



## Separacja produktów biotechnologii w wodnych układach dwufazowych. Cz. I – Podstawy teoretyczne

Magdalena Zielińska-Dawidziak, Tomasz Jankowski

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza, Poznań

### The separation of biotechnology products in aqueous two-phase systems. Part I – Theoretical background

#### Summary

The article presents the principles of liquid-liquid extraction in aqueous two-phase systems which offer a great potential for the recovery and purification of various biomolecules, cells and organelles from fermentation slurries. These systems consisting of a solution of two polymers (e.g. polyethylene glycol/dextran), polymer and salt (e.g. polyethylene glycol/phosphate) or a thermoseparating polymer (oxyethylene-oxypropylene copolymer) offer mild separation conditions due to the high concentration of water, which makes them suitable for biotechnology applications.

#### Key words:

aqueous two-phase systems, extraction, partitioning, polyethylene glycol.

#### Adres do korespondencji

Magdalena  
Zielińska-Dawidziak,  
Katedra Biotechnologii  
i Mikrobiologii Żywności,  
Akademia Rolnicza,  
ul. Wojska Polskiego 48,  
60-627 Poznań.

#### biotechnologia

1 (56) 142–152 2002

### 1. Wstęp

Produkty procesów biotechnologicznych takie jak enzymy, niektóre antybiotyki, rekombinowane białka, przeciwciała, witaminy itp., są po etapie hodowli mikroorganizmów wydzielone do środowiska hodowlanego lub zamknięte w zawieszonych w cieczy komórkach. Płyny pochodzące zawierają mikroorganizmy, rozpuszczone metabolity i resztki substratów, są często lepkie, a zawieszane cząstki mają niewielkie wymiary i są bardzo ściśliwe, co znacznie utrudnia fizyczne metody separacji (1,2).

Produkty metabolizmu lub inne substancje pozyskiwane z komórek są często substancjami wrażliwymi, a ich aktywność biologiczna zależy od zachowania w czasie separacji odpowiednich warunków środowiska, tj. temperatury, pH, siły jonowej, obecności pewnych związków organicznych itp. Szczególnie dotyczy to substancji białkowych takich jak enzymy, antybiotyki, rekombinowane białka itp., gdzie wydzielanie i oczyszczanie tych substancji musi zapewnić zachowanie ich aktywności biologicznej i przeciwdziałanie ich dezaktywacji.

Tradycyjne metody separacji produktów biotechnologii, np. destylacja lub ekstrakcja z użyciem rozpuszczalników organicznych, mogą powodować dezaktywację produktu, albo jak w przypadku chromatografii czy krystalizacji są metodami bardzo kosztownymi i mało wydajnymi, co w wielu przypadkach ogranicza ich stosowanie w skali przemysłowej. Ponadto, gdy pozyskiwanie produktów biosyntezy wymaga dezintegracji komórek, obecność rozdrobnionych resztek ścian komórkowych i duża lepkość homogenatów utrudnia wydajne odwirowanie lub filtrację zanieczyszczeń.

Ekstrakcja w wodnych układach dwufazowych (ATPS – *aqueous two-phase systems*) należy do „łagodnych” i skutecznych metod separacji aktywnych produktów biotechnologii oraz umożliwia jednoczesne oddzielanie biomasy lub jej pozostałości, usuwanie zanieczyszczeń i koncentrację produktu.

## 2. Wodne układy dwufazowe

Wodny układ dwufazowy można utworzyć przez (tab. 1):

- mieszanie dwóch wodnych roztworów polimerów, zazwyczaj glikolu polietylerowego (PEG) z dekstranem, skrobią hydroksypropylową, alkoholem poliwinylowym lub innym związkiem wielkocząsteczkowym,
- mieszanie polimeru rozpuszczonego w wodzie (PEG) z roztworem soli (fosforatów, siarczanów, cytrynianów),
- zmianę temperatury wodnego roztworu niejonowego związku powierzchniowo czynnego (polimery typu oksyetylen-oksypropylen (EO/PO), np. triton X 114) na wyższą od temperatury mętnienia (*cloud point*) lub niższą od krytycznej temperatury roztworu, po przekroczeniu których roztwór rozdziela się na dwie fazy.

W dwóch pierwszych typach układów dwufazowych w wyniku mieszania dwóch wodnych roztworów polimerów lub polimeru i soli w określonych warunkach (tj. wartości pH, siły jonowej i całkowitego stężenia makromolekuł), otrzymuje się emulsję typu woda-w-wodzie, co jest konsekwencją termodynamicznej niezgodności substancji tworzących fazy (3). Pod działaniem siły grawitacyjnej lub odśrodkowej utworzona emulsja ponownie rozdziela się na dwie fazy, nazywane potocznie fazą górną i dolną (rys. 1) (4). Jednak każda z faz układu zawiera pewną, zwykle bardzo małą, ilość składnika, który jest istotny dla drugiej fazy. Pomimo że molekularny mechanizm separacji faz w ATPS typu polimer/polimer lub polimer/sól nie jest jeszcze



całkowicie poznany, do interpretowania zjawiska stosowana jest teoria Flory-Hugginsa lub Ogstona i wsp. (5-9).

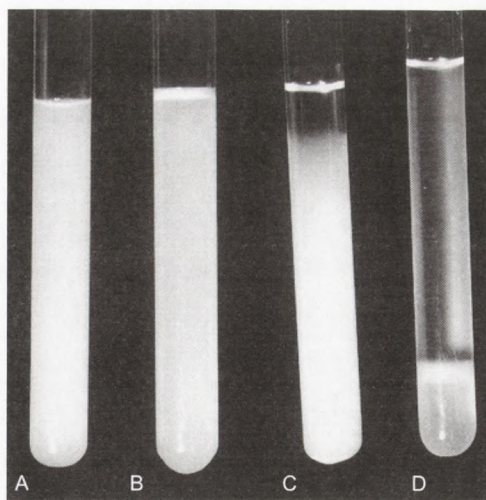
Tabela 1

Przykłady wodnych układów dwufazowych powstających w wyniku zmieszania wodnych roztworów dwóch polimerów lub polimeru i soli (2,47,48).

Faza górna	Faza dolna
glikol polietylenowy	alkohol poliwinylowy poliwinylpyrolidon dekstran fikal skrobia hydroksypropylowa pullulan lewan maltodekstryny fosforany siarczany cytryniany
glikol polipropylenowy	glikol polietylenowy glikolmetoksypropylenowy alkohol poliwinylowy poliwinylpyrolidon hydroksypropylodekstran dekstran
alkohol poliwinylowy	metryloceluloza dekstran hydroksypropylodekstran skrobia hydroksypropylowa
metryloceluloza	dekstran hydroksypropylodekstran skrobia hydroksypropylowa
etylohydroksyceluloza	dekstran skrobia hydroksypropylowa
fikal	dekstran
hydroksypropylodekstran	dekstran

Wodne układy dwufazowe typu polimer/polimer lub polimer/sól są zdecydowanie „łagodniejsze” dla materiałów biologicznych niż systemy ekstrakcyjne zawierające organiczne rozpuszczalniki. Zawartość wody w ATPS wynosi zazwyczaj 85-95%, a w konsekwencji napięcie powierzchniowe pomiędzy fazami jest wyjątkowo niskie, tj.  $1 \times 10^{-4}$  N/m czyli około 400 razy niższe niż w typowych układach woda/roztwór organiczny (10), natomiast międzyfazowa różnica gęstości wynosi 0,003-0,005 g/cm<sup>3</sup> (11).

Rys. 1. Migracja komórek *Saccharomyces cerevisiae* w wodnym układzie dwufazowym PEG 8000 (10%)/dekstran 50 000 10% (B,D) i w medium odniesienia (woda) (A,C). A i B prezentują dane układy bezpośrednio po przygotowaniu, natomiast C i D po upływie 6 min. W układach A i B komórki są równomiernie rozproszone. Po upływie 6 min można zaobserwować wyraźne skupienie komórek w dolnej fazie układu dwufazowego – dekstranie (D), natomiast w układzie odniesienia komórki stopniowo sedimentują (C).



W układach fazowych trzeciego typu, termoseparujących w określonych zakresach temperatury, faza dolna jest wzbogacana w polimer o właściwościach powierzchniowo czynnych, natomiast górna jest praktycznie pozbawiana go (12). W tych układach rozdział wodnego roztworu substancji powierzchniowo czynnej jest wynikiem zależnego od temperatury, odwracalnego uwodnienia grup funkcyjnych (zwykle polarnych reszt oksyetylenowych). Należy dodać, że odpowiedni dobór związku tworzącego fazę termoseparującą umożliwia rozdział w pożądanym zakresie temperatury, np. wodny roztwór tritonu X114 rozdziela się w temperaturze 25°C (13). Z kolei temperatura mętnienia glikolu polietylenowego, który zawiera jedynie oksyetylen (EO = 100%), wynosi 100°C. W innych związkach typu EO/PO zmiana proporcji grup oksyetylenowych i oksypropylenowych znacząco wpływa na temperaturę mętnienia. Roztwory 10% EO50/PO50, EO30/PO70, EO20/PO80 separują odpowiednio w temperaturze 50, 40 i 30°C (12). Temperatura mętnienia zależy także od stężenia i masy cząsteczkowej polimeru (14,15) i jest obniżana przez dodatek soli (16). Zastosowanie ATPS tego rodzaju zostało pierwszy raz przedstawione przez Bordiera (17).

Układ termoseparujący różni się od układów typu polimer/polimer-woda lub polimer/sól-woda niższą zawartością wody w fazie dolnej, w której następuje zagęszczenie substancji powierzchniowo czynnej (do 25%) (12). Napięcie powierzchniowe w tych układach jest porównywalne z napięciem w układach polimer/polimer i wynosi 0,01-0,004 mN/m. Jednakże ekstremalnie niska różnica gęstości pomiędzy fazami, charakterystyczna dla układów termoseparujących, zmniejsza wydajność procesu (11), ponieważ należy wtedy wydłużać działanie siły odśrodkowej lub grawitacyjnej na układ, w porównaniu do innych ATPS.

ATPS typu EO/PO są w praktyce stosowane najczęściej w połączeniu z typowym układem polimer/polimer. Pierwszy etap separacji odbywa się zwykle w układzie po-



limer termoseparujący (typu EO/PO)/PEG lub polimer termoseparujący/skrobia hydroksypropylowa (12). Po utworzeniu dwóch faz, oddzielana jest faza EO/PO, a następnie ogrzewana do wymaganej temperatury mętnienia. Powstaje wówczas wtórny układ dwufazowy. Wszystkie substancje, które po pierwszym rozdziale trafiły do fazy EO/PO znajdują się wtedy w fazie górnej (prawie 100% wody), a fazą dolną będzie zagęszczony polimer typu EO/PO. Zastosowanie takiego układu umożliwia odzyskanie polimeru tworzącego w pierwszym etapie fazę dolną (istotne obniżenie kosztów w porównaniu do układów typu PEG/dekstran) oraz ograniczenie wprowadzania do środowiska niepożądanych soli (np. fosforanów).

### 3. Fizykochemiczne podstawy separacji w ATPS

Stężenia polimerów lub polimeru i soli w obu fazach konieczne do otrzymania układów dwufazowych, określone są w diagramach fazowych, opracowanych przez różnych autorów (9,18,19). Analizę składu faz, konieczną do wykreślenia diagramów fazowych, wykonuje się za pomocą metod polarymetrycznych (20) lub chromatografii cieczowej (21).

Na rysunku 2 przedstawiono uogólniony diagram charakteryzujący wodny układ dwufazowy. Graniczne stężenia polimerów lub polimeru i soli w poszczególnych fazach tworzących układ dwufazowy przedstawia krzywa graniczna TB, zwana binodą. Obszar pod krzywą odpowiada stężeniom tworzącym układ jednofazowy, zaś powyżej tej krzywej stężeniom tworzącym układy dwufazowe. Położenie krzywej granicznej zależy od rodzaju związków tworzących fazy, temperatury układu i obecności w układzie innych substancji. Na przykład, wzrost masy cząsteczkowej polimerów tworzących dwie fazy, przesuwa krzywą w kierunku niższych stężeń (2).

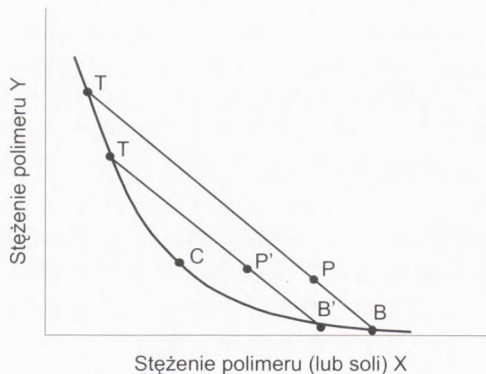
Stany równowagi układu dwufazowego przedstawiono na diagramie za pomocą linii prostych łączących odpowiednie punkty na krzywej granicznej. Linie te nazywane są cięciwami równowagi (TB, T'B'). Na przykład, układ o sumarycznym składzie oznaczonym punktem operacyjnym P leżącym na cięciwie TB, rozwarstwi się na dwa roztwory o składach wyrażonych punktami T i B, zaś układ o składzie P' odpowiednio na roztwory T' i B'. Podobnie zachowa się każdy układ dwufazowy o sumarycznym składzie należącym do tej samej cięciwy. Długość cięciw maleje wraz z obniżaniem sumarycznego stężenia związków tworzących fazy i w punkcie krytycznym C skład obu faz jest jednakowy.

Charakterystyczne odcinki na cięciwie równowagi określają stosunek masowy faz po rozdziale:

$$\text{masa}_{\text{fazy górnej}} / \text{masa}_{\text{fazy dolnej}} = \overline{PB} / \overline{PT}$$

Przyjmuje się także, że stosunek masowy jest równoważny stosunkowi objętości ( $m_{fg}/m_{fd} = V_{fg}/V_{fd}$ ).

Rys. 2. Uogólniona krzywa binodalna. Objasnienia w tekście.



Przy doborze układu ekstrakcyjnego do separacji określonej substancji, obok rodzaju związków tworzących układ, bardzo ważne jest położenie punktu operacyjnego względem krzywej granicznej. Jeżeli punkt operacyjny leży zbyt daleko od binody, gdzie stężenia obu związków są duże, istnieje zagrożenie wytrącenia z roztworu separowanej substancji. Wówczas gdy punkt operacyjny jest położony zbyt blisko binody, niewielkie rozcieńczenie może spowodować przesunięcie się tego punktu na lewą stronę binody i w konsekwencji powstanie jednej fazy.

#### 4. Współczynnik podziału

W procesach ekstrakcji, w tym ekstrakcji w ATPS, wykorzystuje się zróżnicowaną rozpuszczalność separowanej substancji w fazach tworzących układ. Stosunek stężenia separowanej substancji w fazie górnej ( $c_G$ ) do jej stężenia w fazie dolnej ( $c_D$ ) nazywa się współczynnikiem podziału  $K$ :

$$K = c_G/c_D.$$

Zdefiniowany w ten sposób współczynnik jest wypadkową wielu czynników związanych z właściwościami układu oraz separowanej substancji, co można wyrazić następująco (22):

$$\ln K = \sum \ln K_i = \ln K_{el} + \ln K_{hphb} + \ln K_{rozm} + \ln K_{biosp} + \ln K_{konf} + \ln K^\circ$$

gdzie  $K_i$  oznaczają cząstkowe współczynniki podziału uwzględniające oddziaływania elektrostatyczne ( $K_{el}$ ), oddziaływania hydrofilowo-hydrofobowe ( $K_{hphb}$ ), wielkość separowanej substancji ( $K_{rozm}$ ), jej konfigurację ( $K_{konf}$ ) i biospecyficzność ( $K_{biosp}$ ), natomiast  $K^\circ$  – pozostałe.



Do czynników związanych z właściwościami separowanej substancji, wpływających na wielkość współczynnika podziału należą (22):

- Właściwości powierzchniowe, takie jak hydrofobowość powierzchni i obecność na nich grup biospecyficznych oraz wielkość powierzchni.

- Wielkość cząsteczki – współczynnik podziału w danym układzie maleje wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej separowanej substancji. Wynika z tego, że prawdopodobieństwo ekstrakcji mniejszych cząsteczek do fazy górnej jest większe (23).

- Ładunek – ponieważ fazy tworzące układ są również obdarzone ładunkiem, w układzie występują oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy substancjami separowanymi i tworzącymi układ. Przemieszczanie się cząsteczek obdarzonych ładunkiem pomiędzy fazami jest ściśle związane z różnicą pH występującą w układzie (24).

- Chiralność, która wpływa na prezentację grup funkcyjnych przez separowaną cząsteczkę i zdolność określonych enancjomerów do oddziaływań z innymi cząsteczkami podczas rozdziału w ATPS (np. albumina surowicy bydłowej -BSA- migrując do fazy dekstranowej wiąże się tylko z (L)-tryptofanem) (25).

- Skład aminokwasowy separowanych białek. W badaniach podziału pojedynczych aminokwasów pomiędzy fazy, stwierdzono bardzo silną tendencję do migracji tryptofanu do fazy górnej (PEG). Zatem białka zawierające dużą zawartość tryptofanu będą z reguły gromadzić się w górnej fazie układu ATPS. Zaproponowano zatem możliwość wprowadzenia do sekwencji aminokwasowej białek za pomocą metod inżynierii genetycznej dodatkowych reszt tryptofanowych w celu ułatwienia ich ekstrakcji z fazy górnej (26,27).

Bardzo ważny wpływ na wielkość współczynnika K ma dobór składu układu separacyjnego. Z praktycznego punktu widzenia czynniki związane z układem są ważniejsze, ponieważ zdecydowanie łatwiej jest manipulować układem separacyjnym niż materiałem, który poddaje się separacji. Do podstawowych czynników związanych z układem separacyjnym, które wpływają na gromadzenie się białek w określonej fazie, należą (9):

- Hydrofobowość, która wiąże się bezpośrednio z rodzajem polimeru zastosowanym w układzie, stopniem jego podstawienia i polimeryzacji lub soli tworzącej układ. Można uznać, że obowiązuje tu zasada „podobne-lubi-podobne”, a zatem substancje hydrofobowe będą migrować do fazy bardziej hydrofobowej (24,28).

- Skład faz tworzących układ, który zależy zarówno od rodzaju związków tworzących fazę jak i ich masy cząsteczkowej. Stwierdzono, że zwiększenie masy cząsteczkowej danego polimeru w układzie lub jego stężenia zmniejsza liczbę cząsteczek migrujących do fazy utworzonej z tego polimeru (29).

- Temperatura – wraz ze wzrostem temperatury zmieniają się oddziaływania polimer-polimer, co także powoduje zmiany w oddziaływaniu pomiędzy polimerem i substancjami rozproszonymi w układzie separacyjnym (9,30).

- Wartość pH układu jest wyjątkowo silnym czynnikiem wpływającym na rozdział separowanej substancji pomiędzy fazy. Wpływ ten tłumaczy się oddziaływa-



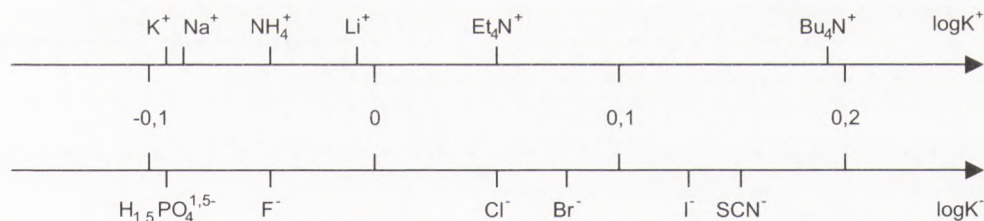
niami elektrostatycznymi, na co wskazuje różnica w migracji związków w układach, w których występuje różnica pH między fazami (np. gdy rośnie pH fazy górnej w stosunku do pH fazy dolnej, rośnie także współczynnik podziału separowanych substancji wykazujących ładunek ujemny) (31-34).

– Ładunek roztworu (oddziaływania elektrostatyczne). W wyniku różnego powinowactwa jonów do polimerów tworzących fazy, wytwarza się międzyfazowa różnica potencjałów. Znaczenie i mechanizm tego efektu nie jest jeszcze do końca poznany (34-36).

– Obecność dodatkowych elektrolitów w układzie dwufazowym. Jony określonych soli występujące w nadmiarze gromadzą się w warstwie granicznej pomiędzy fazami i powodują charakterystyczny rozkład ładunku nazywany podwójną warstwą elektryczną, co z kolei zwiększa potencjał międzyfazowy i wpływa na rozdział cząsteczek obdarzonych ładunkiem (np. białek). Na podstawie badań nad współczynnikami podziału jonów pewnych soli stwierdzono, że jeżeli dąży się do zgromadzenia białka o ładunku ujemnym w górnej fazie, należy dobrać taką sól, by przestrzeń międzyfazowa od strony górnej fazy wykazywała ładunek dodatni. Następuje to, wtedy gdy współczynnik podziału kationu w danym układzie jest wyższy od współczynnika podziału dla anionu (rys. 3) (29,37,38).

– Dodatek substancji powierzchniowo czynnych (w tym hydrotropów) może znacznie wpływać na zmianę współczynnika podziału ze względu na interakcje białka z surfaktantami i możliwość tworzenia miceli (39,40).

– Obecność w jednej z faz biospecyficznych ligandów (ekstrakcja powinowactwa) (10,37). Po częściowym uaktywnieniu łańcuchów PEG-u (do 5% cząsteczek), wiąże się z jego cząsteczkami ligandy. Wprowadzane ligandy często zawierają grupy hydrofobowe (aminowe, merkaptoponowe lub fenolowe) (41). Mogą to być także kwasy tłuszczowe (np. palmitynowy) (42), reaktywne barwniki triazynowe (błękit cybakronowy, czerwień i żółć procjonowa) (43,44) lub jony metali, gdy rozdział dotyczy związków, których aktywność zależna jest od utworzenia kowalencyjnych wiązań z tymi jonami (45). Możliwe jest także prowadzenie ekstrakcji powinowactwa przez wprowadzanie koenzymów, przeciwciał monoklonalnych lub innych silnie specyficz-



Rys. 3. Przykładowe, hipotetyczne współczynniki podziału kationów i anionów wyznaczone w układzie 8% PEG ( $M_{cz}$  3000-3700)/8% dekstran ( $M_{cz}$  500 000) zawierającym 20-25 mM różnych soli w 25°C (37).



nych związków, które mają taki współczynnik podziału, że występować będą tylko w jednej z faz i dzięki temu separowana cząsteczka o wysokim powinowactwie do ligandu, będzie migrować do pożądanego fazy (46). Zazwyczaj nie wprowadza się ligandów do fazy dolnej, ponieważ dąży się do tego, by gromadziły się w niej wszystkie inne związki stanowiące zanieczyszczenia. Po rozdzieleniu faz, konieczne jest przeprowadzenie dodatkowo reakcji dysocjacji wiązania ligand-białko.

Należy przy tym pamiętać, że żaden z wymienionych czynników wpływających na współczynnik podziału nie jest niezależny od pozostałych. Na przykład, zastosowanie polimeru o zwiększonej liczbie grup hydrofobowych, w znaczący sposób zmieni rozmieszczenie jonów w roztworze i potencjał międzyfazowy układu (22). Dlatego bardzo trudne jest oddzielne analizowanie wpływu poszczególnych czynników.

W praktyce często wykonuje się badania modelowe, które umożliwiają przewidywanie współczynnika podziału separowanych substancji. Do badań tych wykorzystuje się substancje, które różnią się określoną właściwością i analizuje, w jaki sposób różnice te wpływają na wielkość współczynnika podziału. Modelowe doświadczenia dotyczą zarówno związków tworzących układ, jak i tych, które w nim migrują. Dzięki tym doświadczeniom są możliwe pewne uogólnienia dotyczące zmian współczynnika K.

## 5. Podsumowanie

Pomimo że z roku na rok wzrasta liczba prac badawczych wykazujących praktyczną użyteczność wodnych układów dwufazowych w separacji produktów biotechnologii, nadal brak teoretycznych modeli umożliwiających projektowanie układów dwufazowych i przewidywanie zachowania się substancji poddawanych separacji. Dotyczy to w szczególności:

- ustalenia kryteriów molekularnych niezbędnych do opisu krzywych równowagi dwóch faz,
- przewidywania położenia cięciw równowagi w układach dwufazowych,
- przewidywania rodzaju związków tworzących fazy i składu faz do separacji określonej substancji,
- przewidywania wielkości współczynnika podziału na podstawie oddziaływań pomiędzy separowaną cząsteczką i związkami tworzącymi fazy.

## Literatura

1. Bender W., Kogolin B., (1986), Chem. Ing. Tech., 58, 565-577.
2. Hustedt H., Kroner K.-H., Kula M.-R., (1985), *Partitioning in Aqueous Two-phase Systems: Theory, Methods, Uses and Applications to Biotechnology*, Eds. Walter H., Brooks D. E., Fisher D., Academic Press, New York, 529-587.

3. Tolstoguzov V. B., (1985), *Food Macromolecules*, Eds. Mitchell J. R., Ledward D. A., Elsevier, London.
4. Zielińska-Dawidziak M., (2000), badania nie publikowane.
5. Flory P. J., (1953), *Principles of Polymer Chemistry*. Cornell University Press, Ithaca, NY.
6. Edmond E., Ogston A. G., (1968), *Biochem. J.*, 109, 659-663.
7. Ogston A. G., (1983), *Chemistry and Technology of Water Soluble Polymers*, Ed. Finch A., Plenum Press, New York, 203-205.
8. Gustafsson A., Wenerstrom H., Tjerneld F., (1986), *Polymer*, 27, 1768-1770.
9. Albertsson P.-A., (1986), *Partition of Cell Particles and Macromolecules*, 3<sup>rd</sup> ed., Wiley, New York.
10. Mattiasson B., (1983), *Trends Biotechnol.*, 1, 16-20.
11. Minuth T., Gieren H., Pape U., Raths H. C., Thommes J., Kula M.-R., (1997), *Biotechnol. Bioeng.*, 55, 339-347.
12. Persson J., Nystrom L., Ageland H., Tjerneld F., (1999), *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 74, 238-243.
13. Metivier A., Boyaval P., Duffes F., Dousset X., Compoin J.-P., Marion D., (2000), *Let. Appl. Microbiol.*, 30, 42-46.
14. Alred P. A., Kozlowski A., Harris J. M., Tjerneld F., (1994), *J. Chromatogr.*, 659, 289-298.
15. Johansson H.-O., Lundh G., Karlstrom G., Tjerneld F., (1996), *Biochim. Biophys. Acta*, 1290, 289-298.
16. Berggren K., Veide A., Nygren P.-A., Tjerneld F., (1999), *Biotechnol. Bioeng.*, 62, 135-144.
17. Bordier C., (1981), *J. Biol. Chem.*, 25, 1604-1607.
18. Tjerneld F., Johansson G., (1990), *Bioseparation*, 1, 255-263.
19. Kula M.-R., (1985), *Fluid Phase Equil.*, 62, 53-63.
20. Larsson M., Mattiasson B., (1988), *Biotechnol. Bioeng.*, 31, 979-983.
21. Planas J., Lefebvre D., Tjerneld F., Hahn-Hagerdal B., (1997), *Biotechnol. Bioeng.*, 54, 303-309.
22. Albertsson P.-A., (1987), *Microbial Physiology for Biotechnological Innovation: Microorganisms in Aqueous Two-Phase Systems*, Royal Swedish Academy of Engineering Sciences, Stockholm, 1-10.
23. Sasakawa S., Walter H., (1972), *Biochemistry*, 11, 2760-2765.
24. Eiteman, M. A., Gainer, J. L., (1990), *Biotechnol. Prog.*, 6, 479-484.
25. Ekberg B. S. B., Albertsson P. A., (1985), *J. Chromatogr.*, 333, 211-214.
26. Huddleston J. G., Veide A., Kohler K., Flanagan J., Enfors S.-O., Lyddiatt A., (1991), *Trends Biotechnol.*, 9, 381-388.
27. Kohler K., Ljunsqvist C., Kondo A., Veide A., Nilsson B., (1991), *Bio/Technology*, 9, 642-646.
28. Shanbhag, V. P., Axelsson C.-G., (1975), *Eur. J. Biochem.*, 60, 17-22.
29. Johansson G., (1989), *Protein Purification. Principles, High Resolution Methods, and Applications*, Eds. Janson J. Ch., Ryden L., VCH Publishers, New York.
30. Karlstrom G., (1985), *J. Phys. Chem.*, 89, 4962-4965.
31. Albertsson P.-A., Sasakawa S., Walter H., (1970), *Nature*, 228, 1329-1330.
32. Walter H., Sasakawa S., Albertsson P.-A., (1972), *Biochemistry*, 11, 3880-3883.
33. DeLigny C. L., Gelsema W. J., (1982), *Sep. Sci. Technol.*, 17, 375-380.
34. Eiteman M. A., (1994), *Sep. Sci. Technol.*, 29, 685-700.
35. King R. S., Blanch H. W., Prausnitz J. M., (1988), *AIChE J.*, 34, 1585-1594.
36. Reitherman R., Flangan S. D., Barondes S. H., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, 297, 193-202.
37. Johansson G., (1974), *Acta Chem. Scand.*, B-28, 873-882.
38. Bamberger S., Seaman G. V. F., Brown J. A., Brooks D. E., (1984), *J. Colloid Interface Sci.*, 99, 187-184.
39. Albertsson P. A., Andersson B., (1981), *J. Chromatogr.*, 215, 131-136.
40. Svensson P., Schroder W., Akerlund H. E., Albertsson P. A., (1985), *J. Chromatogr.*, 323, 363-368.
41. Walter H., Krob E. J., (1976), *FEBS Lett.*, 61, 290-293.
42. Shanbhag V. P., Johansson G., (1974), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 61, 1141-1146.
43. Kroner H.-K., Cordes A., Schelper A., Morr M., Buckmann A. F., Kula M.-R., (1982), *Affinity Chromatography and Related Techniques*, Eds. Grinbau T. C. J., Visser J., Nivard R. J. F., Elsevier, Amsterdam, 491-501.
44. Kopperschlager G., Lorenz G., Usbeck E., (1983), *J. Chromatogr.*, 259, 97-105.



45. Kwon Y. J., Hatti-Kaul R., (1999), *Biotechnol. Techniques*, 13, 145-148.
46. Mattiasson B., Eriksson H., (1982), *Clin. Chem.*, 28, 680-683.
47. Kula M., (1985), *Comprehensive Biotechnology*, vol.2, Eds. Cooney C. L., Humphrey A. E., Pergamon Press, Oxford, 451-457.
48. Hustedt H., Kroner K.-H., Menge U., Kula M.-R., (1985), *Trends Biotechnol.*, 1, 1-6.