

Evaluation of polyethylene glycol phosphate aqueous two-phase systems in purifying pepsin from residues of the slaughter house

Evaluación de los sistemas bifásicos acuosos polietilenglicol fosfato en la purificación de pepsina proveniente de residuos de matadero

Maryen Alberto Vázquez¹ and Beatriz Farruggia²

¹*Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba*

²*Laboratorio de Bioseparación, Departamento de Físico-química, Universidad Nacional del Rosario.*

Email: mvazquez@ica.co.cu

In order to determine the most suitable aqueous two-phase system in pepsin separation, different purification systems formed by polyethylene-glycol (PEG) and potassium phosphate were evaluated. The study was conducted on enzyme homogenates of porcine gastric mucus (PH) and bovine abomasum homogenates (BH). Different molecular mass of polyethylene - glycol (1500 and 3000) and distribution of temperature (8 and 20 °C) were evaluated. The distribution of the pure enzyme was first determined, and then, the performance of the enzyme in the homogenates. The enzyme yield and the purification factor were determined for each system. The pepsin distribution in both homogenates showed similar performance to the pattern enzyme and distribution constants higher than the unit (PH 2.7 and BH 1.5) were obtained. The purification indicators for both preparations showed a purification factor higher than 3 (HP 3.25 and BH 3.81) and yields higher than 60 % (PH 74.16 and BH 61.54). The system formed by PEG 1500/phosphate at a distribution temperature of 20 °C was the best variant. This method of separation and purification of pepsin is a simple and rapid alternative, also allows obtaining an adequate purity for further extractives steps of the enzyme.

Key words: enzymes, purification systems, homogenates

In the agricultural industry, the residues treatment and the search of new enzymes are aspects of great importance (Saval 2012). In Cuba, few proteins that are isolated from a bacterial culture or are purified from their natural source to supply the industry, which are mostly imported (Montes de Oca *et al.* 2013). The obtaining of enzyme preparations to replace commercial enzymes in different uses represents a significant cost savings for the country and, if the obtaining source of these is a waste, the benefit is double, because when used decreases its negative effect on the environment.

By the shown, the study of new isolation forms and enzymes purification from natural substrates and industrial waste is of interest. One of the enzymes most used in research laboratories are the proteases, such as pepsin, which initiates protein degradation in the stomach (Morillo *et al.* 2015). Pepsin is widely used in food and pharmaceutical industries and is a useful tool for *in vitro* digestibility simulations of many foods. However, their purification procedure, like that of any other enzyme, is a highly complex

Para determinar el sistema bifásico acuoso más adecuado en la separación de pepsina, se evaluaron diferentes sistemas de purificación formados por poli etilenglicol (PEG) y fosfato de potasio. El estudio se realizó en homogenados enzimáticos de mucosa gástrica porcina (HP) y homogenados de abomaso bovino (HB). Se evaluaron diferentes masas moleculares de poli etilenglicol (1500 y 3000) y temperaturas de reparto (8 y 20 °C). Se determinó primeramente el reparto de la enzima pura y luego, el comportamiento de la enzima presente en los homogenados. Se determinó el rendimiento de enzima y el factor de purificación para cada sistema. El reparto de la pepsina en ambos homogenados mostró comportamiento similar a la enzima patrón y se obtuvieron constantes de reparto superiores a la unidad (HP 2.7 y HB 1.5). Los indicadores de la purificación para ambos preparados mostraron un factor de purificación superior a 3 (HP 3.25 y HB 3.81) y rendimientos superiores a 60 % (HP 74,16 y HB 61, 54). El sistema formado por PEG 1500/fosfato a una temperatura de reparto de 20 °C resultó la mejor variante. Este método de separación y purificación de pepsina es una alternativa simple y rápida, además permite obtener una pureza adecuada para posteriores pasos extractivos de la enzima.

Palabras clave: enzimas, sistemas de purificación, homogenados

En la rama agropecuaria, el tratamiento de residuos y la búsqueda de nuevas enzimas son aspectos de gran importancia y actualidad (Saval 2012). En Cuba, son pocas las proteínas que se aíslan de un cultivo bacteriano o se purifican a partir de su fuente natural para abastecer a la industria, por lo cual se importan en su mayoría (Montes de Oca *et al.* 2013). La obtención de preparados enzimáticos que sustituyan enzimas comerciales en diferentes usos representa un ahorro económico considerable para el país y, si la fuente de obtención de estos es un desecho, el beneficio es doble, pues al utilizarse disminuye su efecto negativo en el ambiente.

Por lo antes expuesto, el estudio de nuevas formas de aislamiento y purificación de enzimas a partir de sustratos naturales y desechos industriales es objeto de interés. Una de las enzimas que más se emplean en los laboratorios de investigación son las proteasas, como es la pepsina, que inicia la degradación de las proteínas en el estómago (Morillo *et al.* 2015). La pepsina es ampliamente utilizada en la industria alimentaria y en la farmacéutica y constituye una herramienta útil para realizar simulaciones *in vitro* de la digestibilidad de

process.

At present there are dissimilar extraction and isolation techniques, but science increasingly moving towards the use of simple, rapid and inexpensive methods that provide a final product in fewer steps. Among these methods it is highlighted the purification in aqueous two-phase systems (ATPS), characterized by being simple and provide an environment of high stability to macromolecules. In addition, unlike other methods, these can be scaled without major complications. For these reasons, this research aims to study the aqueous two-phase systems in the separation and purification of pepsin from the slaughter house wastes.

Materials and methods

Obtaining enzymatic crudes. The gastric mucus of three stomachs per species (pigs and cattle) for obtaining the homogenates was taken. The animals that were extracted the organ intake the same diet and belonged to the same category (fattening).

Immediately after removing the stomach of the animal just slaughtered, the mucus was separated. It was washed with saline solution and specific regions were taken. In the pig, the mucus from the fundic area of the stomach was taken and in the cattle, the abomasum gastric mucus, up to collect a total weight of 100 g of mucus. The collected mucus was cut into small portions, fat was manually removed and mixed with 300 mL of potassium phosphate buffer 50 mM at pH 7.0 using a blade homogenizer, with short and repeated cycles of 1 min. each. The raw extract was filtered with glass fiber to remove cell remains, and then centrifuged at low temperature (5 °C) for twenty minutes at 15000 rpm. The supernatant was divided into small fractions and stored at -20 °C until their further use (Boeris *et al.* 2009).

Before use, the homogenate was thawed and the stored fat was removed at the top by using Pasteur pipettes.

Preparation of two phase systems. The two – phase systems (TPS) were formed with polyethylene glycol (PEG) of different molecular mass (1500 and 3000) and potassium phosphate (Pi), as showed in table 1. The concentration of these compounds was selected according to partitions reported by Boeris *et al.* (2009) and according to binodial diagrams proposed by Lei *et al.* (1990) and Tubío *et al.* (2007). An amount of 2 g of each system were prepared at pH 6.0 by direct weight of the components. The constituents were mixed and equilibrated for 30 min. at 20 °C. Then they were

muchos alimentos. Sin embargo, su procedimiento de purificación, al igual que el de cualquier otra enzima, es un proceso sumamente complejo.

En la actualidad existen disímiles técnicas extractivas y de aislamiento, pero la ciencia avanza cada vez más hacia la utilización de métodos sencillos, rápidos y económicos que brinden un producto final en el menor número de pasos. Entre estos métodos se destaca la purificación en sistemas bifásicos acuosos (SBA), que se caracterizan por ser simples y brindar un ambiente de alta estabilidad para las macromoléculas. Además, a diferencia de otros métodos, estos pueden ser escalados sin grandes complicaciones. Por estas razones, este trabajo tiene como objetivo estudiar los sistemas bifásicos acuosos en la separación y purificación de la pepsina proveniente de los desechos de matadero.

Materiales y Métodos

Obtención de los crudos enzimáticos. Se tomó la mucosa gástrica de tres estómagos por especie (cerdos y bovinos) para realizar la obtención de los homogenados. Los animales a los que se les extrajo el órgano consumían la misma dieta y pertenecían a la misma categoría (ceba).

Inmediatamente después de extraído el estómago del animal recién sacrificado, se separó la mucosa. Se enjuagó con solución salina y se tomaron regiones específicas. En el cerdo, se tomó la mucosa de la región fúndica del estómago y en el bovino, la mucosa gástrica del abomaso, hasta coleccionar un peso total de 100 g de mucosa. La mucosa colectada se cortó en pequeñas porciones, se removió la grasa de forma manual y se mezcló con 300 mL de buffer fosfato de potasio 50 mM a pH 7.0 mediante un homogeneizador de cuchilla, con ciclos cortos y repetidos de 1 min. cada uno. El extracto crudo se filtró con fibra de vidrio para remover restos celulares groseros, y luego se centrifugó a baja temperatura (5 °C) durante veinte minutos a 15000 rpm. El sobrenadante se dividió en pequeñas fracciones y se almacenó a -20 °C hasta su uso posterior (Boeris *et al.* 2009).

Antes de su utilización, el homogenado se descongeló y se eliminó la grasa acumulada en la parte superior mediante el empleo de pipetas Pasteur.

Preparación de los sistemas bifásicos. Los sistemas bifásicos (SBA) se formaron con polietilenglicol (PEG) de diferentes masas moleculares (1500 y 3000) y fosfato de potasio (Pi), según se indica en la tabla 1. La concentración de estos compuestos se seleccionó de acuerdo con particiones informadas por Boeris *et al.* (2009) y según los diagramas binodiales propuestos por Lei *et al.* (1990) y Tubío *et al.* (2007).

Se prepararon 2 g de cada sistema a pH 6.0 por

Table 1. Composition of PEG/phosphate systems

System	[PEG] (% P/P)	[Salt] (% P/P)	Water (% P/P)
PEG 1500/Pi	13.88	15.74	70.38
PEG 3000/Pi	11.80	13.70	74.50

agitated by inversion and were let to rest for 24 h in separating funnel at constant temperature. Once reached the balance, the upper and lower phases were separated and six new smaller ATPS were reconstituted to later test the pepsin distribution.

Determination of distribution coefficient. To determine the coefficient of enzyme distribution, 250 μ L of a solution pepsin concentration pattern 10 g/L were added to the preformed two-phase system, which contained 2 mL of each balanced phase.

To determine the effect of temperature, the coefficient of enzyme distribution in the different systems (PEG 1500 and PEG 3000) at 8 and 20 °C was evaluated. After mixing by inversion for a minute, it was let to rest 30 min. in bath with controlled temperature, prior to phase separation to allow the balance distribution was reached. There was not variation in the volume of each phase when adding the protein. Subsequently, it was removed with micropipette the maximum amount of both phases discarding the interface.

The coefficient of pepsin pattern distribution was calculated as the ratio of enzyme activity in the upper and lower phases respectively.

For the distribution of porcine (PH) and bovine (BH) homogenates it was proceeded to prepare the two-phase systems the same way as for the distribution of pure enzyme. The constituents were mixed and equilibrated for 30 min. at 20 °C, shake by inversion and then, let to rest for 24 h in separating funnels, at constant temperature of 25 °C.

To prevent the disappearance of ATPS by dilution, BH and PH masses corresponding at 15% of the total mass of the system were used. The volume ratio between the phases, once the balance was reached ($R = 1$), did not affect the distribution constant.

The distribution was carried out in rest for 2 h at 20 °C. Separated the upper and lower phases, three samples of each phase per each two- phase system were taken and enzyme activity and total protein concentration was determined.

The distribution constants of total protein and enzyme, for each homogenate were determined by the ratio of protein concentration and enzyme activity between the phases, respectively.

Determination of proteins concentration. The protein concentration of homogenates, and their purified fractions by the aqueous two- phase system, was determined by absorbance readings at 280 nm. For calculating a pattern curve of serum bovine albumin with concentration range between 0.05 and 0.5 mg/mL was used. All analyzes were performed in triplicate. To correct interference by phases, target systems without protein were used.

In the distribution of the enzyme pattern (pepsin), the concentration was determined by calibration curves on the upper and lower phases of the two-phase systems under study. Pepsin concentration

peso directo de los componentes. Los constituyentes se mezclaron y equilibraron durante 30 min. a 20 °C. Se agitaron luego por inversión y se dejaron en reposo durante 24 h en ampollas de decantación a temperatura constante. Una vez alcanzado el equilibrio, las fases superiores e inferiores se separaron y se reconstituyeron seis nuevos SBA más pequeños para ensayar posteriormente el reparto de la pepsina.

Determinación del coeficiente de reparto. Para determinar el coeficiente de reparto de la enzima, se incorporaron 250 μ L de una solución de pepsina patrón de concentración 10g/L al sistema bifásico preformado, el cual contenía 2 mL de cada fase equilibrada.

Para determinar el efecto de la temperatura, se evaluó el coeficiente de reparto de la enzima en los diferentes sistemas (PEG 1500 Y PEG 3000) a 8 y 20 °C. Luego de mezclar por inversión durante un minuto, se dejó reposar 30 min. en baño con temperatura controlada, previo a la separación de las fases para permitir que se alcanzara el equilibrio de reparto. No se observó variación en el volumen de cada fase al añadir la proteína. Posteriormente, se retiró con micropipeta la máxima cantidad de ambas fases descartando la interface.

El coeficiente de reparto de la pepsina patrón se calculó como la relación de actividad enzimática en las fases superior e inferior, respectivamente.

Para el reparto de los homogenados porcino (HP) y bovino (HB) se procedió a preparar los sistemas bifásicos de igual forma que para el reparto de la enzima pura. Los constituyentes se mezclaron y se equilibraron durante 30 min. a 20 °C, se agitaron por inversión y luego, se dejaron en reposo durante 24 h en ampollas de decantación, a temperatura constante de 25 °C.

Para evitar la desaparición del SBA por dilución, se emplearon masas de HB y HP correspondientes a 15 % de la masa total del sistema. La relación de volúmenes entre las fases, una vez que se alcanzó el equilibrio ($R=1$), no afectó la constante de reparto.

El reparto se llevó a cabo en reposo durante 2 h a 20 °C. Separadas las fases superior e inferior, se tomaron tres muestras de cada fase por cada sistema bifásico y se determinó la actividad enzimática y concentración de proteínas totales.

Las constantes de reparto de proteínas totales y de enzima, para cada homogenado se determinaron mediante la relación de concentración de proteínas y de actividad enzimática entre las fases, respectivamente.

Determinación de la concentración de proteínas. La concentración de proteínas de los homogenados, así como de sus fracciones purificadas por el sistema bifásico acuoso, se determinó mediante lecturas de absorbancia a 280 nm. Para el cálculo se empleó una curva patrón de sero albumina bovina con intervalo de concentración entre 0.05 y 0.5 mg/mL. Todos los análisis se realizaron por triplicado. Para corregir las interferencias por parte de las fases, se emplearon sistemas blancos sin proteínas.

En el reparto de la enzima patrón (pepsina), la

interval between 0.05 and 0.5 mg/mL for each phase were used and targets without proteins to correct possible interference. All analyzes were performed in triplicate.

Determination of enzyme activity. The enzyme activity of crudes and their purified fractions was determined by the technique of milk coagulation, described by Tubío *et al.* (2007).

Increasing volumes (50, 75, 100, 150 and 200 uL) of commercial pepsin solution (0.1 g/L) were added to the tubes with 2 mL of milk, so that the aggregate volume did not exceed 10% of the total volume for measures of coagulation time (Ct) not be affected by dilution. To perform a calibration curve the Ct for each of the added volumes of pepsin were calculated and Ct was showed in a graph versus 1/mass (1/μg) of pepsin aggregates.

The concentration of pepsin average in g/L in the different samples was calculated by interpolation of the values of Ct in the calibration curve.

The inverse of the slope of the graph Ct vs. 1/μL allows to obtaining the coagulase activity –total activity in U/mL. An enzymatic unit is defined as the amount of enzyme that coagulates 2 mL of skim milk at 35 °C per minute. All measurements were performed in triplicate.

Determination of purification factor. It was determined by the ratio of enzymatic activity obtained in the separation process with respect to the initial enzymatic activity (Bravo *et al.* 2011).

Yield (y %) of total proteins and pepsin in superior phase of each system was calculated using the following equation (Bravo *et al.* 2011):

$$y \% = \frac{100}{1 + \frac{1}{K_p R}}$$

Where:

Kp is the constant of pepsin distribution

R is the volume ratio between the upper and lower phases, respectively

Statistical analysis. To study the effect of temperature and molar mass in the distribution constant of pepsin pattern an analysis of variance was carried out, according to simple classification model with factorial arrangement 2 x 2. The Duncan test (1955) was applied for comparing means.

The determinations of the enzymatic activity, protein concentration and distribution constants, were analyzed according to simple classification model. The mean values were compared by the Duncan test (1955) in necessary cases. The data were analyzed using computer statistical package InfoStat, version 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012).

Results and Discussion

Table 2 shows the effect of temperature and the molecular mass of PEG on the distribution constant of

concentración se determinó mediante curvas de calibración en las fases superior e inferior de los sistemas bifásicos en estudio. Se empleó intervalo de concentración de pepsina entre 0.05 y 0.5 mg/mL para cada fase y blancos sin proteína para corregir las posibles interferencias. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Determinación de la actividad enzimática. La actividad enzimática de los crudos como de sus fracciones purificadas se determinó mediante la técnica de coagulación de la leche, descrita por Tubío *et al.* (2007).

Se agregaron volúmenes crecientes (50, 75, 100, 150 y 200 uL) de una solución de pepsina comercial (0,1 g/L) a los tubos con 2 mL de leche, de modo que el volumen agregado no superara 10 % del volumen total para que las medidas del tiempo de coagulación (Tc) no se afectaran por la dilución. Para realizar una curva de calibración se calcularon los Tc para cada uno de los volúmenes agregados de pepsina y se graficó Tc en función de 1/masa (1/μg) de pepsina agregados.

La concentración de pepsina promedio en g/L en las diferentes muestras se calculó por interpolación de los valores de Tc en la curva de calibración.

La inversa de la pendiente de la gráfica Tc vs 1/μL permite obtener la actividad coagulasa -actividad total- en U/mL. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que coagula 2 mL de leche descremada a 35 °C por minuto. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Determinación del factor de purificación. Se determinó mediante la relación de la actividad enzimática obtenida en el proceso de separación con respecto a la actividad enzimática inicial (Bravo *et al.* 2011).

Se calculó el rendimiento (y %) de proteínas totales y el de pepsina en la fase superior de cada sistema mediante la siguiente ecuación (Bravo *et al.* 2011):

$$y \% = \frac{100}{1 + \frac{1}{K_p R}}$$

Donde:

Kp es la constante de reparto de la pepsina

R es la relación de volúmenes entre las fases superior e inferior, respectivamente

Análisis estadístico. Para el estudio del efecto de la temperatura y la masa molar en la constante de reparto de la pepsina patrón se realizó un análisis de varianza, según modelo de clasificación simple con arreglo factorial 2 x 2. Se aplicó la dócima de Duncan (1955) para la comparación de medias.

Las determinaciones de la actividad enzimática, la concentración de proteínas y las constantes de reparto, se analizaron según modelo de clasificación simple. Los valores medios se compararon mediante la dócima de Duncan (1955) en los casos necesarios. Los datos se analizaron mediante el paquete estadístico computarizado InfoStat, versión 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012).

pepsin pattern.

The best pepsin distributions were found in systems with PEG 1500 and for a temperature of 20 °C. These results are in agreement with that of pointed by Spelzini *et al.* (2006, 2011), who reported that the systems

Resultados y Discusión

La tabla 2 muestra el efecto de la temperatura y la masa molecular del PEG en la constante de reparto de la pepsina patrón.

Table2. Effect of temperature and molecular mass of PEG on the distribution constant of pepsin pattern (Kp) in ATPS.

Molecular mass of PEG	Temperatura, °C		SE± and significance
	8	20	
1500	2.76 ^c	3.89 ^d	0.02
3000	1.60 ^a	2.05 ^b	P<0.0001

Means with different letters differ at P<0.05

better adapted to separate the pepsin are those with low molecular masses of PEG.

In this study a satisfactory separation of the enzyme towards the upper phase of the two systems was obtained, with values of coefficient distribution higher to the unit, which indicates a favorable interaction between the protein and PEG. This performance of pepsin in the two-phase system is due to, mainly, to its structure, because although most of the hydrophobic residues are inside the molecule, this has a high hydrophobic character in the surface exposed to the solvent, generating interactions with the system under study (Spelzini *et al.* 2005).

The PEG has a flexible molecule, which can acquire a compact structure that is stabilized by intramolecular hydrophobic unions. This compact structure has lower interaction with the solvent than the molecules fully extended, allowing interacts with the protein domain (Marini *et al.* 2011). The ability to interact with proteins is also mediated by their molecular mass and the effect of temperature (Bassani *et al.* 2010).

According to Tubío *et al.* (2007), the increase in the molecular mass of PEG induces the displacement the distribution equilibrium towards the phase where the polymer is in lower concentration, that is, towards the lower phase. The volume excluded by the PEG increases as its molecular mass increases, causing a transfer of pepsin to the salt- rich phase, with the consequent decrease of the distribution constant. This effect agrees with the results which are obtained in this study.

Arakawa and Timasheff (1985) studied the interaction between PEG and lacto globulin β , depending on the molecular mass of PEG. These authors observed that the preferential exclusion increases when the size of the PEG increases. This result is in favor of the steric exclusion as one of the factors which determines the interaction of PEG with proteins.

In the case of the effect of temperature on the distribution enzyme, it is observed that an increase in it induces a displacement of pepsin to the polymer-rich phase, informed by Spelzini *et al.* (2008). This effect is manifested for most of proteins, where the temperature increase leads to the distribution coefficient increase.

Los mejores repartos de la pepsina se encontraron en los sistemas con PEG 1500 y para una temperatura de 20 °C. Estos resultados están en concordancia con lo planteado por Spelzini *et al.* (2006, 2011), quienes informan que los sistemas más adaptados para separar la pepsina son aquellos con bajas masas moleculares de PEG.

En este estudio se logró una separación satisfactoria de la enzima hacia la fase superior de ambos sistemas, con valores de coeficientes de reparto superiores a la unidad, lo que indica una interacción favorable entre la proteína y el PEG. Este comportamiento de la pepsina en el sistema bifásico se debe, principalmente, a su estructura, ya que aunque la mayor parte de los residuos hidrofóbicos se encuentran hacia el interior de la molécula, esta posee un alto carácter hidrofóbico en la superficie expuesta al solvente, lo que genera las interacciones con el sistema en estudio (Spelzini *et al.* 2005).

El PEG presenta una molécula flexible, que puede adquirir una estructura compacta que se estabiliza por uniones hidrofóbicas intramoleculares. Esta estructura compacta tiene menor interacción con el solvente que las moléculas completamente extendidas, lo que permite que interactúe con el dominio proteico (Marini *et al.* 2011). La capacidad de interactuar con las proteínas está mediada además por su masa molecular y por el efecto de la temperatura (Bassani *et al.* 2010).

Según Tubío *et al.* (2007), el aumento en la masa molecular del PEG induce el desplazamiento del equilibrio de reparto hacia la fase donde dicho polímero se encuentra en menor concentración, o sea, hacia la fase inferior. El volumen excluido por el PEG aumenta a medida que se incrementa su masa molecular, lo que provoca una transferencia de la pepsina a la fase rica en sal, con la consecuente disminución de la constante de reparto. Este efecto concuerda con los resultados que se obtienen en este estudio.

Arakawa y Timasheff (1985) examinaron la interacción entre PEG y β lacto globulina, en función de la masa molecular de PEG. Estos autores observaron que la exclusión preferencial se incrementa cuando se aumenta el tamaño del PEG. Este resultado está a favor de la exclusión estérica como uno de los factores que

Several authors stated (Imelio *et al.* 2008, Spelzini *et al.* 2008) that in the systems formed by PEG / Pi, the pepsin transfer from the salt- rich phase towards the PEG -rich phase is favored by increase of temperature, mainly to low molecular mass of PEG. Spelzini *et al.* (2011) studied the heat associated with the pepsin distribution and found that enthalpy changes are associated with the transfer of pepsin from the salt-rich phase to the PEG- rich phase.

When the transfer of protein from one phase to the other is carried out, a large enthalpy change suggests the breaking of many intermolecular unions (structured water in the protein domain and in the polymer). This effect may be due to the strong interaction PEG-protein that induces the displacement of water in the protein domain. It is also considered, that the structured water around the hydrophobic chain (ethylene) of PEG molecule release the ordered water (Tubío *et al.* 2007).

As it is shown in figure 1, high separation of contaminating proteins was achieved. The enzyme was distributed mainly towards the upper PEG- rich phase and most of their impurities towards the interface and the lower phase.

Figure 2 show that the values of enzymatic activity in the upper phase of each system have higher values to those of the lower phase and to the original preparations.

Spelzini *et al.* (2011) refers that PEG produces interaction not destabilizing in the secondary structure of protein. Therefore, to separate the enzymes in the upper PEG-rich phase is a benefit, in terms of stability for subsequent purification steps.

As figure 3 shows, there is greater enzyme distribution than the total proteins, suggesting high recovery of enzymatic activity in the upper phase of the system in relation to the rest of the proteins present in the

determinan la interacción de PEG con proteínas.

En el caso del efecto de la temperatura en el reparto de la enzima, se observa que un incremento en la misma induce un desplazamiento de la pepsina hacia la fase rica en polímero, según informó Spelzini *et al.* (2008). Este efecto se manifiesta para la mayoría de las proteínas, donde el aumento de temperatura conduce al incremento del coeficiente de reparto.

Varios autores plantean (Imelio *et al.* 2008, Spelzini *et al.* 2008) que en los sistemas formados por PEG/Pi, la transferencia de pepsina desde la fase rica en sal hacia la fase rica en PEG se favorece por aumento de la temperatura, fundamentalmente a baja masa molecular de PEG. Spelzini *et al.* (2011) estudiaron el calor asociado al reparto de la Pepsina y encontraron que grandes cambios de entalpía están asociados a la transferencia de pepsina desde la fase rica en sal a la fase rica en PEG.

Cuando se lleva a cabo la transferencia de proteína de una fase a la otra, un gran cambio de entalpía sugiere la ruptura de numerosos enlaces intermoleculares (agua estructurada en el dominio proteico y en el polímero). Este efecto se puede deber a la fuerte interacción PEG-proteína que induce el desplazamiento del agua en el dominio proteico. Se piensa además, que el agua estructurada alrededor de la cadena hidrofóbica (etileno) de la molécula de PEG libera el agua ordenada (Tubío *et al.* 2007).

Como se muestra en la figura 1, se logró alta separación de las proteínas contaminantes. la enzima se repartió mayoritariamente hacia la fase superior rica en PEG y la mayoría de sus impurezas hacia la interface y la fase inferior.

La figura 2 muestra que los valores de actividad enzimática en la fase superior de cada sistema presentan valores superiores a los de la fase inferior y a los preparados originales.

Spelzini *et al.* (2011) refieren que el PEG produce interacción de tipo no desestabilizante en la estructura

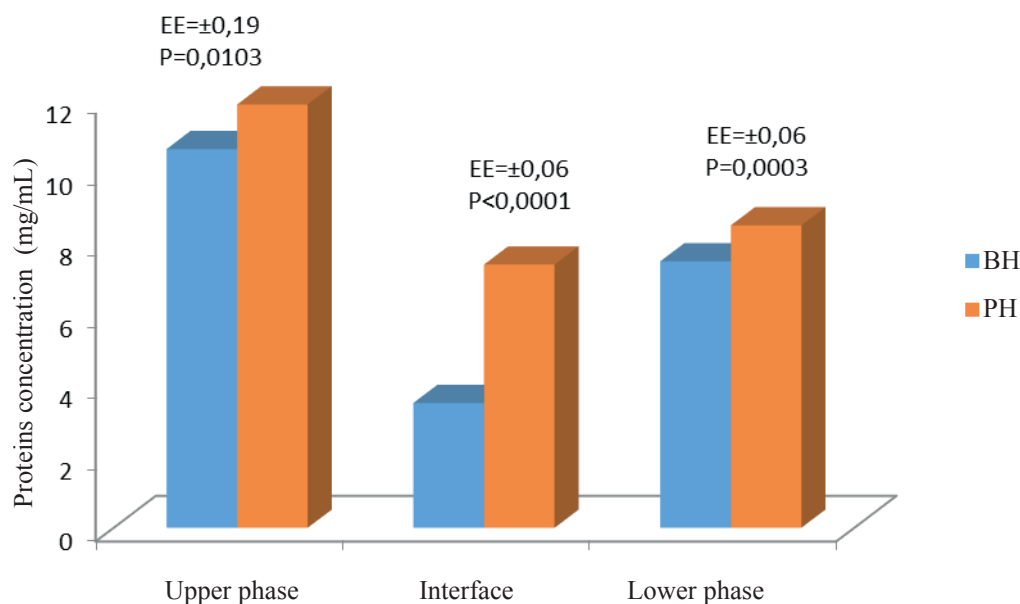


Figure 1. Distribution of total proteins in the different phases of the aqueous two-phase system: PH (porcine homogenate), BH (bovine homogenate).

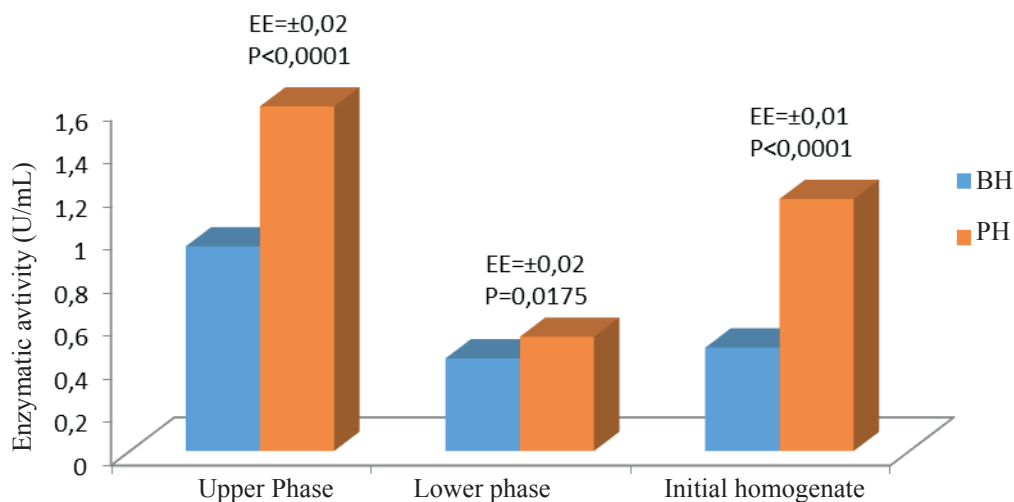


Figure 2. Enzymatic activity in the different phases of the aqueous two-phase system: PH (porcine homogenate), BH (bovine homogenate).

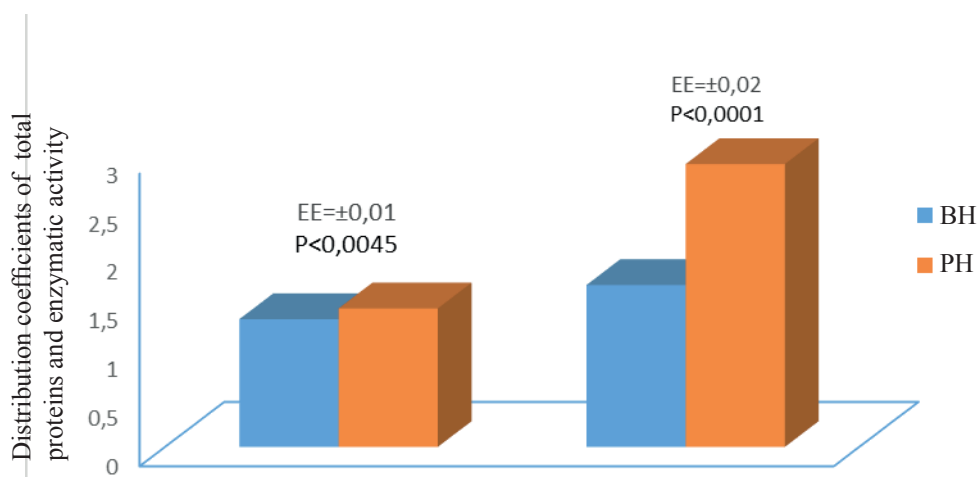


Figure 3. Distribution coefficients of total proteins (Kp) and enzymatic activity (Ke) for the distribution of porcine and bovine (PH and BH) homogenates, in PEG1500/Pi (R= 1) systems.

homogenates.

Figure 4 shows that for both homogenates a purification factor exceeding three was obtained, which indicate that the target protein of a complex mixture was extracted. Although the porcine homogenate showed higher yield of enzymatic activity, for both homogenates best performance of enzyme was achieved than of protein, which shows the separation of pepsin of much of the contaminating proteins.

As for the purification factor, values higher than three were reached. Differences between homogenates are associated with higher concentration of contaminating proteins in the porcine homogenate.

Previous studies of pepsin purification from their natural sources with the use of PEG/Pi two-phase systems described by Rito (2004) and Boeris *et al.* (2009) refers yield values and purification factors similar to this study.

It is known that the yield of a pure enzyme is very high (between 80 and 95 %). However, when the method is used in the purification of the same enzyme in a

secundaria de las proteínas. Por ello, separar las enzimas en la fase superior rica en PEG supone un beneficio, en cuanto a la estabilidad para posteriores pasos de purificación.

Como muestra la figura 3, hay mayor reparto de enzima que de proteínas totales, lo que sugiere alta recuperación de la actividad enzimática en la fase superior del sistema en relación con el resto de las proteínas presentes en los homogenados.

La figura 4 muestra que para ambos homogenados se obtuvo un factor de purificación superior a tres, lo que indica que se extrajo la proteína blanco de una mezcla compleja. Aunque el homogenado porcino mostró mayor rendimiento de actividad enzimática, para ambos homogenados se logró mejor rendimiento de enzima que de proteína, lo que evidencia la separación de la pepsina de gran parte de las proteínas contaminantes.

En cuanto al factor de purificación, se alcanzaron valores superiores a tres. Las diferencias entre los homogenados se asocian a que existe mayor concentración de proteínas contaminantes en el homogenado porcino.

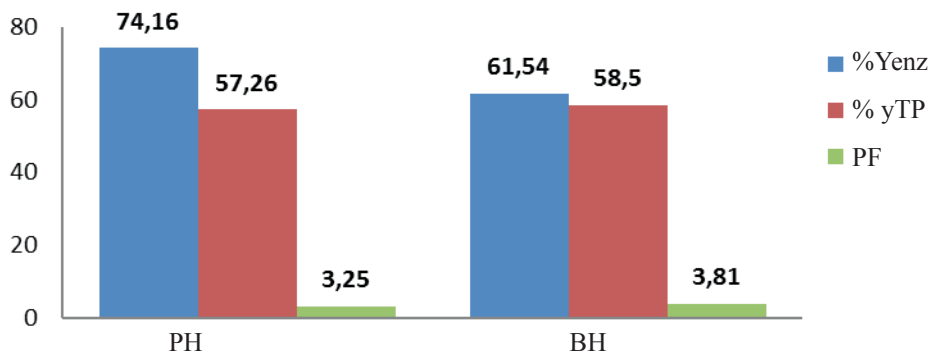


Figure 4. Yield of total proteins (% yTP), yield of the de enzymatic activity (%Yenz) and purification factor (PF) for porcine (PH) and bovine (BH) homogenates.

complex mixture, such as the animal tissue homogenate or plant tissue homogenate, the yield is lower. This is due to the presence of other macromolecules such as nucleic acids and proteins, which can interact with the enzyme and cause its precipitation on the interface (Bassani *et al.* 2010).

Pepsin is purified from their natural sources by different methods, which it combines the fractional precipitation with addition of salts (Páez de Leon *et al.* 1995) and polyelectrolytes of opposite load (Boeris *et al.* 2009), the anionic exchange chromatography (Rocha *et al.* 2010), gel filtration (Brier *et al.* 2007), among others. Most of these methods allow obtaining only a very few amount of the enzyme. Furthermore, in many cases the process is complex and expensive.

Pepsin purification with the use of aqueous two-phase systems provides a simple, fast and inexpensive alternative besides of having the possibility of being widely applied (Du *et al.* 2007). The use of this method to obtain preparations that do not require high degrees of purity is of choice, as the characteristics of the system provide a suitable environment that preserves the biological activity of materials and provides high stability to macromolecules (Kayitmazer *et al.* 2007).

It is concluded that the two-phase system composed by PEG1500/potassium phosphate at a distribution temperature of 20 °C was the variant that achieved the best pepsin distribution towards the upper PEG rich- phase. This system allow eliminates most of the contaminating proteins in a stage, obtain a purification factor higher three for each extract and ensure an acceptable purity for subsequent extractive steps of the enzyme.

Estudios anteriores de purificación de pepsina a partir de sus fuentes naturales con la utilización de los sistemas bifásicos PEG/Pi descritos por Rito (2004) y Boeris *et al.* (2009) refieren valores de rendimiento y factores de purificación semejantes a este estudio.

Se conoce que el rendimiento de una enzima pura es muy alto (entre 80 y 95 %). Sin embargo, cuando el método se emplea en la purificación de la misma enzima presente en una mezcla compleja, como es el homogenado de tejido animal o tejido vegetal, el rendimiento es más bajo. Esto se debe a la presencia de otras macromoléculas como los ácidos nucleicos y las proteínas, que pueden interactuar con la enzima y causar su precipitación en la interface (Bassani *et al.* 2010).

La pepsina se purifica a partir de sus fuentes naturales por diferentes métodos, los que combinan la precipitación fraccionada con adición de sales (Páez de León *et al.* 1995) y polielectrolitos de carga opuesta (Boeris *et al.* 2009), la cromatografía de intercambio aniónico (Rocha *et al.* 2010), la filtración en gel (Brier *et al.* 2007), entre otros. La mayoría de estos métodos solo permiten obtener muy poca cantidad de la enzima. Además, el proceso en muchos casos es complejo y costoso.

La purificación de pepsina con la utilización de los sistemas bifásicos acuosos brinda una alternativa simple, rápida y de bajo costo, además de que tiene la posibilidad de aplicarse a gran escala (Du *et al.* 2007). El empleo de este método para la obtención de preparados que no requieran altos grados de pureza resulta de elección, pues las características del sistema brindan un entorno adecuado que preserva la actividad biológica de materiales y proporciona alta estabilidad a las macromoléculas (Kayitmazer *et al.* 2007).

Se concluye que el sistema bifásico compuesto por PEG1500/fosfato de potasio a una temperatura de reparto de 20 °C fue la variante que logró el mejor reparto de la pepsina hacia la fase superior rica en PEG. Este sistema permite eliminar gran parte de las proteínas contaminantes en una sola etapa, obtener un factor de purificación superior a tres para cada extracto y garantizar una pureza aceptable para posteriores pasos extractivos de la enzima.

References

- Arakawa, T. & Timasheff, S. N. 1985. "Mechanism of polyethylene glycol interaction with proteins". *Biochemistry*, 24(24): 6756–6762, ISSN: 0006-2960, 1520-4995, DOI: 10.1021/bi00345a005.
- Bassani, G., Fuciños, P., Picó, G. & Farruggia, B. 2010. "Candida rugosa lipase Lip1–polyethyleneglycol interaction and the relation with its partition in aqueous two-phase systems". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(2): 532–537, ISSN: 0927-7765, DOI: 10.1016/j.colsurfb.2009.09.031.
- Boeris, V., Spelzini, D., Farruggia, B. & Picó, G. 2009. "Aqueous two-phase extraction and polyelectrolyte precipitation combination: A simple and economically technologies for pepsin isolation from bovine abomasum homogenate". *Process Biochemistry*, 44(11): 1260–1264, ISSN: 13595113, DOI: 10.1016/j.procbio.2009.07.001.
- Bravo, M. K. E., Muñoz, D. K., Calderón, G. J. & Osorio, D. E. J. 2011. "Desarrollo de un método para la extracción de polifenol oxidasa de uchuva (*Physalis peruviana* L.) y aislamiento por sistemas bifásicos acuoso". *Vitae*, 18(2): 124–132, ISSN: 0121-4004, 2145-2660.
- Brier, S., Maria, G., Carginale, V., Capasso, A., Wu, Y., Taylor, R. M., Borotto, N. B., Capasso, C. & Engen, J. R. 2007. "Purification and characterization of pepsins A1 and A2 from the Antarctic rock cod *Trematomus bernacchii*". *FEBS Journal*, 274(23): 6152–6166, ISSN: 1742464X, DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.06136.x.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C. W. 2012. InfoStat. version 2012, [Windows], Universidad Nacional de Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat, Available: <http://www.infostat.com.ar/>.
- Du, Z., Yu, Y. L. & Wang, J. H. 2007. "Extraction of Proteins from Biological Fluids by Use of an Ionic Liquid/Aqueous Two-Phase System". *Chemistry - A European Journal*, 13(7): 2130–2137, ISSN: 09476539, 15213765, DOI: 10.1002/chem.200601234.
- Duncan, D. B. 1955. "Multiple Range and Multiple F Tests". *Biometrics*, 11(1): 1–42, ISSN: 0006-341X, DOI: 10.2307/3001478.
- Imelio, N., Marini, A., Spelzini, D., Picó, G. & Farruggia, B. 2008. "Pepsin extraction from bovine stomach using aqueous two-phase systems: Molecular mechanism and influence of homogenate mass and phase volume ratio". *Journal of Chromatography B*, 873(2): 133–138, ISSN: 15700232, DOI: 10.1016/j.jchromb.2008.07.006.
- Kayitmazer, A. B., Strand, S. P., Tribet, C., Jaeger, W. & Dubin, P. L. 2007. "Effect of Polyelectrolyte Structure on Protein–Polyelectrolyte Coacervates: Coacervates of Bovine Serum Albumin with Poly (diallyl dimethyl ammonium chloride) versus Chitosan". *Biomacromolecules*, 8(11): 3568–3577, ISSN: 1525-7797, 1526-4602, DOI: 10.1021/bm700645t.
- Lei, X., Diamond, A. D. & Hsu, J. T. 1990. "Equilibrium phase behavior of the poly(ethylene glycol)/potassium phosphate/water two-phase system at 4.degree.C". *Journal of Chemical & Engineering Data*, 35(4): 420–423, ISSN: 0021-9568, 1520-5134, DOI: 10.1021/je00062a014.
- Marini, A., Imelio, N., Picó, G., Romanini, D. & Farruggia, B. 2011. "Isolation of a *Aspergillus niger* lipase from a solid culture medium with aqueous two-phase systems". *Journal of Chromatography B*, 879(22): 2135–2141, ISSN: 15700232, DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.05.042.
- Montes de Oca, O. A., Bermúdez, R. C. & Serrat, D. M. 2013. "Evaluación del boniato tetuanado como sustrato para la obtención de proteína microbiana". *Tecnología Química*, 33(3): 340–352, ISSN: 2224-6185.
- Morillo, O. T., García, L. P. J., Guerrero, C. B. R., Torres, V. Y. & Castañeda, R. R. 2015. "Evaluación de la producción experimental de enzimas coagulantes de leche utilizando cepas de *Rhizomucor spp.*". *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(1): 54–60, ISSN: 1909-8758, 0123-3475, DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50701.
- Páez de León, L., Pinzón, G. & Otaiza, V. E. 1995. "Purification and assay of chicken pepsin". *Acta Científica Venezolana*, 46(4): 237–241, ISSN: 0001-5504, PMID: 9334437.
- Rito, P. M. 2004. "Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products". *Journal of Chromatography B*, 807(1): 3–11, ISSN: 1570-0232, DOI: 10.1016/j.jchromb.2004.01.008.
- Rocha, G. F., Fernández, G. & Parisi, M. G. 2010. "Estudios de Caracterización Cinética y Fisicoquímica de una Proteinasa Aspártica Aislada de Frutos Maduros de *Salpichroa origanifolia*". *Información Tecnológica*, 21(2): 21–28, ISSN: 0718-0764, DOI: 10.4067/S0718-07642010000200004.
- Saval, S. 2012. "Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro". *BioTecnología*, 16(2): 14–46.
- Spelzini, D., Farruggia, B., Guerra, N. P., Rua, M. L. & Pastrana, L. 2011. "Production of aspartic peptidases by *Aspergillus spp.* using tuna cooked wastewater as nitrogen source and further extraction using aqueous two phase system". *African Journal of Biotechnology*, 10(68): 15287–15294, ISSN: 1684-5315, DOI: 10.4314/ajb.v10i68.
- Spelzini, D., Farruggia, B. & Picó, G. 2005. "Features of the acid protease partition in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol–phosphate: Chymosin and pepsin". *Journal of Chromatography B*, 821(1): 60–66, ISSN: 15700232, DOI: 10.1016/j.jchromb.2005.04.007.
- Spelzini, D., Peleteiro, J., Picó, G. & Farruggia, B. 2008. "Polyethyleneglycol–pepsin interaction and its relationship with protein partitioning in aqueous two-phase systems". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 67(2): 151–156, ISSN: 09277765, DOI: 10.1016/j.colsurfb.2008.06.013.
- Spelzini, D., Picó, G. & Farruggia, B. 2006. "Dependence of chymosin and pepsin partition coefficient with phase volume and polymer pausidispersity in polyethyleneglycol–phosphate aqueous two-phase system". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 51(1): 80–85, ISSN: 09277765, DOI: 10.1016/j.colsurfb.2006.03.023.
- Tubío, G., Nerli, B. & Picó, G. 2007. "Partitioning features of bovine trypsin and α -chymotrypsin in polyethyleneglycol-sodium citrate aqueous two-phase systems". *Journal of Chromatography B*, 852(1–2): 244–249, ISSN: 15700232, DOI: 10.1016/j.jchromb.2007.01.025.