

双水相萃取技术在提取纯化生物制品中的应用*

范勇,卢艳敏,崔波

(齐鲁工业大学 食品科学与工程学院,山东 济南,250353)

摘 要 作为一种液液萃取技术,双水相已广泛应用于多种生物制品的提取纯化,如蛋白质、遗传物质、小分子物质、细胞及细胞器等。其主要技术优势:易于连续化操作、操作条件温和、易于扩大化生产,文中主要介绍双水相法提取生物制品,双水相与其他新技术相结合的应用及双水相技术面临的问题与发展趋势。

关键词 双水相萃取;生物制品;应用

双水相(aqueous two phase systems, ATPS)即2种不相溶的聚合物溶液或聚合物溶液与盐相互混合达到一定临界浓度时,形成互不相溶的两相。双水相系统主要有以下几种类型:聚合物-聚合物,聚合物-盐,离子液体-盐,小分子醇-盐和2种表面活性剂^[1]。1956年,Albertsson等测定了多种双水相的相图及研究多种生物制品(如蛋白质、核酸、病毒、细胞及细胞颗粒)在双水相中的分配行为。其研究表明,ATPS法提取生物制品蕴含巨大的应用价值^[2]。ATPS技术主要优势:ATPS含水量达70%~90%,能提供温和的提取条件和环境,适于提取不稳定的生物粒子;界面张力低,可提高传质速度;ATPS技术可连续化,集成化生产,减少单元操作过程。此外,ATPS技术优势还包括自然分相时间短,易于扩大化生产,分配系数可控。ATPS已被广泛应用于多种生物制品的提取纯化^[3-4]。

1 双水相法提取生物制品

ATPS提取生物制品可归纳为以下几个方面:(1)提取蛋白质、酶,ATPS提取蛋白质的优势在于大大降低了破坏蛋白质结构的可能性,保留其原有的活性;(2)提取遗传物质DNA;(3)提取具有高附加值的小分子物质;(4)提取细胞及细胞器。物质的表面性质、电荷作用、与疏水键的相互作用使目标物与杂质在上下相分配系数不同,可将目标物与杂质分离,如通过物质的表面性质(疏水性、亲水性)将目标物与杂质(表面性质与目标物相反)分离。目前研究较多的是ATPS萃取目标物的实验工艺条件,影响目标

物分配行为包括多种因素,如ATPS体系的组成成分及分子质量、浓度或TLL, pH值,相比 V_r ,温度,样品添加量等,评价指标包括提取率、分配系数 K 、纯化因子等参数,综合考虑以上影响因素及评价指标可利用多种方法达到最佳提取条件。

1.1 双水相法提取蛋白质

ATPS提取的蛋白质主要有酶、具有治疗作用的抗体、捕光色蛋白质如藻胆蛋白等。ATPS提取蛋白质的优势在于大大降低了破坏蛋白质结构的可能性,保留其原有的活性。关于ATPS提取分离蛋白质的研究应用已有诸多报导。

Radosław Dembczyn'ski等^[5]用环氧乙烷-环氧丙烷共聚物(E050P050)- K_2HPO_4 体系从蛋清中提取溶菌酶,实验采用了3种不同浓度的体系,综合考虑分配系数和提取率,采用体系B(3.3% E050P050, 13.3% K_2HPO_4 , pH=7, 0.85 mol/L NaCl, 样品添加量为稀释3倍的7 mL蛋白)。由于E050P050的浊点较低,将富含E050P050的上相提取出来再经过加热(高于其浊点)使其形成两相,溶菌酶分配在富含水的上相,实验表明经过2次ATPS提取后提取率、纯化因子和酶活分别为85%, 16.9, 32, 300 U/mg。应用温度诱导分离型聚合物的ATPS提取溶菌酶有利于相成分的循环再利用,可降低生产成本。Aguilar等^[6]用聚乙二醇(PEG)-磷酸钾盐ATPS提取由大肠杆菌重组菌生产的青霉素酰化酶,实验表明最优参数为PEG 1 450 g/mol, 系线TLL 48.5%, 相比 V_r = 1.0, pH = 7, 样品添加量35%时,上相纯化因子和提取率分别为3, 97%。此外,将ATPS法与色谱法提取青霉素酰化酶的实验成本进行比较,ATPS法的花费减少了37%。成本降低是由于操作单元的减少。因此证明ATPS法适于提取青霉素酰化酶及具

第一作者:硕士研究生(崔波教授为通讯作者, E-mail: cuibopaper@163.com)。

* 山东省高等学校科技计划项目, J11LC12

收稿日期:2014-11-29, 改回日期:2015-04-17

有规模化生产的前景。

关于 ATPS 法提取具有治疗作用的蛋白质已有广泛研究报导。Platis 等^[7]研究采用 PEG-磷酸钾盐 ATPS 提取在转基因烟草中表达的 HIV 单克隆抗体 2F5(mAb2F5),在最优条件下 PEG 1 500 g/mol 12%, K_3PO_4 13%, $pH = 5$,提取率和纯化因子分别为 95%,3~4。Rosa 等^[8]用含有化学改性 PEG 的 ATPS 提取由中国仓鼠卵巢细胞生产的人体免疫球蛋白 gamma(IgG),在血清中,IgG 是含量最多的免疫球

蛋白,其具有重要的免疫作用。实验表明,用含有 150 g/mol PEG-COOH 的 PEG-葡聚糖(简写 Dex)体系提取 IgG,IgG 的纯化因子和提取率分别为 1.9,93%。ATPS 中添加化学物质如修饰的聚合物、金属离子、极性溶剂等可提高目标物的选择性,提高目标物的产率和纯度。目前,国内外已开展了应用亲和双水相(聚合物上耦联特定的亲和配基)提取蛋白质的研究,表 1 为近年来应用亲和双水相提取蛋白质的实例。

表 1 亲和双水相法提取蛋白质的实例

Table 1 some examples of aqueous two-phase affinity partitioning systems for recovery and purification of proteins

提取物	双水相体系	亲和配基	提取率,分配系数 K	参考文献
IgG	DexT500/PEG 3350	PEG-苯甲基	88%	9
葡糖淀粉酶	PEG 300/磷酸盐	淀粉	K 由 6.6 降低到 0.73	10
IgG	DexT500/PEG 1450	PEG-IgG-HRP	91%	11
S-23 骨髓瘤蛋白质	DexT500/PEG 6000	PEO-二硝基苯基	K 提高 2.8~7	12
溶菌酶	DexT500/PEG 8000	葡聚糖-苯甲酰	K 由 0.2 增加到 0.85	13
几丁质酶	PEG6000/磷酸盐	壳聚糖	90%	14
角质酶	PEG1500/磷酸盐	丁酸盐	98%	15
磷脂酶 D	PEG6000/磷酸盐	藻朊酸盐	85%	16

由于人们越来越重视合成色素对人体健康的危害,所以在食品和化妆品行业中关于提取纯化有色化合物的研究越来越多。某些天然有色化合物在分子技术领域中可以作为荧光标记。存在于藻类和蓝细菌中的藻胆蛋白是一种重要的捕光色蛋白,这种蛋白可作为天然色素使用。Benavides^[17]等用 PEG-磷酸钾体系从紫球藻中提取纯化 B-藻红蛋白(BPE),实验表明,最优条件为 PEG1000 g/mol(29%)-磷酸钾盐(9%),TLL 45%, $V_r = 4.5$, $pH = 7$,提取率和纯化因子分别达 90%,4。Chethana 等^[18]用 PEG-磷酸钾盐从钝顶螺旋藻中提取 C-藻蓝蛋白(CPC),C-藻蓝蛋白富集在 PEG 上相,实验研究了 PEG 分子量、系统 TLL、体积比 V_r 、PEG 浓度、盐浓度对 CPC 分配行为的影响。PEG 1500 分配系数 K 随 TLL 的增加而增加,但纯度降低,PEG 4000,6000 ATPS 中的 CPC 的分配行为与体系 PEG 1500 相似。同样考查了 3 种不同 V_r (0.22,0.54,1.25)对 CPC 分配行为影响, $V_r = 0.22$,CPC 纯化因子最大达 3.4,但提取率仅为 40%(PEG 4000/磷酸盐 TLL14%)。实验条件在 $pH 7.0$,PEG4000 6%,磷酸盐 15%, $V_r 0.25$,纯化因子和提取率达 4.32,79%,实验结果表明此 ATPS 适于提取钝顶螺旋藻中的 CPC。

1.2 双水相法提取遗传物质

关于 ATPS 法提取纯化遗传物质的研究已有报

道,如质粒 DNA 载体。Trindade 等^[19]用 PEG- $(NH_4)_2SO_4$ 体系提取质粒 DNA(pDNA)载体。实验从大肠杆菌细胞溶解产物中提取质粒 DNA 载体,体系条件为 PEG 600 34%, $(NH_4)_2SO_4$ 6%, $V_r = 9.3$ 样品添加量 20%,pDNA 完全分配在下相,提取率达 100%,pDNA 浓缩了 3 倍。为了实现工艺过程强化,样品添加量从 20% 提高到 40%,样品添加量 40% 为时,提取率达为 85%,pDNA 浓缩了 8 倍。

Duarte 等^[20]用 ATPS 法提取 pDNA 与聚合物相连的一种复合物,此种复合物是一种可用于基因治疗的基因载体。采用 2 种 ATPS 体系(600 g/mol PEG- $(NH_4)_2SO_4$ 和 350 g/mol PEG-Dextran 110)连续进行提取,将聚乙二醇化聚乙烯亚胺(pPEI)添加到第二阶段的 ATPS 体系中,pPEI 作为亲和配体可与目标物定向结合,可提高双水相相对目标物的选择性。经过 2 种 ATPS 萃取后 RNA 和杂蛋白被完全分离去除,目标复合物的提取率达到 100%,虽然用超滤膜将目标物与 PEG 和 Dextran 分离时会使得目标物产率损失 5%~10%。但实验证明了亲和双水相相对于质粒复合物的提取具有潜在的应用价值。

Matos 等^[21]用 2 次 ATPS 从 PCR 中提取小片段 DNA,首先用 PEG4000-聚丙烯酸盐 24000ATPS 提取 DNA,PCR 分配在富含 PEG 的上相,再将上相与

Na_2SO_4 组成双水相, DNA 分配在富含 Na_2SO_4 的下相, 蛋白质和大分子 DNA 被除去, 小片段 DNA (小于 4000 bp) 的提取率达 95%。

1.3 双水相法提取小分子物质

近年来, 具有高附加值的小分子物质成为研究热点, 应用 ATPS 法提取小分子物质的研究也逐渐增加。Zhi jian Tan 等^[22] 用 ATPS 法从芦荟中提取具有抗氧化作用和药用价值的蒽醌类化合物 (AQs), 实验考查了不同小分子醇与 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 组成的双水相提取 AQs, 结果表明采用正丙醇- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 体系提取率最高, 条件为 25 °C 下, 正丙醇 17.84 %, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 26.66 %, AQs 的最高提取率达 95.56 %。

Peretra 等^[23] 用 PEG-聚丙烯酸钠 (NaPA)- Na_2SO_4 提取克拉维酸, 实验首先考查聚合物 PEG (2000, 4000, 6000) 和聚丙烯酸钠对克拉维酸的影响, 结果表明 2 种聚合物对其没有降解。研究 NaCl 和 Na_2SO_4 对克拉维酸分配系数 K 的影响, 添加 Na_2SO_4 体系的 K 值高于添加 NaCl 的, 与 NaCl 相比 Na_2SO_4 对克拉维酸分配在富含 PEG 上相的作用更强。体系条件为 PEG4000 10%, NaPA8000 20%, Na_2SO_4 6%, K 值为 9.15。此体系中克拉维酸的 K 值高于 PEG-磷酸钾 ATPS (K=8.2), 证明这种 ATPS 体系适合克拉维酸的初步纯化。

孙晨等^[24] 采用脂肪醇聚氧乙烯醚 (AEO-7)- $\text{NNa}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 双水相提取 L-苯丙氨酸, 实验考察了不同盐 (NaCl 、 Na_2SO_4 、 NNa_3PO_4)、AEO-7 含量、提取时间、加入 L-苯丙氨酸的含量和温度对 L-苯丙氨酸提取率和分配系数的影响, 当条件为 AEO-7 的体积浓度为 8%, $\text{NNa}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 的质量浓度为 85 g/L, 温度 40 °C, L-苯丙氨酸的质量浓度为 0.532 8 g/L, 提取时间 60 min, L-苯丙氨酸的提取率和分配系数分别为 98.7%, 15.3, 实验表明 AEO-7 / NNa_3PO_4 ATPS 适于提取 L-苯丙氨酸

1.4 双水相法提取细胞及细胞器

ATPS 法提取细胞, 主要应用包括细胞分选、细胞器的分离。熊霞等^[25] 采用 ATPS 纯化大鼠背根神经节细胞质膜, 差速离心后得到的质膜浓度提高了 2.3 倍。Edahiro^[26] 采用 PEG-Dex 提取花青素含量较高的草莓细胞, 花青素含量差异大的细胞被分开, 分成 2 个细胞群。ATPS 中添加 1.8 mmol/kg 磷酸钾缓冲液, 培养 10 d 花青素含量高的草莓细胞完全分配在下相。Morre 等^[27] 采用 ATPS 法从哺乳动物细胞中提

取质膜和高尔基体, 质膜纯度达 85%, 离心后下相高尔基体浓缩了 3.5 倍。与上相的亲合力由小到大依次为内质网、线粒体、高尔基体、溶菌酶和核内体、质膜。ATPS 法适于提取细胞及细胞器。

2 双水相与其他其他新技术的集成

为更高效的提取分离目标物, 采用 ATPS 与其他新技术集成。主要包括: (1) 与双向电泳技术结合, 主要应用与蛋白质提取方面以得到相关信息; (2) 与微流控制技术相结合, 通过流体动力学提高传质速率来提高提取分离效果; (3) 与高速逆流色谱技术结合, 有效的将 ATPS 萃取技术与色谱分离结合在一起, 高效的提取纯化目标物质; (4) 双水相与温度诱导相分离、磁场作用、超声波作用、气溶胶技术等常规技术实现集成化, 改善了双水相萃取技术中的一些问题, 如成相聚合物回收困难、相分离时间较长、易乳化等。

2.1 双水相与双向电泳技术结合

ATPS 与双向电泳 (2-DE) 技术结合主要应用与蛋白质提取方面, 通过双向电泳图谱得到蛋白质的一些相关信息如分子质量、等电点 (pI)、表达水平。双向电泳具有简便、快速、高分辨率和重复性等优点, 克服了 SDS-PAGE 的一些不足, 如 SDS-PAGE 很难检测到低丰度蛋白, 聚合蛋白质, 疏水蛋白。Gu 和 Glatz^[28] 将双水相 PEG 3350 (15.7%) Na_2SO_4 (8.9%)-NaCl (3%) 与双向电泳结合得到蛋白质特性的 3D 图, 包括等电点 pI、分子质量 M_w 和表面疏水性 SH。得到玉米胚芽蛋白的 3D 图, 与 pH=7 的玉米胚芽提取物相比, pH=4 时提取物蛋白质较少、疏水性强、分子量小。

2.2 微流控制与双水相技术结合

微流控制分离通过改变几何形状来影响两相间的流动模式和界面形状, 从而提高界面间的传质速率和目标物的提取率。近年来, 微流控制技术与 ATPS 结合的研究已受到关注。黄宇石等^[29] 用 PEG- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 体系提取糖化酶, 实验设计了提取分离的微流控装置, 研究了微通道内的雷诺层流条件, 并将了微流控和烧杯中的 ATPS (PEG24%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20%, $V_r=1$, 糖化酶酶粉 0.03g) 溶液进行了对比实验, 微流控萃取的传质速率是烧杯中的 2.8 倍, 微通道和烧杯中单位双水相体积单位时间的传质量分别为 127.15, 2.96 g/cm³ · s, 前者是后者的 42 倍, 微流控制与 ATPS 技术相结合, 提供了两相比较快的环隙流

动速度和较大的传质比表面积,微流控双水相萃取效果远优于普通烧杯中萃取。

SooHoo^[30]将 ATPSPEG-葡聚糖(简写 Dex)与微流控制结合从全血中提取白血球,实验根据微流装置的层流流动特点,考查聚合物间无稳定界面(不相融的 PEG-PEG-Dex),一个稳定界面(不相融的 Dex-PEG-Dex),2个稳定界面(PEG-PBS(磷酸盐缓冲液)-Dex)3种萃取情况,结果表明提取效果最好的配置是 Dex-PEG-Dex,其白细胞与红细胞之比是样品的 9.13 倍。

Meagher 等^[31]应用微流控制双水相法,结果表明可除去约 85% 的杂蛋白。Yushi Huang^[32]等用微流控制双水相法提取牛血清蛋白,3 个周期提取仅用 3.6s,牛血清蛋白提取率达 71%,结果优于普通双水相。

2.3 高速逆流色谱与双水相结合

鄧文波等^[33]采用高速逆流色谱与 PEG1000-磷酸钾盐 ATPS 相结合对标准蛋白质混合物以及卵白蛋白进行分离,结果表明 PEG1000 15%, K_3PO_4 盐 17%, pH 9.2, 高速逆流色谱流速 0.8 mL/min, 转速 850 r/min, 成功分离细胞色素 C、溶菌酶和肌红蛋白的混合物,PEG1000 16%, K_3PO_4 17%, pH 9.2, 高速逆流色谱流速 1.8 mL/min, 转速 850 r/min, 200 min 内从鸡蛋蛋清样品中分离卵白蛋白,其电泳纯度为 100%,收率达 95%。

Liu 等^[34]将高速逆流色谱与 ATPS 乙醇- $(NH_4)_2SO_4$ 相结合成功分离 4 种核苷,双水相条件为乙醇 27%, $(NH_4)_2SO_4$ 21%, 高速逆流色谱以上相作为流动相,流动方向从头到尾,流速 0.7 mL/min, 转速 800 r/min, 分离了 4 种核苷腺嘌呤核苷、尿嘧啶核苷、鸟嘌呤核苷、胞嘧啶核苷。

2.4 双水相与其他技术相结合

Lopes 等^[35]采用温度诱导双水相体系从大肠杆菌发酵液中提取绿色荧光蛋白和除去内毒素,结果表明,绿色荧光蛋白的提取率达 96% 且除去了 99% 的内毒素。翟素玲等^[36]采用双水相电泳(PEG-Dex)分离氨基酸,结果表明,ATPS 萃取过程中外加电场使苯丙氨酸和色氨酸的分离效果有明显的提高,延长分离时间或提高电场强度使苯丙氨酸萃取率达到 90% 以上,基本实现完全分离。Save 等^[37]将 ATPS 萃取与气溶胶技术结合,实验考察了淀粉转葡糖苷酶的传质性能,传质系数 K 高于喷射床,表明 ATPS 萃取结合气溶胶技术有效提高了萃取柱的传质性能。

3 双水相技术面临的问题及展望

ATPS 萃取技术克服了有机溶剂使生物粒子变性作用,其操作条件温和适于提取生物制品。对于蛋白质、遗传物质、小分子物质、细胞、细胞器的提取分离已有许多的研究,但双水相萃取技术还面临很多问题:(1)对于 ATPS 机理研究还不够成熟,需进一步的深入研究。ATPS 组分间作用比较复杂,目标物的分配行为受表面性质、电荷作用与其他作用力的影响。关于物质在 ATPS 体系间的分配行为的研究比较少,缺乏理论或模型解释;(2)ATPS 萃取生物制品虽具有粗分离的作用,但同时也引入成相物质且目标物与成相物质难于分离,对后续分离工艺不利,分离过程产生的成相物质的溶液难于回收利用;(3)ATPS 萃取的研究多数建立在实验基础上,缺乏对于相间传质传递的动力学研究。所以作为一种重要的提取纯化的技术方法 ATPS 萃取应用于工业生产还面临诸多问题。

目前,在生物制药业中,下游加工过程的费用占总成本的 40% ~ 70%,因此,关于降低 ATPS 生产成本的研究也不断增加。降低 ATPS 生产成本的方法主要有:(1)降低 ATPS 组成成分的成本,开发廉价 ATPS 体系;(2)ATPS 相成分循环再利用。Ghosh 等^[38]用廉价的 DexT40 代替昂贵的 DexT50,用变性淀粉、乙基羟乙基纤维素等代替昂贵的葡聚糖,用羟基纤维素、聚乙烯醇等代替 PEG,可制成廉价的 ATPS 体系。Dembczyński 等^[39]用 EO50PO50- K_2HPO_4 温度诱导 ATPS 体系提取溶菌酶,研究了相成分 EO50PO50 和 K_2HPO_4 的循环再利用提取溶菌酶。但 ATPS 萃取生物制品仍有巨大潜在的价值,研究人员也在不断探索以解决以上所面临的问题。

ATPS 萃取技术未来发展的方向主要包括 2 个方面:(1)所有理论研究不能脱离实际应用,ATPS 萃取技术的发展应适于大规模的工厂生产,要相对容易建立投产这就离不开技术集成化和提高 ATPS 萃取技术本身的优势,在萃取的同时达到分离以节省后续分离的麻烦,使其在应用中可减少成本的投入;(2)同时生产应用离不开理论基础研究,ATPS 萃取技术所面临的问题正是理论研究亟待解决的,ATPS 体系热力学和动力学机理研究的不断深入也是此技术未来发展的一大挑战。

参 考 文 献

- [1] Ruiz-Ruiz F, Benavides J, Aguilar O, et al. Aqueous two-

- phase affinity partitioning systems: current applications and trends[J]. *Journal of chromatography A*, 2012, 1 244: 1 – 13.
- [2] Albertsson P A. Partition of Cell Particles and Macromolecules[M]. New York: Wiley and Son 1986.
 - [3] 谭志坚, 李芬芳, 邢建敏. 双水相萃取技术在分离纯化中的应用[J]. *化工技术与开发*, 2010, 39(8): 29 – 35.
 - [4] Dembczyński R, Bia as W, Jankowski T. Partitioning of lysozyme in aqueous two-phase systems containing ethylene oxide-propylene oxide copolymer and potassium phosphates[J]. *Food and Bioproducts Processing*, 2013, 91(3): 292 – 302.
 - [5] Dembczyński R, Bia as W, Regulski K, et al. Lysozyme extraction from hen egg white in an aqueous two-phase system composed of ethylene oxide-propylene oxide thermoseparating copolymer and potassium phosphate[J]. *Process Biochemistry*, 2010, 45(3): 369 – 374.
 - [6] Aguilar O, Albiter V, Serrano-Carreón L, et al. Direct comparison between ion-exchange chromatography and aqueous two-phase processes for the partial purification of penicillin acylase produced by *E. coli*[J]. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 2006, 835(1/2): 7 – 83.
 - [7] Platis D, Labrou NE. Development of an aqueous two-phase partitioning system for fractionating therapeutic proteins from tobacco extract[J]. *Journal of chromatography A*, 2006, 1 128(1/2): 114 – 124.
 - [8] Rosa PA, Azevedo AM, Ferreira IF, et al. Downstream processing of antibodies: single-stage versus multi-stage aqueous two-phase extraction[J]. *Journal of chromatography A*, 2009, 1 216(50): 8 741 – 8 749.
 - [9] Rosa P A J, Azevedo A M, Ferreira I F. Affinity-enhanced purification of human antibodies by aqueous two-phase extraction[J]. *Separation and Purification Technology*, 2009, 65(1): 31 – 39.
 - [10] de Gouveia T, Kilikian B V. Bioaffinity extraction of glucoamylase in aqueous two-phase systems using starch as free bioligand[J]. *Journal of Chromatography. B*, 2007, 43(1): 241 – 246.
 - [11] Hye-Mee Park, Sang-Woo Lee, Woo-Jin Chang. Affinity separation by protein conjugated IgG in aqueous two-phase systems using horseradish peroxidase as a ligand carrier[J]. *Journal of Chromatography. B*, 2007(1/2): 8 – 112.
 - [12] Flanagan S D, Barondes S H. Affinity partitioning. A method for purification of proteins using specific polymer-ligands in aqueous polymer two-phase systems[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1975, 250(4): 1 484 – 1 489.
 - [13] Lu M, Tjerneld F. Interaction between tryptophan residues and hydrophobically modified dextran - Effect on partitioning of peptides and proteins in aqueous two-phase systems[J]. *Journal of Chromatography A*, 1997, 766: 99 – 108.
 - [14] Teotia S, Lata R, Gupta M N, Chitosan as a macroaffinity ligand - Purification of chitinases by affinity precipitation and aqueous two-phase extractions[J]. *Journal of Chromatography. A*, 2004, 1 052(1/2): 85 – 91.
 - [15] Fernandes S, Johansson G, Hatti-Kaul R. Purification of recombinant cutinase by extraction in an aqueous two-phase system facilitated by a fatty acid substrate[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001, 73(6): 465 – 475.
 - [16] Teotia S, Gupta M N. Purification of phospholipase D by two-phase affinity extraction[J]. *Journal of Chromatography. A*, 2004, 1 025(2): 297 – 301.
 - [17] Benavides J, Rito-Palomares M. Simplified two-stage method to B-phycoerythrin recovery from *Porphyridium cruentum*[J]. *Journal of Chromatography. B; Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2006, 844(1): 39 – 44.
 - [18] Chethana S, Chetan A, Nayak M C, et al. Single step aqueous two-phase extraction for downstream processing of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis*[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52(4): 2 415 – 2 421.
 - [19] Trindade IP, Diogo MM, Prazeres DMF, et al. Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography[J]. *Journal of Chromatography. A*, 2005, 1 082(2): 176 – 184.
 - [20] Duarte SP, Fortes AG, Prazeres DM, et al. Preparation of plasmid DNA polyplexes from alkaline lysates by a two-step aqueous two-phase extraction process[J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1 164(1/2): 105 – 112.
 - [21] Matos T, Johansson HO, Queiroz JA, et al. Isolation of PCR DNA fragments using aqueous two-phase systems[J]. *Separation and Purification Technology*, 2014, 122: 144 – 148.
 - [22] TAN Z J, LI F F, Xu X L. Extraction and purification of anthraquinones derivatives from *Aloe vera* L. using alcohol/salt aqueous two-phase system[J]. *Bioprocess and biosystems engineering*, 2013, 36(8): 1 105 – 1 113.
 - [23] Pereira J F B, Santos V C, Johansson H O, et al. A stable liquid-liquid extraction system for clavulanic acid using polymer-based aqueous two-phase systems[J]. *Separation*

- and Purification Technology, 2012, 98:441 – 450.
- [24] 孙晨, 刘广宇, 徐培辉. 非离子表面活性剂双水相萃取氨基酸研究[J]. 粮食与油脂, 2014, 27(7): 36 – 39.
- [25] 熊霞, 沈剑英, 李建军, 等. 大鼠背根神经节细胞质膜的双水相法纯化及其蛋白质组学研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36(11): 1 458 – 1 468.
- [26] Edahiro J, Yamada M, Seike S, et al. Separation of cultured strawberry cells producing anthocyanins in aqueous two-phase system[J]. J Biosci Bioeng, 2005, 100(4): 449 – 454.
- [27] Morre D M, Morre D J. Aqueous two-phase partition applied to the isolation of plasmamembranes and Golgi apparatus from cultured mammalian cells[J]. Journal Chromatography B, 2000, 743: 377 – 387.
- [28] Gu Z, Glatz C E. Aqueous two-phase extraction for protein recovery from corn extracts[J]. Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences. 2007, 845(1): 38 – 50.
- [29] 孟涛, 黄宇石, 李伟, 等. 微流控双水相技术萃取糖化酶实验研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(7): 249 – 252.
- [30] Soohoo J R, Walker G M. Microfluidic aqueous two phase system for leukocyte concentration from whole blood[J]. Biomed Microdevices, 2009, 11(2): 323 – 329.
- [31] Meagher R J, Light Y K, Singh A K. Rapid, continuous purification of proteins in a microfluidic device using genetically-engineered partition tags[J]. Lab Chip, 2008, 8(4): 527 – 532.
- [32] Yushi Huang, Tao Meng, Ting Guo, et al. Aqueous two-phase extraction for bovine serumalbumin (BSA) with co-laminar flow in a simple coaxial capillary microfluidic device[J]. Microfluidics and Nanofluidics, 2014, 16(3): 483 – 491.
- [33] 鄧文波, 邓秋云, 宋江楠, 等. 高速逆流双水相色谱法纯化卵白蛋白[J]. 生物工程学报, 2005, 21(1): 129 – 134.
- [34] LIU D, ZOU X, GAO M, et al. Hydrophilic organic/salt-containing aqueous two-phase solvent system for counter-current chromatography: a novel technique for separation of polar compounds[J]. Journal of chromatography A, 2014, 1356: 157 – 162.
- [35] Lopes André M, Magalhães Pérola O, Mazzola Priscila G, et al. Green fluorescent protein extraction and LPS removal from *Escherichia coli* fermentation medium using aqueous two-phase micellar system[J]. Separation and Purification Technology, 2011, 81(3): 339 – 346.
- [36] 翟素玲, 刘建刚, 骆广生. 双水相电泳分离氨基酸[J]. 高校化学工程学报, 2000, 14(3): 293 – 296.
- [37] Save S V, Pangarker V G, Kumer S V. Intensification of mass-transfer in aqueous 2-phase systems[J]. Biotechnology and bioengineering, 1993, 41(1): 72 – 78.
- [38] Sanjoy Ghosha, Vijayalakshmi. Evaluation of an alternative source of dextran as a phase forming polymer for aqueous two-phase extractive system[J]. Biochemical Engineering Journal, 2004, (21): 241 – 252.
- [39] Dembczynski R, Bialas W, Jankowski T. Recycling of phase components during lysozyme extraction from hen egg white in the E050P050/K₂HPO₄ aqueous two-phase system[J]. Biochemical Engineering Journal, 2010, 51(1/2): 24 – 31.

Application of aqueous Two-Phase Systems for extraction and purification of biological products

FAN Yong, LU Yan-min, CUI Bo

(College of Food Science and Engineering, Qilu University of Technology, Jinan 250353, China)

ABSTRACT Aqueous Two-Phase Systems (ATPS) is a liquid-liquid extraction technique that has been widely used to extract and purify a variety of biological products, including proteins, genetic material, low molecular weight products, cells and cell organelles. The main advantages of this technique include continuous processing, mild operating conditions and feasible to scale up. In this review, the application of ATPS for the extraction of biological products and ATPS combined with other new technology are highlighted. Problems and trends of the application of ATPS are discussed.

Key words aqueous two-phase systems extraction, biological products, application