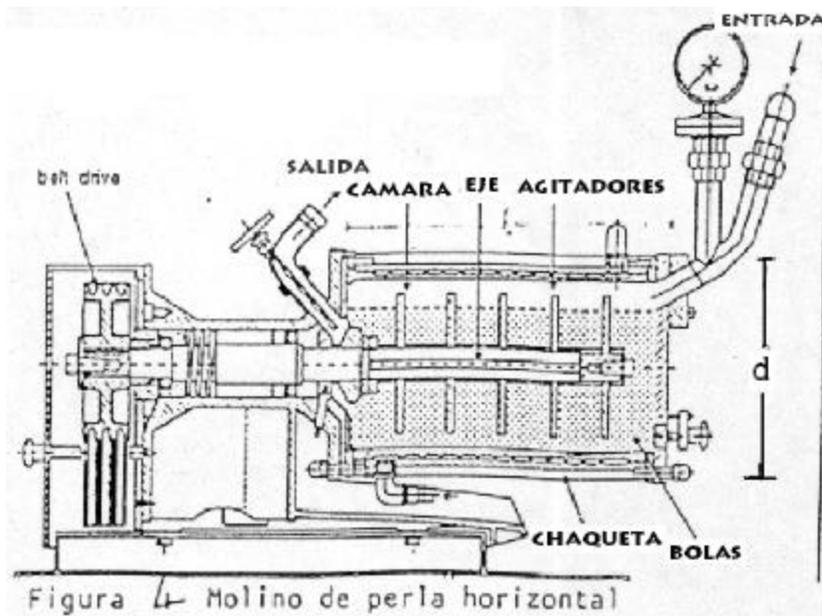


Molinos de Bolas

Los molinos de bolas a gran escala constan de:

- una cámara de molienda
 - con perlas de vidrio (elemento activo de la molienda)
- un eje giratorio que posee:
 - discos
 - barras
 - anillosque provocan el movimiento del contenido del molino.
El tipo de agitador está directamente relacionado con el transporte óptimo de la energía



Los discos, barras o anillos permiten solo el paso de las células a través de la cámara, no así el de las bolas.

Los molinos de perlas tienen una relación longitud a diámetro de la cámara de molienda de

1: 2.5 a 1:3.5

Los volúmenes de las cámaras van entre:

- Laboratorio 50 ml
- Industrial 250 lts para flujos de 2000l/h

Mecanismo

1. Se produce un transporte de energía cinética desde el agitador a las bolas de vidrio.
2. Se forman diferentes perfiles de velocidad en el interior de la cámara.
3. Se generan fuertes esfuerzos de corte, junto con el hecho de aumentar la frecuencia y fuerza de las colisiones entre las bolitas y las células lo que provoca la desintegración de éstas.

Parámetros operacionales

1. Velocidad del agitador
2. Diseño del agitador
3. Velocidad de alimentación de la suspensión
4. Tamaño de bolas de vidrio
5. Carga de bolas
6. Concentración celular
7. Temperatura
8. Tiempo de residencia Ecuación de Diseño

1.- Velocidad del agitador (\bar{u})

La velocidad promedio se define como:

$$\bar{u} = \frac{D_m \cdot \mathbf{p} \cdot n}{60000}$$

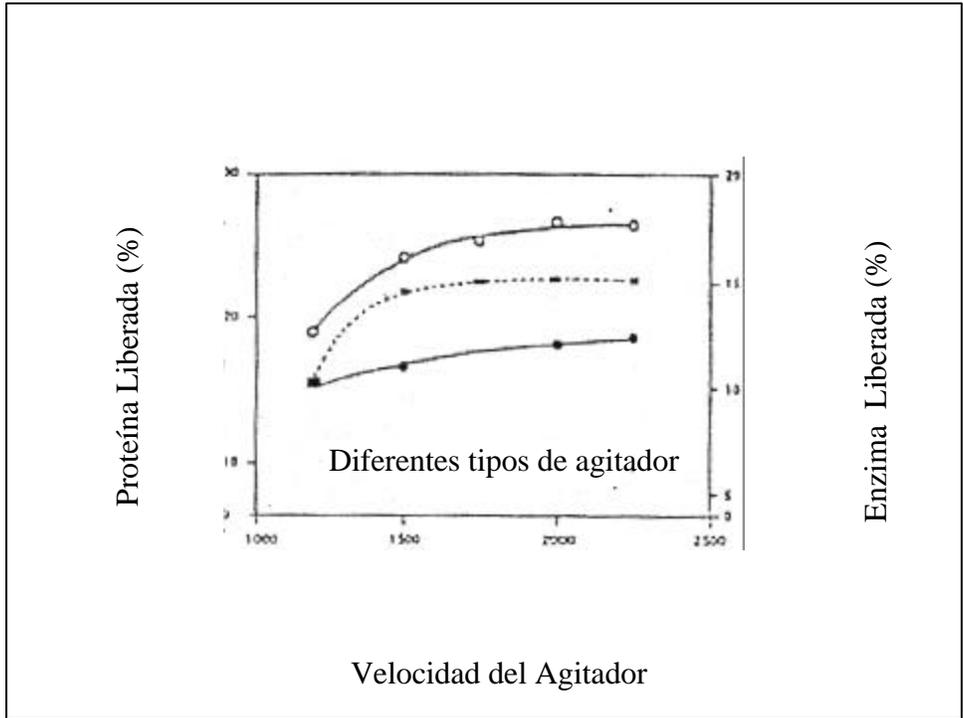
Donde

D_m : Diámetro promedio de los anillos

n: Velocidad de agitación

A medida que: aumenta de la velocidad del agitador:

- Aumenta la fuerza de corte y la frecuencia de colisiones
- Aumenta la temperatura
- Aumenta la erosión de las bolitas



2.- Diseño del agitador

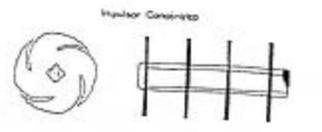
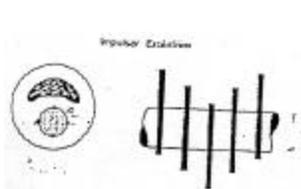
El tipo de agitador promueve una mezcla del tipo flujo pistón, pero con una distribución de tiempos de residencia, lo cual afecta el nivel de ruptura de las células.

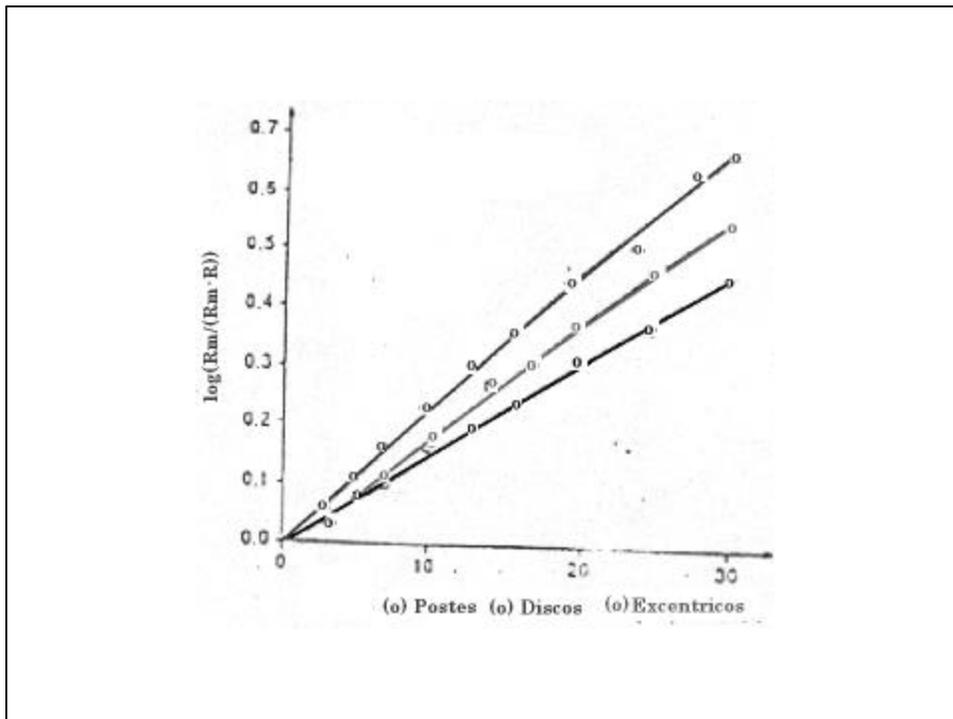
Ejemplo

Anillos Excéntricos

Anillos Concéntricos

$$D_m = 2\sqrt{\frac{e^2 + d^2}{4}}$$





3.- Velocidad de alimentación de la suspensión

La potencia consumida es función de la velocidad de agitación y levemente de la velocidad de alimentación, por lo cual considerando este punto se recomienda operar a los flujos más altos posible.

4.- Tamaño de bolitas de vidrio

Dependiendo la escala, el tipo de célula y la localización del producto de interés se recomiendan diferentes tamaños de bolitas.

Escala

Laboratorio Φ : 0.2-1.5 mm

Industrial Φ : 0.4-1.5 mm

Tipo de célula

Levadura $\Phi > 0.5$ mm

Bacterias $\Phi < 0.5$ mm

Localización

Espacio periplasmático (más fácil) Mayor Tamaño

Protoplasmático (más difícil) Más pequeñas

Eficiencia

$$Razón = \frac{\text{Volumen Molino}}{\text{Volumen Bolitas}}$$

- Cuando hay un mayor número de bolitas aumenta el número de colisiones y aumenta la eficiencia, para poder mantener la "Razón" se debe trabajar con bolitas más pequeñas.
- Al disminuir el diámetro de las bolitas, éstas tienden a flotar

EXISTE UN DIAMETRO OPTIMO DE BOLI TAS QUE SE DETERMI NA EXPERI MENTALEMENTE

5.- Carga de bolitas

La carga óptima de bolitas dependerá del tipo de células y del diámetro de éstas.

Nivel de la carga

- Baja provoca baja eficiencia
- Alta provoca un alto consumo de potencia y alta liberación de calor.

CARGA OPTIMA ENTRE 80-90%

Si $\Phi = 0.5 \text{ mm}$ 85%

Si $\Phi = 1.0 \text{ mm}$ 80%

6.- Concentración de la suspensión celular

El peso húmedo de células óptimo es entre 40-50%.

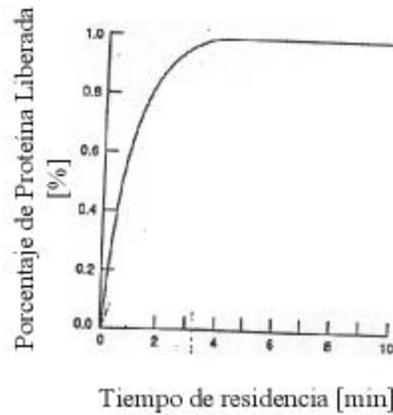
7.- Efecto de la temperatura

La temperatura facilita el rompimiento pero puede afectar el producto.

Temperatura óptima entre 5-15°C, para ello se requiere de sistemas de enfriamiento

8.- Tiempo de Residencia

A mayor tiempo de residencia mayor rompimiento



DISEÑO DE UN MOLINO DE BOLAS

Este tipo de equipos puede operar en forma batch o continua.

Operación Batch

El grado de rompimiento se mide en forma:

- Directa: Contando células rotas
- Indirecta: Midiendo componentes liberados durante el rompimiento, por ejemplo
 - Proteínas
 - Actividad de enzima

Ecuación de DISEÑO

Al igual que los homogenizadores de alta presión los molinos de bolas presenta una cinética de rompimiento de 1º orden respecto al tiempo.

Del balance de masa para la proteína liberada:

$$V_m \cdot \frac{dR}{dT} = k(R_M - R) \cdot V_m$$

V_M : Volumen libre del molino

R: Producto liberado.

R_M : Producto máximo que se podría liberar.

t: Tiempo de operación o residencia

k: Constante cinética [t^{-1}]

f(T, tipo y concentración de células, carga, velocidad de agitación, diámetro de las bolitas)



Integrando entre $t=0$ $R=0$

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

En el caso de trabajar evaluando actividad

Integrando entre $t=0$ $A=0$

$$\ln \frac{A_M}{A_M - A} = k \cdot t$$

A: Actividad de la enzima liberada

A_M : Actividad máxima que se podría liberar.

t: Tiempo de operación o residencia

k: Constante cinética [t^{-1}]

f(T, tipo y concentración de células, carga, velocidad de agitación, diámetro de las bolitas)

Ejemplo 1:

En un estudio de liberación de proteínas intracelulares en función de la velocidad de agitación empleando un molino de bolas, con bolas de entre 0,55 y 0,85 mm de diámetro, utilizando una suspensión celular de una concentración 50% (peso / volumen), un flujo de alimentación igual a 50 L/h y una carga de alimentación de 85%. Bajo estas condiciones se obtuvieron los siguientes datos:

Velocidad de Agitación (rpm)	Proteína liberada (mg/mL)
1200	15,88
1500	22,35
1750	22,90
2000	22,94
2250	23,00

a) Determine la velocidad de agitación óptima para este agitador.

Ejemplo 2:

Seleccionada la velocidad de agitación se varió el diámetro del agitador, obteniéndose los siguientes datos:

Tiempo de residencia (min)	Agitador 1 $\log(Rm/(Rm-R))$	Agitador 2 $\log(Rm/(Rm-R))$
3	0,037	0,060
5	0,090	0,150
10	0,160	0,225
15	0,225	0,325
20	0,300	0,425

1. Estimar las constantes cinéticas de desintegración para cada tipo de agitador.
2. Calcular el tiempo requerido para obtener un 80% de rompimiento para cada agitador.

Escalamiento

Transferencia de calor

El principal problema es remover la energía, que debe ser disipada.

Toda la energía entregada por los agitadores es transferida al interior del molino como calor.

Este calor debe ser removido por las paredes.

Así se definió:

$$R = \frac{\text{Área de transferencia de calor}}{\text{Volumen de molino}} = \frac{\mathbf{p} \cdot T \cdot L}{\frac{\mathbf{p} \cdot T^2 \cdot L}{4}} = \frac{4}{T}$$

Donde T: Diámetro del Molino

L: Largo del Molino

Esta razón disminuye cuando se aumenta el diámetro

Escalamiento

Potencia

La potencia entregada se determina como:

$$Potencia = c \cdot \mathbf{r} \cdot N^3 \cdot D^5$$

Donde ρ : Densidad de la suspensión

N: Velocidad de rotación de los impeler

D: Diámetro del impeler

C: constante

Si se aumenta el diámetro del impeler se aumenta la energía o potencia entregada.

Si el diámetro del molino se duplica el área de transferencia se reduce y no se disipa toda la energía.

SE DEBEN EVALUAR LAS DIMENSIONES PARA OPTIMIZAR NIVEL DE ENFRIAMIENTO Y MINIMIZAR EL CONSUMO DE POTENCIA

Características de las células

Membrana celular

Estructura de la membrana celular

Las características de las membranas nos permiten diferenciar a las bacterias en 2 tipos:

- Gram-negativas

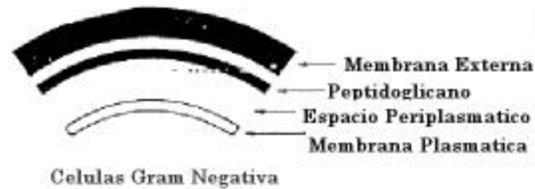
Como modelo se utilizará una bacteria Gram-negativa, no tiene núcleo y todo su material genético se encuentra en una simple cadena de DNA, un ejemplo es la *E.coli*.

- Gram-positivas

Entre ellas las bacterias del tipo Bacillus

Gram-negativas

La estructura de una Gram-negativa involucra tres capas :

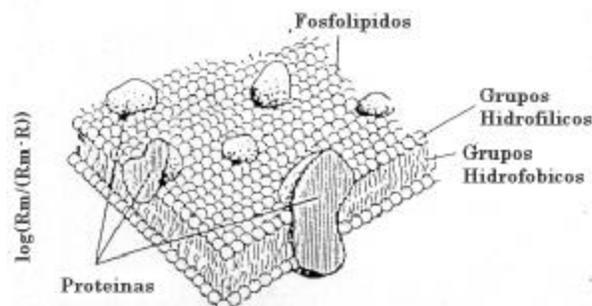


Membrana externa: 8nm de ancho, polímero que contiene proteínas y lipopolisacáridos

Peptidoglicano: Delgada capa de peptidoglicano

Espacio periplasmático : 8 nm de ancho, donde a menudo se localizan algunas enzimas

Membrana plasmática : Compuesta de fosfolípidos, pero contiene proteínas dispersas e iones metálicos, estas moléculas de lípidos, tienen dos partes una hidrofóbica y una hidrofílica. La parte hidrofóbica o cola, a menudo contiene dos grupos alquilo, y la parte hidrofílica o cabeza a menudo tiene un grupo cargado, zwitterion, o un grupo alcohol. Las colas hidrofóbicas suelen agruparse con otros grupos hidrofóbicos y las cabezas son expuestas al agua



Gram-positivas

Gram-positivas involucra sólo dos capas :

- Peptidoglucano
- Espacio periplasmático
- Membrana plasmática

En el caso de las bacterias de este tipo la capa de peptidoglucano presenta condiciones de mayor resistencia que en bacterias gram-negativas, motivo por el cual no resultan necesariamente más fáciles de romper.



Funciones de las membranas

Cada membrana tiene diferentes funciones:

La membrana externa y la capa de peptidoglucano proporcionan la resistencia mecánica y su ruptura es lo fundamental para la ruptura de células.

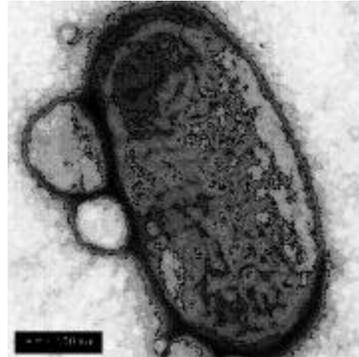
La membrana plasmática es muy débil y controla la permeabilidad de la célula, lo que incluye el transporte de nutrientes al interior de la célula y la exportación de metabolitos "en el interior de las soluciones circundantes".

El interior de la célula llamado citoplasma, es una solución acuosa de sales, azúcar, amino ácidos y biopolímeros. En los biopolímeros se incluyen proteínas, muchas de ellas enzimas, RNA y DNA.

Células Procariontes

En los procariontes ocurre que las proteínas se encuentran en solución, pero en muchos procariontes modificados se sintetiza un exceso de proteínas las cuales precipitan en el interior del citoplasma (muchas veces éstas son las proteínas que se desean recuperar).

En algunos casos sólo se quiere remover algunas de las capas para liberar alguna proteína específica.



Células Eucariontes

En el caso de las células eucariontes, que poseen un núcleo y son estructuras más complejas que las procariontes, tienen una membrana alrededor de las células similar a las que tienen las procariontes. La membrana de las eucariontes contiene organelos, como las mitocondrias que son las responsables de la respiración y los núcleos que contienen el DNA en los cromosomas. Cada estructura está rodeada de una membrana similar a la membrana celular interna de los procariontes.



Rompimiento Celular

Métodos No- Mecánicos

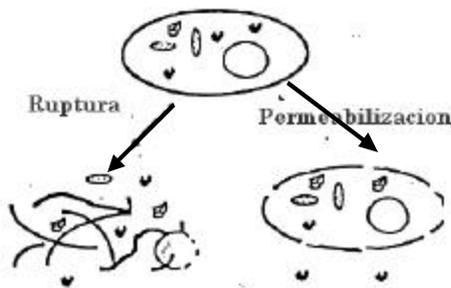
Métodos No-mecánicos				
Técnicas	Principios	Stress	Costos	Ejemplos
Permeabilización Enzimático	Permeabilización de la pared celular, lo cual produce el rompimiento de la célula	Suave	Caro	Tratamiento de <i>M. lysodeikticus</i> con lisozima.
Shock Osmótico	Ruptura Osmótica de la membrana	Suave	Barato	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	

Tratamiento enzimático

Teoría

Existen enzimas que pueden hidrolizar la membrana celular de microorganismos. Cuando la membrana ha sido suficientemente permeabilizada, algunos compuestos intracelulares pueden ser liberados al medio.

Comparación entre un proceso de rompimiento y otro de permeabilización.



Metodología

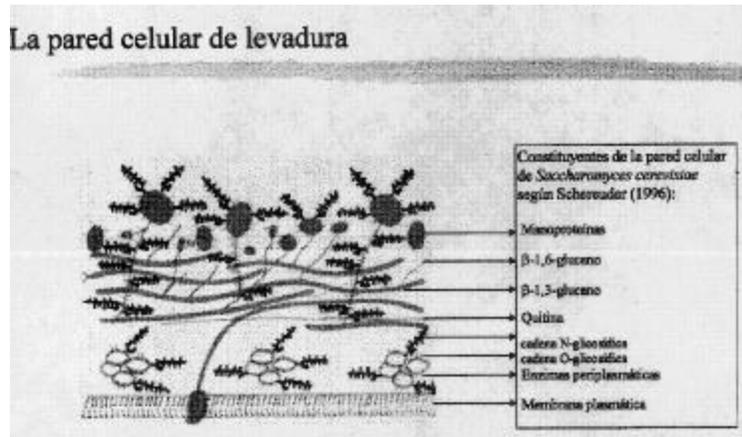
El modo de acción es muy simple basta con agregárselo a una suspensión y se produce una reacción muy rápida la cual deteriora la pared celular. La reacción es selectiva y ataca a determinadas estructuras de la pared celular como son las glucanasa, mananasa.

Ventajas: Método suave y selectivo escalable

Desventajas: Costo de la enzima lo hace difícil de utilizar a gran escala.

Microorganismo	Enzima	Efecto
Bacterias	Lisozima	Ruptura de los enlaces β -1,4 entre N-acetil murámico y N-acetil glucosamida
Levaduras	Complejo glucanasa-mananasa	Rompe la capa de glucano y de manano
Células de plantas	Celulosas y peptinasas	Rompen capa de celulosa y peptino

La pared celular de levadura



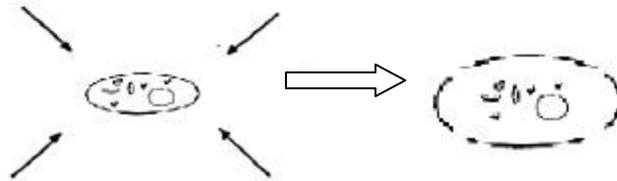
Shock Osmótico

Teoría

Resulta ser uno de los métodos más simple:

1. Las células se colocan en una volumen de agua 2 veces mayor que el volumen de células.
2. Bajo estas condiciones las células se hinchan, debido a un simple flujo osmótico que se produce debido a que las células contienen solutos (los causantes del flujo osmótico de agua al interior de la célula).
3. Las células se hinchan y algunas llegan a reventarse.

La susceptibilidad de las células es relativa y depende fuertemente de su tipo.



Ejemplos

1. Los glóbulos rojos son fáciles de lisar.
2. Las células vegetales son muchos más difíciles, dado que sus paredes contienen compuestos que son impermeables al flujo osmótico.

Se puede calcular la presión necesaria para romper células a partir de la ley van't Hoof. La cual se deduce desde la condición de equilibrio :

$$DP = - R \cdot T \cdot c_1$$

Donde

c_1 : Concentración de solutos en el interior de la célula.

En el caso de una célula que contiene una concentración de solutos del orden de 0.2 M, calculando la diferencia de presión alcanzara valores del orden de -5 atm (dentro mayor presión que afuera).

Solubilización

Teoría

Es uno de los métodos no-mecánicos más utilizados para el rompimiento de células.

Los detergentes tienen una zona hidrofílica y otra hidrofóbica, por esta razón pueden interactuar tanto con el agua como con los lípidos.

Su habilidad se basa en la solubilización de los lípidos de la pared celular.

Los detergentes más utilizados son de tres tipos:

- Detergente aniónico
- Detergente catiónico
- Detergente no-iónico y polidispersante

Detergentes aniónicos

Ejemplos

- Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11} \text{SO}_3^- \text{Na}^+$
- Sulfonato de Sodio $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9 \text{-Phenyl-SO}_3^- \text{Na}^+$
- Tauroclorato de Sodio

El SDS es uno de los detergentes aniónicos más ampliamente estudiados.

Entre los materiales aniónicos se encuentran los jabones (sales de ácidos grasos), estos jabones dependen del grupo de ácido carboxílico que tengan y resultan efectivos a altos pH donde el grupo se encuentra ionizado. A su vez resultan ineficientes en aguas duras que contengan iones calcio que pueden reaccionar con ellos y formar compuestos insolubles.

Las desventajas de los detergentes tradicionales se puede superar si se reemplazan los grupos **carboxilos** por grupos **sulfatos**.

Los sulfatos que contienen grupos fenilos son más efectivos que los compuestos que contienen grupos alquilos, debido principalmente que no son fáciles de degradar microbianamente, como son los detergente utilizados para lavado.

Detergentes cationicos

Ejemplos

- Bromuro de Catiltrimetil Amonio (CTAB) $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15} \text{N}^+ (\text{CH}_3)_3 \text{Br}$

Son detergentes más suaves (tipo shampoo), por lo cual se produce un rompimiento más suave de las células.

Detergente no-iónicos

Ejemplos

- Triton X-100 $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{-Phenyl-(OCH}_2\text{CH}_2)_{9,5}\text{OH}$

Son generalmente polímeros solubles en agua, se utilizan en los detergente para lavar vajilla.

Estos detergente también tienen una parte hidrofóbica y una hidrofílica, pero la parte hidrofílica no es ni un sulfato ni un tetraalquilamonio sino un alcohol. .

A bajas concentraciones de detergente no se produce degradación de los lípidos, pero a alta concentración se produce una degradación que resulta lineal a la concentración de detergente, junto a esta variable también se altera la tensión superficial de la solución.

La relación que se produce entre la solubilización y otros fenómenos es que el detergente forma micelas, en cuyo interior se encapsulan los lípidos digeridos (Cabezas hidrofílicas y colas hidrofóbicas que están en contacto con la sopa de lípidos).

Procedimiento

1. Se coloca un determinado volumen de detergente concentrado por un volumen de células. Generalmente la mitad de volumen de detergente que de volumen de células.
2. El detergente rompe la membrana celular.
3. La suspensión resultante se centrifuga para remover los fragmentos de células y luego se pasa a través de una columna de adsorción o por etapas de extracción para aislar el producto.

Tratamiento con solvente (disolución de lípidos)

Es una técnica la cual no ha sido muy documentada, sólo se requiere de información experimental.

Una buena forma de seleccionar el solvente es analizar la volatilidad (desde manuales), este parámetro puede relacionarse con las interacciones lípido solvente, poniendo atención en el calor de mezcla.

Solventes con similar solubilidad atacarán los lípidos de forma similar.

Procedimiento

1. El método consiste en adicionar la suspensión de biomasa un volumen de tolueno del orden de un 10% de biomasa.
2. El tolueno es absorbido por las células, las cuales se hinchan y luego explotan.
3. El contenido de las células se libera al medio y luego puede ser separado.

Existen otros solventes que puede ser utilizados como :

- Benceno (que es cancerígeno y de una alta volatilidad, el tolueno también es cancerígeno pero de más baja volatilidad).
- Cumeno
- Clorobenceno
- Xileno
- Octanol (Altos alcoholes)

Tratamiento alcalino

Es un tratamiento bastante fuerte, no selectivo y barato.

Algún álcalis es agregado a un suspensión de células, el álcalis reacciona con la pared celular en diversas formas, produciendo la saponificación de lípidos.

Desventajas : Una alta concentración de álcalis puede hasta producir la denaturalización de las proteínas (destruyendo el producto).

Resulta la opción menos utilizada.