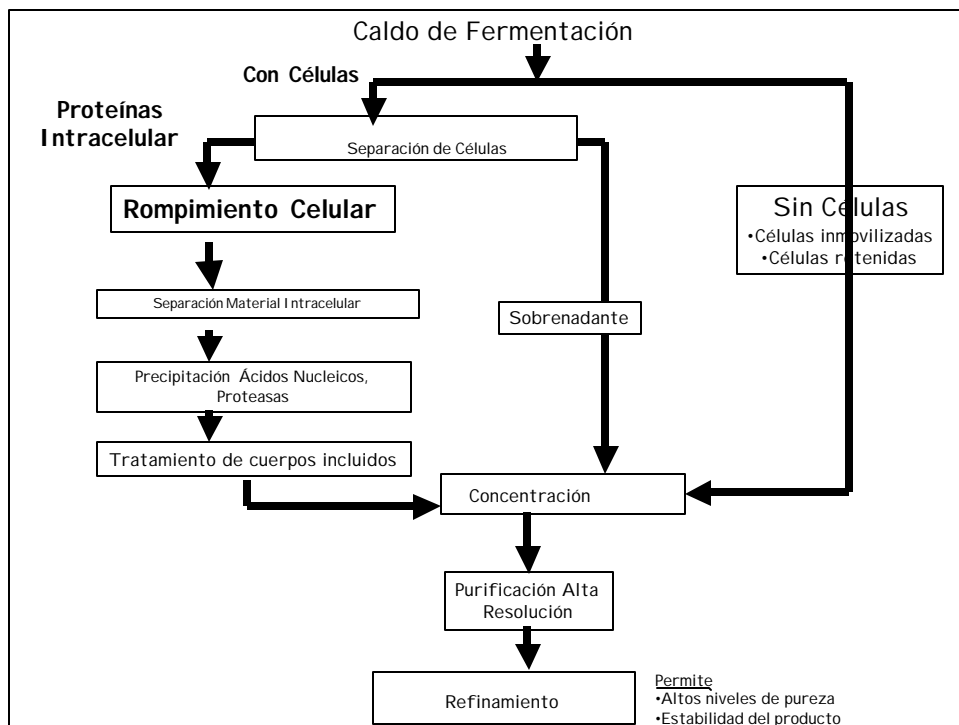


Rompimiento Celular

Separación y Procesos Biotecnológicos



ROMPIMIENTO DE CÉLULAS **(Cell Disruption)**

¿Cuándo se usa?

Los procesos de bio-separación se inician con una separación de la biomasa desde el resto del cultivo. En muchos casos los productos se encuentran en el medio. En estos casos la biomasa se descarta y hasta se puede vender como sub-producto.

Pero en otros casos el **producto de interés** se encuentra en el **interior de las células**, en particular la mayoría de las proteínas producidas por manipulación genética de bacterias que no segregan la proteína al medio, pero que son precipitadas en el interior de la células en forma de cuerpos incluidos ("inclusion bodies") .

➔ **Se trata de proteínas intracelulares.**

Procesos y Equipos

La liberación de las proteínas intracelulares involucra la **ruptura o permeabilización de la pared celular**.

Los equipos involucrados en esta etapa no han sido diseñados especialmente para el área biotecnológica sino que son prestadas de otras áreas (área de alimentos, de pinturas y pigmentos).

Este rompimiento o permeabilización se puede llevar a cabo por dos métodos:

- Métodos No - Mecánicos**
- Métodos Mecánicos**

La selección de una u otra técnica dependerá las características del producto se desea purificar, tales como:

- Resistencia a:
 - Medios alcalinos
 - Solventes
 - Detergentes
 - Enzimas
 - Temperatura
 - Esfuerzo de corte.

La técnica utilizada determinará el tamaño de los desechos que se producirán.

Métodos Mecánicos

Métodos Mecánicos

El rompimiento se lleva a cabo por acción mecánica, pudiendo ser:

- Fricción
- Efecto de la presión
- Colisiones.

Estos métodos incluyen las operaciones unitarias de ultrasonido, homogenización, molinos de bolas, etc.

Estos métodos resultan ser **agresivos** con las proteínas de interés, debido principalmente a la generación de calor.

Adicionalmente, el escalamiento resultan ser un problema significativo.

<u>Métodos Mecánicos</u>				
Técnicas	Principios	Stress	Costos	Ejemplos
Homogenizador de cuchillos	Las células son rotas en un mezclador	Moderado	Moderado	Rompimiento de tejidos y células animales.
Homogenizador alta presión	Las células son forzadas a pasar a través de un pequeño orificio lo que produce que se rompan por el esfuerzo de corte	Fuerte	Moderado	Tratamiento a gran escala de suspensión de células.
Ultrasonificación	Las células son quebradas en una cavidad ultrasónica	Fuerte	Caro	Rompimiento de suspensiones de células a lo menos en pequeña escala
Molienda	Las células son rotas por medio de una molienda con abrasivos	Moderado	Barato	
Molinos de bolas	Las células son trituradas con bolas de acero o vidrio	Fuerte	Barato	Rompimiento a gran escala para suspensiones de células y células de plantas

Métodos No-Mecánicos

Pueden ser de dos tipos:

• Agente químicos

- Solventes orgánicos
- Detergentes
- Alcalis
- Agua (shock osmótico)

• Enzimáticos se trata de enzimas que permeabilizan en forma selectiva las membranas celulares, tales como lisozima, glucanasas, mananasas, etc.

Los métodos no-mecánicos son fáciles de escalar, si uno necesita tratar 10 veces más materia orgánica basta con adicionar 10 veces más reactivo químico o enzimático.

<u>Métodos No-mecánicos</u>				
Técnicas	Principios	Stress	Costos	Ejemplos
Permeabilización Enzimático	Permeabilización de la pared celular, lo cual produce el rompimiento de la célula	Suave	Caro	Tratamiento de <i>M. lysodeikticus</i> con lisozima.
Shock Osmótico	Ruptura Osmótica de la membrana	Suave	Barato	Ruptura de Células de Glóbulos Rojos.
Solubilización	Disolución de la membrana celular con detergentes	Suave	Moderadamente Caro	Rompimiento de bacterias con SDS.
Disolución de Lípidos	Solventes orgánicos que disuelve la pared celular y también la desestabilizan	Moderado	Barato	Rompimiento de levaduras con tolueno.
Tratamiento con álcalis	Solubilización de la membrana por saponificación de los lípidos	Fuerte	Barato	

Rompimiento Celular Métodos Mecánicos

Separación y Procesos Biotecnológicos

MÉTODOS MECÁNICOS

Los métodos mecánicos se pueden dividir en dos tipos :

Métodos a pequeña escala son :

- Ultrasonificación
- Molinos con abrasivos
- Homogenizadores

Métodos a gran escala

- Homogenizadores a alta presión
- Molinos de bolas

Ambos son operaciones unitarias típicas de la Ingeniería de Procesos y de la industria de alimentos.

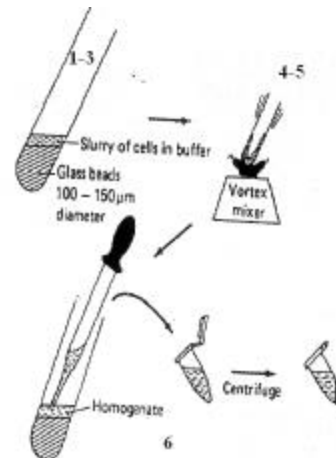
MÉTODOS MECÁNICOS

Pequeña Escala

Desintegración completa de una célula

Para determinar el contenido de proteínas total de una célula se debe realizar la desintegración total de ellas, para ello se utiliza la siguiente metodología:

1. Se adicionan 1 volumen de bolas de vidrio en un ependorf.
2. Se adiciona 1 volumen de las células a desintegrar (en forma de pasta, previamente separadas del caldo)
3. Se adiciona 0.5 volumen de buffer, se puede adicionar algún detergente (SDS, Triton X-100)
4. Se agitan fuertemente en un vortex, entre 2 y 5 minutos (controlando que no se caliente)
5. Se repite el punto 4 hasta asegurarse que no se rompen más las células.
6. Se separan los desechos de la solución y se analiza la concentración de proteínas.

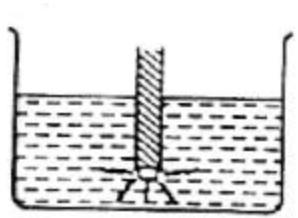


100% Rompimiento

Ultrasonificación

Se utilizan frecuencias de 20 KHz esto produce vibraciones que provocan el fenómeno de cavitación.

- Se producen zonas de baja presión en el líquido
- El líquido se transforma en gas formándose pequeñas burbujas
- Las burbujas colapsan debido a los cambios de presión.
- Se producen fuertes esfuerzos de corte en el líquido que rompen las células.

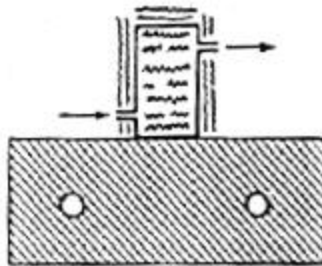


Ultrasonificador

Molina con abrasivos

Procedimiento:

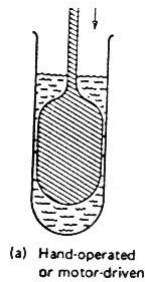
1. Se utilizan un recipiente donde se agrega algún agente abrasivo, como bolas de vidrio.
2. El sistema se hace vibrar lo que produce:
 - Colisiones de las bolas con la biomasa
 - Fuertes esfuerzos de cortes
 - Se produce la ruptura de las células.
3. Posteriormente, se separan las bolitas y desechos celulares y se recupera el sobrenadante.



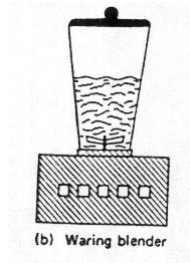
Homogenizadores

La idea es generar altos esfuerzos de corte que produzcan la ruptura de las células. Los altos esfuerzos de corte se pueden obtener por:

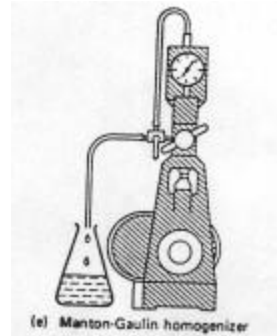
1. Émbolos
2. Cuchillas
3. Pistones



Émbolos



Cuchillas



Pistones

MÉTODOS MECÁNICOS

Gran Escala

Homogenizadores a alta presión

Son los equipos más ampliamente usado en el rompimiento celular.

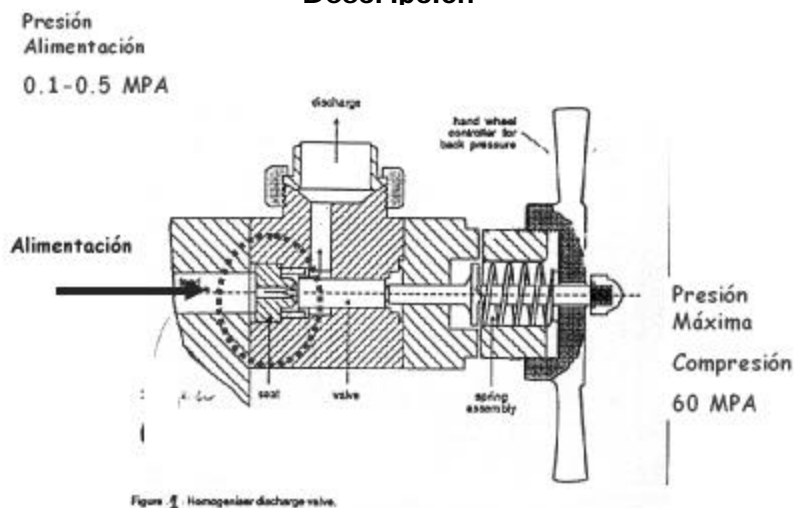
Resulta ser un método no selectivo

Se componen de:

- Pistón a alta presión
 - Laboratorio 1-2
 - Industria
- Válvulas

La suspensión que se procesa se hace pasar varias veces hasta lograr el nivel de liberación deseado.

Descripción



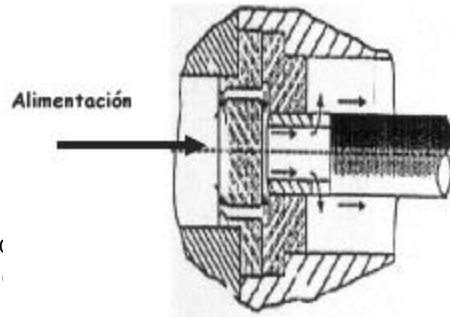
Mecanismo

Las células se rompen cuando la suspensión pasa a alta presión por la válvula de descarga. Las células son sometidas a :

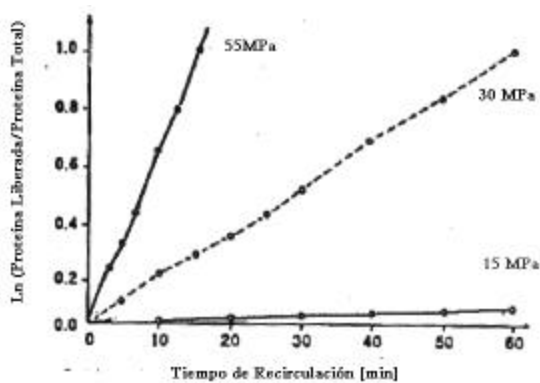
- Turbulencia
- Cavitación
- Fuertes esfuerzos de corte

Parámetros de Diseño

1. Presión de operación
2. Diseño de la válvula
3. Localización del Producto
4. Temperatura de operación
5. Número de Pasadas



1. - Presión de operación



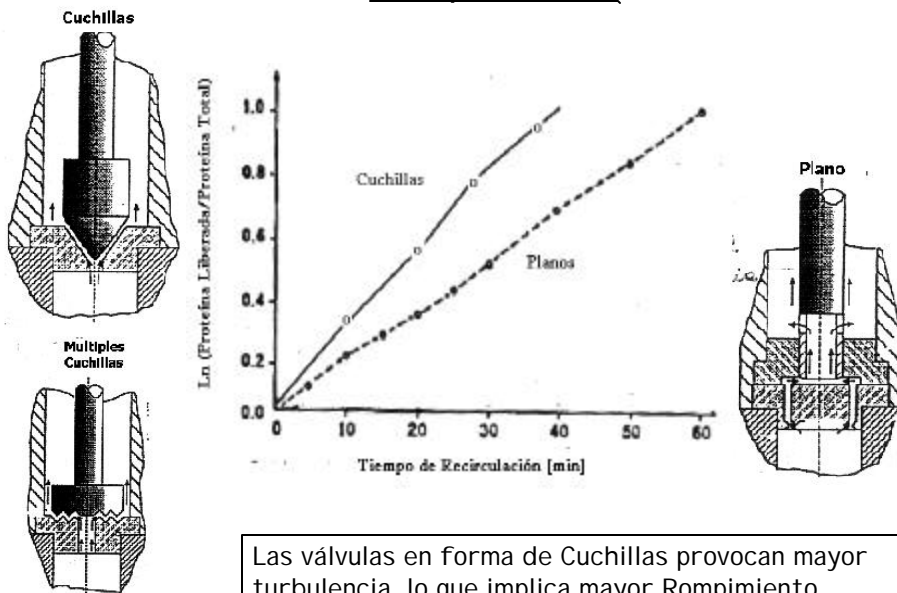
Condiciones:

-A mayor presión mayor liberación de proteínas.

-Siempre se trabaja $P > 30$ Mpa

-La presión más usada es 55 MPa

2.- Tipo de Válvula



3.- Localización del Producto

Dependiendo donde se encuentre localizado el producto se deberán aplicar diferentes condiciones para romper la célula, por ejemplo:

- Si el producto se encuentra en la membrana, se debe aplicar un menor esfuerzo.
- Si se encuentra dentro de un organelo, debe ser mayor esfuerzo.

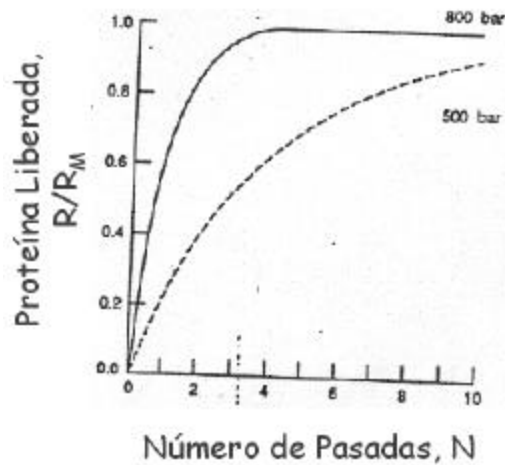
4.- Temperatura

La temperatura tiene un doble efecto, dado que ha mayor temperatura:

- Se reduce la viscosidad, lo cual es positivo para el proceso
- Pero se puede denaturar el producto

SE DEBE BUSCAR UNA TEMPERATURA OPTIMA

5.- Número de Pasadas

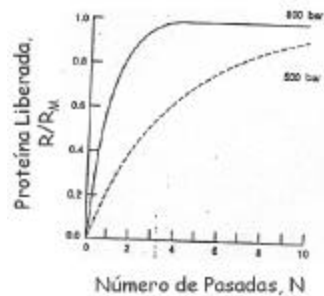


A medida que aumenta el número de pasadas aumenta la proteína liberada.

DISEÑO DE UN HOMOGENIZADOR A ALTA PRESION

La cinética de desintegración de las células es de 1ª orden respecto al número de pasos

$$\frac{dR}{dN} = k(R_M - R)$$



R: Producto liberado luego de N pasos.

R_M : Producto máximo que se podría liberar.

N: Número de pasos

k: Constante cinética f(T,P, tipo de válvula)

Generalmente

$$k = k^* P^a$$

$$a = 2.9 \text{ Levaduras}$$

$$a = 2.2 \text{ E.coli}$$

Integrando $N=0 \quad R=0$
 $N=N \quad R=R$

$$\ln \frac{R_M}{R_M - R} = k \cdot N$$

La ecuación de Diseño queda de la forma:

$$\ln \frac{R_M}{R_M - R} = k^* \cdot P^a \cdot N$$

SE DETERMINA EL NUMERO DE PASADAS PARA UN NIVEL DE ROMPIMIENTO DADO

EJEMPLO 1

En la recuperación de **β**-galactosidasa de *E.coli*, se hace pasar por un homogenizador de alta presión. La suspensión contiene 47,6 g/l en peso seco. La presión de operación utilizada fue de 60 MPa.

La cantidad de proteína liberada después de cada paso se presenta en la siguiente tabla

Paso	% Recuperación
1	63.0
2	79.0
5	96.0
10	99.9

1. Estime el valor de la constante cinética de rompimiento.
2. Estime el número de pasos para liberar el 93% de la enzima.

ESCALAMIENTO

El escalamiento se hace en base al factor "Q" que se define como:

$$\Theta = \frac{\text{Porcentaje de Proteína liberada}}{\text{Potencia Consumida}}$$

La Potencia consumida se determina como:

$$\text{Potencia} = F \cdot P = N \cdot V \cdot P$$

F: Caudal a tratar

V: Volumen a tratar por pasada

P: Presión

El porcentaje de proteína liberada se calcula como:

$$\text{Porcentaje de Proteína Liberada} = \frac{R}{R_M} * 100 = (1 - e^{-k \cdot P^a \cdot N}) * 100$$

Luego

$$\Theta = \frac{(1 - e^{-k \cdot P^a \cdot N}) * 100}{F \cdot P}$$

Se puede encontrar la presión de operación óptima que maximiza Q, para un número de pasadas dada:

$$\frac{d\Theta}{dP} = 0 \qquad \frac{d^2\Theta}{dP^2} < 0$$

EJEMPLO 2

Células de *Micrococcus* son rotas, a 5° C, en un homogenizador Manton-Gaulin que opera a presiones entre 200 y 550 kgf/cm². Se han realizado experimentos en el equipo obteniendo los diversos porcentajes de liberación de proteínas en función del número de pasadas.

Tabla N°2: Porcentaje de Rompimiento de Células

N° Pasadas		Presión	
	200	300	550
1	5	13.5	42
3	14	33.5	83
5	22	47.5	94.5

Si se necesita liberar el 80% de las células indique :

¿Que condiciones de Operación son más convenientes: trabajar a una presión de 230 ó 430 (kgf/cm²)? .

Calentamiento

Como se señalo el proceso de rompimiento celular se produce por una entrega de energía al sistema, esto provoca un aumento de la temperatura el cual se puede determinar mediante la siguiente relación:

$$\text{Potencia} = F \cdot r \cdot C_p \cdot \Delta T$$

Donde

r: Densidad

C_p: calor específico

DT: Aumento de temperatura

Ejemplo 3

Determine el aumento de temperatura si la presión en el homogenizado es de 700 bar, la densidad 1100 kg/m³ y el calor específico 4000 J/kg K