



CARRERA DE ESPECIALIZACIÓN EN
BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL

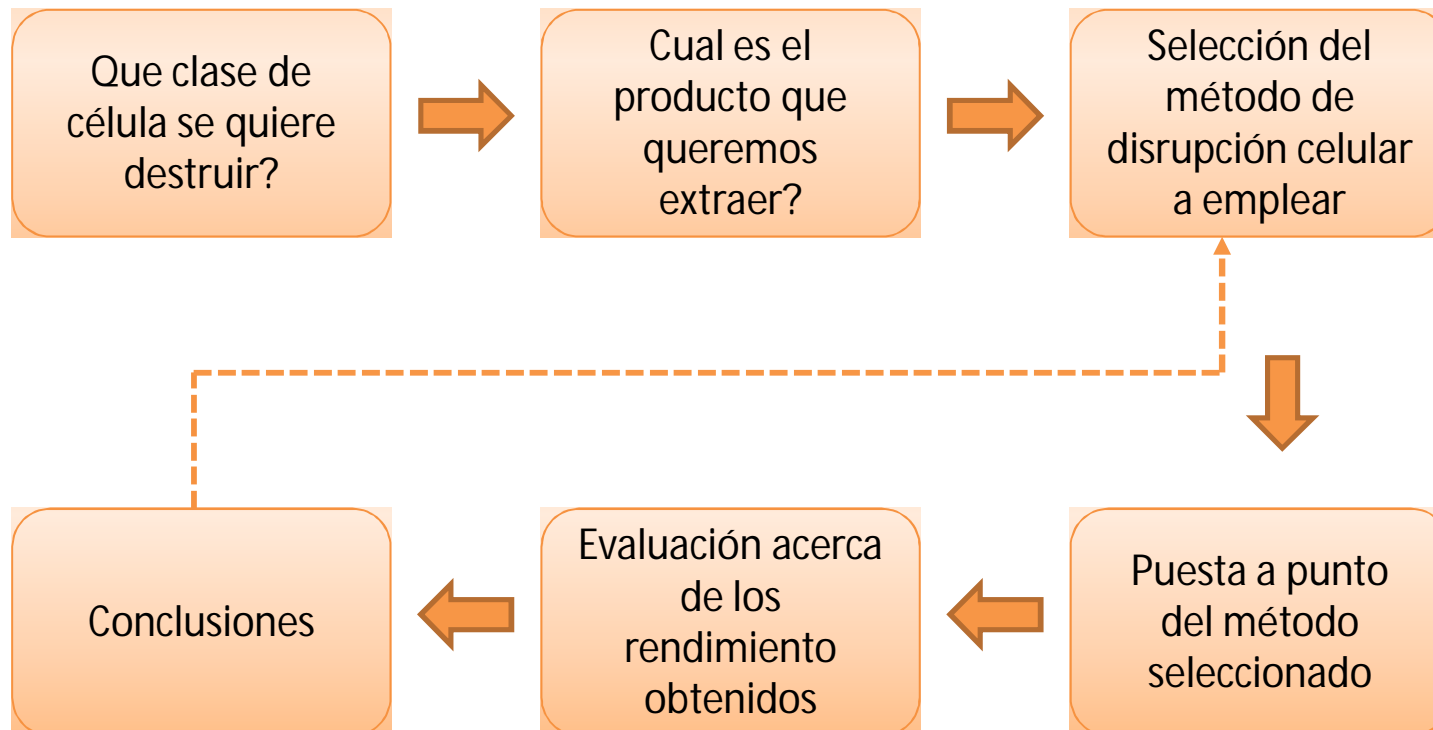
RUPTURA CELULAR



RUPTURA CELULAR

UNIDAD 2

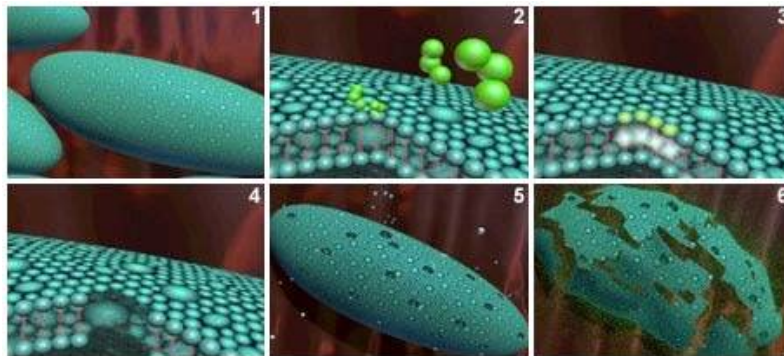
PROCESO GENERAL



MÉTODOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS

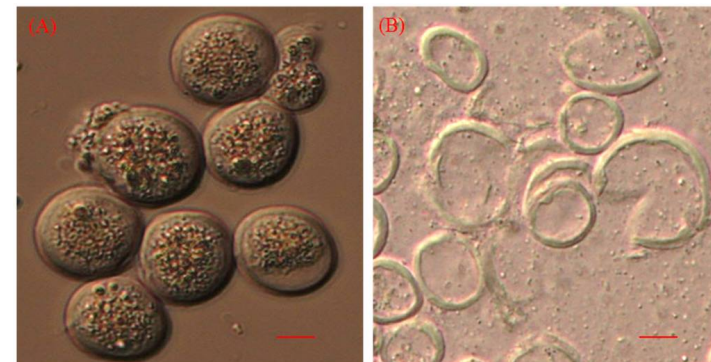
Químicos

- ✓ Alcalis
- ✓ Solventes
- ✓ Detergentes
- ✓ Ácidos
- ✓ Sustancias caotrópicas



Biológicos

- ✓ Enzimas
- ✓ Fagos
- ✓ Virus



MÉTODOS FÍSICOS

No Mecánicos

- ✓ Shock osmótico
- ✓ Congelamiento y descongelamiento
- ✓ Expansión de gas
- ✓ Secado

Mecánicos

- ✓ Sonicado
- ✓ Extrusión
- ✓ Choque
- ✓ Agitación con abrasivos
- ✓ Homogenización de alta presión



Testigo

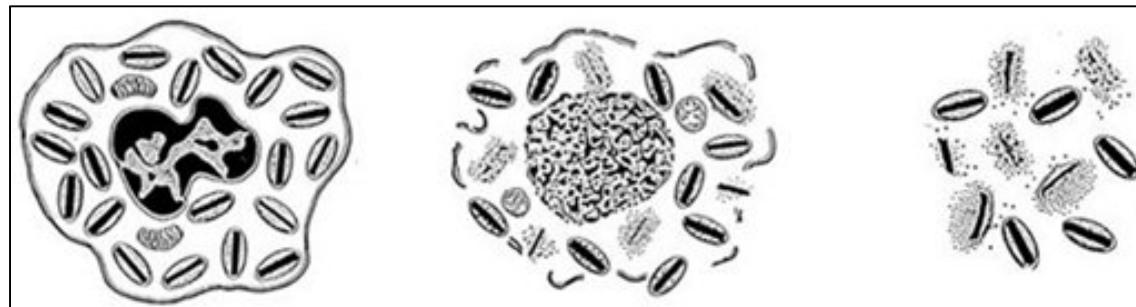
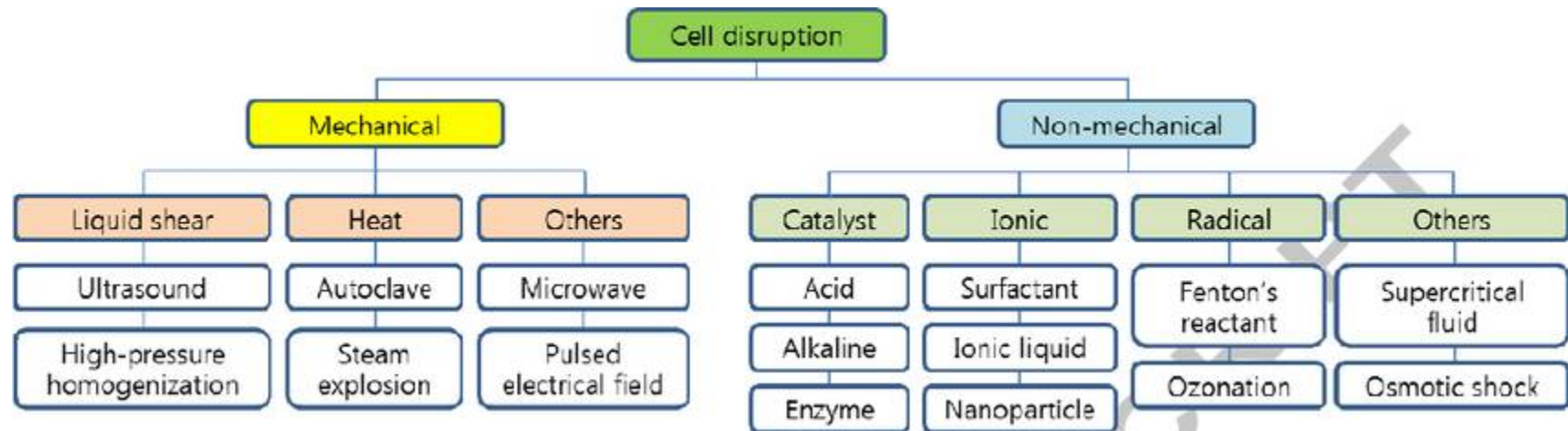


Homogenizada



Sonicada

Clasificación de métodos de ruptura celular....



Factores que influyen en el método de ruptura

Dependientes del microorganismo

- ✓ Medio de cultivo: *Complejos y resistentes a la ruptura.*
- ✓ Tipo de microorganismo: *Ej: Gram +*
- ✓ Estado fisiológico.
- ✓ Tamaño
- ✓ Forma
- ✓ Velocidad de crecimiento: *Ej: En estado estacionario son más resistentes*

Dependientes del producto

- ✓ Sensibilidad al calor
- ✓ Sensibilidad al shear: Fuerza de corte
- ✓ Localización

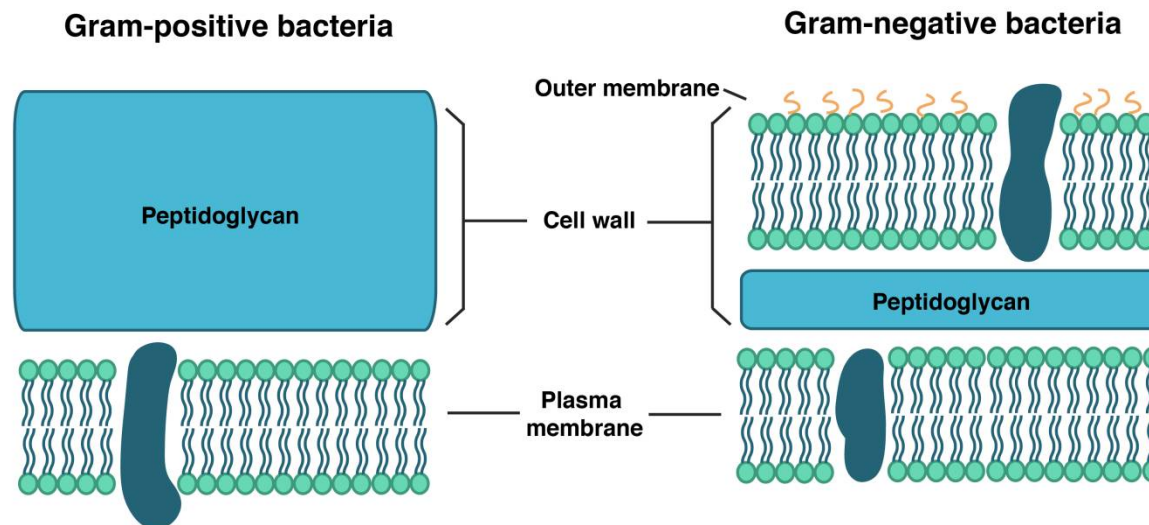
Composición de la pared celular

BACTERIAS GRAM POSITIVAS:

- Peptidoglicanos.

BACTERIAS GRAM NEGATIVAS:

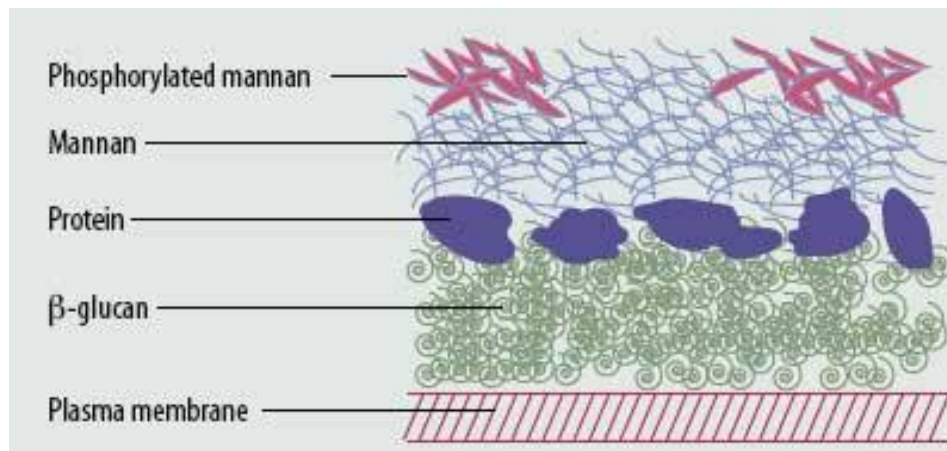
- Capa Externa: fosfolípidos, lipoproteínas, proteínas → Detergentes, EDTA
- Capa Interna: Peptidoglicano → Lisoenzimas



Composición de la pared celular

LEVADURAS:

- Capa Externa: Proteína manano → Proteasas, manonasas.
- Capa Interna: Glucano → glucanasa.

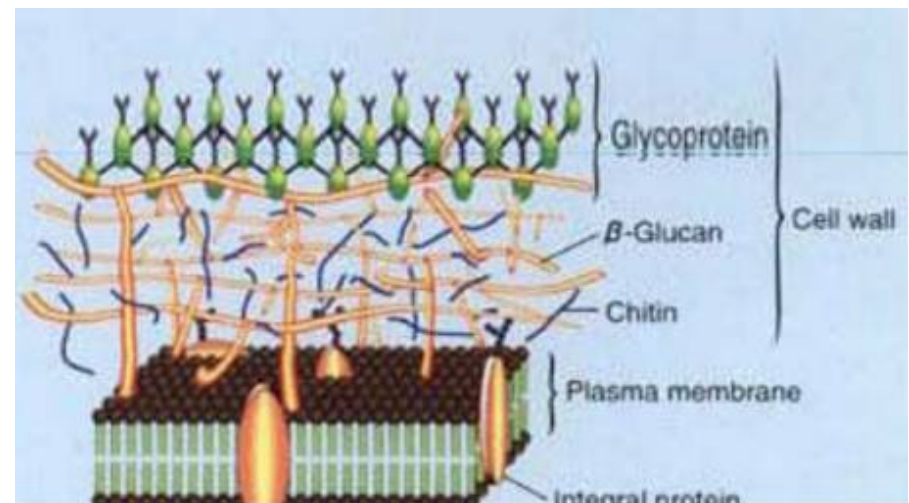


- Estructura muy gruesa (100-200nm)
- Representa del 15-25% del peso celular en masa seca
- Compuesto por dos capas de polisacáridos, una capa interna transparente y una amorfa, constituida principalmente de β -1,3 y β 1,6- glucanos.

HONGOS

- Capa Externa: glicoproteínas y β glucanos.
- Capa Interna: Chitin / microfibrinas

Proteasas : Degradan las proteínas de interés, pero son específicas de cada microorganismo.



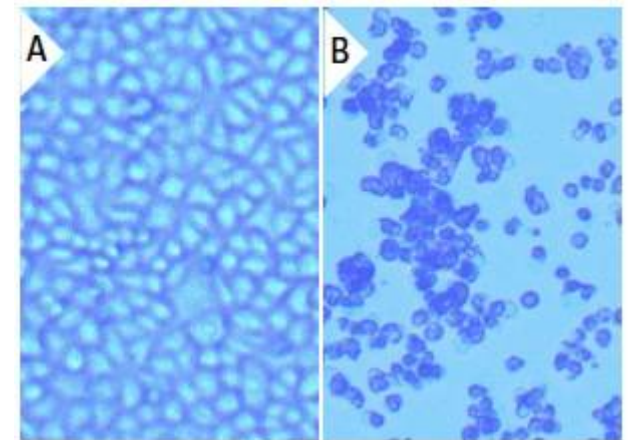
Problemas de la ruptura celular excesiva

✓ DISMINUCIÓN DEL TAMAÑO DE LOS DESECHOS CELULARES:

- Dificultad en la separación.

✓ LIBERACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS:

- Aumento en la viscosidad del homogenato.
- Dificultad en la separación de los desechos celulares.
- “Envenenamiento” de matrices cromatográficas.
- Agregación de proteínas: Pueden pptar.



Eliminación de ácidos nucleídos



✓ Degradación:

Nucleasas (Benzonase)

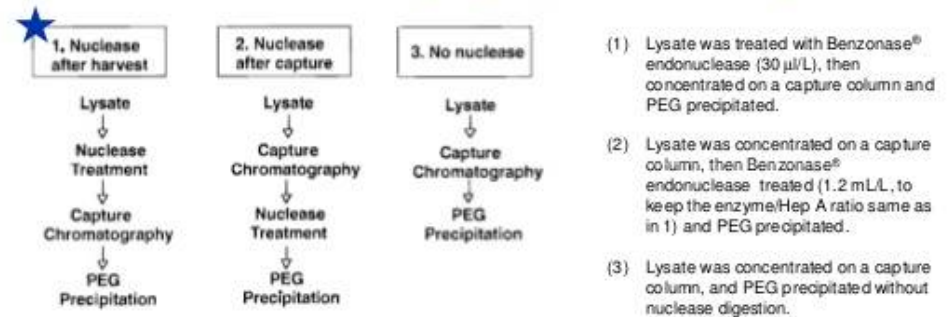
✓ Precipitación:

Polímeros de carga positiva (PEI)



Igualación de carga → Ppta.

Effect of position of nuclease treatment on DNA concentrations (HepA, Merck & Co.)

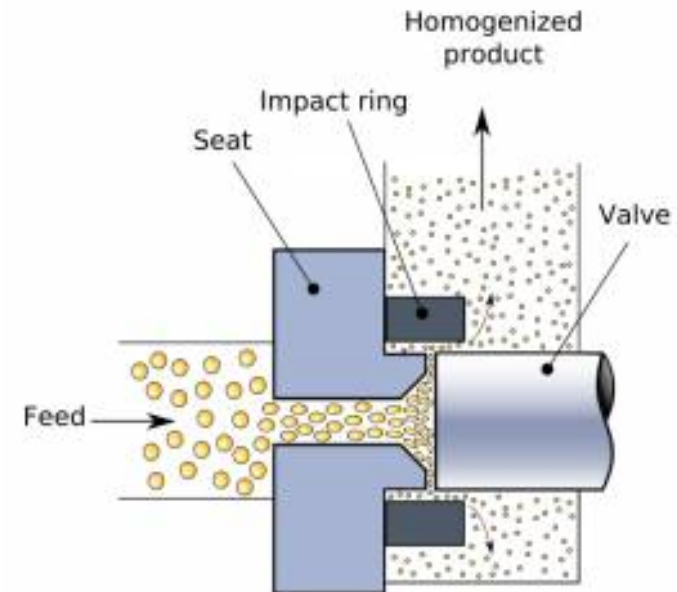


	HAV % recovery	HAV/protein ratio	HAV/DNA ratio
(1) nuclease-lysate	57	5.0	>42 500
(2) nuclease-capture	36	1.8	>42 500
(3) no nuclease	30	1.7	1 000

SOURCE: Hagen et al., Biotechnol. Prog. 1996, 12, 406-406



HOMOGENIZADOR DE ALTA PRESIÓN



Los *homogenizadores de alta presión* han sido utilizados como herramientas de ruptura de células microbianas durante muchos años.

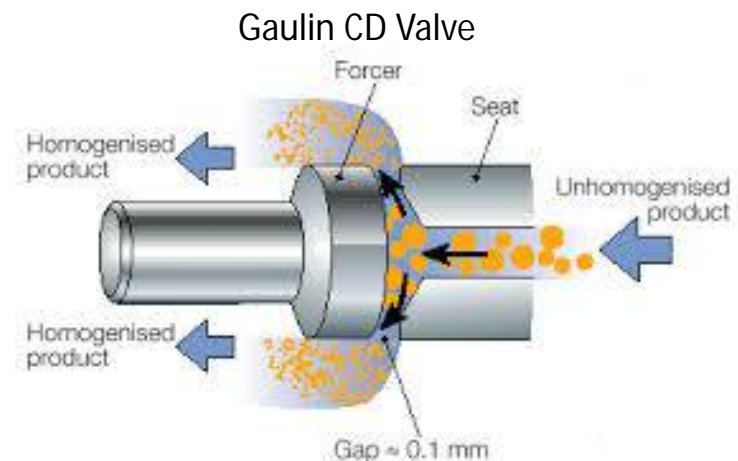
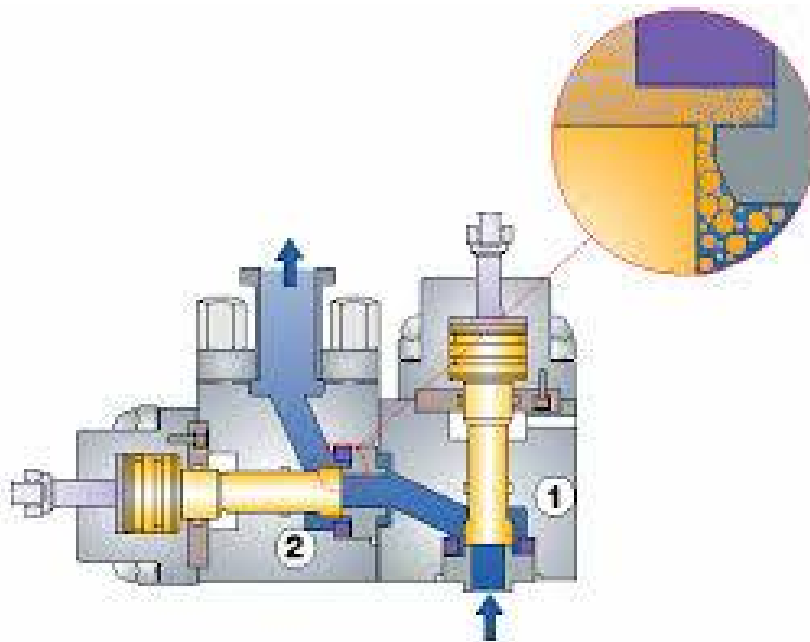
Con la excepción de microorganismos filamentosos, el método ha sido generalmente usado con éxito en muchas variedades de bacterias, levaduras y micelas

Homogenizador de Alta Presión...

Este tipo de homogenizador trabaja forzando las células en suspensión a través de un canal estrecho o un orificio bajo presión.

Se aplica una elevada presión a una suspensión de células forzándolas a través de una válvula, sometiéndolas a un alto estrés de corte (shear), rompiendo las membranas.

La disrupción ocurre por la combinación de *fuerzas de corte en la región de la válvula*, *cavitación (debido a las regiones de baja presión generadas)* y *al impacto con el anillo*.



Homogenizador de Alta Presión...

Los parámetros de operación con un efecto en la eficiencia de los homogenizadores de alta presión son :

- Presión
- Temperatura
- Numero de pasajes
- Válvula e anillo de impacto
- Flujo

$$\ln \left(\frac{R_m}{R_m - R} \right) = k \cdot N \cdot P^a$$

R_m = Cantidad máxima de producto librado.

R = Cantidad de producto liberado luego de N pasos.

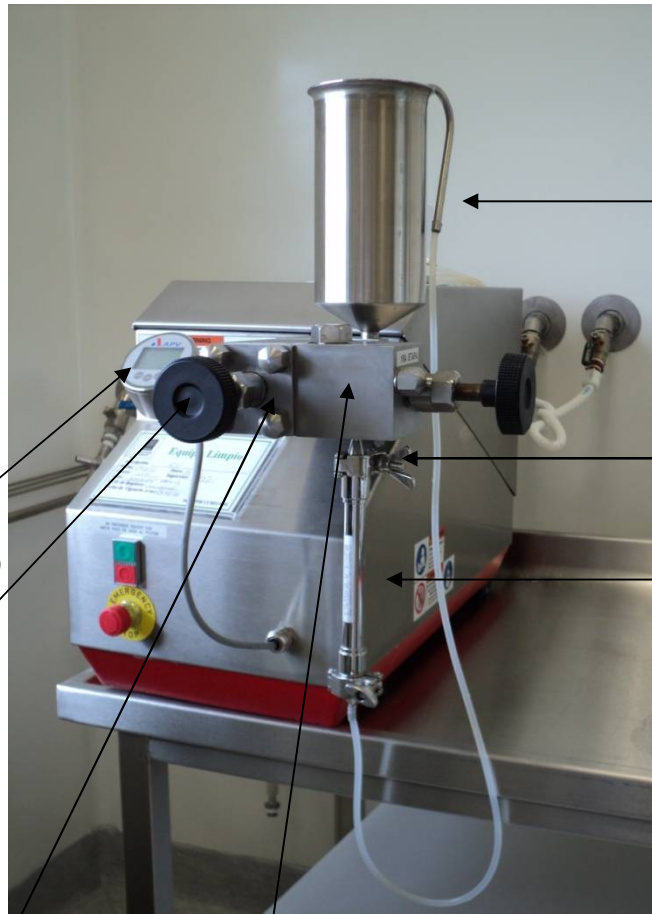
K = Cte. de ruptura celular (Depende del T y tipo de $m\emptyset$)

N = No. de pasajes.

P = Presión a la que es sometida la suspensión celular.

a = Depende del estado metabólico del $m\emptyset$ y del $m\emptyset$.

Homogenizador de Alta Presión...



- ← Tolva alimentación
- ← Descarga
- ← Intercamb. de calor
- ← Manómetro
- ← Conjunto actuador de la válvula
- ← Válvula homogenizante. Aro de choque del asiento de la válvula
- ← Conjunto de válvulas homogenizantes

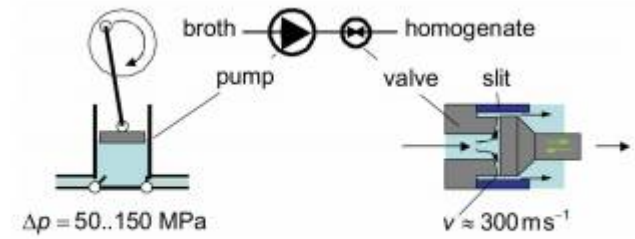


Figure 2-7 A homogenizer

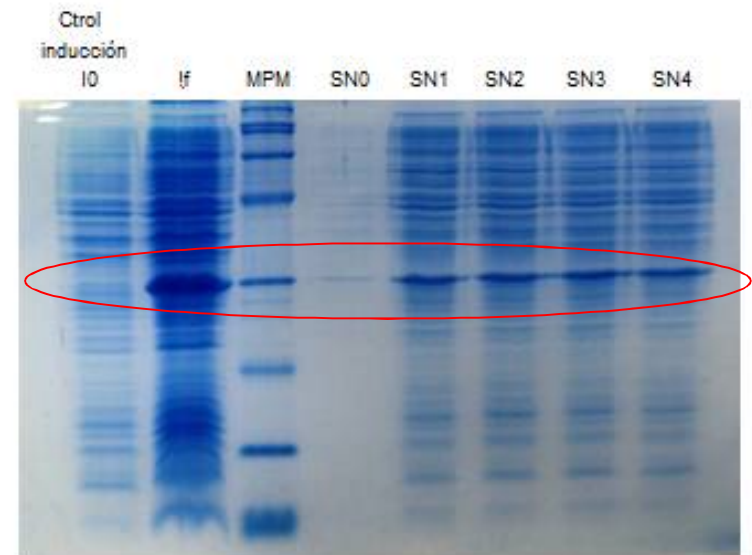
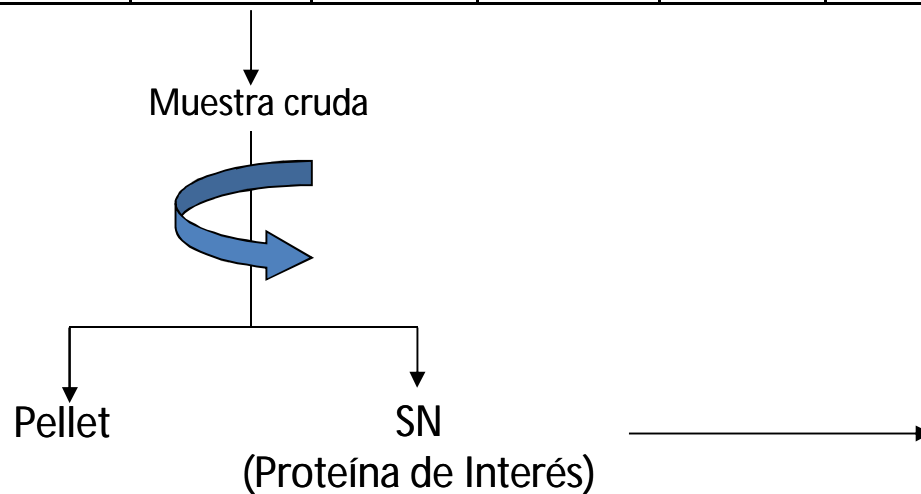
Presión máxima de funcionamiento	2000 bar 29000 psi 200 MPa
Capacidad nominal	11 L/h
Tamaño mínimo de la muestra	100ml
Volumen retención aproximado	13ml
Pistón tubular	Cerámica- 10mm 70rpm
Asientos de válvulas de bombas	Carburo de tungsteno

Homogenizador de Alta Presión...

Resultados:

$P_{\text{Ruptura}} = 800 \text{ bar}$

No. De Pasos (N)	Muestra	t (min)	Flujo (ml/min)	Temperatura Entrada	Temperatura Salida	DO ₆₀₀	Concentración de proteína (mg/ml)
0	CRX0	-	-	-		11,98	0,859
1	CRX1	10	200	10	16	2,26	2,836
2	CRX2	11	205	14	17	1,13	3,086
3	CRX3	11	215	14	20	0,858	3,174
4	CRX4	11	220	15	20	0,808	3,215



Influencia de la presión sobre el porcentaje de ruptura...

Efecto de la presión de operación sobre la eficiencia de la disrupción durante un proceso en homogenizador de alta presión.

Microorganism	Enzyme	Percentage Disrupted	
		55 MPa	130 MPa
<i>E. Coli</i>	Fumarase	79	97
<i>B. Cereus</i>	L-Leucine DH	62	91
<i>L. Confusus</i>	L-2-hidroxisocaprost DH	52	94
<i>S. Cerevisiae</i>	D-glucose-6- phosphate DH	39	89
<i>C. Boidinii</i>	Formate DH	32	77

Homogenizador de Alta Presión...

Los parámetros de operación con un efecto en la eficiencia de los homogenizadores de alta presión son :

- Presión
- Temperatura
- Numero de pasajes
- Válvula e anillo de impacto
- Flujo

$$\ln \left(\frac{R_m}{R_m - R} \right) = k \cdot N \cdot P^a$$

R_m = Cantidad máxima de producto librado.

R = Cantidad de producto liberado en N número de pasajes.

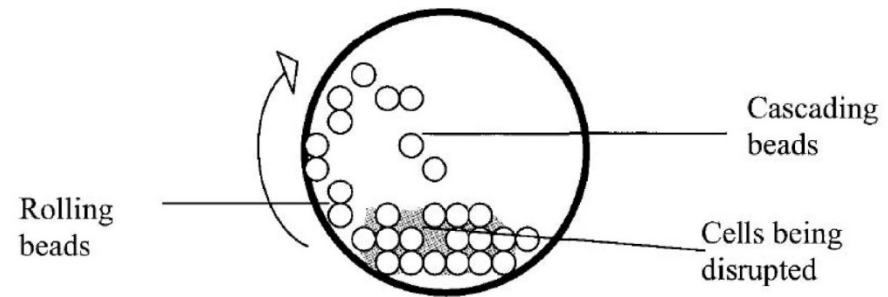
k = Cte. de ruptura celular (Depende del T y tipo de $m\emptyset$).

N = No. de pasajes.

P = Presión a la que es sometida la suspensión celular.

a = Depende del estado metabólico del $m\emptyset$ y del $m\emptyset$.

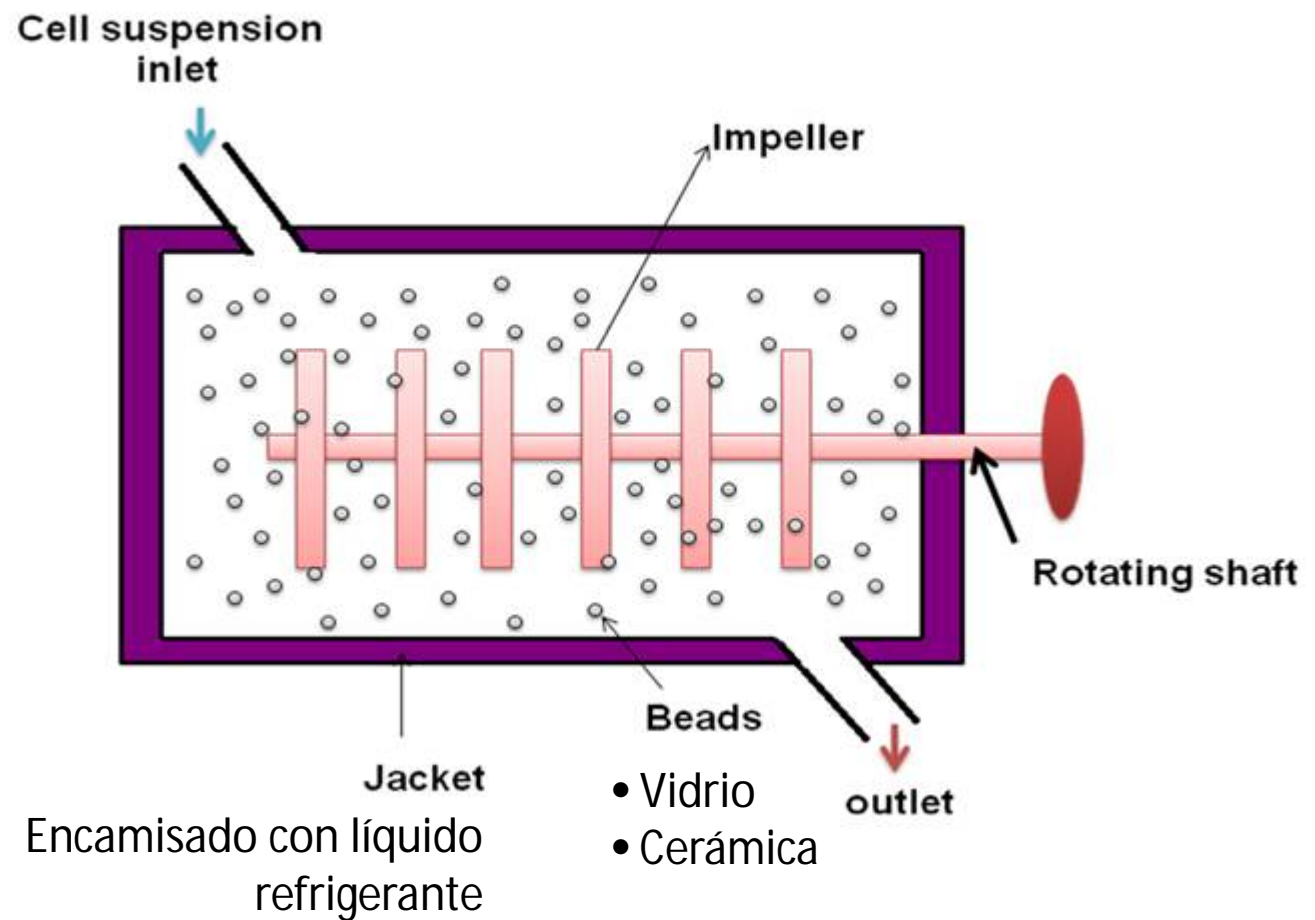
MOLINO DE BOLILLAS



Consiste en un agitador a discos montado sobre un motor central que gira en una cámara central, la cual esta cargada con esferas de vidrio, metal, cerámica u otro material.

Molino de Bolillas (Bead Mill)...

1. Pintura
2. Farmacéutica: hormonas, microcristales
3. Biotech



Molino de Bolillas (Bead Mill)...



Características:

- Un solo pasaje a través del equipo.
- Presión ambiente.

Consideraciones:

- Tamaño de las esferas (0,2-15mm)
- Cantidad y material de las esferas
- Velocidad de agitación
- Temperatura de trabajo
- Velocidad de flujo
- Concentración de la suspensión

$$\ln \left(\frac{R_m}{R_m - R} \right) = k \cdot t$$

R_m = Cantidad máxima de producto librado.

R = Cantidad de producto liberada en t .

k = Cte. de ruptura celular (Depende del T y tipo de $m\emptyset$)

t = tiempo de residencia en función del flujo de la suspensión celular.

Dependencia de la constante

Homogenizador de Alta Presión

- ✓ Temperatura
- ✓ Tipo de microorganismo
- ✓ Concentración de células:
Ej : Masa Seca = 10g/L

Molino de bolillas

- ✓ Velocidad de agitación:
> ω de giro \rightarrow > probabilidad de choque
- ✓ Concentración de células: 50-60%
70% de la capacidad del equipo.
- ✓ Concentración de bolillas:
30% de la capacidad del equipo.
- ✓ Diámetro de bolillas:
+ pequeño mejor \rightarrow Sin pérdidas.
- ✓ Temperatura
- ✓ Tipo de microorganismo

MÉTODOS QUÍMICOS

Tratamiento con solventes orgánicos (Cloroformo, tolueno)

Los solventes orgánicos *permeabilizan las membranas celulares* disolviendo componentes hidrofóbicos de la pared, como los fosfolípidos de la membrana interna en las bacterias Gram (-).

Tratamiento con álcalis (Hidróxido de sodio e hipoclorito)

Se produce la *saponificación de los lípidos de las membranas*. Es una técnica severa pero efectiva y de bajo costo, siempre y cuando el producto de interés sea resistente a la degradación a pH elevados.

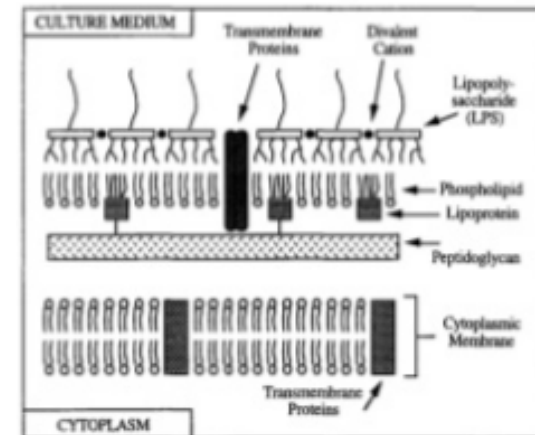
Agentes Caotrópicos (Urea, clorhidrato de guanidina)

Interfieren con los enlaces *no covalentes* (puentes de hidrogeno, fuerzas de van der Waal) desorganizando la estructura del agua haciéndola menos hidrofílica, debilitando las interacciones soluto-soluto

Métodos Químicos...

Agentes Quelantes (EDTA)

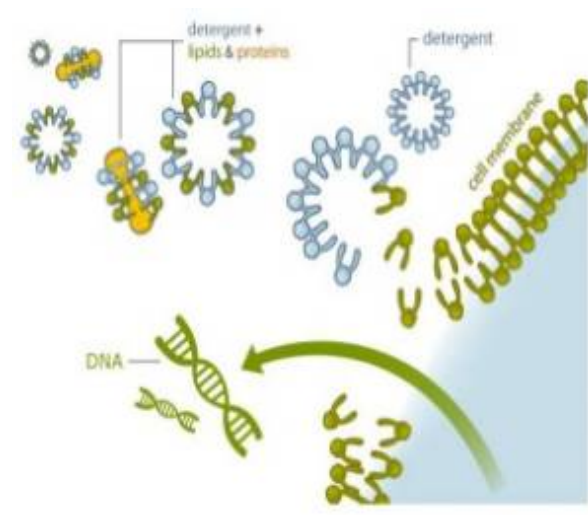
Este agente *quela los iones Ca^{2+} y Mg^{2+}* que unen a los LPS adyacentes haciendo que se liberen parte de los LPS conteniendo proteínas y fosfolípidos de la membrana (Gram-).



Tratamiento con detergentes

Debido a que son anfipáticos *forman micelas con los lípidos de las membranas*, desestabilizándolas.

Se clasifican en : catiónicos (Sales de tetra-aquilamónio, pH básico), aniónicos (SDS, pH ácido) y no iónicos (Triton-X)



Antibióticos

Son efectivos contra bacterias Gram (-). Diferentes antibióticos causan lisis por distintos mecanismos.

MÉTODOS FÍSICOS

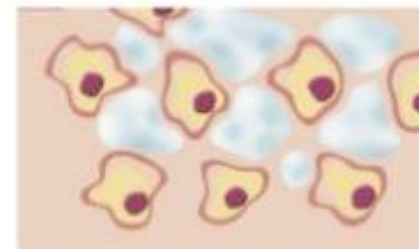
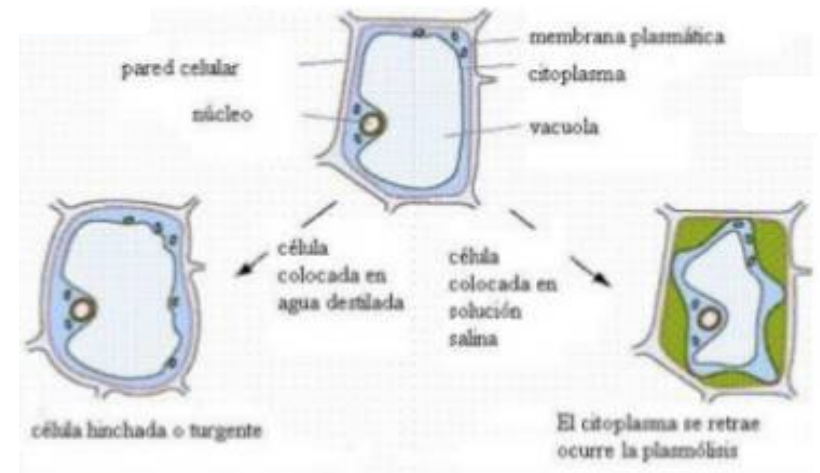
Shock osmótico

El estrés osmótico es generado cuando las células son situadas en medio hiper/hipotónico.

Congelamiento/Descongelamiento

Los *crisales de hielo* que se forman y crecen durante el congelamiento, *rompen mecánicamente la integridad del interior de la membrana celular*, haciéndola permeable.

La congelación rápida lesiona más específicamente las membranas celulares produciendo la lisis celular.



Enfriamiento lento



Enfriamiento rápido

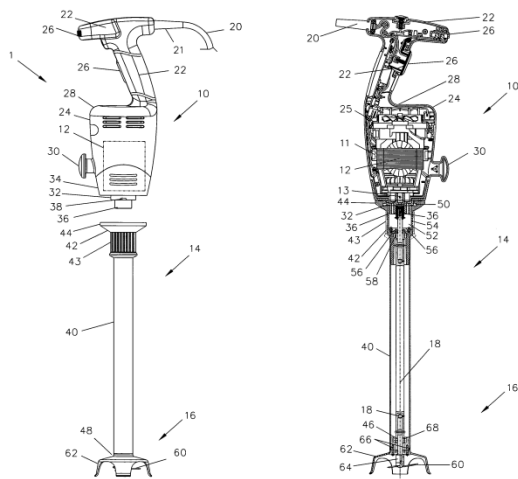
Métodos físicos...

Descompresión

Proceso por el cual las células se *mezclan con un gas presurizado por un tiempo específico*. El gas entra en las células y luego al liberar la presión aplicada el mismo se expande causando la disrupción.

Termólisis

Las células son llevadas a *mayores temperaturas* con el fin de romper o debilitar la membrana externa



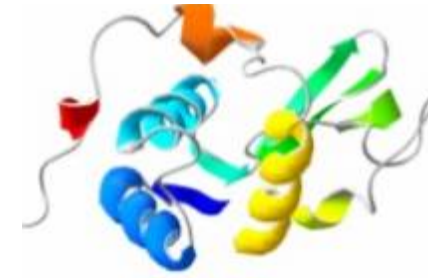
Disruptor Celular



Sonicador

MÉTODOS ENZIMATICOS

- ✓ Método muy preciso
- ✓ Requiere de la compresión precisa de la estructura de las paredes celulares que se desean romper.
- ✓ Elevado costo (Técnica muy específica)



Lisozima
(muramidasa)

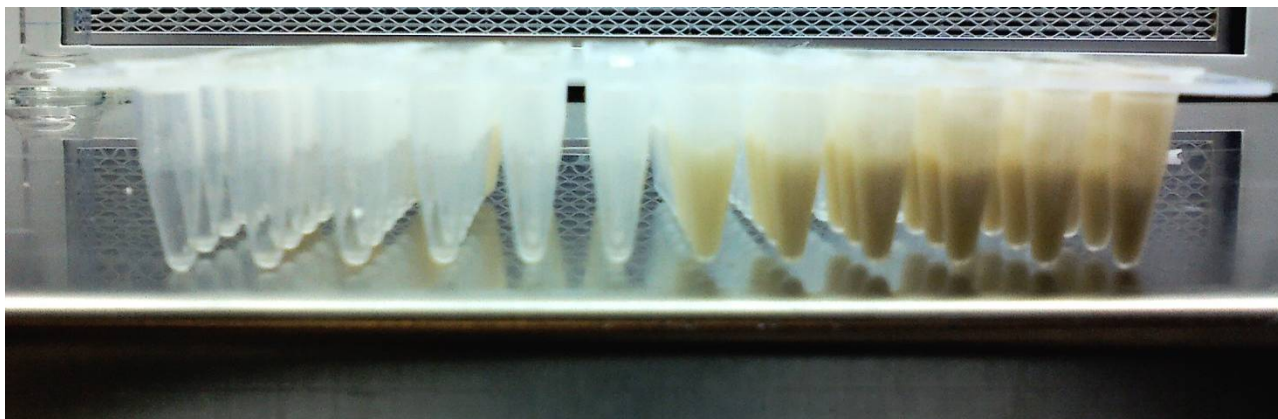
VENTAJAS	DESVENTAJAS
No requiere equipos especiales	Se requiere enzimas diferentes para cada microorganismo (\neq componentes en la pared celular)
Liberación más selectiva del producto	La enzima que se utiliza se pierde (Costo adicional)
Condiciones de operación menos agresivas	
La inmovilización puede ser una herramienta útil para reducción de costos	

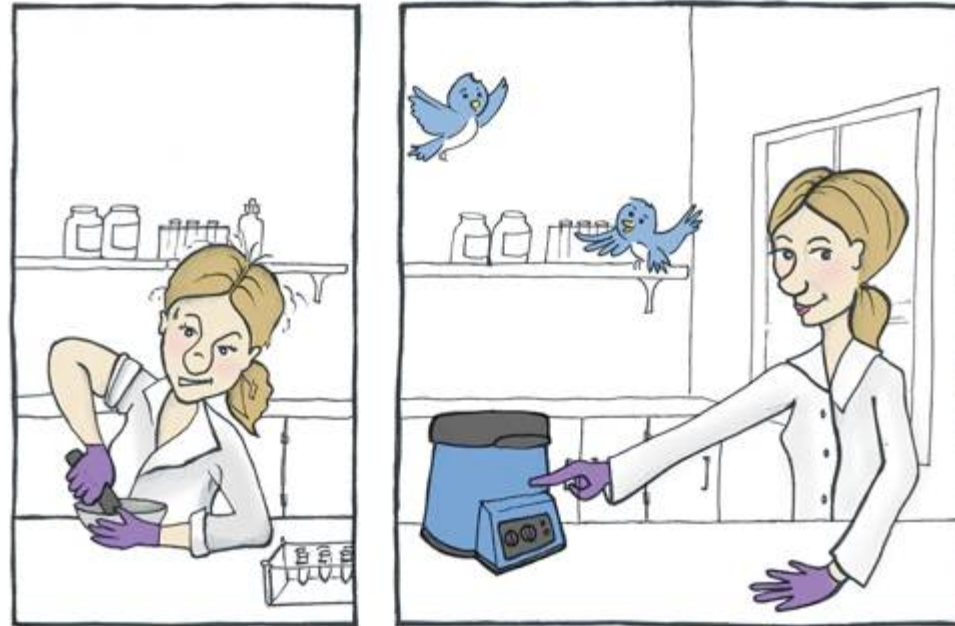
Métodos enzimáticos...

Autólisis

Proceso por el cual las células inducen su propia destrucción. Se produce la activación de señales que activan la liberación de enzimas que degradan las organelas y las membranas de las mismas células.

El mecanismo es lento, por lo que se transforman las cepas con el fin de hacer los sistemas autolíticos mucho más activos (Introducción de genes que codifican antibióticos y enzimas que degraden más rápidamente los componentes celulares) ó con inductores de la autólisis.





GRACIAS!!!