturbar relativamente poco la función y estructura naturales de la enzima, lo que contribuye a mantener su actividad<sup>10</sup>.

Para evaluar la cantidad de enzima adsorbida se han utilizado diversas técnicas<sup>11</sup>. Algunas de ellas se basan en la medición de la reducción de la concentración proteica en la solución una vez que la superficie sólida entra en contacto con la solución. Con esta finalidad, algunos autores<sup>4,12,13,14</sup> utilizaron el método de Lowry<sup>15</sup> y otros<sup>3,8,16,17</sup> el método de Bradford<sup>18</sup>.

## INTRODUCTION

Considerable attention in the last few decades has been focused on the preparation of immobilized enzymes, and a variety of supports and techniques for immobilization has been developed. In this way, numerous approaches have been explored for the preparation of immobilized enzymes because they have several advantages over enzymes in bulk solution<sup>1</sup>. Thus, the immobilization leads to ease of recoverability and reusability of the enzymes<sup>2</sup>. In fact, for large scale production, the process would be more economical if the enzyme could be reused, for example, by immobilization<sup>3,4</sup>. Moreover, these systems may increase the stability of enzymes to thermal treatments and extremes of pH<sup>5</sup>.

Moreover, high concentration and even distribution of the enzyme, enhancing its operational stability have been mentioned by Moreno and Sinisterra (1994)<sup>6</sup> as positive aspects of immobilization of enzymes on solid support, especially for industrial and clinical utilization. According to Kiliñç *et al.* (2002)<sup>7</sup>, immobilization imparts stability to proteins by restricting the movement of the protein molecule by attachment to an inert body via chemical bonds. The various domains are therefore held in the correct orientation to retain activity at least over an extended period of time when compared with enzymes in free solution.

Immobilization of enzymes has been carried out by entrapment, ionic interaction, complex formation with metal, covalent attachment, encapsulation and adsorption to hydrophobic or hydrophilic surfaces<sup>8</sup>. Among these methods, adsorption has been considered as a simple and economical method<sup>9</sup>. Moreover, enzyme immobilization by adsorption has the benefit of wide applicability and may provide relatively small perturbation of the enzyme native structure and function, which contributes to the maintenance of the enzyme activity<sup>10</sup>.

Various techniques have been used to evaluate the amount of the adsorbed enzyme<sup>11</sup>. Some of them are based on the measurement of the decrease in protein concentration in the solution after the solid surface have come in contact with the solution. For this purpose, some authors<sup>4,12,13,14</sup> used the Lowry method<sup>15</sup> and others<sup>3,8,16,17</sup> the Bradford one<sup>18</sup>.

Otras técnicas emplean la medición directa de las proteínas adsorbidas en la superficie, utilizando métodos más sofisticados tales como el análisis inmunosorbente ligado a enzimas, el radiomarcado, el microbalance de cristales de cuarzo, la elipsometría, la fluorescencia de reflexión interna total y la reflexión de neutrones<sup>11</sup>.

La papaína es una cisteína endopeptidasa, de la *Carica papaya*, estable a 4 °C, pero cuya actividad disminuye aproximadamente un 20% a los 6 meses. El pH sugerido para su uso varía entre 6.0 y 7.0<sup>19</sup>. Esta enzima presenta una amplia actividad proteolítica hacia proteínas, péptidos de cadena corta, enlaces amida y ésteres de aminoácido, y se utiliza ampliamente en alimentación y medicina<sup>20</sup>.

La necesidad de inmovilizar la papaína se debe a su gran potencial industrial, por ejemplo como agente de estabilización por frío en la fabricación de cerveza y para el ablandamiento de carnes<sup>1</sup>. Además, la papaína inmovilizada se ha utilizado en la síntesis enzimática de péptidos<sup>20</sup>.

Nuestro interés en la inmovilización de la papaína está asociado a sus posibilidades de reutilización en el proceso de hidrolización de proteínas para elaborar suplementos dietéticos ricos en oligopéptidos con diversas aplicaciones clínicas. La acción de esta enzima en solución no digerible ya ha sido analizada en nuestro laboratorio, y ha demostrado su eficacia en la preparación de hidrolizados de proteínas con elevado contenido en oligopéptidos<sup>21,22</sup>.

Aunque se han analizado diversos soportes para la inmovilización de la papaína<sup>1,2,7,20,23</sup>, no se ha encontrado ningún trabajo en la literatura relativo al uso con este fin de carbón activado o alúmina. En este artículo, publicamos los resultados de la inmovilización de la papaína en estos dos soportes, con la finalidad de preparar suplementos dietéticos de bajo coste, utilizando suero como fuente de proteínas hidrolizadas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

L-fenilalanina, L-tirosina, L-triptófano, papaína (P3375), alúmina (tipo A-5) y carbón activado (20-60 mesh) se adquirieron a Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.). El suero (en polvo) fue amablemente proporcionado por una empresa de alimentación (Minas Gerais, Brasil).

Other techniques employ the direct measurement of proteins adsorbed on the surface, using more sophisticated methods such as enzyme-linked immunosorbent, radiolabeling, quartz crystal microbalance, ellipsometry, total internal reflection fluorescence and neutron reflection<sup>11</sup>.

Papain is a cysteine endopeptidase, from *Carica papaya*, stable at 4°C but its activity decreases about 20% in 6 months. The pH suggested for its use varies from 6.0 to 7.0<sup>19</sup>. This enzyme shows extensive proteolytic activity towards proteins, short-chain peptides, amino acid ester and amide links, and is applied extensively in the fields of food and medicine<sup>20</sup>.

The need for the immobilization of papain has been due to its great industrial potential, such as chill proofing agent in beer fabrication and tenderization of meat<sup>1</sup>. Also, immobilized papain has been employed in the enzymatic syntheses of peptides<sup>20</sup>.

Our interest in immobilizing papain is associated to its reusability in the process of hydrolysing proteins to produce dietary supplements rich in oligopeptides with various clinical applications. The action of this enzyme in a bulk solution has already been tested in our laboratory and showed to be efficient in preparing protein hydrolysates with high oligopeptide content<sup>21,22</sup>.

Although several supports have been tested for immobilizing papain<sup>1,2,7,20,23</sup>, no work was found in the literature concerning the use of activated carbon or alumina for this purpose. In this paper, we report the immobilization of papain on these two supports, aiming the preparation of low cost dietary supplements, using whey as hydrolysed protein source.

## MATERIAL AND METHODS

L-phenylalanine, L-tyrosine, L-tryptophan, papain (P3375), alumina (A-5 type) and activated carbon (20-60 mesh) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). The whey (powder) was kindly furnished by a food industry (Minas Gerais, Brazil).

### *Immobilization of papain*

Papain was immobilized by adsorption on two supports: activated carbon (AC) and alumin (AL).

### *Inmovilización de la papaína*

La papaína se inmovilizó mediante adsorción en dos soportes: carbón activado (CA) y alúmina (AL). En un vaso de precipitados se colocaron 10 mL de solución enzimática al 0,1% (p/v) en tampón fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7.5 y 10 g de soporte. Tras 30 min., 60 min. y 90 min. de contacto a 25 °C y 12 h a 5 °C, se centrifugó la mezcla a 11.000 x g durante 20 min., a 25 °C (centrífugo Jouan, modelo BR4i, Francia). Se prepararon muestras en blanco utilizando únicamente el tampón fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7.5.

### *Determinación del índice de inmovilización*

Los complejos enzima:sustrato se filtraron con papel cuantitativo en vacío y los residuos se lavaron 3 veces con 50 mL de agua destilada. Los filtrados y las aguas residuales se recuperaron para la determinación del contenido de proteína no absorbida mediante el método de Lowry<sup>16,24</sup>, utilizando como estándar albúmina de suero bovino. El mismo método se utilizó para la cuantificación de proteínas en la solución enzimática al 0,1%. La cantidad de enzima inmovilizada se obtuvo de la diferencia entre el contenido proteico de la solución enzimática y el detectado para la suma de los filtrados y las aguas residuales. El índice de inmovilización se calculó mediante la ecuación siguiente:

$$\% \text{ of immobilized enzyme} = \frac{\text{amount of immobilized enzyme}}{\text{amount of added enzyme}} \times 100$$

### *Determinación de la estabilidad operativa de la papaína inmovilizada*

Para evaluar la capacidad de reutilización de la papaína se midió la actividad residual de la enzima después de haber sido utilizada hasta 20 veces. Para medir la actividad enzimática se cuantificó la fenilalanina (Phe) expuesta por la hidrólisis enzimática de las proteínas del suero. Como se ha descrito anteriormente por nuestro grupo<sup>25</sup>, esto corresponde al índice de exposición (IE) de la Phe (véase a continuación), que se puede medir mediante espectrofotometría de derivada segunda (SDS).

En primer lugar, se inmovilizó la papaína de la manera descrita anteriormente, en las condiciones que obtuvieron el índice de inmovilización mayor.

A volume of 10mL of the 0.1% (w/v) enzymatic solution in phosphate buffer 0.1 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7.5 and 10g of the support were placed in a beaker. After 30 min, 60 min and 90 min of contact at 25°C as well as 12 h at 5°C, the mixture was centrifuged at 11.000 x g for 20 min, at 25°C (Centrifuge Jouan, BR4i model, France). Blanks were prepared using only the phosphate buffer 0.1 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7.5.

### *Determination of the immobilization rate*

The enzyme:substrate complexes were filtered through quantitative paper under vacuum and the residues were washed three times with 50mL of distilled water. The filtrates and the waste waters were collected for the determination of the unabsorbed protein content, by the Lowry method<sup>16,24</sup>, using bovine serum albumin as standard. The same method was used for the protein quantification in the 0.1% enzymatic solution. The amount of immobilized enzyme was obtained by the difference between the protein content of the enzymatic solution and that one found for the sum of the filtrates and waste waters. The immobilization rate was calculated by the equation bellow:

$$\% \text{ of immobilized enzyme} = \frac{\text{amount of immobilized enzyme}}{\text{amount of added enzyme}} \times 100$$

### *Determination of the operational stability of immobilized papain*

The reusability of papain was evaluated by measuring the residual activity of the enzyme after it has been used for up to 20 times. The quantification of phenylalanine (Phe) exposed by the enzymatic hydrolysis of whey proteins was used for measuring the enzyme activity. As described before by our group<sup>25</sup>, this corresponds to the exposure rate (ER) of Phe (see bellow), which may be measured by second derivative spectrophotometry (SDS).

First, papain was immobilized, as described above, using the condition that produced the highest immobilization rate. Then, appropriate volumes of a 10% (w/v) whey solution were added to the enzyme:substrate complex in order to obtain an enzyme:substrate ratio (E:S) of 1%. The mixture was stirred for 1h, at 25°C, in a velocity sufficient to keep the complex in

A continuación, se añadieron los volúmenes correspondientes de una solución de suero al 10% (p/v) al complejo enzima:sustrato para obtener una proporción enzima:sustrato (E:S) del 1%. La mezcla se agitó durante 1 h a 25 °C, a una velocidad suficiente para mantener el complejo en suspensión. Seguidamente, se centrifugó a 11.000 x g durante 20 min., a 25 °C, y se filtró con papel cuantitativo en vacío. Los residuos se lavaron tres veces con 5,0 mL de agua destilada y se sometieron a hidrólisis sucesivas, obteniéndose seis hidrolizados correspondientes a la primera, segunda, quinta, 10<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup> y 20<sup>a</sup> utilización de la enzima inmovilizada. A continuación, se liofilizaron los hidrolizados (Labconco, modelo 77500, Kansas City, MI, EE. UU.) y se sometieron al SDS, como se describe a continuación.

#### *Determinación del índice de exposición de la fenilalanina*

El índice de exposición de la fenilalanina se midió mediante SDS, de la manera descrita anteriormente por nuestro grupo<sup>15,26</sup>. Brevemente, se midió la absorbancia de las muestras entre 250 y 280 nm. Se obtuvieron los espectros de la derivada segunda (espectrofotómetro CECIL, modelo CE2041, Buck Scientific, Inglaterra) y se utilizó el área del tercer pico negativo para calcular la cantidad de Phe de las muestras, empleando una curva estándar. Para obtener el espectro de la derivada segunda se utilizó el software GRAMS-UV (Galactic Industries Corporation, Salem, NH, EE. UU.).

Para la curva estándar, se prepararon soluciones de almacenamiento de Phe ( $6,05 \times 10^{-4}$  mol/L), Tyr ( $5,52 \times 10^{-4}$  mol/L) y Trp ( $4,90 \times 10^{-4}$  mol/L) en tampón fosfato 0,01 mol/L, pH 6.0. Seguidamente, se mezclaron 10 mL de cada solución y se efectuaron diluciones sucesivas de esta mezcla para obtener las concentraciones de Phe en un rango de 0,13 a  $1,01 \times 10^{-4}$  mol/L. Los espectros de estas soluciones diluidas se registraron entre 250 y 280 nm y se utilizó el área del tercer pico negativo de Phe para obtener la curva estándar en función de su concentración.

suspension. Then, it was centrifuged at 11.000 x g for 20 min, at 25°C, and filtered through quantitative paper under vacuum. The residues were washed three times with 5.0mL of distilled water and submitted to successive hydrolysis giving rise to six hydrolysates corresponding to the first, second, fifth, 10<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> utilizations of the immobilized enzyme. The hydrolysates were, then, freeze-dried (Labconco, 77500 model, Kansas City, MI, USA) and submitted to the SDS, as described bellow.

#### *Determination of exposure rate of phenylalanine*

The exposure rate of phenylalanine was measured by SDS, as described before by our group<sup>15,26</sup>. Briefly, the absorbance of the samples was measured from 250 to 280 nm. Second derivative spectra were drawn (CECIL spectrophotometer, CE2041 model, Buck Scientific, England) and the area of the third negative peak was used to calculate the amount of Phe in the samples, employing a standard curve. A software GRAMS-UV (Galactic Industries Corporation, Salem, NH, EUA) was used to draw the second derivative spectra.

For the standard curve, stock solutions of Phe ( $6.05 \times 10^{-4}$  mol/L), Tyr ( $5.52 \times 10^{-4}$  mol/L) and Trp ( $4.90 \times 10^{-4}$  mol/L) were prepared in in 0.01 mol/L phosphate buffer, pH 6.0. Then, 10 mL of each solution were mixed and successive dilutions of this mixture were made to have Phe concentrations in a range from 0.13 to  $1.01 \times 10^{-4}$  mol/L. Spectra of these diluted solutions were recorded from 250 to 280 nm and the area of the third negative peak of Phe was used to draw the standard curve in function of its concentration.

#### *Statistical Analysis*

All experiments were carried out in triplicate. Differences between means of areas of negative peaks were evaluated by analysis of variance (ANOVA) and Duncan test<sup>27</sup>. Differences were considered to be significant at  $p < 0.05$  throughout this study.



*Análisis estadístico*

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Las diferencias entre las medias de las áreas de pico negativo se evaluaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) y el análisis de Duncan<sup>27</sup>. En este estudio, las diferencias se consideraron significativas con  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*Índice de inmovilización de la papaína*

Los datos de la Tabla 1 muestran que los mayores índices de inmovilización se obtuvieron con tiempo de 30 y 60 min. a 25 °C, así como con 12 h a 5 °C, para los dos soportes utilizados. Por tanto, se eligió la condición de 30 min. a 25 °C para evaluar la eficacia de la hidrólisis, ya que es la más ventajosa desde el punto de vista económico.

**TABLA 1.** índice de inmovilización de la papaína en carbón activado y alúmina.  
**TABLE 1.** Immobilization rate of papain on activated carbon and alumina.

Soportes de inmovilización <i>Immobilization supports</i>		
Parámetros de inmovilización <i>Immobilization parameters</i>	Carbón activado <i>Activated Carbon</i>	Alúmina <i>Alumina</i>
	Índice de inmovilización <sup>a</sup> (%) <i>Immobilization rate<sup>a</sup> (%)</i>	Índice de inmovilización <sup>b</sup> (%) <i>Immobilization rate<sup>b</sup> (%)</i>
30 min. / 25 °C	97,4 x 0,8 <sup>a,1</sup>	13,2 x 1,0 <sup>a,2</sup>
60 min. / 25 °C	98,6 x 0,3 <sup>a,1</sup>	10,0 x 2,7 <sup>a,2</sup>
90 min. / 25 °C	95,4 x 0,8 <sup>b,1</sup>	03,9 x 1,7 <sup>b,2</sup>
12 h / 5 °C	97,5 x 0,7 <sup>a,1</sup>	12,7 x 1,0 <sup>a,2</sup>

<sup>a,b</sup> Cada valor representa la media de la determinación triple.

Las distintas letras en superíndice indican diferencias estadísticas (p<0,05) con distintos tiempos de tratamiento en el mismo soporte. Los distintos números en superíndice indican diferencias estadísticas (p<0,05) con distintos soportes y el mismo tratamiento.

<sup>a,b</sup> Each value represents the mean of triple determination.

Different superscript letters indicate statistically significant differences (p<0.05) for different treatment times and the same support. Different superscript numbers indicate statistically significant differences (p<0.05) for different supports and the same treatment.

Además, se puede observar en la Tabla 1 que el tipo de soporte afectaba al índice de inmovilización, que fue muy superior para el carbón activado (entre 95% y 99%) que para la alúmina (entre 4% y 13%). Este resultado se podría explicar por el hecho de que las proteínas de gran estabilidad estructural (proteínas duras) apenas se absorben en soportes hidrofílicos<sup>11</sup>, como la alúmina<sup>28</sup>. La papaína se podría considerar una

## RESULTS AND DISCUSSION

*Immobilization rate of papain*

The data in Table 1 show that the highest immobilization rates were obtained at times of 30 min and 60 min at 25°C, as well as 12h at 5°C, for both supports used. Thus, the condition of 30 min, at 25°C, was chosen for evaluating the hydrolysis efficiency since it is the most advantageous from the economical point of view.

Also, one can see in Table 1 that the type of the support affected the immobilization rate, which was much higher for the activated carbon (95% to 99%) than for alumina (4% to 13%). This result could be explained by the fact that proteins having high structural stability (hard proteins) are barely adsorbed on hydrophilic supports<sup>11</sup>, such as alumina<sup>28</sup>. Papain could be considered as a hard protein, since it has low

proteína dura, debido a su poca masa molecular, a su elevada estabilidad térmica y a tres enlaces cruzados disulfato<sup>29</sup>.

Teniendo en cuenta que no se ha encontrado ningún informe sobre la inmovilización de papaína en carbón activado o alúmina, los datos obtenidos en el presente trabajo se compararon con los obtenidos utilizando otros soportes.

Se encontraron cuatro estudios relativos a soportes hidrofílicos. Al utilizar sílice y diferentes niveles de pH, los índices de inmovilización variaban entre 13% y 16%, próximos a los valores encontrados en este estudio para la alúmina<sup>30</sup>. En el caso de otros soportes, los resultados de la alúmina fueron superiores a los del presente trabajo. Éste fue el caso de la circonia, una especie de sílice cristalino, cuyo índice de inmovilización cambió del 30% al 80<sup>30</sup>. La papaína se inmovilizó en chitosán, un polisacárido policatiónico hidrofílicante, con un nivel de pH próximo a 7.0, obteniéndose un índice de inmovilización del 36%<sup>7</sup>. El uso de sefaroza activada mediante iones de cobre para la inmovilización de la papaína alcanzó un índice de inmovilización extremadamente elevado, del 96%, según Afaq e Iqbal (2001)<sup>1</sup>.

Por otro lado, en lo concerniente a los soportes hidrofóbicos, sólo se encontró un informe. En él, Zhuang *et al.* (1992)<sup>2</sup>, utilizando una membrana de polivinilo, obtuvieron un índice de inmovilización entre el 4% y el 13%, muy inferior al obtenido en el presente trabajo con el carbón activado.

#### *Espectros SDS de la fenilalanina y los hidrolizados enzimáticos*

La absorbancia y los espectros de SDS de Phe en una mezcla de aminoácidos aromáticos, y del hidrolizado obtenido tras la segunda hidrólisis con pH 6.0, se muestran en la Figura 1. En el caso del Phe (Figura 1b), se pueden observar cuatro picos negativos, indicados mediante las letras "a", "b", "c" y "d", situados en el rango de 250 a 280 nm con máximos a 253, 258, 263, 268 y 273 nm y mínimos a 257, 262, 267 y 272 nm. El espectro SDS del hidrolizado se aproxima al del Phe, con picos negativos situados en casi las mismas longitudes de onda. La similitud entre los espectros de las proteínas y los aminoácidos estándar ya había sido descrita anteriormente

molecular mass, high thermal stability and three disulfide cross linkages<sup>29</sup>.

Considering that no report about the immobilization of papain in either activated carbon or alumina was found in the literature, the data obtained in the present work were compared to those using other supports.

Relating to hydrophilic supports, four studies were found. Thus, working with silica and using different conditions of pH, the immobilization rate varied from 13% to 16%, near to the values found here for alumina<sup>30</sup>. For other supports, the results were higher than those of the present work for alumina. This was the case of zirconia, a kind of crystalline silica, for which the immobilization rate changed from 30% to 80<sup>30</sup>. Papain was immobilized in chitosan, a hydrophilic polycationic polysaccharide, at a pH near 7.0 and show 36% of immobilization rate<sup>7</sup>. The use of sepharose, activated by cupric ions, for immobilizing papain reached an immobilization rate extremely high, i.e., 96%, according to Afaq and Iqbal (2001)<sup>1</sup>.

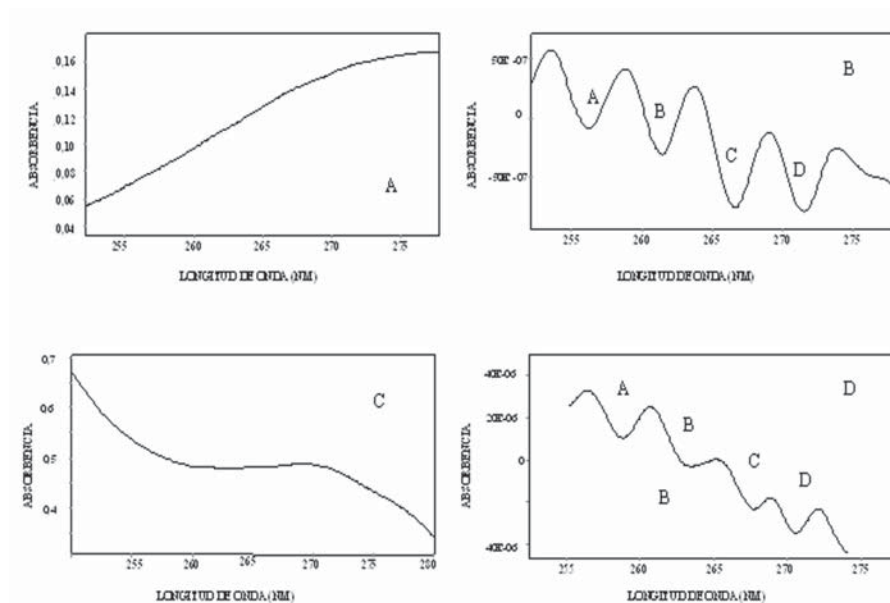
On the other hand, concerning the hydrophobic supports, only one report was found. Thus, Zhuang *et al.* (1992)<sup>2</sup>, using a polyvinyl membrane, obtained an immobilization rate varying from 4% to 13%, much smaller than those of the present work for activated carbon.

#### *SDS Spectra of phenylalanine and enzymatic hydrolysates*

The absorbance and SDS spectra of Phe, in a mixture of aromatic amino acids, and of the hydrolysate obtained after the second hydrolysis, in pH 6.0, are shown in Figure 1. In case of Phe (Figure 1b), we can see four negative peaks, indicated by letters "a", "b", "c" and "d", situated within the range of 250 to 280 nm with maxima at 253, 258, 263, 268 and 273 nm and minima at 257, 262, 267 and 272 nm. The SDS spectrum of the hydrolysate is close to that of Phe, with negative peaks situated in almost the same wavelengths. The likeness among the spectra of standard amino acids and proteins had previously been described by Ichikawa and Terada (1977)<sup>31</sup>, working with several native and denatured proteins. The same result was previously achieved in our laboratory using different enzymes for hydrolysing casein and skim milk<sup>26,32,33</sup>.

por Ichikawa y Terada (1977)<sup>31</sup>, trabajando con diversas proteínas nativas y desnaturalizadas. El mismo resultado se obtuvo en nuestro laboratorio utilizando diferentes enzimas con caseína hidrolizada y nata de leche<sup>26,32,33</sup>.

**Figura 1.** Absorbencia y espectro de derivada segunda de Phe en una solución de Tyr y Trp (A y B, respectivamente) y del hidrolizado obtenido tras la segunda hidrólisis (C y D, respectivamente), con pH 6.0. **Figure 1.** Absorbance and second derivative spectra of Phe in a solution containing Tyr and Trp (A and B, respectively) and of hydrolysate obtained after the second hydrolysis (C and D, respectively), in pH 6.0.



Por otra parte, en algunos informes publicados, el número de picos negativos de Phe fue distinto al encontrado en el presente trabajo. Ichikawa y Terada (1977)<sup>31</sup> indicaron cinco picos para este aminoácido en pH 7.0, mientras que Miclo *et al.* (1995)<sup>34</sup> describieron la presencia de seis en pH 1.9. Estas discrepancias se podrían asociar a diversos factores, tales como formas de Phe (libre o éster), tipo de equipo utilizado (el espectrofotómetro y el software utilizados para medir los espectros de absorción y de derivada), las propiedades del disolvente y el nivel de pH utilizado<sup>31,35</sup>.

Respecto a la curva estándar de Phe, la que utiliza el área de pico negativo “c” presentó el mejor coeficiente de correlación (el mayor y más significativo). La ecuación de la curva y el coeficiente de correlación fueron  $y = 3,0077x + 0,7587$  y  $R^2 = 0,9576$ . Este resultado concuerda con otros publicados<sup>32,36</sup> y también con estudios anteriores efectuados en nuestro laboratorio<sup>21,26,33</sup>,

On the other hand, in some reports in the literature, the number of negative peaks for Phe was different from that found in the present work. Thus, five peaks for this amino acid in pH 7.0 were shown by Ichikawa and Terada (1977)<sup>31</sup>, while Miclo *et al.* (1995)<sup>34</sup> described the presence of six, in pH 1.9. These discrepancies could be associated to several factors such as forms of Phe (free or ester), type of equipment (spectrophotometer and software used for measuring absorption and derivative spectra), properties of the solvent and pH used<sup>31,35</sup>.

Concerning the standard curve of Phe, the one using the area of negative peak “c” presented the best correlation coefficient (the highest and most significant). The curve equation and the correlation coefficient were  $y = 3.0077x + 0.7587$  e  $R^2 = 0.9576$ . This result is in agreement with others in the literature<sup>32,36</sup> and also with previous studies carried out in our laboratory<sup>21,26,33</sup>, since in all these works a linearity for the standard curve



ya que en todos estos trabajos se observa la linealidad de la curva estándar de Phe en presencia de Tyr y Trp a distintas concentraciones.

*Estabilidad operativa de la papaína inmovilizada*

Como se muestra en la Tabla 2, al inmovilizar la papaína en carbón activado, su actividad enzimática permaneció inalterada (100%) hasta cinco veces, lo que indica que se podría utilizar esta enzima cinco veces en las condiciones establecidas en este estudio. Vale la pena indicar que, incluso después de utilizar esta enzima 20 veces, su actividad fue del 54% del valor inicial, que se puede considerar buena, en comparación con otros datos publicados<sup>20,23</sup>.

of Phe, in presence of Tyr and Trp in several concentrations, was shown.

*Operational stability of immobilized papain*

As shown in Table 2, when papain was immobilized in activated carbon, its enzymatic activity kept unchangeable (100%) up to five times, indicating that one could use this enzyme five times, using the conditions established here. It is worth stating that even after using this enzyme 20 times, its activity was 54% of the initial value, which may be considered a good one, comparing to other data of the literature<sup>20,23</sup>.

**TABLA 2.** Estabilidad operativa de la papaína en carbón activado y alúmina.  
**TABLE 2.** Operational stability of immobilized papain on activated carbon and alumina.

Soportes de inmovilización Immobilization supports				
Nº de utilizaciones de la enzima Number of times of utilization of the enzyme	Carbón activado Activated carbon		Alúmina Alumina	
	Índice de exposición de Phe <sup>a</sup> Exposure rate of Phe <sup>a</sup>	Actividad enzimática, (%) Enzyme activity, (%)	Índice de exposición de Phe <sup>b</sup> Exposure rate of Phe <sup>b</sup>	Actividad enzimática, (%) Enzyme activity, (%)
1	75.4 x 8.9 <sup>a</sup>	100	124.1 x 9.5 <sup>a</sup>	100
2	71.7 x 9.2 <sup>ab</sup>	100	121.8 x 6.9 <sup>a</sup>	100
5	66.1 x 9.5 <sup>ab</sup>	100	120.3 x 6.3 <sup>a</sup>	100
10	57.7 x 6.1 <sup>b</sup>	82	117.9 x 17.9 <sup>a</sup>	100
15	40.0 x 5.5 <sup>c</sup>	55	116.2 x 9.5 <sup>a</sup>	100
20	37.6 x 7.3 <sup>c</sup>	54	84.9 x 6.3 <sup>b</sup>	74

<sup>a, b</sup> Índice de exposición de Phe, en mg de Phe/100g de hidrolizado. Cada valor representa la media de la determinación triple. Las letras distintas son diferentes significativamente (p < 0,05) para distinto número de veces de utilización de la enzima con el mismo soporte.

<sup>a, b</sup> Exposure rate of Phe, in mg of Phe/100g of hydrolysate. Each value represents the mean of triple determination. Different letters are significantly different (p < 0.05) for different number of times of utilization of the enzyme using the same support.

Los resultados de la inmovilización de papaína en alúmina fueron aún mejores que los del carbón activado (Tabla 2), ya que la constancia de la actividad enzimática se obtuvo hasta 15 veces (100%), y sólo se redujo al 74% después de haber sido utilizada 20 veces.

Estos resultados muestran claramente que la inmovilización de papaína en carbón activado y especialmente en alúmina se puede considerar cuando se asocie el interés al uso de esta enzima en procesos industriales a gran escala.

No se ha encontrado publicado ningún informe relativo a la estabilidad operativa de la papaína en carbón activado o alúmina. Los datos obtenidos utilizando otros soportes fueron inferiores a los

The results of the immobilization of papain in alumina were still better than in activated carbon (Table 2), since the constancy of the enzymatic activity was obtained up to 15 times (100%), and only reduced to 74% after having been used for 20 times.

These results show clearly that the immobilization of papain in carbon activated and specially in alumina may be considered when the interest is associated to the use of this enzyme in large scale industrial processes.

No report concerning the operational stability of papain in either activated carbon or alumina was found in the literature. The data using other supports were lower than those found here for

encontrados aquí para ambos soportes. Por tanto, la actividad de la papaína inmovilizada en un portador de fibra de nitrilon<sup>20</sup> y en un quitosán<sup>23</sup> descendió al 56% y 72%, respectivamente, tras haberse utilizado 10 veces

En otros estudios, no se indicó ningún valor de actividad enzimática y sólo se mencionó el número de veces que se podría utilizar la enzima. En el primero, los autores indicaron que la papaína inmovilizada en un polímero de polivinilo se podía utilizar al menos 10 veces<sup>2</sup>. En otros dos trabajos, esta enzima se inmovilizó en una membrana de polisulfona, utilizando<sup>37</sup> o no<sup>38</sup> un complejo de avidina-biotina como espaciador no covalente, lo que permitía su uso 18 y 20 veces, respectivamente.

### CONCLUSIÓN

El índice de inmovilización de la papaína en carbón activado (CA) fue muy superior al de la alúmina (AL), habiendo alcanzado el 99% y el 13%, respectivamente. Por otro lado, la estabilidad operativa de la papaína en AL fue mejor que la del CA, ya que se pudo volver a utilizar hasta 15 y 5 veces, respectivamente, sin alteraciones en su actividad.

both supports. Thus, the activity of immobilized papain on a nitrilon fibre carrier<sup>20</sup> and on a chitosan<sup>23</sup> decreased to 56% and 72%, respectively, after having been used for 10 times

In other studies, no value for the enzymatic activity was shown and only the number of times that the enzyme could be used was mentioned. In the first one, the authors reported that the papain immobilized in a polyvinil polymer could be used for at least 10 times<sup>2</sup>. In other two works, this enzyme was immobilized in a polysulfone membrane, using<sup>37</sup> or not<sup>38</sup> an avidin-biotin complex as a non-covalent spacer which allowed its use for eighteen and twenty times, respectively.

### CONCLUSION

The immobilization rate of papain on activated carbon (AC) was much higher than on alumina (AL), having reached 99% and 13%, respectively. On the other hand, the operational stability of papain on AL was better than on AC, since it could be repeatedly reused up to 15 and 5 times, respectively, with no change in its activity.

### REFERENCIAS/REFERENCES

1. Afaq S, Iqbal J. Immobilization and stabilization of papain on chelating sepharose: a metal chelate regenerable carrier. *EJB* 2001; 4: 120-124.
2. Zhuang P, Butterfield DA. Structural and enzymatic characterizations of papain immobilized onto vinyl alcohol/ vinyl butyral copolymer membrane. *J. Memb. Sci.* 1992; 66: 247-257.
3. Dinella C, Stagni A, Lanzarini G. Pectolytic enzymes co-immobilization on  $\gamma$ -alumina spheres via organophosphates compounds. *Process Biochem.* 1997; 32: 715-722.
4. Rani AS, Das MLD, Satyanarayana S. Preparation and characterization of amyloglucosidase adsorbed on activated charcoal. *J. Mol. Catal. B* 2000; 10: 471-476.
5. Furegon L, Peruffo ADB, Curioni A. Immobilization of rice limit dextrinase on  $\gamma$ - alumina beads and its possible use in starch processing. *Process Biochem.* 1996; 32: 113-120.
6. Moreno JM, Sinisterra JV. Immobilization of lipase from *Candida cylindracea* on inorganic supports. *J. Mol. Catal.* 1994; 93: 357-369.
7. Kiliç A, Önal S, Telefoncu A. Stabilization of papain by modification with chitosan. *Turk. J. Chem.* 2002; 26: 311-316.
8. Ladero M, Santos A, García-Ochoa F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enz. Microb. Technol.* 2000; 27: 583-592.
9. Al-Duri B, Yong YP. Lipase immobilisation: An equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports. *Biochem. Eng. J.* 2000; 4: 207-215.
10. Durán N, Rosa MA, D'annibale A, Gianfreda L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enz. Micro. Technol.* 2002; 31: 907-931.
11. Nakanishi K, Sakiyama T, Imamura K. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *J. Biosc. Bioeng.* 2001; 91: 233-244.
12. Serralha FN, Lopes JM, Lemos F, Prazeres DMF, Aires-Barros MR, Cabral JMS, Ramôes-Ribeiro F. Zeolites as supports for an enzymatic alcoholysis reaction. *J. Mol. Catal. B.* 1998; 4: 303-311.

13. Tu W, Sun S, Nu S, Li X. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Cicer arietinum* (gram chocken bean) and its catalytic actions. *Food Chem.* 1999; 64: 495-500.
14. Hosseinkhani S, Nemat-Gorgani M. Partial unfolding of carbonic anhydrase provides a method for its immobilization on hydrophobic adsorbents and protects it against irreversible thermoinactivation. *Enz. Microb. Technol.* 2003; 33: 179-184.
15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Bio. Chem.* 1951; 193: 265-275.
16. Costa SA, Tzanov T, Paar A, Gudelj M, Gübitz GM, Cavaco-Paulo A. Immobilization of catalases from *Bacillus SF* on alumina for the treatment of textile bleaching effluents. *Enz. Microb. Technol.* 2001; 28: 815-819.
17. Tzanov T, Costa SA, Gübitz GM, Cavaco-Paulo A. Hydrogen peroxide generation with immobilized glucose oxidase for textile bleaching. *J. Biotechnol.* 2002; 93: 87-94.
18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 1976; 72: 248-254.
19. Beyon R, Bond JS. *Proteolytic enzymes: a practical approach. The practical approach series.* Oxford: Oxford University Press; 2001
20. Li YF, Jia FY, Li JR, Liu G, Li YZ. Papain immobilization on a fibre carrier containing primary amine groups. *Biotechnol. Assl. Biochem.* 2001; 33: 29-34.
21. Barbosa CMS, Morais HA, Delvivo FM, Mansur HS, Oliveira MC, Silvestre MPC. Papain hydrolysates of casein: molecular weight profile and encapsulation in lipospheres. *J. Sci. Food Agric.* 2004; 84: 1891-1900.
22. Lopes DCF, Delvivo FM, Silvestre MPC. Hydrolysates of skim milk powder: peptide profiles for dietetic purposes. *Brit. Food J.* 2005; 107: 42-53.
23. Lin H, Wang H, Xue C, Ye M. Preparation of chitosan oligomers by immobilized papain. *Enz. Microb. Technol.* 2002; 31: 588-592.
24. Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 1972; 45: 422 - 427.
25. Morais HA, Silva VDM, Oliveira MC, Silvestre MPC. Characterization of free aromatic amino acids and estimation of exposition rate of Phe in casein hydrolysates by second derivative. *Acta Cient. Venez.* 2004; 55:1-6.
26. Lopes DCF, Delvivo FM, Silvestre MPC. Use of activated carbon for removing phenylalanine from skim milk powder. *Food Sci. Technol.* 2005; 38: 447-453.
27. Pimentel-Gomes F. *Curso de estatística experimental.* Piracicaba: Nobel; 2000.
28. Giles CH. Adsorption. In: Heftman E. *Chromatography.* New York: Reinhold; 1961.
29. Whithaker JR. Effect of substrate concentration on rates of enzyme catalyzed reaction. In: *Principles of enzymology for the food science.* California, Marcel Dekker; 1994.
30. Huckel M, Wirth H-J, Hearn MTH. Porous zirconia: a new support material for enzyme immobilization. *J. Biochem. Biophys. Methods* 1996; 31: 165-179.
31. Ichikawa T, Terada H. Second derivative spectrophotometry as an effective tool for examining phenylalanine residues in proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1977; 494: 267-270.
32. Barbosa CMS, Morais HA, Silva VDM, Oliveira MC, Silvestre MPC. Padronização de método analítico para avaliação do grau de exposição da fenilalanina em hidrolisados de caseína, por espectrofotometria derivada segunda. *Rev. Bras. Ciên. Farmac.* 2002; 38: 113-119.
33. Soares DLR, Biasutti EAR, Capobianco M, Vieira CR, Silva VDM, Januário JN, Aguiar MJB, Silvestre MPC. Preparation of enzymatic skim milk hydrolysates with low phenylalanine content. *Acta Famac.Bon.* 2006 (in press).
34. Miclo L, Perrin E, Driou A, Mellet M, Linden G., 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.* 1995; 46: 186-192.
35. Levillain P, Fompeydie D. Spectrophotométrie dérivée: intérêt, limites et applications. *Analysis* 1986; 14: 1-20.
36. Zhao Q, Sannier F, Garreau I, Lecoœur C, Piot JM. 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* 1996; 723: 35-41.
37. Bhardwaj A, Lee J, Glauner K, Ganapathi S, Bhattacharyya D, Butterfield DL. Biofunctional membranes: an EPR study of active site structure and stability of papain non-covalently immobilized on the surface of modified poly(ether)sulfone membranes through the avidin-biotin linkage. *J. Memb. Sci.* 1996; 119: 241-252.
38. Butterfield DL, Lee J, Ganapathi S, Bhattacharyya D. Biofunctional membranes Part IV. Active-site structure and stability of an immobilized enzyme, papain, on modified polysulfone membranes studied by electron paramagnetic resonance and kinetic. *J. Memb. Sci.* 1994; 91: 47-64.