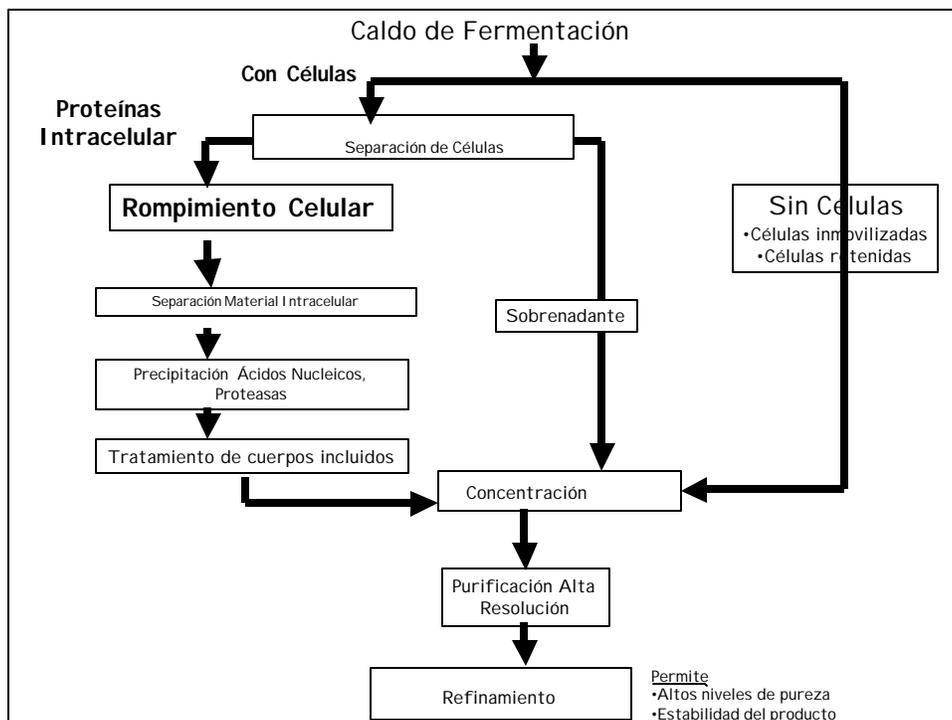


# Rompimiento Celular

## Separación y Procesos Biotecnológicos



## Membrana celular

### Estructura de la membrana celular

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

#### - Gram-negativas

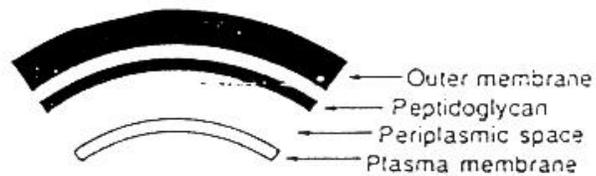
Como modelo se utilizará una bacteria Gram-negativa, no tiene núcleo y todo su material genético se encuentra en una simple cadena de DNA, un ejemplo es la *E.coli*, ampliamente utilizada como huésped en la mayoría de proteínas recombinantes.

#### - Gram-positivas

Entre ellas las bacterias del tipo Bacillus

## Gram-negativas

La estructura de una Gram-negativa involucra tres capas :



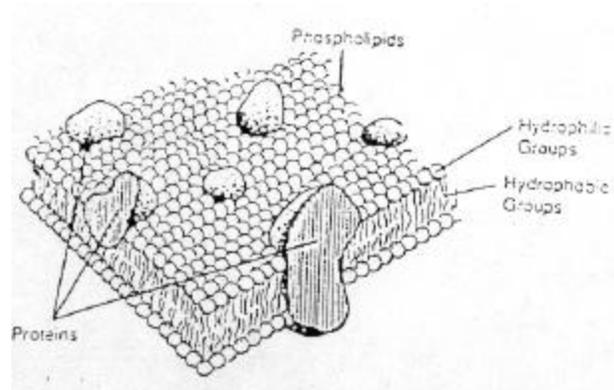
Gram-negative Cell Envelope

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

**Peptidoglucano:** Delgada capa de peptidoglucano

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

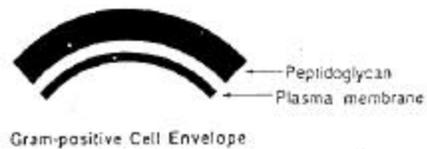
**Membrana plasmática** : Compuesta de fosfolípidos, pero contiene proteínas dispersas e iones metálicos, estas moléculas de lípidos, tienen dos partes una parte hidrofóbica y una hidrofílica. La parte hidrofóbica o cola, a menudo contiene dos grupos alquilo, y la parte hidrofílica o cabeza a menudo tiene un grupo cargado, zwitterion, o un grupo alcohol. La cola hidrofóbica 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.

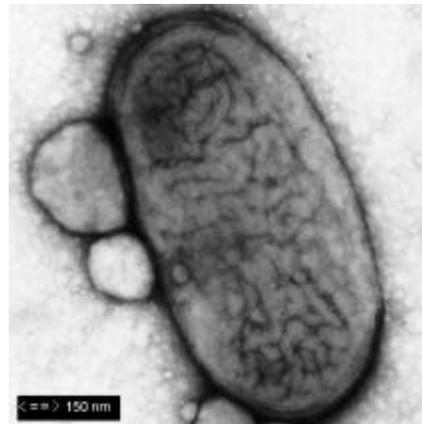
La membrana plasmática es muy débil y controla la permeabilidad de la célula, lo que incluye el transporte de nutrientes al interior de la célula y la exportación de metabolitos "en el interior de las soluciones circundantes".

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

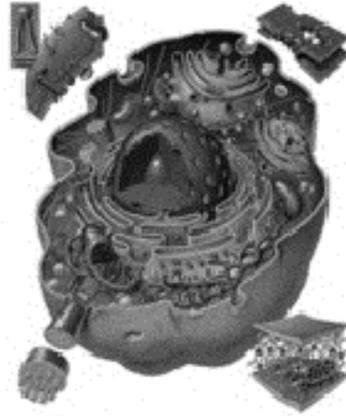
En los procariontes ocurre que las proteínas se encuentran en solución, pero en muchos procariontes modificados se sintetiza un exceso de proteínas las cuales precipitan en el interior del citoplasma (muchas veces éstas son las proteínas que se desean recuperar).

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 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

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.
<b>Homogenizador alta presión</b>	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	<b>Tratamiento a gran escala de suspensión de células.</b>
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	
<b>Molinos de bolas</b>	Las células son trituradas con bolas de acero o vidrio	Fuerte	Barato	<b>Rompimiento a gran escala para suspensiones de células y células de plantas</b>

### 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.

<b><u>Métodos No-mecánicos</u></b>				
<b>Técnicas</b>	<b>Principios</b>	<b>Stress</b>	<b>Costos</b>	<b>Ejemplos</b>
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
- Molina 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.

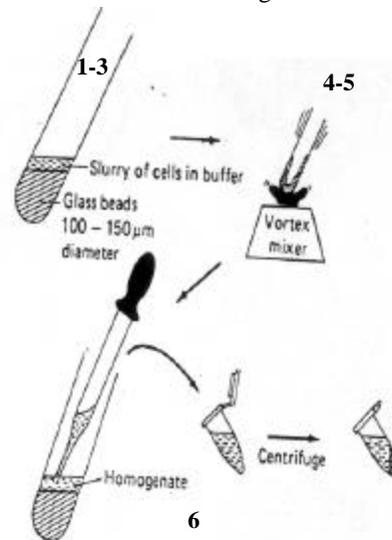
## MÉTODOS MECÁNICOS

### 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.

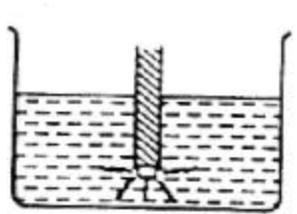


**100% Rompimiento**

### 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.

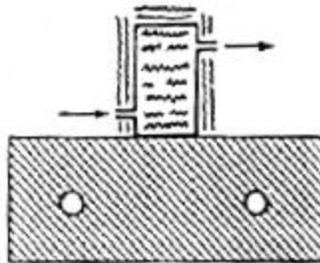


Ultrasonificador

### Molina con abrasivos

Procedimiento:

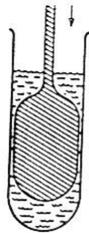
1. Se utilizan un recipiente donde se agrega algún agente abrasivo, como bolas de vidrio.
2. El sistema se hace vibrar lo que produce:
  - Colisiones de las bolas con la biomasa
  - Fuertes esfuerzos de cortes
  - Se produce la ruptura de las células.
3. Posteriormente, se separan las bolitas y desechos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



## Homogenizadores

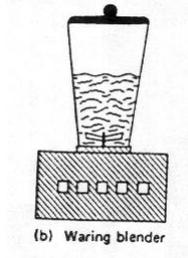
La idea es generar altos esfuerzos de corte que produzcan la ruptura de las células. Los altos esfuerzos de corte se pueden obtener por:

1. Émbolos
2. Cuchillas
3. Pistones



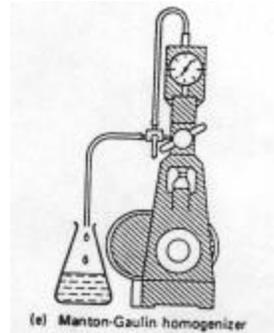
(a) Hand-operated or motor-driven

Émbolos



(b) Waring blender

Cuchillas



(c) Manton-Gaulin homogenizer

Pistones

## MÉTODOS MECÁNICOS

Gran Escala

### Homogenizadores a alta presión

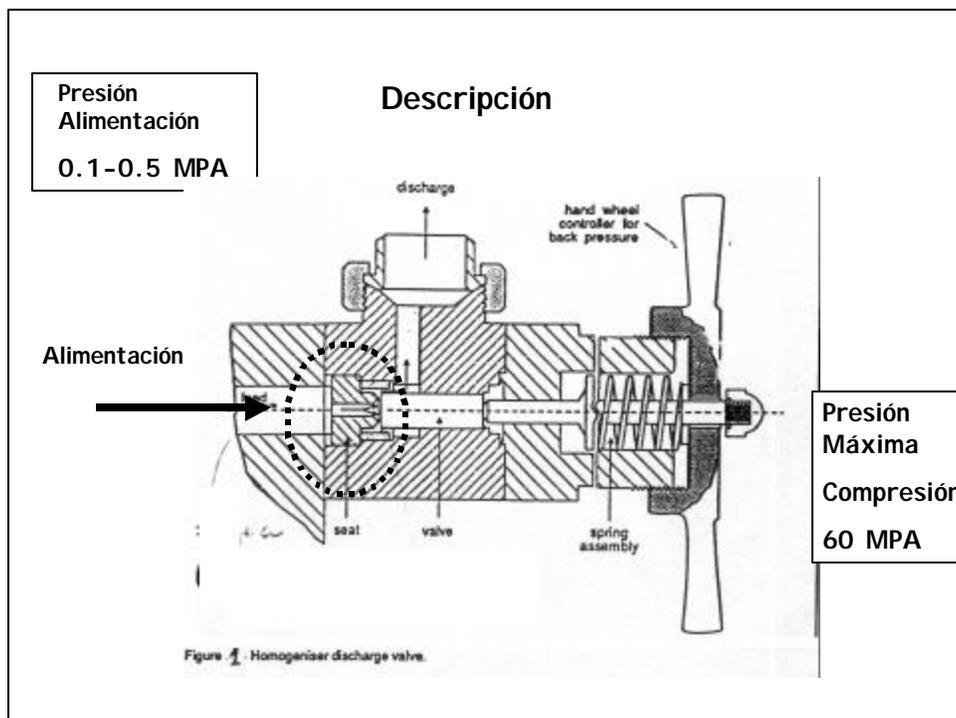
Son los equipos más ampliamente usado en el rompimiento celular.

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.



### Mecanismo

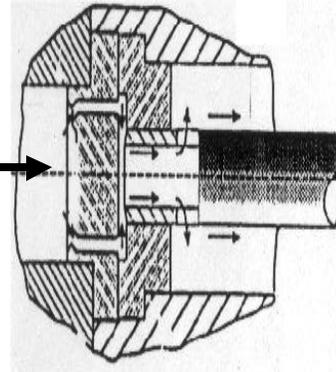
Las células se rompen cuando la suspensión pasa a alta presión por la válvula de descarga. Las células son sometidas a :

- Turbulencia
- Cavitación
- Fuertes esfuerzos de corte

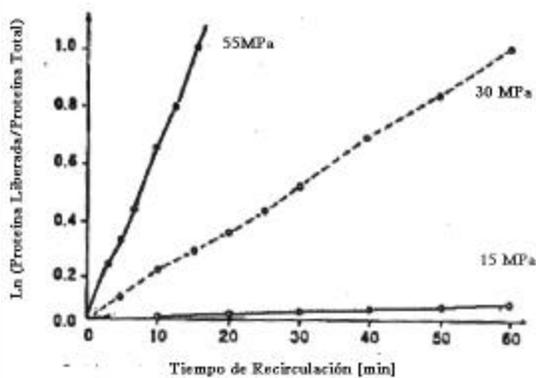
### Parámetros de Diseño

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

Alimentación



### 1. - Presión de operación



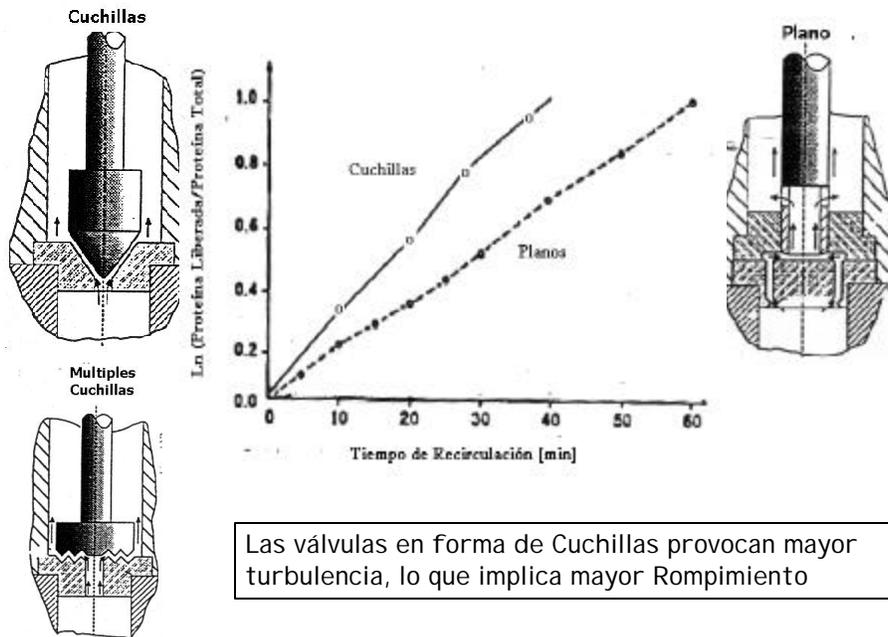
Condiciones:

-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.

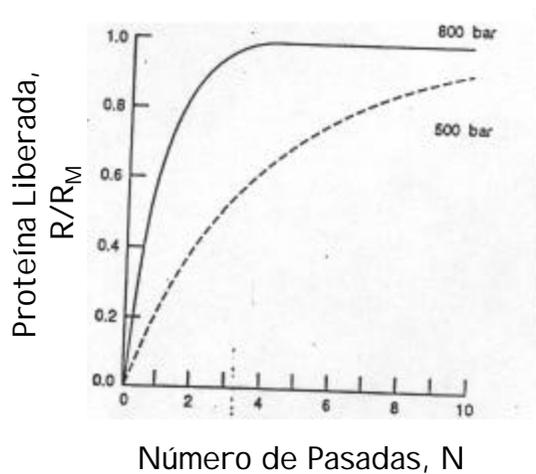
## 4.- Temperatura

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

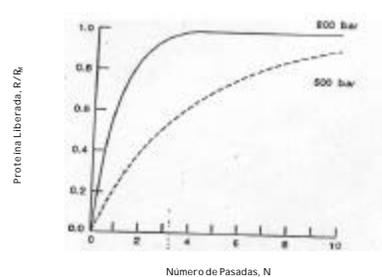


A medida que aumenta el número de pasadas aumenta la proteína liberada.

### 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<sub>M</sub>: Producto máximo que se podría liberar.
  - N: Número de pasos
  - k: Constante cinética f(T,P, tipo de válvula)
- Generalmente

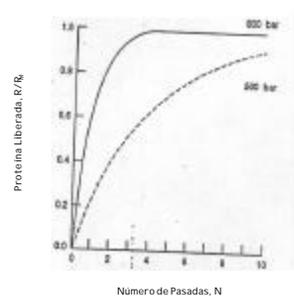
$$k = k^* P^a$$

a= 2.9 Levaduras

a= 2.2 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  $\beta$ -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/cm<sup>2</sup>. 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/cm<sup>2</sup>)? .

### Calentamiento

Como se señaló 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

Cp: calor específico

DT: Aumento de temperatura

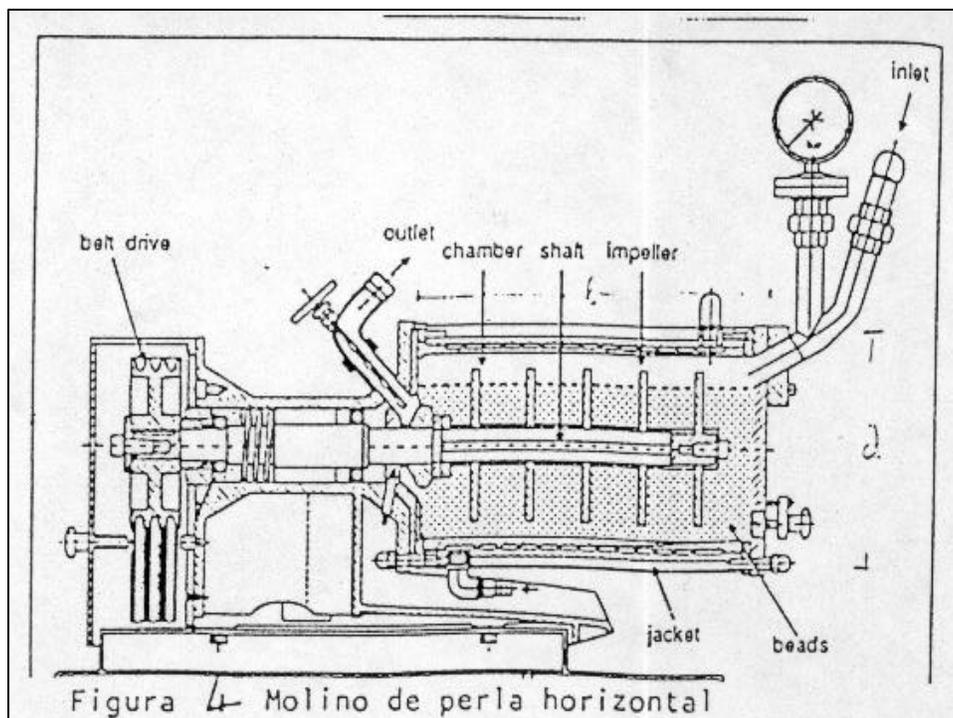
### Ejemplo 3

Determine el aumento de temperatura si la presión en el homogenizado es de 700 bar, la densidad 1100 kg/m<sup>3</sup> y el calor específico 4000 J/kg K

## 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

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

La velocidad promedio se define como:

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

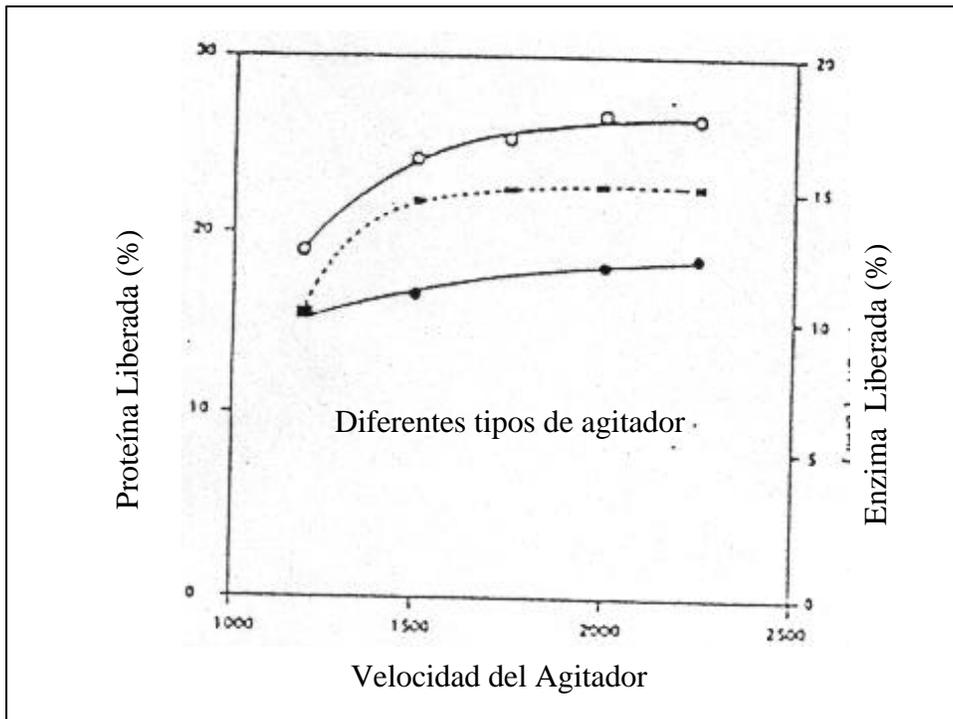
Donde

$D_m$ : 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



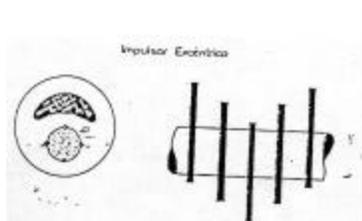
## 2.- Diseño del agitador

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.

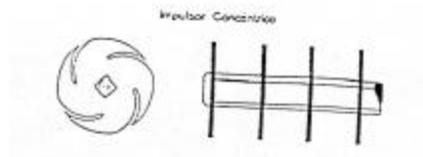
Ejemplo

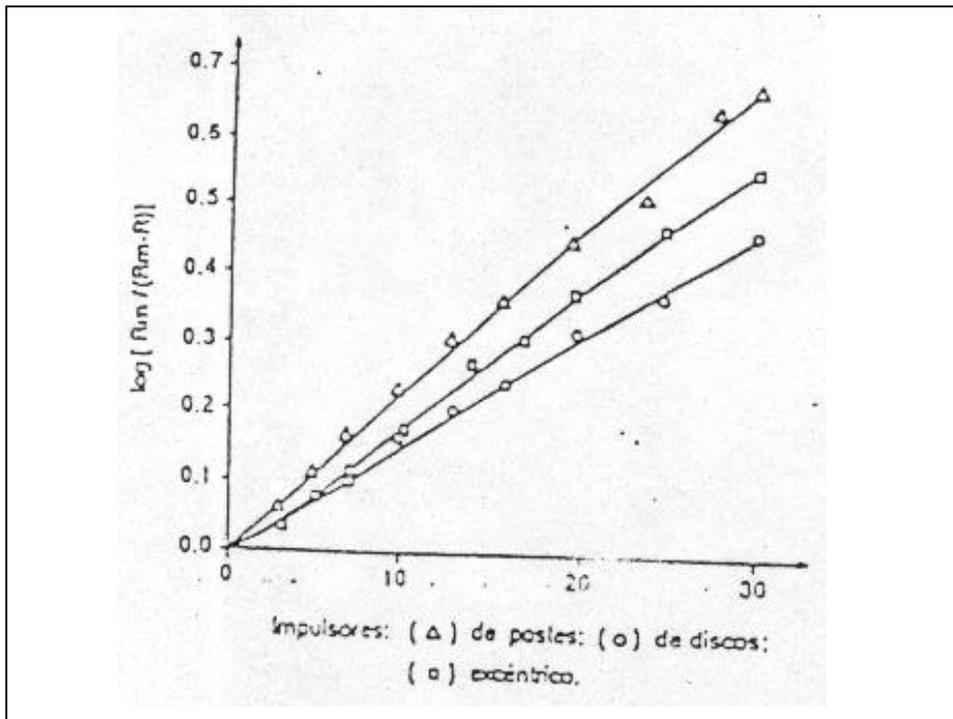
Anillos Excéntricos

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



Anillos Concéntricos





### 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  $\Phi$ : 0.2-1.5 mm

Industrial  $\Phi$ : 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

Protoplásmatico (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%.

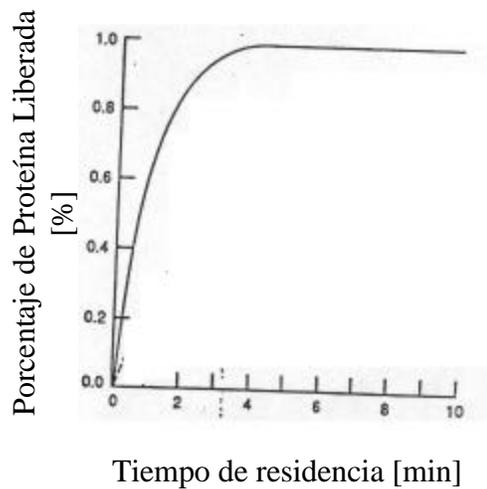
### 7.- Efecto de la temperatura

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

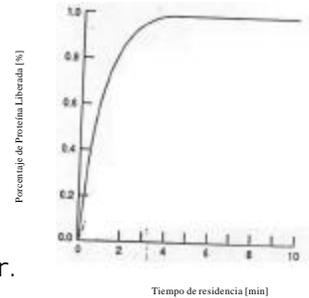
R: Producto liberado.

$R_M$ : 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  $t=0$   $A=0$

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

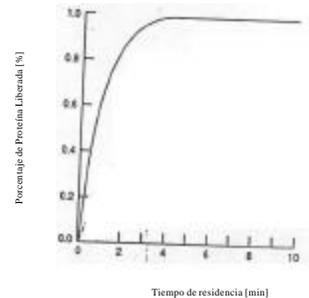
A: Actividad de la enzima liberada

$A_M$ : 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:

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

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:

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

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:

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

Donde T: Diametro 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  $\rho$ : 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**

# Rompimiento Celular

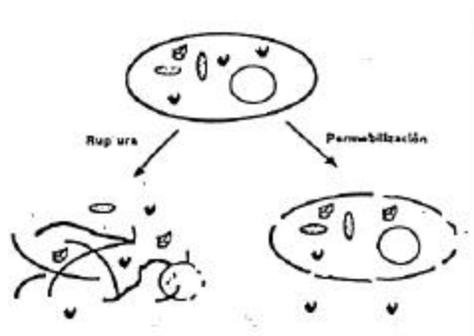
## Métodos No- Mecánicos

<b>Métodos No-mecánicos</b>				
<b>Técnicas</b>	<b>Principios</b>	<b>Stress</b>	<b>Costos</b>	<b>Ejemplos</b>
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. Una comparación entre un proceso de rompimiento y otro de permeabilización.



### Metodología

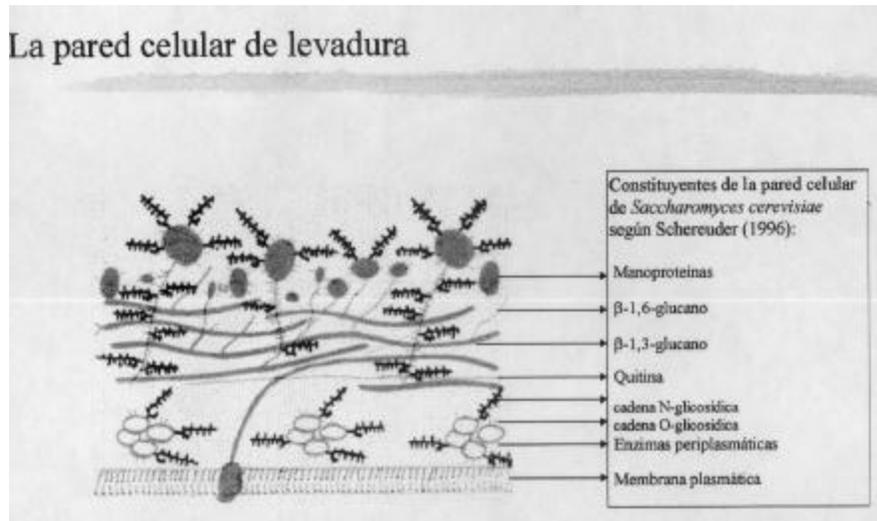
El modo de acción es muy simple basta con agregárselo a una suspensión y se produce una reacción muy rápida la cual deteriora la pared celular. La reacción es selectiva y ataca a determinadas estructuras de la pared celular como son las glucanasa, mananasas.

**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 $\beta$ -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



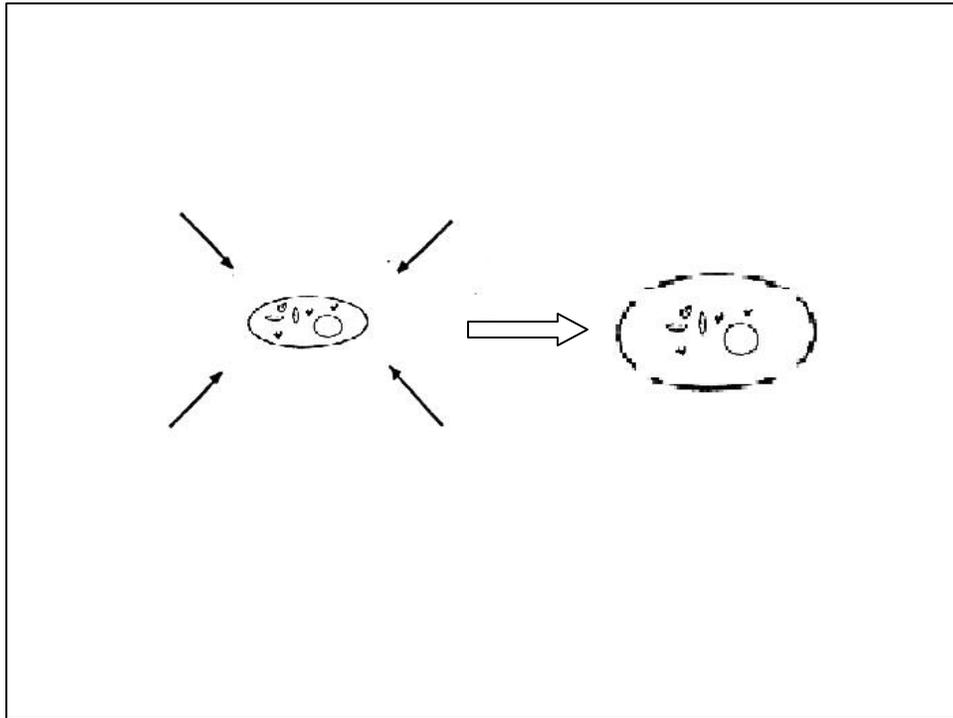
### Shock Osmótico

#### 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.



Los glóbulos rojos son fáciles de lisis.

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 detergentes 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 cancerigeno y de una alta volatilidad, el tolueno también es cancerigeno 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.**