



APLICACIÓN GENÉRICA DE SISTEMAS DE DOS FASES ACUOSAS POLIETILÉNGLICOL – SAL PARA EL DESARROLLO DE PROCESOS DE RECUPERACIÓN PRIMARIA DE COMPUESTOS BIOLÓGICOS

GENERIC APPLICATION OF POLYETHYLENE GLYCOL – SALT AQUEOUS TWO- PHASE SYSTEMS FOR THE DEVELOPMENT OF PROCESSES TO BIOLOGICAL PRODUCTS PRIMARY RECOVERY

J. Benavides y M. Rito-Palomares*

Departamento de Biotecnología e Ingeniería de Alimentos, Tecnológico de Monterrey
Eugenio Garza Sada 2501 Sur, CP 64849, Monterrey NL, México.

Recibido 2 de Noviembre 2007; Aceptado 5 de Agosto 2008

Resumen

Se evaluó la aplicación genérica de los sistemas de dos fases acuosas (SDFA) polietilén-glicol (PEG) – solución salina como una estrategia práctica para el desarrollo de bioprocesos que permiten la recuperación primaria de compuestos biológicos. Se utilizaron cuatro modelos experimentales: B-ficoeritrina (BFE) producida por *Porphyridium cruentum*, C-ficocianina (CFC) producida por *Spirulina maxima*, pseudo-partículas 2/6 de rotavirus (dRLP) producidas por células de insecto High Five™ y por último luteína producida por *Chlorella protothecoides*. Se estudió la influencia de los parámetros de sistema (peso molecular del polímero, PM PEG; longitud de línea de corte, LLC; relación de volumen, V_R ; el pH del sistema) sobre el comportamiento de partición de los modelos experimentales seleccionados. Se establecieron condiciones de proceso para la recuperación primaria de los productos de interés utilizando SDFA. Dichas condiciones resultan en procesos con un reducido número de etapas, lo cual favorece el rendimiento obtenido de los productos. La influencia de los parámetros de sistema sobre el comportamiento de partición de los productos fue correlacionada con sus características fisicoquímicas, lo cual permitió establecer reglas generales que facilitan el desarrollo predictivo de procesos para la recuperación primaria de compuestos biológicos utilizando SDFA PEG – solución salina.

Palabras clave: sistemas de dos fases acuosas, recuperación primaria, compuestos biológicos.

Abstract

The generic application of Aqueous Two-Phase Systems (ATPS) polyethylene glycol (PEG) – salt was evaluated as a practical strategy for the development of bioprocesses for the primary recovery of biological products. Four experimental models were used: B-phycoerythrin (BFE) from *Porphyridium cruentum*, C-phycoerythrin (CFC) from *Spirulina maxima*, double layered rotavirus-like particles (dRLP) produced in High Five™ insect cells, and lutein from *Chlorella protothecoides*. Influence of the system parameters (polymer molecular weight, MW PEG; tie line length, TLL; volume ratio, V_R ; system pH) upon partition behavior of the selected experimental models. Process conditions for the primary recovery of the products of interest using ATPS were established. Such conditions result in processes with reduced number of stages, which favored high yields. The influence of system parameters upon partition behavior of the four experimental models was correlated with their physicochemical properties, which allowed establishing general rules that facilitate the predictive development of processes for the primary recovery of biological products using SDFA PEG – salt.

Keywords: aqueous two-phase systems, primary recovery, biological products.

1. Introducción

Los sistemas de dos fases acuosas (SDFA) es una técnica que han demostrado tener potencial para la recuperación primaria de compuestos biológicos. Los primeros estudios realizados con SDFA llevados a cabo por Albertsson (1956) demostraron que era

posible separar y recuperar componentes celulares (organelos), así como pigmentos de algas y cianobacterias utilizando dicha técnica. De los experimentos de Albertsson (1956) a la fecha se han realizado estudios acerca del comportamiento de partición células, organelos y productos biológicos (tanto proteicos como no proteicos) en SDFA

* Autor para la correspondencia. E-mail: mrito@itesm.mx.

(Shibusawa y col., 2007; Schindler y Nothwang, 2006; Edahiro y col., 2005; Rito-Palomares, 2004; Kepka y col., 2003; Cunha y Aires-Barros, 2002).

Estos sistemas líquido-líquido son formados al mezclar dos sustancias solubles en agua, las cuales al superar cierta concentración se vuelven inmiscibles entre sí, dando como resultado la formación de dos fases. Existen SDFA polímero – polímero (polietilenglicol (PEG) – Dextrano, PEG – Polivinil alcohol, etc.), sin embargo, el uso de dichos sistemas está limitado por los costos de algunos polímeros (principalmente dextrano). Adicionalmente, el PEG forma sistemas de dos fases acuosas cuando es mezclado con soluciones salinas concentradas (PEG – fosfato de potasio, PEG – sulfato de sodio, etc.) (Albertsson y col., 1990). Debido a su bajo costo y corto tiempo de separación los sistemas PEG – sal son frecuentemente empleados. Los SDFA más utilizados y mejor caracterizados son los formados por PEG – fosfato de potasio (Rito-Palomares, 2004).

En años recientes el interés sobre la aplicación de los SDFA como método de recuperación primaria y purificación parcial de compuestos biológicos ha aumentado notablemente. Entre las principales ventajas que ofrece esta técnica de recuperación se encuentra: a) su alta eficiencia, b) factibilidad de escalamiento, c) bajos costos de inversión y operación, y d) generalmente permiten la recuperación y purificación de compuestos biológicos en su forma nativa, lo cual es de gran valor, ya que al conservar la estructura se conserva al mismo tiempo la función específica de los mismos. Los SDFA pueden ser usados en conjunto con otros procesos de separación sin afectar a las etapas previas o posteriores de recuperación (Rito-Palomares, 2002). En los últimos años esta técnica ha adquirido auge, ya que tiene la capacidad de llevar a cabo la integración (sustitución de dos o más operaciones unitarias por una sola) e intensificación (procesamiento de mayor cantidad de material biológico utilizando equipo de la misma capacidad) de procesos.

Los SDFA han sido utilizados exitosamente en la recuperación y purificación de una gran variedad de productos biológicos, como por ejemplo enzimas (Shibusawa y col., 2007; Aguilar y col., 2006; Spelzini y col., 2006; Pico y col., 2006), virus y pseudo-partículas virales (Benavides y col., 2006; Liu y col., 1998; Andrews y col., 1995), pigmentos de naturaleza proteica y no proteica (Benavides y Rito-Palomares, 2006; Esmanhoto y Vahan Kilikian, 2004; Cisneros y col., 2004), DNA genómico y plásmidos (Frerix y col., 2007; Rahimpour y col., 2006; Ribeiro y col., 2002), etc. De igual manera esta técnica ha sido utilizada en el fraccionamiento de células y organelos (Nam y col., 2005; Edahiro y col., 2005; Johansson y Walter, 2000; Morre y Morre, 2000). Sin embargo, a pesar de que esta técnica ha demostrado tener un gran campo de aplicación las investigaciones realizadas se han

enfocado fuertemente hacia la recuperación de proteínas, dejando a un lado compuestos de bajo peso molecular. Actualmente existe un gran auge en el estudio de las propiedades nutraceuticas que algunos compuestos naturales de bajo peso molecular presentan, particularmente fitoquímicos (Rao y Rao, 2007; Iriti y Faoro, 2006). La recuperación de dichos compuestos mediante el uso de SDFA representa un gran campo de oportunidad, por lo cual establecer la aplicación genérica (recuperación de compuestos biológicos proteicos y no proteicos, de alto y bajo peso molecular) de dicha técnica permitiría ampliar el campo de investigación relacionado con la misma.

A pesar de las múltiples ventajas y amplio espectro de aplicación que han demostrado los SDFA el uso de esta técnica ha sido limitado debido a la escasa información acerca de los procesos y fenómenos fisicoquímicos involucrados en el comportamiento de partición (Rito-Palomares, 2004). Generalmente el desarrollo de procesos para la recuperación de compuestos biológicos utilizando sistemas de dos fases acuosas conlleva la realización de experimentos factoriales completos en los cuales los parámetros de sistema (concentración de polímero y sal en el sistema asociado a la longitud de línea de corte LLC; peso molecular del polímero utilizado, PM PEG; relación de volumen entre la fase superior e inferior, V_R ; pH del sistema, pH; etc.) son variados dentro de un amplio rango de valores para de esa manera determinar las condiciones que favorecen la partición del compuesto de interés hacia una fase particular del sistema. Si bien este enfoque brinda excelentes resultados generalmente incurre en gastos innecesarios de recursos y en un elevado tiempo de experimentación. Lo anterior pone en evidencia la necesidad de desarrollar un método para el diseño predictivo de procesos de recuperación primaria de compuestos biológicos utilizando SDFA. El estudio del comportamiento de partición de compuestos biológicos y la correlación de dicho comportamiento con las características fisicoquímicas (peso molecular, punto isoeléctrico e hidrofobicidad) de dichos compuestos permitirían establecer reglas generales que permitan el diseño predictivo de procesos para la recuperación primaria de compuestos biológicos utilizando SDFA.

En esta investigación, se presenta la aplicación genérica de sistemas de dos fases acuosas PEG – solución salina para la recuperación de compuestos biológicos, eligiendo cuatro modelos experimentales ampliamente estudiados por nuestro grupo de investigación (B-ficoeritrina (BFE) producida por *Porphyridium cruentum*, C-ficocianina (CFC) producida por *Spirulina maxima*, pseudo-partículas 2/6 de rotavirus (dIRLP) producidas por células de insecto High FiveTM y luteína producida por *Chlorella protothecoides*). Los resultados previamente reportados fueron utilizados para proponer una correlación de la influencia de los parámetros de sistema sobre el comportamiento de

Tabla 1. Características fisicoquímicas de los modelos experimentales seleccionados.

Modelo Experimental	Peso molecular, PM (g/mol)	Punto isoeléctrico, pI	Hidrofobicidad ^b
Pseudo-partículas virales (dIRLP)	50,000,000	6.5 ^a	Hidrofilico
B-ficoeritrina (BFE)	245,000	4	Hidrofilico
C-ficocianina (CFC)	44,000	4.8	Hidrofilico
Luteína	570	NA	Hidrofóbico

Se muestra el peso molecular, el punto isoeléctrico y la hidrofobicidad de los modelos experimentales seleccionados: B-ficoeritrina producida por *Porphyridium cruentum*, C-ficocianina producida por *Spirulina maxima*, pseudos-partículas 2/6 de rotavirus producidas por células de insecto High FiveTM, y luteína producida por *Chlorella protothecoides*.

^a El punto isoeléctrico de las dIRLP fue estimado mediante el uso del programa computacional CLC Protein Workbench (Versión 2.0.2).

^b La hidrofobicidad de los modelos experimentales fue obtenida mediante la escala Kyte-Doolittle.

partición de los productos provenientes de los modelos seleccionados. Como resultado se obtuvo la información necesaria para establecer reglas generales que facilitan el diseño predictivo de procesos de recuperación primaria mediante sistemas de dos fases acuosas. Dicho diseño predictivo presenta numerosas ventajas al ser comparado con el enfoque tradicional mediante el cual han sido desarrollados los procesos de recuperación primaria utilizando esta técnica.

2. Materiales y Métodos

2.1. Modelos experimentales, sistemas de expresión y ruptura celular.

La Tabla 1 muestra las características fisicoquímicas principales (peso molecular, hidrofobicidad y punto isoeléctrico) de los modelos experimentales seleccionados. Los cuatro modelos experimentales, B-ficoeritrina (BFE) producida por *Porphyridium cruentum*, C-ficocianina (CFC) producida por *Spirulina maxima*, pseudo-partículas 2/6 de rotavirus (dIRLP) producidas por células de insecto High FiveTM, y luteína producida por *Chlorella protothecoides*, fueron obtenidos utilizando condiciones de cultivo y protocolos de ruptura celular previamente reportados por Benavides y Rito-Palomares (2006), Benavides y Rito-Palomares (2005), Benavides y col. (2006), y Cisneros y col. (2004) respectivamente.

2.2. Construcción de los sistemas de dos fases acuosas PEG – solución salina.

Los sistemas de dos fases acuosas se construyeron utilizando soluciones estándar de polietilenglicol (PEG 50% p/p de peso molecular 400, 600, 1000, 1450, 3350 u 8000 g/mol) y solución salina (fosfato de potasio 40% p/p pH 7 o sulfato de amonio 40% p/p pH 5). Los sistemas fueron construidos pesando las soluciones estándar previamente elaboradas en tubos cónicos para microcentrifuga (con capacidad

máxima de 1.8 ml) para los sistemas de 1 gramo de peso total, o bien en tubos cónicos de 15 o 50 ml para los sistemas de mayor peso. Posteriormente se agregó agua bidestilada y por último la muestra con el compuesto de interés. La muestra consistió en un estándar del compuesto de interés (sistemas modelo), y una vez que el comportamiento de partición de compuesto purificado fue establecido la muestra fue sustituida por el extracto crudo resultante de ruptura celular (sistemas complejos), el cual contenía el producto de interés, contaminantes y restos celulares de cada uno de los modelos experimentales seleccionados. Se variaron los parámetros de sistema (peso molecular del polímero, PM PEG; concentración de PEG y sal, LLC; relación de volumen, V_R ; el pH del sistema, porcentaje de muestra, etc.) para de esa manera estudiar el efecto de estos sobre el comportamiento de partición de cada uno de los modelos experimentales seleccionados.

Una vez construidos, los sistemas de dos fases acuosas se agitaron por 10 min en un agitador por inversión para de esta forma lograr mezclar los compuestos. Los sistemas se centrifugaron (1500 – 2000 X g por 10 – 20 min) para de esa forma acelerar el equilibrio de fases y la partición de los compuestos en el sistema. Posteriormente se procedió a obtener el V_R (relación de volumen entre la fase superior y la inferior) del sistema, calculando para esto el volumen de la fase superior e inferior de los sistemas. El volumen de cada fase se estimó utilizando tubos de centrifuga graduados (tubos de 1.8, 15 o 50 ml). Muestras representativas fueron obtenidas de cada fase para su posterior análisis. Todos los sistemas fueron probados al menos por triplicado, y en todos los casos el porcentaje de error estuvo entre $\pm 10\%$.

2.3. Técnicas analíticas.

Se llevó a cabo el análisis de cada una de las fases recolectadas para de esa manera determinar la concentración y/o pureza de los modelos

experimentales seleccionados en cada una de las fases del sistema. El porcentaje de recuperación se definió con respecto a la cantidad de compuesto de interés agregado al sistema. La pureza de BFE y CFC es definida como la relación de absorbancia 545nm/280nm y 620nm/280nm respectivamente. La pureza de las dRLP se expresó como el porcentaje con respecto a otras proteínas presentes en la muestra. Las técnicas analíticas utilizadas para cada modelo experimental son las previamente reportadas por Benavides y Rito-Palomares (2006), Benavides y Rito-Palomares (2005), Benavides y col. (2006), y Cisneros y col. (2004) respectivamente.

3. Resultados y Discusión

3.1. Sistemas de dos fases acuosas polietilenglicol – fosfato de potasio para la recuperación primaria de compuestos biológicos.

Se analizó el comportamiento de partición de los cuatro modelos experimentales seleccionados (BFE, CFC, dRLP y luteína) en SDFA PEG – sal, y procesos para la recuperación primaria de cada uno de ellos fueron desarrollados. A continuación se presenta un resumen de los resultados previamente reportados obtenidos para cada uno de los modelos experimentales seleccionados y que fueron utilizados para establecer las reglas generales para el desarrollo de procesos que utilizan SDFA para la recuperación de productos biológicos.

B-ficoeritrina producida por Porphyridium cruentum

La B-ficoeritrina (BFE) es una ficobiliproteína (proteínas que toman la función de pigmentos accesorio en el sistema fotosintético de algas y cianobacterias). La BFE es una proteína altamente hidrofílica con un peso molecular relativamente elevado (245 kDa) y un punto isoelectrónico (pI) de 4 (Hernández-Mireles y col., 2006). Se eligió la microalga *Porphyridium cruentum* como sistema de expresión ya que ha demostrado su potencial para la producción de BFE (Benavides y Rito-Palomares, 2004; Bermejo y col., 2002). Se observó una obvia afinidad de BFE por la fase superior del sistema, particularmente en los sistemas con PEG de bajo peso molecular, mientras que en la fase inferior no se detectó el compuesto de interés. Se establecieron las condiciones y parámetros de sistema óptimos para llevar a cabo la recuperación primaria de BFE producida por *Porphyridium cruentum* en la fase superior de los SDFA PEG – fosfato de potasio. Estos parámetros fueron: PEG 1000 g/mol, LLC 45% p/p, pH 7, V_R 4.5 y 40% p/p extracto crudo de BFE. De esta manera se recuperó el 92% de BFE en la fase superior del sistema con una pureza (definida como la relación de absorbancia a 545 nm y 280 nm; Abs545nm/Abs280nm) de 3.2, lo cual representa un factor de purificación superior a 4.5 (Benavides y Rito-Palomares, 2006). En general los resultados

obtenidos demostraron el gran potencial de los sistemas de dos fase acuosas PEG – fosfato de potasio para llevar a cabo la recuperación primaria de BFE. La Fig. 1 (A) muestra un diagrama de flujo simplificado del proceso de recuperación desarrollado. Como se puede observar dicho proceso cuenta con un número reducido de etapas, lo cual reduce la pérdida del producto de interés.

C-ficocianina producida por Spirulina maxima

La C-ficocianina (CFC), al igual que la BFE, es una ficobiliproteína encontrada en algas y cianobacterias. Es una proteína altamente hidrofílica, con un bajo peso molecular (44 kDa, considerablemente menor al de BFE) y punto isoelectrónico cercano de 4.8 (MacColl y col., 1971). Se eligió la microalga *Spirulina maxima* como sistema de expresión ya que tiene un potencial demostrado para la producción de CFC (Vonshak, 1990). Al igual que en el caso de BFE se observó una obvia afinidad de CFC por la fase superior del sistema. Se establecieron las condiciones y parámetros de sistema óptimos para llevar a cabo la recuperación primaria de CFC producida por *Spirulina maxima* en la fase superior de los SDFA PEG – fosfato de potasio. Estos parámetros fueron: PEG 1450 g/mol, LLC 34% p/p, pH 7, V_R 0.3 y 10% p/p extracto crudo de CFC. De esta manera se recuperó el 98% de CFC en la fase superior del sistema con una pureza (definida como la relación de absorbancia a 620 nm y 280 nm; Abs629nm/Abs280nm) de 2.1, lo cual representa un factor de purificación de 3 (Benavides y Rito-Palomares, 2005). Como se puede observar el porcentaje de recuperación alcanzado es cercano al 100%, sin embargo el factor de purificación obtenido no es tan alto como en el caso de BFE. Los resultados obtenidos demostraron el gran potencial de los sistemas de dos fase acuosas PEG – fosfato de potasio para llevar a cabo la recuperación primaria de CFC. La Fig. 1 (B) muestra un diagrama de flujo simplificado del proceso desarrollado para la recuperación primaria de CFC producida por *Spirulina maxima*. Como se puede observar dicho proceso cuenta con un número reducido de etapas, lo cual reduce la pérdida del producto de interés.

Pseudopartículas 2/6 de rotavirus (dRLP) producidas por células de insecto (High FiveTM)

Una vez concluidos los estudios de recuperación primaria de BFE y CFC se decidió trabajar con un modelo proteico de elevado peso molecular, para de esa manera poder establecer la forma en la que dicha característica influye en el comportamiento de partición en SDFA. Para este fin se trabajó con pseudopartículas 2/6 de rotavirus (dRLP, double layered Rotavirus-Like Particles). Dichas partículas están conformadas por las proteínas estructurales VP2 y VP6 de rotavirus. Dichas proteínas estructurales forman estructuras esféricas de doble

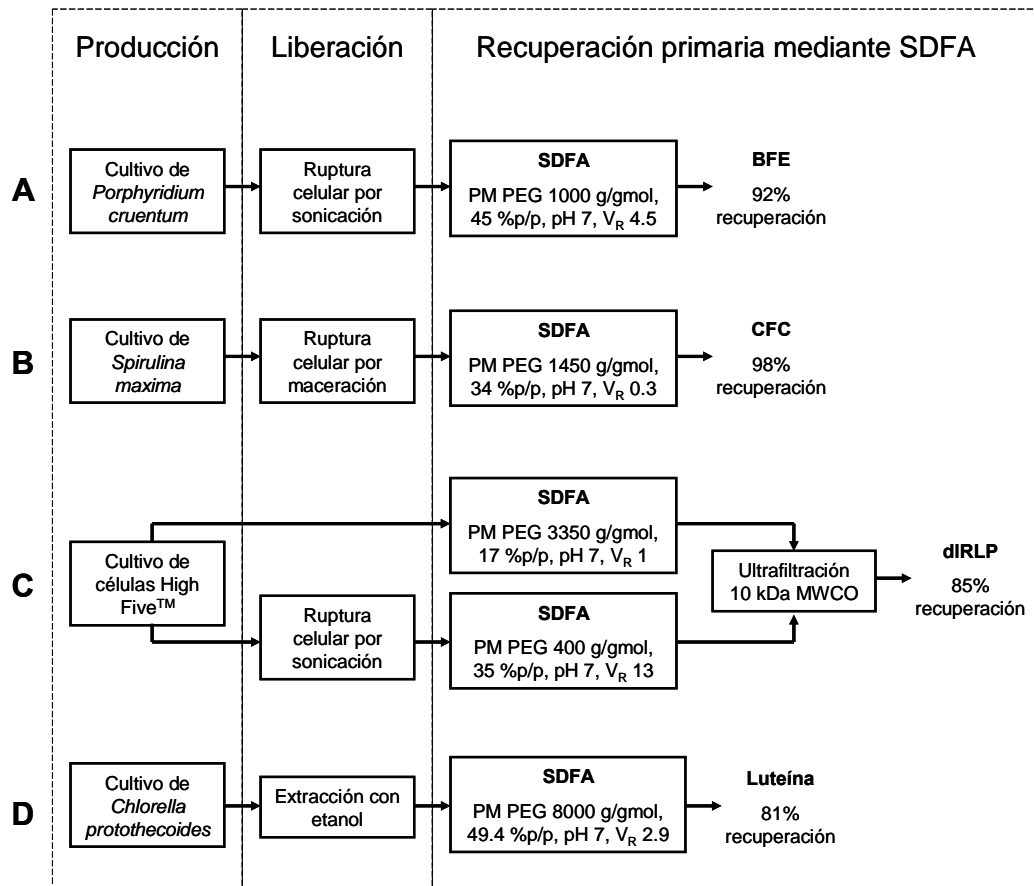


Fig. 1. Procesos de recuperación primaria de los modelos experimentales seleccionados mediante sistemas de dos fases acuosas PEG – sal. A, B-ficoeritrina (BFE) producida por *Porphyridium cruentum*; B, C-ficocianina (CFC) producida por *Spirulina maxima*; C, pseudo-partículas 2/6 de rotavirus (dIRLP) producidas por células High Five™; y D, luteína producida por *Chlorella protothecoides*. La información detallada de los procesos desarrollados para BFE, CFC, dIRLP y luteína esta reportada en Benavides y Rito-Palomares (2006), Benavides y Rito-Palomares (2005), Benavides y col. (2006), y Cisneros y col. (2004), respectivamente.

capa (nucleocápside y cápside). La formación de la nucleocápside (la cual tiene un diámetro aproximado de 50nm) es dada por la interacción de 120 unidades de VP2 (Mena y col., 2005). La siguiente capa de la cápside está conformada por 260 trimeros de VP6, lo cual significa que la capa proteica está formada por 780 unidades de VP6 (Mena y col., 2005). El peso molecular total de las pseudo-partículas 2/6 de rotavirus (dIRLP) se encuentra alrededor de los 50,000 kDa (Mena y col., 2005). Estas pseudopartículas son altamente hidrofílicas y tienen un punto isoelectrico (pI) estimado de 6.5. El pI de las dIRLP fue estimado mediante el uso del programa computacional CLC Protein Workbench (Versión 2.0.2). A pesar de que las proteínas estructurales de diversas pseudo-partículas virales han sido expresadas en bacterias, levaduras y células de mamífero, el sistema de expresión más utilizado es el que involucra la infección de células de insecto con baculovirus. Se sabe que las células de insecto son capaces de expresar y ensamblar in vivo cápsides virales conformadas por más de una proteína

estructural. Adicionalmente, proporcionan un ambiente eucariótico el cual provee las condiciones óptimas para el ensamblaje, lo cual es reflejado en una alta productividad (comparada con células de mamífero). Una característica adicional que hace de las células de insecto un sistema de expresión ideal para proteínas recombinantes es su capacidad de hacer modificaciones postraduccionales complejas (imposibles de llevar a cabo en bacterias y levaduras).

La expresión de pseudo-partículas 2/6 de rotavirus en células High Five™ da como resultado la liberación de 60% de las dIRLP al medio de cultivo (por efecto lítico sobre las células), mientras que el 40% de las mismas permanece en células que no experimentaron lisis al finalizar la fermentación (Benavides y col., 2006). Ambas fracciones, intracelular y extracelular (40 y 60% del total de dIRLP, respectivamente) de las dIRLP fueron recuperadas con estrategias independientes. La fracción intracelular de las dIRLP fue liberada mediante ruptura celular. Para recuperar la fracción

intracelular se diseñó un proceso de recuperación constituido por dos etapas de extracción PEG – fosfato de potasio en serie (PEG 400 g/mol, V_R 13.0, pH 7 y LLC 35% p/p), logrando recuperar el 90% de las dIRLP intracelulares en la fase superior del sistema (Benavides y *col.*, 2006), concentrando los restos celulares en la interfase. En lo que respecta a la recuperación de la fracción extracelular se diseñó una estrategia que involucra una sola extracción con S DFA PEG – fosfato de potasio (PEG 3350 g/mol, V_R 1.0, pH 7 y LLC 17% p/p), logrando recuperar el 82% de las dIRLP extracelulares en la interfase (Benavides y *col.*, 2006). El volumen de la interfase es reducido (aproximadamente representa el 10% del volumen total del sistema), lo cual permite concentrar el producto. Esto representa un beneficio adicional al evitar la introducción de etapas posteriores necesarias para concentrar del producto de interés. De esta manera se logró un rendimiento global del 85% y una pureza similar a la obtenida con el gradiente de cloruro de cesio (6 – 11%), técnica usualmente utilizada para la recuperación de este tipo de partículas. El diagrama simplificado de la estrategia propuesta se muestra en la Fig. 1 (C). La estrategia propuesta es más simple, económica y rápida que la técnica de gradiente de cloruro de cesio (Benavides y *col.*, 2006). Adicionalmente el escalamiento de la estrategia propuesta no representa problemas, lo cual hace posible su aplicación para la recuperación de dIRLP a escala industrial.

Luteína producida por Chlorella protothecoides

Los sistemas de dos fases acuosas mostraron tener un enorme potencial para la recuperación de compuestos proteicos (BFE, CFC y dIRLP) de los sistemas experimentales previamente descritos. Sin embargo, existen una gran variedad de compuestos de naturaleza no proteica con propiedades nutraceuticas (carotenoides, antocianinas, isoflavonas, etc). Dichos compuestos despiertan día a día el interés de los sectores industriales y en la población en general debido a sus propiedades benéficas sobre la salud humana. Estos compuestos comparten la característica de tener un peso molecular inferior al de la mayoría de las proteínas (< 3000 g/mol), siendo algunos de ellos hidrofóbicos. Debido a esto se decidió determinar la factibilidad de recuperar un compuesto de bajo peso molecular e hidrofobicidad elevada en S DFA. Se eligió la luteína como compuesto modelo para estudiar el comportamiento de partición de productos no-proteicos en sistemas de dos fases acuosas PEG – fosfato de potasio. La luteína es un carotenoide que es encontrado en una gran variedad de fuentes naturales (vegetales de hoja verde, frutas, yema de huevo, microalgas, etc). Este compuesto tiene un peso molecular aproximado de 569 g/mol (con fórmula química condensada $C_{40}H_{56}O_2$). Adicionalmente, la luteína es un compuesto lipofílico, lo cual convierte a este compuesto en un

interesante modelo de estudio, considerando que el principal componente de los S DFA es agua. Se estudió la influencia de los parámetros de sistema (peso molecular del polímero, longitud de línea de corte y concentración del producto) sobre el comportamiento de partición de luteína en sistemas de dos fases acuosas PEG – fosfato de potasio. La adición de etanol al sistema de dos fases acuosas fue necesaria para lograr la disolución de la muestra. Se evaluó el efecto de la adición de etanol sobre el V_R de los sistemas. El sistema de fases acuosas PEG – fosfato de potasio con PEG 8000 g/mol, LLC 49.4% p/p, pH 7 y V_R 2.9 proporcionó las mejores condiciones para la partición de luteína hacia la fase superior (Cisneros y *col.*, 2004). Bajo estas condiciones se logró una recuperación de luteína en la fase superior del 81%. La Fig. 1 (D) muestra el diagrama simplificado del proceso de recuperación primaria de luteína propuesto. Los resultados obtenidos pueden extrapolarse para predecir el comportamiento de partición de compuestos con características fisicoquímicas similares (bajo peso molecular e hidrofobicidad elevada).

3.2. Correlación de las características fisicoquímicas de los productos de interés con su comportamiento de partición

Se estudió el efecto de los parámetros de sistema (peso molecular del polímero, PM PEG; concentración de PEG y sal, LLC; relación de volumen, V_R , y pH del sistema) sobre el comportamiento de partición de los productos de interés de los modelos experimentales en S DFA PEG – sal. De esta manera fue posible establecer las condiciones bajo las cuales la partición de los compuestos de interés era favorecida hacia la fase superior del sistema. La Tabla 2 muestra de manera sintetizada el efecto de los parámetros de sistema sobre el comportamiento de partición de BFE, CFC, dIRLP y luteína. Considerando las propiedades fisicoquímicas de los modelos experimentales, así como la información recabada a lo largo de la investigación relacionada a su recuperación primaria en sistemas de dos fases acuosas PEG – solución salina, es posible establecer reglas generales. Estas reglas permiten anticipar el comportamiento de partición de compuestos biológicos en sistemas de dos fases acuosas a fin de facilitar el desarrollo de sistemas de recuperación.

En lo que respecta al peso molecular del polímero (PM PEG) se puede observar que su incremento tiene un efecto negativo sobre la partición de dIRLP, BFE y CFC hacia la fase superior del sistema (fase polimérica). Este fenómeno es debido al aumento del volumen excluido (Huddleston y *col.*, 1991). A medida que las cadenas poliméricas incrementan su longitud (peso molecular), las fuerzas de interacción entre las mismas aumentan y el volumen libre entre ellas se

reduce. Los compuestos de alto peso molecular no pueden alojarse en el reducido volumen disponible
 Tabla 2. Efecto de los parámetros de sistema sobre la afinidad de los modelos experimentales seleccionados por la fase superior.

Modelo Experimental	Incremento PM PEG	Incremento LLC	Incremento pH	Incremento V_R
Pseudo-partículas virales	Disminuye	Disminuye	No cambio	Aumenta
B-ficoeritrina	Disminuye	No cambio	Disminuye	Aumenta
C-ficocianina	Disminuye	Disminuye	Disminuye	Disminuye
Luteína	Aumenta	Aumenta	No evaluado	No evaluado

Los parámetros de sistema (peso molecular del polímero, PM PEG; concentración de polímero y sal, LLC; pH del sistema, pH; y relación de volumen, V_R) mostraron tener un efecto significativo sobre la afinidad de los cuatro modelos experimentales hacia la fase superior (fase polimérica) del sistema.

cuando se utiliza PEG de alto peso molecular. Por lo tanto no pueden ser recuperados en la fase superior del sistema a menos de que se utilice polímero de bajo peso molecular. Al aumentar estratégicamente el peso molecular de PEG de 400 a 3350 g/mol fue posible forzar a las dIIRLP a particionarse hacia la interfase del sistema. A diferencia de los otros modelos experimentales la luteína no se ve fuertemente afectada por el aumento de volumen excluido, ya que su bajo peso molecular le permite alojarse en el volumen libre de la fase sin experimentar impedimento estérico aun cuando se utilice polímero de alto peso molecular (8000 g/mol). De igual forma es importante considerar el peso molecular de los contaminantes presentes. De esta manera es posible seleccionar una estrategia en la cual se elija un peso molecular de PEG tal que permita la separación selectiva de la proteína de interés y los contaminantes. Se graficó el logaritmo del peso molecular del modelo experimental (PM Producto) contra el logaritmo del peso molecular del PEG (PM PEG) con el cual se obtuvo la mejor recuperación en la fase superior del sistema. Estos dos parámetros guardan una relación lineal ($R^2 = 0.95$), como muestra la Fig. 2. La ecuación derivada [Ec. (1)] puede ser utilizada de una manera práctica para anticipar el peso molecular de PEG que puede ser utilizado para llevar a cabo la recuperación de un compuesto dado. El uso de un peso molecular de polímero mayor al estimado por la ecuación favorecerá la migración de compuesto hidrofílicos de alto peso molecular hacia la fase inferior o interfase del sistema. Por otro lado, el uso de un peso molecular de polímero menor al estimado por la ecuación favorecerá la migración de dichos compuestos hacia la fase superior. Sin embargo, también favorecerá la migración de otros compuestos hidrofílicos hacia la fase superior. Adicionalmente, el aumento del peso molecular del polímero aumenta la hidrofobicidad de la fase superior (Huddleston y col., 1991). Esto es debido a dos razones. Primero, al aumentar el volumen excluido disminuye la cantidad de agua en la fase superior aumentando la hidrofobicidad. Segundo, la reducción estequio-

métrica de los grupos hidroxilo, situados en ambos extremos de la cadena polimérica, hace que el momento dipolar generado por la interacción hidrógeno – oxígeno se vuelva más débil en la fase superior, lo cual aumenta la hidrofobicidad de la misma.

$$\ln PM_{PEG} = -0.26 \ln PM + 10.34 \quad (1)$$

donde: PM y PM PEG son los pesos moleculares (g/mol) del producto de interés y del polietilenglicol (g/mol) utilizado para construir el S DFA, respectivamente.

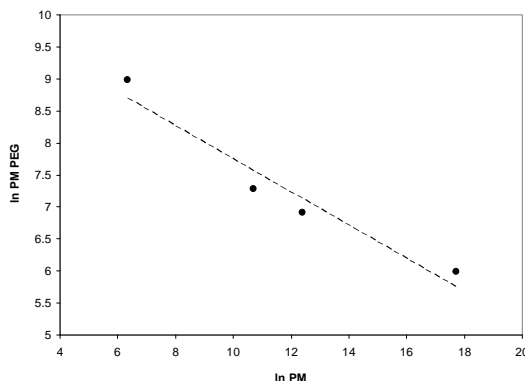


Fig. 2. Relación entre el peso molecular del producto de interés y el peso molecular del polímero (PEG) utilizado. Se puede observar que mientras mayor es el logaritmo del peso molecular del producto de interés (ln PM) menor es el logaritmo del peso molecular del polímero (ln PM PEG) con el que se logra mejor recuperación en la fase superior del sistema, conservando una relación lineal [Ec. (1)]. Esto permite concluir que existe una relación inversamente proporcional entre estos dos parámetros.

Una manera adicional de aumentar el volumen excluido e hidrofobicidad de la fase superior del sistema es incrementando la longitud de línea de corte (LLC). La longitud de línea de corte es un parámetro directamente relacionado con la concentración de polímero y sal en el sistema. Un

aumento en la LLC favorece una mayor concentración de polímero en la fase superior del sistema. Mientras mayor es la concentración de polímero en la fase superior del sistema, mayor es el volumen excluido de la misma. Por lo tanto, al incrementar la LLC aumenta la hidrofobicidad de la fase superior. El incremento de LLC generó la disminución de la afinidad de las dIRLP y CFC, compuestos hidrofílicos de alto peso molecular. Por otro lado la luteína, al ser un compuesto de bajo peso molecular fuertemente hidrofóbico se ve favorecido por el aumento tanto del PM PEG como de la LLC. Esto permite concluir que otra característica fisicoquímica que puede ser correlacionada con el comportamiento de partición de un compuesto en particular es su hidrofobicidad.

El aumento en el pH del sistema mostró tener un efecto significativo sobre el comportamiento de partición de BFE y CFC. Este parámetro también es de importancia para predecir el comportamiento de partición de un compuesto en sistemas de dos fases acuosas, ya que está íntimamente relacionado con la carga electroquímica superficial de la molécula. Cuando el pH del medio se encuentra por debajo del punto isoeléctrico (pI), la molécula (proteína) adquiere una carga electroquímica superficial positiva, ya que algunos residuos de los aminoácidos de la molécula se encuentran protonados. Una vez que el pH se eleva por encima del punto isoeléctrico la molécula adquiere una carga superficial negativa, debido a la desprotonación de los residuos. El PEG cuenta con dos grupos hidroxilo en los extremos de la cadena polimérica, lo cual genera una distorsión en la nube electrónica, creando un momento dipolar positivo. De esta manera, los compuestos cargados negativamente (pH por encima del punto isoeléctrico) tienen cierta afinidad por la fase superior de los sistemas de fases acuosas PEG – solución salina debido a la atracción electroquímica. Por lo tanto es importante tratar de trabajar a valores de pH del sistema que estén por arriba del pI de la proteína de interés. Sin embargo, es necesario considerar que el aumentar innecesaria o excesivamente el pH promovería la migración de proteínas contaminantes hacia la fase superior del sistema, como se vio reflejado en la partición de BFE y CFC hacia la fase superior del sistema (Tabla 2).

Por último se evaluó el efecto de la relación de volúmenes (V_R) sobre el comportamiento de partición de los modelos experimentales seleccionados en SDFA. El aumento de este parámetro favoreció la partición de dIRLP y BFE hacia la fase superior del sistema. Sin embargo, en el caso de CFC al incrementar el V_R del sistema se promovió la partición de contaminantes hacia la fase superior, generando esto en una disminución en el porcentaje de recuperación y pureza del producto de interés. El aumento de V_R mostró ser una estrategia efectiva para sobrellevar fenómenos de saturación en la fase superior del sistema. Sin embargo, es necesario considerar que en algunos casos el grado

relativo de incremento de la partición hacia la fase superior depende de la afinidad que tengan los contaminantes presentes.

3.3. Reglas generales

Como resultado de la correlación entre el comportamiento de partición de los modelos experimentales seleccionados y sus propiedades fisicoquímicas se lograron establecer las siguientes reglas generales:

- Mientras mayor sea el peso molecular del compuesto de interés, menor debe ser el peso molecular del PEG utilizado, para favorecer la recuperación en la fase superior del sistema. Esto es debido, principalmente al fenómeno de volumen excluido. De igual manera, el uso de longitudes de línea de corte elevadas (> 40% p/p) genera volumen excluido tanto en la fase superior como inferior del sistema. Compuestos de bajo peso molecular (< 5000 g/mol) pueden ser recuperados en la fase superior aun cuando se utiliza PEG de alto peso molecular y elevada longitud de línea de corte.
- Mientras más hidrofóbico es el compuesto que se intenta recuperar, el peso del PEG debe ser mayor, para de esa manera lograr que una mayor cantidad de agua sea excluida de la fase superior. De igual manera, el uso de longitudes de línea de corte elevadas (> 40% p/p) genera un aumento en la hidrofobicidad de la fase polimérica, lo cual se ve reflejado en un aumento en el porcentaje de recuperación de compuestos hidrofóbicos.
- En caso de que la molécula presente anfoterismo (cambio de carga electroquímica superficial en función del pH) es recomendable trabajar a valores de pH por arriba del punto isoeléctrico, de tal manera que la carga de compuesto sea negativa y tenga mayor afinidad por el PEG (el cual está ligeramente cargado positivamente).
- El incremento del V_R del sistema permite sobrellevar fenómenos de saturación que puedan existir, incrementando el porcentaje de recuperación en la fase superior. Sin embargo es necesario considerar que si la afinidad de los contaminantes de algunos de los contaminantes presentes por la fase superior es elevada, la pureza disminuirá al no existir una migración selectiva del compuesto de interés hacia dicha fase.

3.4. Desarrollo predictivo de procesos de recuperación primaria de compuestos biológicos mediante Sistemas de Dos Fases Acuosas

A partir de la información recabada se desarrolló una estrategia secuencial para el desarrollo de procesos de recuperación primaria de compuestos biológicos en sistemas de dos fases acuosas PEG – solución salina, considerando como parámetros de decisión las características fisicoquímicas de los compuestos

de interés. La Fig. 3 muestra el diagrama simplificado para el desarrollo predictivo de procesos de recuperación primaria de compuestos biológicos mediante SDFA PEG – sal. Los pasos a seguir para llevar a cabo el diseño predictivo de procesos de recuperación primaria de compuestos biológicos mediante sistemas de dos fases acuosas PEG – solución salina se describen a continuación:

1. **Definir las características del compuesto de interés** - El compuesto de interés es seleccionado y caracterizado, de tal manera que sus propiedades fisicoquímicas sirvan como guía para el desarrollo del proceso de recuperación primaria.
2. **Definir el tipo de SDFA PEG-sales a utilizar** - Considerando el punto isoeléctrico (pI) del producto se elige si se utilizarán sistemas PEG – sulfato y PEG – fosfatos, dependiendo del rango de pH que permite manejar cada uno de estos. Los sistemas PEG – sulfato pueden ser utilizados en valores de pH 6 y menores, mientras que los sistemas PEG – fosfato son utilizados a valores de pH 7 y mayores. Es recomendable trabajar en valores de pH superiores al pI para de esa manera generar afinidad electroquímica entre el compuesto de interés y el PEG.
3. **Definir el peso molecular del polímero y la concentración de polímero y sal a utilizar** - Considerando el peso molecular y la hidrofobicidad del compuesto de interés se eligen los parámetros de sistema (PM PEG y LLC) bajo los cuales la partición hacia la fase superior se ve favorecida. La selección del peso molecular del polímero se puede realizar utilizando la Ec. (1). De igual manera, la selección de la concentración de polímero y sal en el sistema se puede seleccionar considerando el peso molecular y la hidrofobicidad del compuesto de interés. La partición de compuestos hidrofílicos de alto peso molecular hacia la fase superior del sistema se ve favorecido por el uso de concentraciones bajas de polímero y sal, mientras que la de compuestos hidrofóbicos de bajo peso molecular se ve positivamente influenciada por el uso de concentraciones altas de polímero y sal.

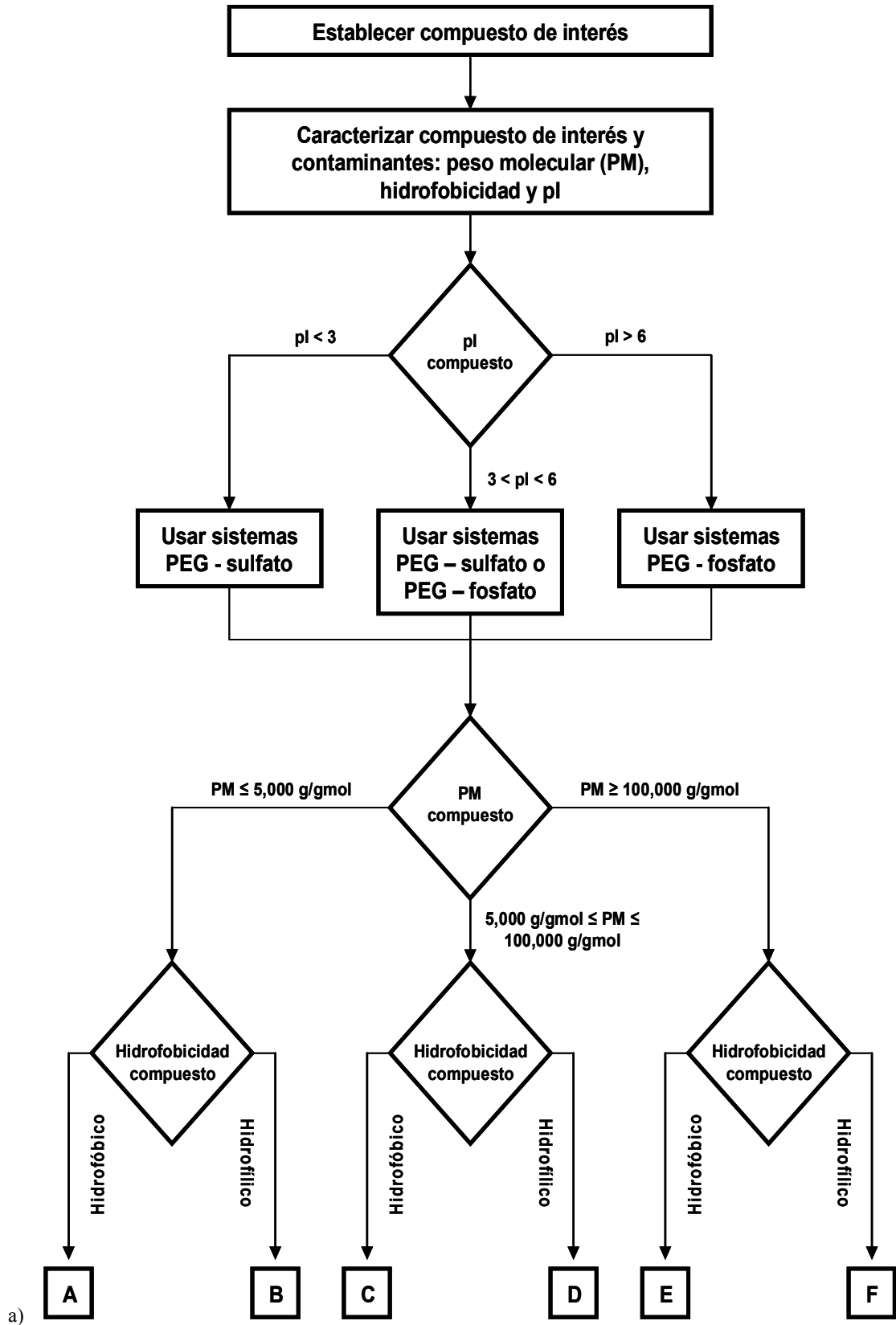
Si la recuperación y pureza mínima del producto de interés no son satisfechas se recomienda explotar el cambio del pH, la relación de volúmenes (V_R) y el uso de sistemas de dos fases acuosas en serie

4. **Determinar el pH óptimo del sistema** – Considerando el pI del compuesto es posible seleccionar un rango en el que el pH del sistema sea variado (pI + 3) de tal manera que se pueda establecer las condiciones que favorezcan la

recuperación y/o pureza del compuesto de interés hacia una fase particular.

5. **Determinar el V_R óptimo del sistema** – Es posible variar el V_R del sistema (siguiendo una misma longitud de línea de corte) para de esa manera determinar el efecto de este parámetro sobre el comportamiento de partición del compuesto de interés. Generalmente el aumento de V_R permite sobrellevar fenómenos de saturación en la fase superior del sistema, permitiendo incrementar la partición del compuesto de interés hacia dicha fase. Sin embargo, en algunas ocasiones es posible que la migración de contaminantes también se vea favorecida al seguir dicha estrategia.
6. **Incrementar la cantidad de muestra alimentada en el SDFA** - Se recomienda evaluar una intensificación del proceso, con la finalidad de determinar si es posible procesar un mayor porcentaje de muestra (% p/p) con un sistema del mismo peso, de tal manera que tanto los costos de inversión como de operación se vean reducidos por cantidad de producto.
7. **Incrementar la pureza del producto mediante el uso de SDFA en serie** - El uso de SDFA en serie es una estrategia que puede ser utilizada para aumentar la pureza del compuesto de interés. La fase hacia donde se particiona el producto es utilizada para generar un nuevo sistema de dos fases acuosas (con parámetros iguales o diferentes al sistema original) en un intento de llevar a cabo una remoción adicional de contaminantes. Sin embargo, esta estrategia es utilizada en pocas ocasiones básicamente debido a 2 razones: a) incurre en gastos adicionales, y b) la introducción de una etapa adicional genera pérdidas en el producto de interés.
8. **Escalamiento del proceso** - Por último se debe establecer la estrategia de escalamiento del proceso diseñado a nivel laboratorio/piloto. A nivel industrial es imposible centrifugar los SDFA para acelerar el equilibrio de las fases, por lo tanto es recomendable realizar estudios de cinética de separación de fases utilizando contenedores con diferentes geometrías (relaciones altura –diámetro, H/D). Ha sido reportado que mientras menor sea la relación H/D, menor será el tiempo necesario para que las fases del sistema lleguen al equilibrio (Solano-Castillo y Rito-Palomares, 2000).

Siempre que la metodología aquí propuesta es posible el diseño predictivo preliminar de procesos para la recuperación primaria de compuestos naturales (proteicos y no proteicos) en sistemas de dos fases acuosas PEG – sal.



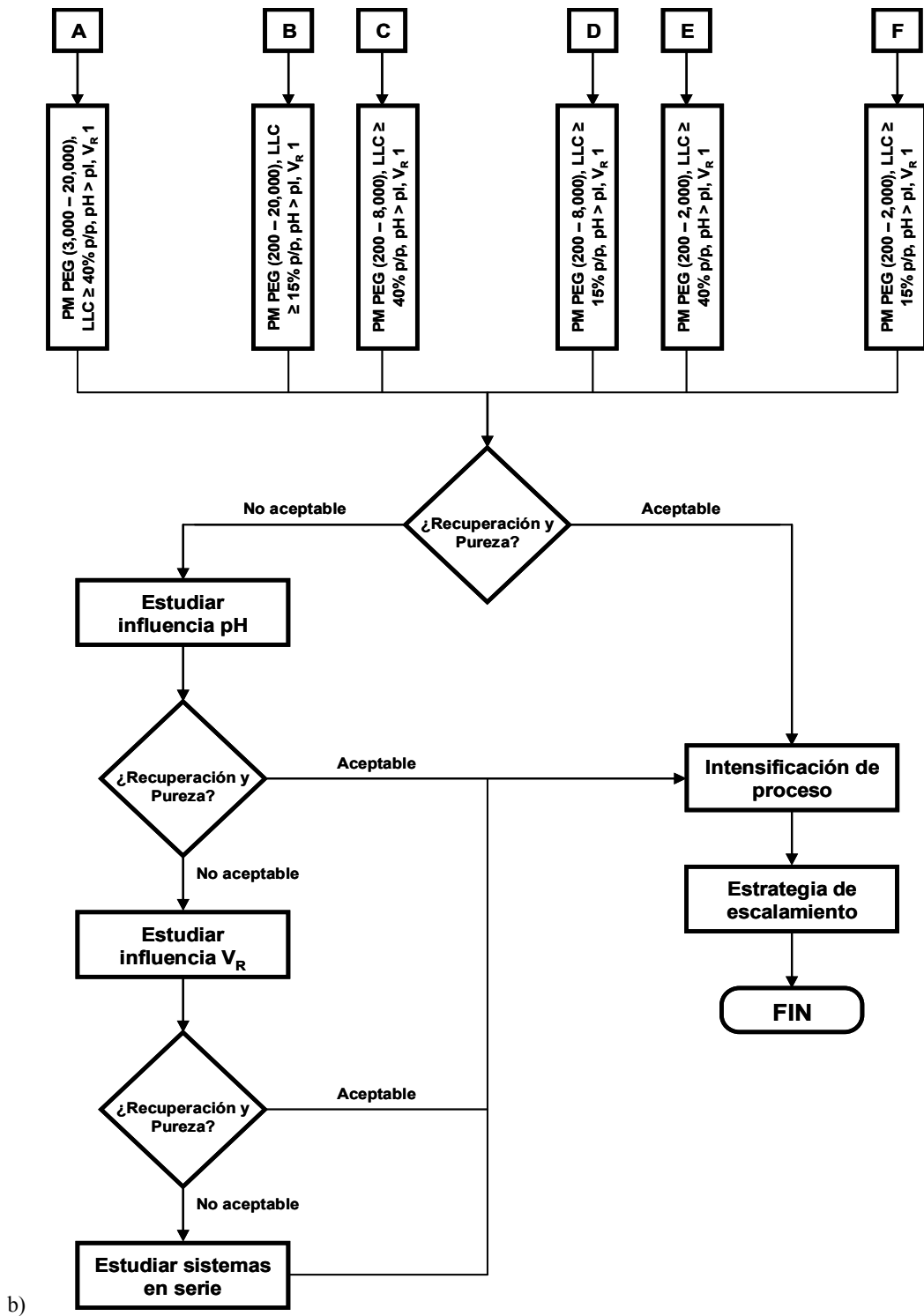


Fig. 3. Diagrama de decisión para el desarrollo para procesos de recuperación y purificación primaria de compuestos biológicos mediante sistemas de dos fases acuosas PEG – solución salina.

Conclusiones

Los parámetros del sistema (longitud de línea de corte, LLC; relación de volúmenes, V_R ; pH y peso molecular del polímero, PM PEG) mostraron tener influencia significativa sobre el comportamiento de

partición de los modelos experimentales seleccionados: B-ficoeritrina (BFE) producida por *Porphyridium cruentum*, C-ficocianina (CFC) producida por *Spirulina maxima*, pseudo-partículas 2/6 de rotavirus (dIRLP) producidas por células de insecto High Five™ y luteína producida por

Chlorella protothecoides. El efecto de estos parámetros sobre el comportamiento de partición de los productos de interés, permitió el establecimiento de reglas generales para el desarrollo de una estrategia para el diseño predictivo de procesos para la recuperación primaria de compuestos biológicos (proteicos y no proteicos) en S DFA PEG – sal. La estrategia desarrollada puede ser aplicada a otro tipo de compuestos no estudiados aquí, incluyendo compuestos hidrofóbicos de bajo peso molecular, cuya recuperación en S DFA representa un área de oportunidad para dicha técnica. Este tipo de estudios favorece la aplicación genérica de los Sistemas de Dos Fases Acuosa polímero – sal para la recuperación primaria de compuestos biológicos.

Referencias

- Aguilar, O., Albitzer, V., Serrano-Carreón, L., Rito-Palomares, M. (2006). Direct comparison between ion-exchange chromatography and aqueous two-phase processes for the partial purification of penicillin acylase produced by *E. coli*. *Journal of Chromatography B* 835, 77-83.
- Albertsson, PÅ. (1956). Chromatography and partition of cells and cell fragments. *Nature* 177, 771-774.
- Albertsson, PÅ., Johansson, G., Tjerneld, F. (1990). Aqueous Two-Phase Separations. In: *Separation in Biotechnology* (Asenjo, JA., ed.). Pp 287-327. Dekker, New York, USA.
- Andrews, BA., Huang, RB., Asenjo JA. (1995). Purification of virus like particles from yeast cells using aqueous two-phase systems. *Bioseparation* 5, 105-112.
- Benavides, J., Mena, JA., Cisneros-Ruiz, M., Ramírez, OT., Palomares, LA., Rito-Palomares, M. (2006). Rotavirus-like particles primary recovery from insect cells in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B* 842, 48-57.
- Benavides, J., Rito-Palomares, M. (2004). Bioprocess intensification: a potential aqueous two-phase process for the primary recovery of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. *Journal of Chromatography B* 807, 33-38.
- Benavides, J., Rito-Palomares, M. (2005). Potential Aqueous Two-Phase Processes for the Primary Recovery of Colored Protein from Microbial Origin. *Engineering in Life Sciences* 5, 259-266.
- Benavides, J., Rito-Palomares, M. (2006). Simplified two-stage method to B-phycoerythrin recovery from *Porphyridium cruentum*. *Journal of Chromatography B* 844, 39-44.
- Bermejo-Román, R., Álvarez-Pez, JM., Ación Fernández, FG., Molina Grima, E. (2002). Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Biotechnology* 93, 73-85.
- Cisneros, M., Benavides, J., Brenes, CH., Rito-Palomares, M. (2004). Recovery in aqueous two-phase systems of lutein produced by the green microalga *Chlorella protothecoides*. *Journal of Chromatography B* 807, 105-110.
- Cunha, MT., Aires-Barros, MR. (2002). Large-scale extraction of proteins. *Molecular Biotechnology* 20, 29-40
- Edahiro, JI., Yamada, M., Seike, S., Kakigi, Y., Miyanaga, K., Nakamura, M., Kanamori, T., Seki, M. (2005). Separation of Cultured Strawberry Cells Producing Anthocyanins in Aqueous Two-Phase System. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100(4), 449-454.
- Esmanhoto, E., Vahan Kilikian, B. (2004). ATPS applied to extraction of small molecules – polycetides – and simultaneous clarification of culture media with filamentous microorganisms. *Journal of Chromatography B* 807, 139-144.
- Frerix, A., Geilenkirchen, P., Muller, M., Kula, MR., Hubbuch, J. (2007). Separation of genomic DNA, RNA, and open circular plasmid DNA from supercoiled plasmid DNA by combining denaturation, selective renaturation and aqueous two-phase extraction. *Biotechnology and Bioengineering* 96, 57-66.
- Hernández-Mireles, T., Benavides, J., Rito-Palomares, M. (2006). Proceso para la purificación del colorante proteico B-ficoeritrina producido por *Porphyridium cruentum*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 5, 131-143.
- Huddleston, J., Veide, A., Köhler, K., Flanagan, J., Enfors, SO., Lyddiat, A. (1991). The molecular basis of partitioning in aqueous two-phase systems. *Trends in Biotechnology* 9, 381-388.
- Iriti, M., Faoro, F. (2006). Grape phytochemicals: A bouquet of old and new nutraceuticals for human health. *Medical Hypotheses* 67, 833-838.
- Johansson, G., Walter, H. (2000). Partitioning and concentrating biomaterials in aqueous phase systems. *International Review of Cytology* 192, 33-60.
- Kepka, C., Collet, E., Persson, J., Ståhl, Å., Lagerstedt, T., Tjerneld, F. and Veide, A. (2003). Pilot-scale extraction of an intracellular recombinant cutinase from *E. coli* cell homogenate using a thermoseparation aqueous two-phase system. *Journal of Biotechnology* 103, 165-181.
- Liu, CL., Kamei, DT., King, JA., Wang, DI., Blankschtein, D. (1998). Separation of proteins and viruses using two-phase aqueous

- micellar systems. *Journal of Chromatography B* 711, 127-138.
- MacColl, R., Lee, J.J., Berns, D.S. (1971). Protein aggregation in C-Phycocyanin. Studies at very low concentrations with the photoelectric scanner of the ultracentrifuge. *Biochemical Journal* 122, 421-426.
- Mena, J.A., Ramirez, O.T., Palomares, L.A. (2005). Quantification of rotavirus-like particles by gel permeation chromatography. *Journal of Chromatography B* 824, 267-276.
- Morre, D.M., Morre D.J. (2000). Aqueous two-phase partition applied to the isolation of plasma membranes and Golgi apparatus from cultured mammalian cells. *Journal of Chromatography B* 743, 377-387.
- Nam, K.H., Chang, W.J., Hong, H., Lim, S.M., Kim, D.I., Koo, Y.M. (2005). Continuous-flow fractionation of animal cells in microfluidic device using aqueous two-phase extraction. *Biomed Microdevices* 7, 189-195.
- Pico, G., Romanini, D., Nerli, B., Farruggia, B. (2006). Polyethyleneglycol molecular mass and polydispersity effect on protein partitioning in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B* 830, 286-292.
- Rahimpour, F., Feyzi, F., Maghsoudi, S., Hatti-Kaul, R. (2006). Purification of plasmid DNA with polymer-salt aqueous two-phase system: optimization using response surface methodology. *Biotechnology and Bioengineering* 95, 627-637.
- Rao, A.V., Rao, L.G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research* 55, 207-216.
- Ribeiro, S.C., Monteiro, G.A., Cabral, J.M., Prazeres, D.M. (2002). Isolation of plasmid DNA from cell lysates by aqueous two-phase systems. *Biotechnology and Bioengineering* 78, 376-384.
- Rito-Palomares, M. (2002). The Practical Application of Aqueous Two-Phase Processes for the Recovery of Biological Products. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 12 (4), 535-543.
- Rito-Palomares, M. (2004). Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. *Journal of Chromatography B* 807, 3-11.
- Schindler, J., Nothwang, H.G. (2006). Aqueous polymer two-phase systems: effective tools for plasma membrane proteomics. *Proteomics* 6 (20), 5409-5417.
- Shibusawa, Y., Takeuchi, N., Tsutsumi, K., Nakano, S., Yanagida, A., Shindo, H., Ito, Y. (2007). One-step purification of histone deacetylase from *Escherichia coli* cell-lysate by counter-current chromatography using aqueous two-phase system. *Journal of Chromatography A* 1151, 158-163.
- Solano-Castillo, C., Rito-Palomares, M. (2000). Kinetics of phase separation under different process and design parameters in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B* 743, 195-201.
- Spelzini, D., Pico, 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 Surf B Biointerfaces* 51, 80-85.
- Vonshak, A. (1990). Recent advances in microalgal biotechnology. *Biotechnology Advances* 8, 709-727.