

ESTRATEGIAS DE BIOINGENIERIA PARA LA RECUPERACION PRIMARIA DE PRODUCTOS BIOLOGICOS

BIOENGINEERING STRATEGIES FOR THE PRIMARY RECOVERY OF BIOLOGICAL PRODUCTS

M. Cisneros-Ruiz y M. Rito-Palomares*

Centro de Biotecnología, Departamento de Tecnología de Alimentos, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM), Av. Eugenio Garza Sada 2501-Sur, Monterrey, NL 64849, México.

Recibido 24 Marzo 2004; Aceptado 14 Abril 2005

Resumen

El creciente interés de las empresas farmacéuticas de desarrollar procesos eficientes y escalables que les permitan sacar rápidamente al mercado nuevos productos las ha obligado a desarrollar nuevas estrategias de bioingeniería. Una de las tendencias actuales es utilizar los enfoques de integración e intensificación de bioprocesos para el desarrollo de sistemas de recuperación y purificación de productos biológicos, particularmente proteínas. En el presente artículo se discuten algunos casos de la aplicación práctica de estos enfoques empleando las técnicas de sistemas de dos fases acuosas y adsorción de cama expandible. Los casos experimentales involucran: la recuperación de proteínas intracelulares de levaduras, la recuperación *in situ* de 6-pentil- α -pirona (aroma de coco) producida por *Trichoderma harzianum*, el desarrollo de un proceso prototipo para la recuperación de c-ficocianina a partir de *Spirulina maxima* y un enfoque nuevo que facilita la recuperación y procesamiento de proteínas expresadas como cuerpos de inclusión. Se anticipa que la aplicación de estas estrategias facilite el desarrollo de sistemas de recuperación para productos de alto valor comercial o la optimización de los procesos ya existentes, atrayendo la atención de la industria para aplicaciones comerciales.

Palabras clave: estrategias de bioingeniería, recuperación, integración de procesos, intensificación de procesos.

Abstract

The increasing interest of the pharmaceutical companies to develop efficient and scale-up processes, that allow them to rapidly bring new products to the market, has forced them to develop new bioengineering strategies. One of the current trend is to exploit bioprocess integration and intensification approaches for the development of recovery and purification processes for biological products, particularly proteins. This article presents some cases of the results of the practical application of these approaches, using the techniques of aqueous two phase system and expanded bed adsorption. The experimental cases involve recovery of intracellular protein from baker's yeast, *in situ* recovery of 6-pentyl- α -pyrone (coconut-like aroma compound) produced by *Trichoderma harzianum*, the development of a prototype process for the recovery of c-phycoerythrin from *Spirulina maxima* and a new approach for the processing and recovery of inclusion bodies. It is expected that in the future the application of these strategies will facilitate the development of recovery systems for products of high commercial value and the optimization of already existing processes, attracting the attention of the industry for commercial applications.

Keywords: bioengineering strategies, recovery, process integration, process intensification.

1. Introducción

La competencia entre las empresas por sacar al mercado nuevos productos farmacéuticos, las ha obligado a buscar nuevas estrategias para el desarrollo de bioprocesos. La necesidad de estrategias que ayuden a reducir el tiempo de escalamiento y

de transferencia de tecnología para facilitar la implementación industrial de los nuevos bioprocesos es evidente. La industria farmacéutica demanda procesos biotecnológicos que le permitan la recuperación y purificación de proteínas mediante el uso de tecnologías escalables y

*Autor para la correspondencia: E-mail: mrto@itesm.mx
Tel: (52) 8183582000 Ext. 4821, Fax: (52) 8183284322

eficientes. A fin de cubrir las necesidades actuales de la industria, la tendencia en bioingeniería es explotar los enfoques de integración e intensificación de bioprocesos en el desarrollo de sistemas de recuperación (Bierau y col., 1999; Rito-Palomares y Lyddiatt, 2002; Choe y col., 2002; Rito-Palomares y Middelberg, 2002). La integración de bioprocesos consiste en la combinación de dos operaciones unitarias para realizar los objetivos específicos que son alcanzados de manera ineficiente en procesos discretos. Esta estrategia ofrece considerables beneficios potenciales para la recuperación de proteínas. Por su parte, la intensificación de bioprocesos comprende el desarrollo de procesos de recuperación orientados a incrementar el flujo de suspensiones biológicas a procesar para obtener productos industriales (Choe y col., 2002). La tendencia predominante es el uso simultáneo de ambas estrategias, resultando en procesos que permiten procesar una mayor cantidad de producto en un menor número de etapas.

Estas estrategias han recibido especial atención desde el punto de vista práctico y comercial en los últimos años. Sin embargo, existen pocas evidencias de la implementación de las mismas en el desarrollo de procesos biotecnológicos para la recuperación de productos biológicos (Thommes y col., 2001). Dos tecnologías que cuentan con las características de proceso que permiten la implementación de las estrategias de integración e intensificación de bioprocesos son los sistemas de dos fases acuosas (*Aqueous two-phase system*, ATPS) y la adsorción de cama expandible (*Expanded bed adsorption*, EBA).

Los sistemas de dos fases acuosas se forman debido a la combinación de solutos hidrofóbicos que presentan incompatibilidad en soluciones acuosas a concentraciones superiores a un punto crítico. Tradicionalmente se han empleado tres tipos de sistemas: polímero - sal, polímero - polímero y otros. El sistema más utilizado es

polímero sal utilizando polietilenglicol (PEG) - fosfatos, debido a diversas ventajas tales como bajo costo, aplicación amplia en el pasado y actual, y el rango de pH (6 - 9) bajo el cual los sistemas son estables. En estos sistemas el producto de interés es concentrado en una fase que contiene predominantemente agua y alguno de los compuestos que forman las fases, el cual en la mayoría de los casos es PEG. En general, esta técnica ha sido empleada para la recuperación de productos biológicos provenientes de diferentes fuentes (Rito-Palomares, 2004).

La técnica de adsorción en cama expandible es el proceso de capturar el producto de interés en un adsorbente selectivo de un diámetro de partícula y densidad seleccionada, tal que permite la fluidización del adsorbente formando un gradiente de concentración estable. El incremento en los espacios huecos de la cama permite el paso con mayor facilidad de partículas biológicas que en una columna de cama empacada, por lo que se elimina la necesidad de pre-clarificar la muestra. En principio, todos los adsorbentes desarrollados para el proceso de cromatografía ya sean de intercambio iónico, hidrofóbicos, de afinidad entre otros, pueden ser empleados en el proceso de EBA (Lyddiatt, 2002).

El presente artículo muestra algunos de los casos experimentales en los que se presenta la implementación de las estrategias de integración e intensificación de bioprocesos empleando las técnicas de ATPS y/o EBA. Dichos casos involucran: (i) la recuperación de proteínas intracelulares de levaduras y del aroma de coco producido por *Trichoderma harzianum*, (ii) el desarrollo de un proceso simplificado para la recuperación de c-ficocianina a partir de *Spirulina maxima* y (iii) un enfoque novedoso para la recuperación de cuerpos de inclusión.

2. Estrategias de integración de procesos para la recuperación de productos biológicos

Los procesos de recuperación de proteínas intracelulares tradicionalmente involucran una etapa de ruptura celular mecánica o química para la liberación del producto, seguida por una etapa de filtración o centrifugación a alta velocidad para remover los fragmentos celulares y algunos contaminantes. Sin embargo, la implementación en gran escala de la eliminación de fragmentos celulares con filtración y/o centrifugación puede ser difícil.

Adicionalmente, lo complejo de la naturaleza de los productos y contaminantes presentes en el interior de la célula puede causar un impacto negativo sobre el proceso de recuperación y la estabilidad del producto de interés. Estas dificultades pueden ser minimizadas y en algunos casos eliminadas si se emplea la extracción con ATPS y EBA. Conjuntamente, el uso de la estrategia de integración de procesos en las operaciones unitarias de ruptura celular y recuperación primaria puede mejorar el rendimiento y la calidad de los productos (Fig. 1) (Bierau y col. 1999; Rito-Palomares y Lyddiatt, 2002).

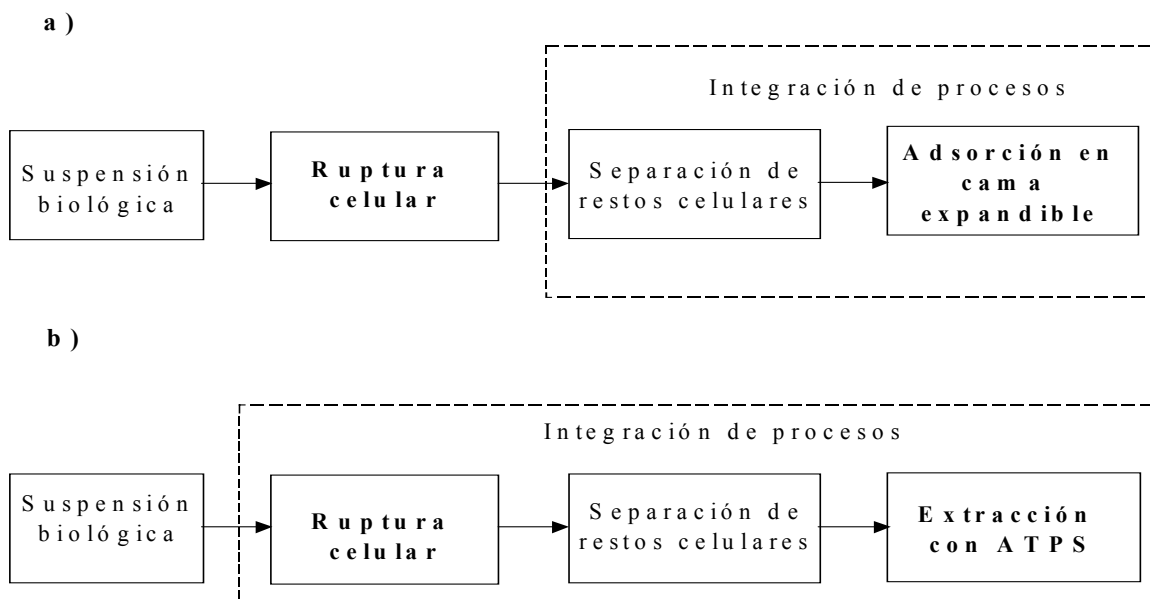


Fig. 1. Representación simplificada de la recuperación de proteínas intracelulares empleando la ruta convencional y la estrategia de integración de procesos utilizando las técnicas de adsorción en cama expandible (a) y sistemas de dos fases acuosas (b).

El diagrama muestran la ruta convencional mediante la cual los restos celulares necesitan ser removidos antes de emplear las técnicas de adsorción en cama expandible o sistemas de dos fases acuosas, así como la potencial aplicación de la estrategia de integración de procesos para cada una de las técnicas.

La integración de la ruptura celular y la extracción con EBA ha permitido la captura directa de la proteína intracelular gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, G3PDH) y otras proteínas de levadura de pan (Bierau y col., 1999; Rito-Palomares y

Lyddiatt, 2002). Sin embargo, el uso de altas concentraciones de biomasa en la ruptura celular ($> 20\%$ peso húmedo/volumen) incrementa fuertemente la expansión de la cama para un flujo dado, provocando dificultades en el proceso de extracción. Por su parte, el uso de la extracción por ATPS

representa una atractiva alternativa para realizar la integración de bioprocesos en tres grandes áreas: (i) bioconversión extractiva (Zijlstra y col., 1998), (ii) fermentación extractiva (Rito-Palomares y col. 2001; Rito-Palomares, 2002) e (iii) integración de la ruptura celular y la etapa de recuperación primaria. Esta última alternativa, involucra realizar la ruptura celular en presencia de los componentes de ATPS para alcanzar el objetivo de integrar los procesos de recuperación primaria de proteínas intracelulares (Fig. 1). La aplicación genérica de esta estrategia ha sido reportada empleando como modelo experimental la recuperación de G3PDH de levadura de pan para comparar el desarrollo del proceso discreto tradicional y una operación completamente integrada (Rito-Palomares y Lyddiatt, 2002). El esquema de proceso propuesto además de permitir integrar las etapas de ruptura celular y extracción con ATPS, permitió determinar condiciones de operación que facilitan la liberación y recuperación de enzimas intracelulares de levaduras en una sola operación (Fig. 1). Es claro que la disminución en el número de operaciones unitarias provoca beneficios económicos al proceso.

La alternativa de fermentación extractiva empleando ATPS permite superar el problema de inhibición del crecimiento del microorganismo durante la fermentación, causado por el aumento de concentración del producto de interés en el caldo de fermentación. Durante la fermentación extractiva, el producto de interés es removido del caldo de fermentación conforme éste es formado, evitando así los problemas tóxicos. Adicionalmente, la integración de estas etapas reduce el número de operaciones unitarias del proceso, beneficiando el aspecto económico y de recuperación del proceso. En este contexto se ha reportado la recuperación *in situ* de 6-pentil- α -pirona (aroma de coco, 6PP) producido por *Trichoderma harzianum* en sistemas de dos fases acuosas (Rito-

Palomares y col., 2001). En este caso se demuestra la aplicación práctica de la estrategia de fermentación extractiva con ATPS para compuestos aromáticos no protéicos en general.

Los estudios antes mencionados demuestran la integración potencial de estas dos etapas de proceso (ruptura celular, y ATPS o EBA) para la recuperación de productos biológicos. En general, se prefiere la estrategia de integrar los sistemas de fases acuosas y ruptura celular cuando se trabaja con cultivos de alta densidad celular, mientras que se prefiere utilizar como etapa de proceso la técnica de EBA para trabajar con cultivos de densidad moderada. Sin embargo, es evidente que se requieren estudios adicionales para manejar eficientemente el uso de EBA y ATPS para la integración de procesos.

3. Intensificación de bioprocesos: un nuevo proceso para la recuperación de productos proteicos de alto valor comercial

El interés actual de las empresas por desarrollar procesos biotecnológicos escalables y eficientes, que les permitan traer rápidamente al mercado nuevos productos económicos, ofrece una atractiva alternativa para explotar ciertos procesos de fermentación mediante los cuales se generan productos de considerable interés económico; a fin de proponer un proceso de recuperación y purificación alterno que sea más rentable. La producción de c-ficocianina (una proteína pigmentada azul) a partir de *Spirulina maxima* representa un caso muy interesante, debido a que tanto su valor industrial como comercial son considerables. El valor comercial de c-ficocianina grado alimentario (pureza 0.7, definida como la relación de absorbancias de 620 nm/280 nm) es aproximadamente \$0.13 USD/mg, mientras que la c-ficocianina grado reactivo (pureza 3.9) varía entre \$1 a 5 USD/mg. En contraste, el valor comercial de c-ficocianina grado

analítico (pureza mayor que 4.0) puede ser superior a \$15 USD/mg (Herrera y col., 1989). Se han reportado con anterioridad protocolos para la recuperación de c-ficocianina a partir de *Spirulina maxima* (Herrera y col., 1989). Sin embargo, estos no han sido capaces de alcanzar la pureza máxima del producto (mayor a 4.0), y están caracterizados por un excesivo número de operaciones unitarias; lo que afecta el rendimiento del proceso (Tabla 1). Adicionalmente, la naturaleza de las etapas empleadas ha dificultado el escalamiento de estos procedimientos (por ejemplo, el uso de molienda manual y el uso de cromatografía). Recientemente, se publicó un reporte sobre la purificación de c-ficocianina a partir de cultivos de *Spirulina maxima* empleando ATPS (Rito-Palomares y col., 2001), el cual representa el desarrollo de un proceso fuertemente simplificado para la purificación de c-ficocianina (Tabla 1). El uso de la estrategia de intensificación de procesos y la integración de las etapas de ruptura celular y recuperación primaria con ATPS en una sola

operación unitaria resultó en el desarrollo de un bioproceso que permite obtener c-ficocianina altamente purificada (pureza mayor 4.0) en solamente 5 operaciones unitarias. La reducción significativa del número de operaciones unitarias y la eliminación de etapas cromatográficas, resulta en grandes beneficios económicos al proceso. Así mismo, la naturaleza de las operaciones unitarias del prototipo resultante junto con los aspectos de control y monitoreo facilitarán su escalamiento y comercialización.

Este y otros ejemplos del uso de ATPS para recuperación de productos proteicos del caldo de fermentación han sido reportados (para información adicional ver Rito-Palomares, 2002). Sin embargo, aunque el uso de esta estrategia simplifica fuertemente el camino para el desarrollo de procesos de recuperación y purificación de proteínas, se requieren casos adicionales en el uso de ATPS para la integración de procesos para llamar la atención hacia esta estrategia de bioingeniería.

Tabla 1. Comparación de protocolos para la recuperación y purificación de c-ficocianina.

Etapas	Protocolo tradicional ^a	Proceso simplificado ^b
1	Fermentación	Fermentación
2	Recuperación de biomasa	Ruptura celular y primera extracción con ATPS
3	Secado	Segunda extracción con ATPS
4	Ruptura celular	Ultrafiltración
5	Extracción con CaCl ₂	Precipitación
6	Centrifugación	
7	Adsorción	
8	Precipitación	
9	Diálisis	
10	Filtración en gel	

a El proceso reportado por Herrera y col. (1989) que sigue la ruta tradicional, en la cual se remueven los restos celulares antes de realizar cualquier etapa de recuperación primaria. Se obtiene c-ficocianina grado reactivo (pureza 3.9).

b El proceso reportado por Rito-Palomares y col. (2001), integra directamente la ruptura celular y la primer etapa de extracción con sistemas de dos fases acuosas. Se obtiene c-ficocianina grado analítico (pureza superior a 4).

4. Nuevas estrategias en el desarrollo de procesos para recuperación de proteínas expresadas como cuerpos de inclusión

La ruta típica para la recuperación de proteínas como cuerpos de inclusión involucra la liberación de los cuerpos de inclusión mediante ruptura celular mecánica (por ejemplo homogenización por alta presión) y su recolección mediante centrifugación. Los cuerpos de inclusión son entonces solubilizados mediante el uso de un desnaturizante fuerte antes de la etapa de reempaquetamiento mediante la remoción de dicho desnaturizante. El proceso entero es complejo, pues requiere de múltiples pasos en la ruptura celular para reducir el tamaño de los restos celulares (Wong *y col.*, 1997), al igual que de repetidos pasos de centrifugación para eliminarlos (Ling *y col.*, 1997), posiblemente con el uso de detergentes y otros agentes químicos (Fig. 2). La complejidad de separar sólidos de tamaño similar junto con la naturaleza multi pasos del método convencional, resultan en un proceso con bajo rendimiento y alto costo. Adicionalmente, el uso de una gran cantidad de tanques de acero proporciona una visión negativa del proceso. Consecuentemente, a pesar de que la formación de cuerpos de inclusión es usualmente asociada con la sobre expresión, con la protección de la proteína de la proteólisis *in vivo* y la prevención de los efectos tóxicos hacia el hospedero, los cuerpos de inclusión son percibidos como una forma de expresión indeseable.

Con la finalidad de superar algunas de las desventajas atribuidas al procesamiento de cuerpos se han propuesto diferentes estrategias (Forman *y col.*, 1990; Meagher *y col.*, 1994; Bailey *y col.*, 1995), sin embargo éstas han sido desventajosas por problemas asociados a la eficiencia en gran escala y complicaciones subsecuentes de procesamiento (Choe *y col.*, 2002). Adicionalmente, se ha reportado una

estrategia diferente involucrando la disolución *in situ* de los cuerpos de inclusión periplásmicos con la subsecuente recuperación de la proteína soluble por ATPS (Hart *y col.*, 1994; Hart *y col.*, 1995). Esta estrategia ha sido extendida para realizar la disolución *in situ* de cuerpos de inclusión citoplasmáticos usando urea y EDTA, obteniendo rendimientos similares a los obtenidos mediante ruptura mecánica (Falconer *y col.*, 1997; Falconer *y col.*, 1998; Falconer *y col.*, 1999).

Esta nueva estrategia de bioingeniería, que explota el uso del método de extracción química, elimina muchas de las limitantes asociadas con el método convencional para procesar cuerpos de inclusión. Adicionalmente, se ha demostrado el acoplamiento potencial de la extracción química con la adsorción en cama fluidizada y fases acuosas (Fig. 2) para la proteína de la cápside mayor (L1) del virus papiloma (HPV) tipo 16 expresada como cuerpos de inclusión en *E. coli* (Choe *y col.*, 2002; Rito-Palomares y Middelberg, 2002). Una comparación directa entre la nueva estrategia propuesta con el proceso existente involucrando homogenización repetida y centrifugación (Fig. 2), resalta la superioridad de la primera.

El proceso propuesto simplifica grandemente el camino tradicional mediante el cual proteínas expresadas como cuerpos de inclusión pueden ser recuperadas, con una visión práctica de implementación comercial. Es necesario considerar algunos aspectos operacionales asociados a la integración de la extracción química - ATPS, y el uso de altas concentraciones de urea, que pueden limitar la formación de las fases. Sin embargo, es claro que para ciertos productos, esta estrategia de bioingeniería abre el camino para la futura intensificación de bioprocesos, particularmente para aquellas proteínas que su producción usando el proceso convencional no es económicamente factible.

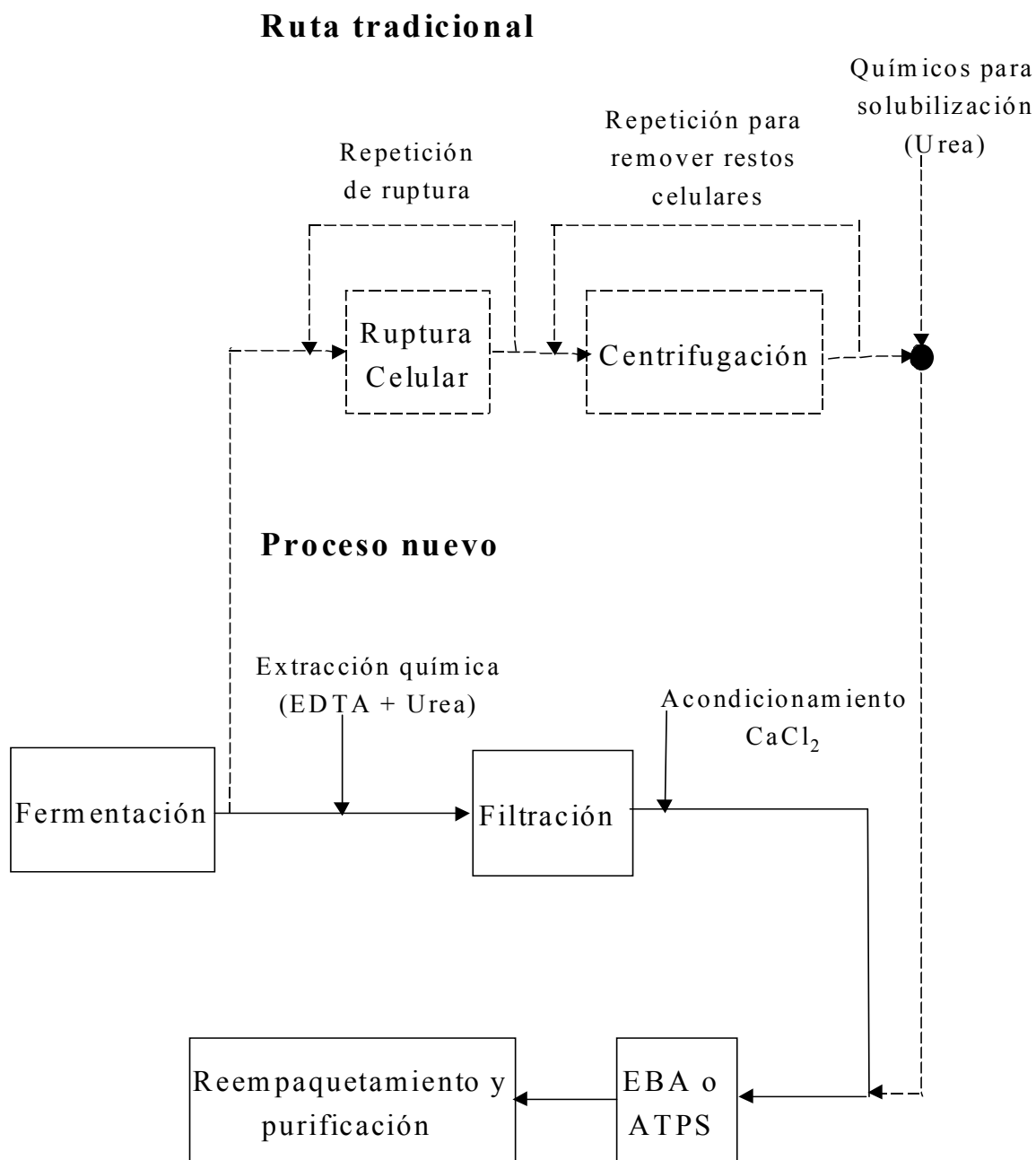


Fig. 2. Comparación directa del proceso tradicional y el propuesto involucrando nuevas estrategias de bioingeniería para el procesamiento de proteínas expresadas como cuerpos de inclusión.

Conclusiones

Es evidente que las estrategias de bioingeniería tradicionales para la recuperación de proteínas exhibe una serie de limitaciones para el emergente tipo de productos biotecnológicos. Resulta claro que continuar con el uso de las estrategias convencionales en el desarrollo de procesos biotecnológicos para la recuperación de proteínas recombinantes, dará como resultado procesos con un número excesivo de operaciones unitarias. Así mismo, estos procesos serán caracterizados probablemente por el uso de etapas cromatográficas que eventualmente dificultaran la factibilidad económica del proceso en escala comercial. La tendencia en el desarrollo de sistemas de recuperación demanda el uso de las nuevas estrategias de integración e intensificación de procesos para la purificación de los productos de alto valor o la optimización de los procesos convencionales. Los nuevos procesos biotecnológicos producidos usando las nuevas estrategias de integración e intensificación son caracterizados por un reducido número de etapas mejorando así la percepción económica, facilitando su implementación comercial. Estas estrategias facilitarán el escalamiento y los requerimientos comerciales establecidos por las empresas para sacar al mercado nuevos productos. Es claro que la implementación genérica de estas estrategias para desarrollar procesos de bioseparación identificará oportunidades para la emergente industria biotecnológica y la comercialización de sus productos.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer el apoyo económico de la Cátedra de Investigación, ITESM (CAT 005). M. Cisneros-Ruiz agradece al ITESM por su beca de excelencia doctoral.

Referencias

- Bailey S. M., Blum P. H. y Meagher M. (1995). Improved homogenization of recombinant *Escherichia coli* following pretreatment with guanidine hydrochloride. *Biotechnology Progress* 11, 533-539.
- Bierau H., Zhang Z. y Lyddiatt A. (1999). Direct process integration of cell disruption and fluidised bed adsorption for the recovery of intracellular proteins. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 74, 208-212.
- Choe W., Clemmitt R., Rito-Palomares M., Chase H. y Middelberg A. P. J. (2002). Bioprocess intensification: a radical new process for recovering inclusion body protein. *Transactions of Institution of Chemical Engineers* 80, 45-50.
- Falconer R. J., O'Neill B. K. y Middelberg A. P. J. (1997). Chemical treatment of *Escherichia coli*: I. Extraction of intracellular protein from uninduced cells. *Biotechnology and Bioengineering* 53, 458-463.
- Falconer R. J., O'Neill B. K. y Middelberg A. P. J. (1998). Chemical treatment of *Escherichia coli*. II. Direct extraction of recombinant protein from cytoplasmic inclusion bodies in intact cells. *Biotechnology and Bioengineering* 57, 381-386.
- Falconer R. J., O'Neill B. K. y Middelberg A. P. J. (1999). Chemical treatment of *Escherichia coli*. III. Selective extraction of a recombinant protein from cytoplasmic inclusion bodies in intact cells. *Biotechnology and Bioengineering* 62, 455-460.
- Forman S. M., deBernardes E. R., Feldberg R. S. y Swartz R. W. (1990). Crossflow filtration for the separation of inclusion bodies from soluble proteins in recombinant *Escherichia coli* cell lysate. *Journal of Membrane Science* 48, 263-279.

- Hart R. A., Lester P. M., Reifsnnyder D. H., Ogez J. R. y Builder S. E. (1994). Large-scale *in situ* isolation of periplasmic IGF-I from *Escherichia coli*. *Biotechnology* 12, 1113-1117.
- Hart R. A., Ogez J. R. y Builder S. E. (1995). Use of multifactorial analysis to develop aqueous two-phase systems for isolation of non-native IGF-I. *Bioseparation* 5, 113-121
- Herrera A., Boussiva S., Napoleone V. y Holberg A. (1989). Recovery of c-phycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina maxima*. *Journal of Applied Phycology* 1, 325-331
- Ling Y., Wong H. H., Thomas C. J., Williams D. R. y Middelberg A. P. J. (1997). Pilot scale extraction of PHB from recombinant *E. coli* by homogenization and centrifugation. *Bioseparation* 7, 9-15.
- Lyddiatt, A. (2002). Process chromatography: current constraints and future options for the adsorptive recovery of bioproducts. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 95-103.
- Meagher M. M., Barlett R. T., Rai V. R. y Khan F. R. (1994). Extraction of rIL-2 inclusion bodies from *Escherichia coli* using cross-flow filtration. *Biotechnology and Bioengineering* 43, 969-977.
- Rito-Palomares M. (2002). The practical application of aqueous two-phase processes for the recovery of biological products. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 12, 535-543.
- Rito-Palomares M. y Lyddiatt A. (2002). Process integration using aqueous two-phase partition for the recovery of intracellular proteins. *Chemical Engineering Journal* 87, 313-319.
- Rito-Palomares M. y Middelberg A. P. J. (2002). Aqueous two-phase systems for the recovery of a recombinant viral coat protein from *Escherichia coli*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 77, 1025-1029.
- Rito-Palomares M., Nuñez L. y Amador D. (2001). Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for c-phycocyanin recovery from *Spirulina maxima*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 76, 1273-1280.
- 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.
- Rito-Palomares, M., Negrete, A., Miranda, L., Flores, C., Galindo, E., y Serrano-Carreón, L. (2001). The potential application of aqueous two-phase systems for *in situ* recovery of 6-pentyl- α -pyrone produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzyme and Microbiology Technology* 28, 625-631.
- Thömmes J., Halfar M., Gieren H., Curvers S., Takors R., Brunschier R. y Kula M.-R. (2001). Human chymotrypsinogen B production from *Pichia pastoris* by integrated development of fermentation and downstream processing Part 2. Protein recovery. *Biotechnology Progress* 17, 503-512.
- Wong H. H., O'Neill B. K. y Middelberg A. P. J. (1997). A mathematical model for *Escherichia coli* debris size reduction during high pressure homogenization based on grinding theory. *Chemical Engineering Science* 52, 2883-2890.
- Zijlstra G. M., de Gooijer C. D. y Tramper J. (1998). Extractive bioconversions in aqueous two phase systems. *Current Opinion in Biotechnology* 9, 171-176.