

Unidad II

Ruptura Celular

Nahum Castellanos Pérez

Rompimiento Celular

Una gran cantidad de productos de interés son intracelulares y para obtenerlos se precisa la desintegración de la célula para liberar su contenido al medio.



Métodos

Métodos

DRÁSTICOS:

- Rompimiento total de la célula.

SUAVES:

- alteración química de las cubiertas celulares, permeabilización que facilite la salida del producto.



La selección de una u otra técnica dependerá las características del producto que 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

No Mecánicos.

Mecánicos.

- **No mecánicos:**

- **Lisis celular**
- **Enzimático**
- **Químico (detergentes, disolventes)**
- **Físicos (Choque osmótico)**
- **Tratamiento Alcalino**
- **Termalización**
- **Permeabilización**



Métodos Químicos:

- Choque osmótico.
- Permeabilización.
- Disolución lipídica.
 - ❖ Tolueno 10 % de la biomasa
- Digestión enzimática.
 - ❖ Enzimas que atacan la pared celular
Lisozima: ataca la capa de péptidoglucano de la pared celular.
- Tratamiento alcalino.

- **Mecánicos:**

- **Homogenizador a presión.**

- **Prensa francesa.**

- **Ultrasonido.**

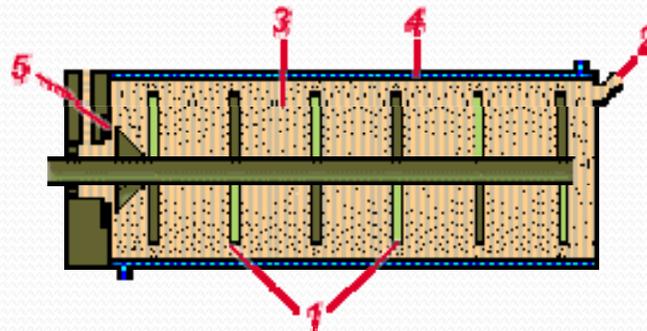
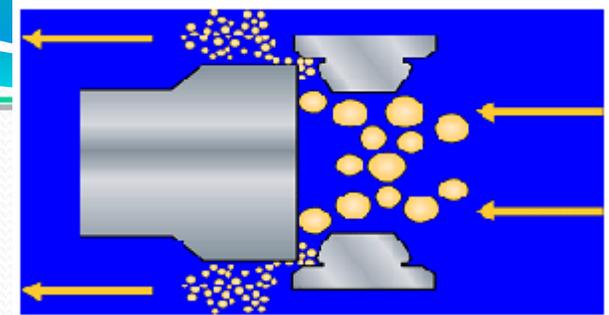
- **Molino de Bolas o Perlas.**

- **Congelación.**

- **Mortero.**

- **Agitación con Abrasivos.**

- **Microfluidizadores.**



- 
- **Los métodos mecánicos implican someter a las células a una deformación en fase sólida o líquida.**
 - **Los métodos no mecánicos utilizan reactivos que pueden ser químicos o enzimáticos, cuyo objetivo es romper o lisar la célula.**

- Actualmente los métodos mecánicos son aplicados industrialmente, mientras que los no mecánicos se utilizan principalmente a pequeña escala (laboratorio).



- Uno de los métodos no mecánicos más utilizado a nivel de laboratorio es a través del uso de reactivos químicos como disolventes.



MÉTODOS NO MECANICOS

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.

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	



MÉTODOS MECANICOS

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.

Métodos Mecánicos

Técnicas	Principios	Stress	Costos	Ejemplos
Homogenizador de cuchillos	Las células son rotas en un mezclador	Moderado	Moderado	Rompimiento de tejidos y células
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 MECANICOS

MÉTODOS DE PERMEABILIZACIÓN



MÉTODOS DE PERMEABILIZACIÓN

- Alteran la estructura de la pared y la membrana celular para facilitar la difusión de productos hacia el exterior.



MÉTODOS DE PERMEABILIZACIÓN

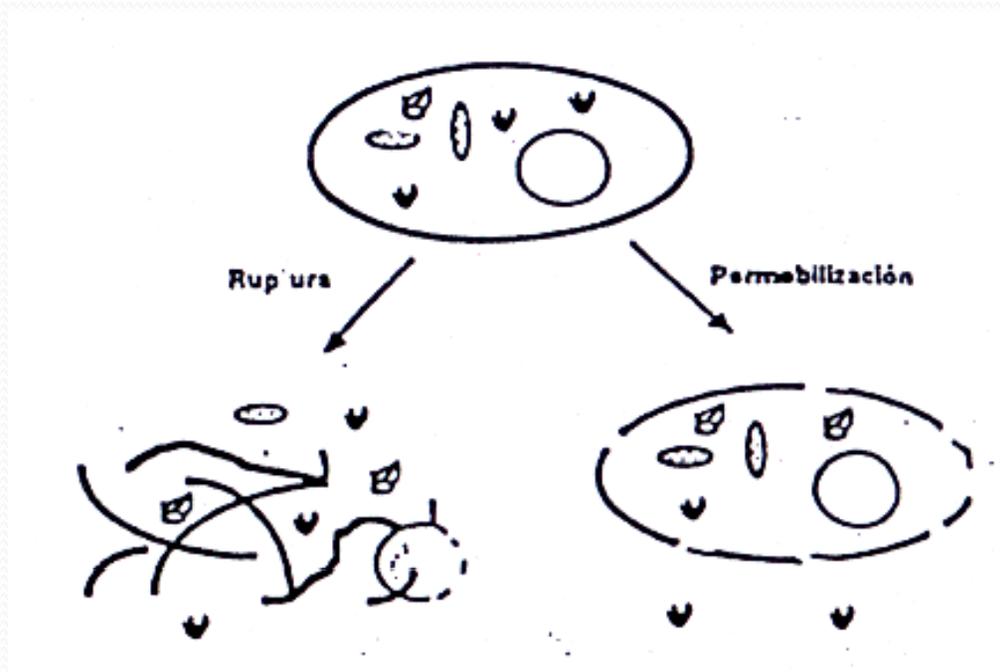
- Ósmosis
- Tolueno al 5%
- Detergentes aniónicos
- Detergentes no aniónicos (SDS y Tritón)
- Agentes caotrópicos (guanidina y urea)
- EDTA

TRATAMIENTO ENZIMATICO

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

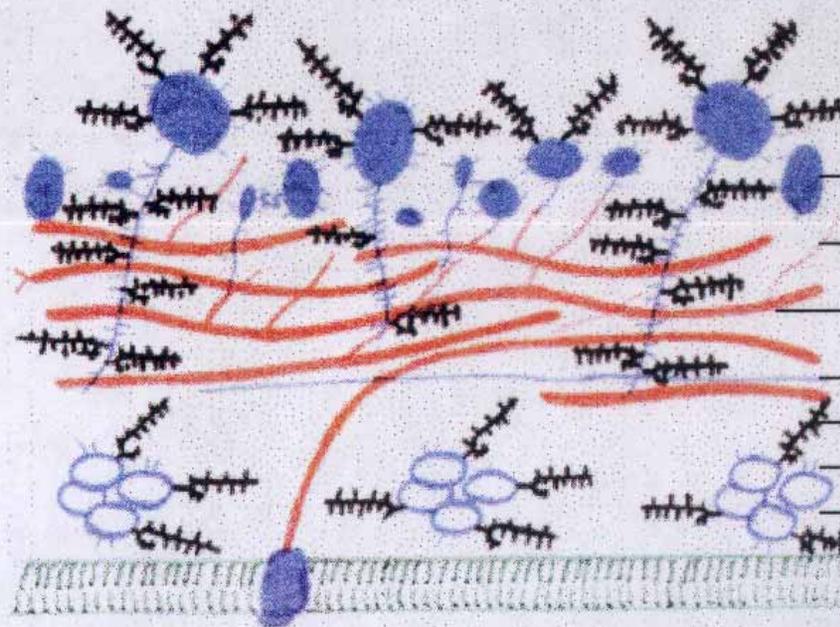
El modo de acción es muy simple basta con agregarse a una suspensión y se produce una reacción muy rápida la cual deteriora la pared celular. La reacción es selectiva y ataca a determinadas estructuras de la pared celular como son las glucanasa, mananasas.

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 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



Constituyentes de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* según Schereuder (1996):

Manoproteínas

β-1,6-glucano

β-1,3-glucano

Quitina

cadena N-glicosídica

cadena O-glicosídica

Enzimas periplasmáticas

Membrana plasmática



SHOCK OSMOTICO

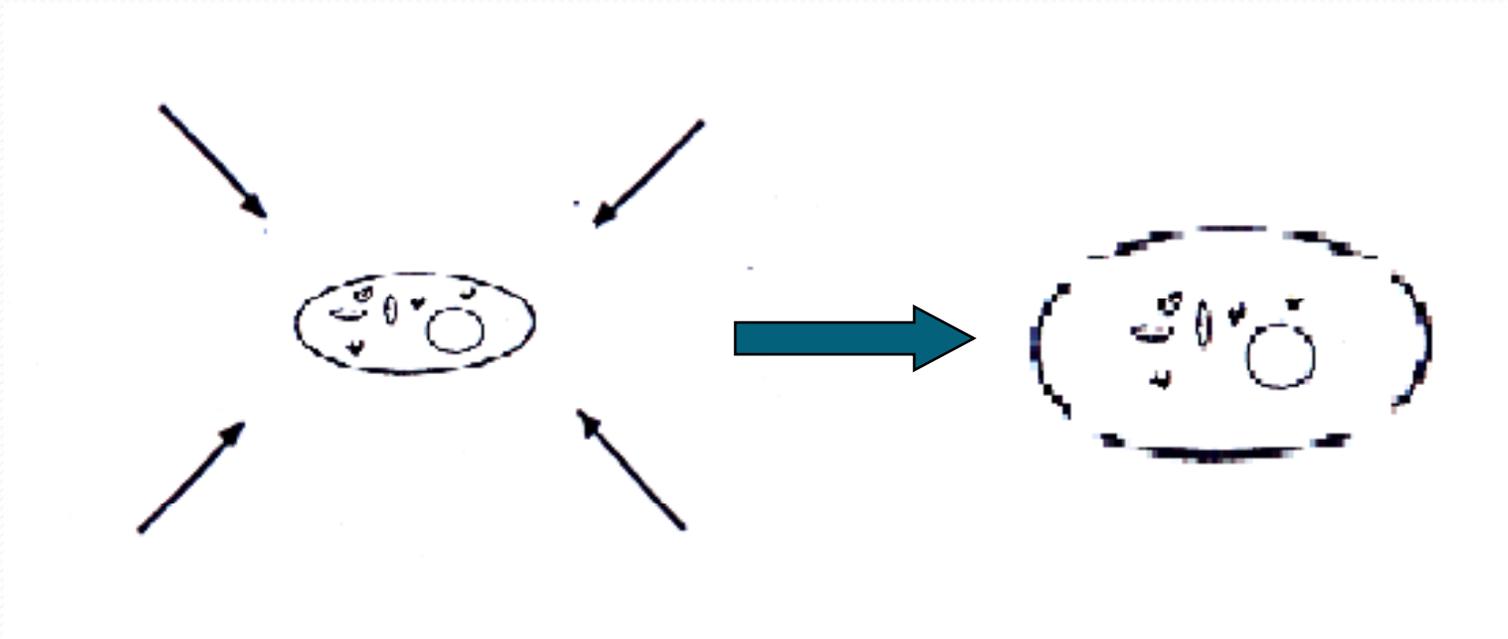
Shock Osmótico

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 lisar.

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 :

$$DP = - R^*T^*c_1$$

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).

SOLUBILIZACION

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 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9$ -**Phenyl-SO**₃⁻ 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 SOLVENTES

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

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.



MÉTODOS MECANICOS

Métodos Mecánicos

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



EQUPOS DE ROMPIMIENTO CELULAR

I. HOMOGEINIZADORES.

**II. HOMOGEINIZADORES DE ALTA PRESION
(orificio).**

III. MOLINOS DE PERLAS DE ALTA VELOCIDAD.

IV. ULTRASONIDO.

V. MICROFLUIDIZADORES.



I. HOMOGENEIZADORES

- Cuchillas.
- Se utilizan para extraer productos de tejidos animales y vegetales.
- Separación de pilis, flagelos de bacterias.



Blenders (Licuadora)

Homogenización por uso de cuchillas. Proceso magnificado por uso de solventes orgánicos y/o detergentes.

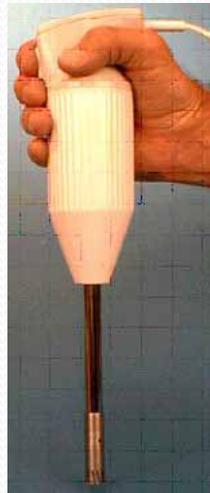
Cuchillas rotan a 6.000 – 50.000 rpm en un contenedor.

Las muestras se pueden reducir hasta partículas de 4 micrones (análisis de citometría de flujo).

Procesamiento de tejidos animales y vegetales. No adecuado para fraccionamiento de microorganismos. Homogenizados de plantas pueden sufrir oxidación enzimática.

Homogenizador Rotor/Stator

Molinos de coloides – H. Willems. Homogenización rápida (10-60 seg.) y completa. Mecanismo de turbulencia ligera. Protección de organelos: menor velocidad y tiempo de exposición. Uso: tejidos animales y vegetales. Genera calor a niveles insignificantes. Formación de espuma y aerosoles

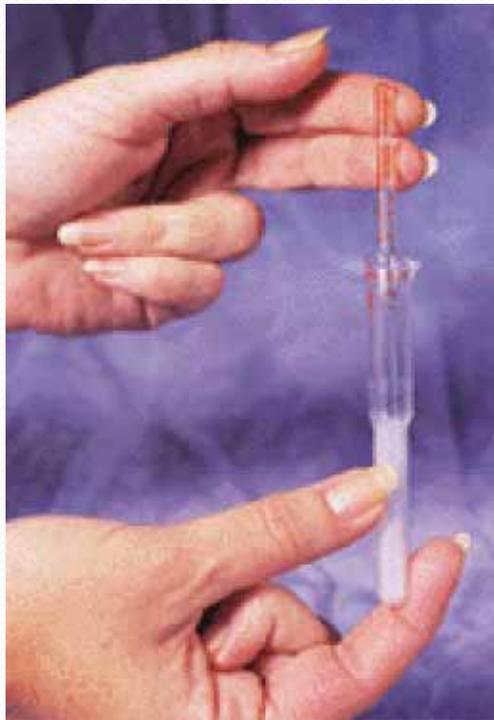




Homogenizador de émbolo y tubo ***Potter, Potter-Elvehjem, Dounce, Ten Broeck.***

- Separación émbolo-pared del tubo calibrada según tamaño de partícula deseado.
- Los tejidos deben ser previamente picados y se suspenden en un volumen exceso de medio (4-10 veces).
- Fraccionamiento de tejidos animales. Preferido en preparación de organelos subcelulares de tejidos frágiles como cerebro e hígado. (Acción suave).
- Permite un mejor control de la temperatura generada por la fricción. No es eficiente en la fragmentación de microorganismos.

Homogenizador de émbolo y tubo *Potter, Potter-Elvehjem, Dounce, Ten Broeck.*



II HOMOGENEIZADORES DE ALTA PRESION (de orificio)

- Consisten en una bomba de alta presión (2 a 5 pistones) y una válvula.
- Bomba de alimentación que transporta la suspensión celular a una P entre 0.1 y 0.5 Mpa hasta otra bomba de alta presión, donde la suspensión es comprimida 40 Mpa.
- La válvula se abre, la susp. es liberada a través de la válvula a alta velocidad y choca contra un anillo de impacto.



- ***Presión de operación***

- P > eficiencia de recuperación

-

- ***Diseño de la válvula***

-

- ***Concentración celular***

- La desintegración es independiente de la concentración de células

-

- ***Temperatura***

- Debe controlarse porque por cada 1000 psi, sube 1.5 C

-

- ***Usos***

- Se utiliza principalmente para bacterias, y menos para hongos.



Tipos

- Prensa X: La muestra se precongela, es sólida al momento del pasaje
- Francesa: Pasa la suspensión celular líquida. Se trabaja entre 7000 y 10.000 psi.
- MANTON-GAULIN: Se usa a escala industrial, se trabaja a menor P, entre 6000 y 8000 psi.



Prensa Francesa

Consiste en el paso de las células a gran presión por un pequeño orificio a una cámara con presión baja, lo cual ocasiona la ruptura de las células por descompresión.

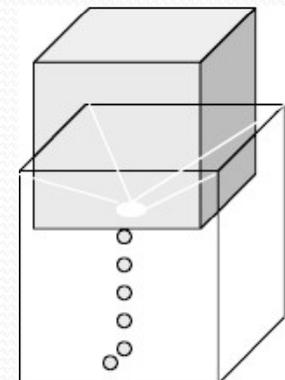
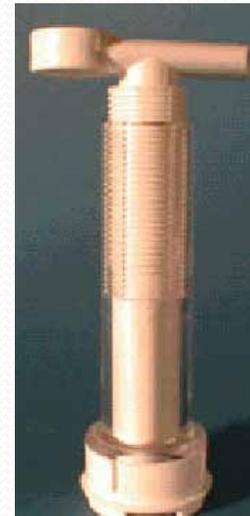
La filtración al pasar las células a través de orificios a presión de diámetros reducidos que provocan la rotura de las membranas celulares. Preparación de extractos de tejidos animales. El tejido es prensado por una placa metálica de tamiz mientras rotan cuchillas que barren lentamente sobre la superficie de la placa. Fragmentos resultantes de 0.3 – 0.5 mm. Es paso preliminar para someter a otros tipos de homogenizador.

Prensa Francesa

**Material celular difícil de fragmentar.
No se usa con frecuencia.**

Mecanismo: paso de las células de una cámara con gran presión a otra con presión baja a través de un orificio. Repetidas a Alta Velocidad. Ruptura por descompresión. (Virus, Bacterias).

**Unidades con capacidad de 1-40 ml.
Presión 20.000 - 40.000 libras por pulgada².**





homogenizadores

Actualmente se dispone de homogenizadores más sofisticados que emplean el mismo principio, pero que permiten controlar el nivel de fricción y la temperatura del proceso, son conocidos como *potters*. Los principales problemas de esta técnica son: la eficiencia baja cuando se usan pequeñas cantidades de medio molidor ó cuando es baja la concentración celular; la fricción genera calor y pueden presentarse alteración en las proteínas

III MOLINOS DE PERLAS DE ALTA VELOCIDAD

- Consiste en una agitación con abrasivos. Las perlas rotan y rompen las células por combinación de fricción más impacto.
- La cantidad de esferas debe ser al menos el 50% del volumen total de la biomasa-líquido.





Parámetros Operacionales

- ***Velocidad de agitación***

A mayor velocidad > esfuerzo de corte > frecuencia de colisión > la Temp.

Existe una velocidad óptima para cada proceso.

- ***Velocidad de alimentación de la suspensión celular***

A mayor velocidad menor eficiencia en la ruptura celular, aunque la variación no es muy importante. Es conveniente trabajar a altas velocidades y aumentar el número de pasajes a través del molino.

Parámetros Operacionales

- **Diseño del agitador**

- **Tamaño de las perlas de vidrio**

El tamaño de las perlas oscila entre 0.2 mm y 0.4 mm de diámetro hasta 1.5 mm de diámetro.

El tamaño elegido depende del tipo celular

Levaduras, Micelio, Microalgas, Cel. Animales 0.5 mm

Bacterias y Esporas 0.1 a 0.5 mm

Cerebro, músculo, piel, hojas. 1.0 a 2.5 mm.

Parámetros Operacionales

- ***Carga de las perlas de vidrio***

Tipo de células

Tamaño de las perlas

< carga < eficiencia

> carga > calor generado

Carga óptima de un molino 80 a 90 %

- ***Concentración celular***

La concentración óptima está entre 30 y 60 %

- ***Temperatura***

Se lleva a cabo entre 5 y 15 C

MORTERO Y MANO

Es un método convencional de rompimiento por fricción.

Pueden emplearse materiales abrasivos como cuarzo, vidrio molido, arena, o materiales silíceos.

La masa celular contenida en un volumen de buffer se mezcla con un volumen de medio moledor (0.5 – 1).

La fricción sobre las células genera calor que puede afectar la actividad que se desea estudiar.





IV. ULTRASONIDO / SONIFICACION

Consiste en la aplicación de ultrasonidos a una suspensión celular.

La intensa agitación producida destruye las membranas celulares. Dependiendo de la frecuencia, intensidad y energía aplicada se pueden destruir asimismo las estructuras subcelulares e incluso solubilizar complejos proteicos.

Se suele aplicar en frío para evitar el sobrecalentamiento de las muestras que podría provocar la desnaturalización de las proteínas.

Se transmite una corriente eléctrica a un sistema mecánico que la convertirá en vibraciones de alta intensidad generándose ondas de ultrasonido que generan millones de burbujas microscópicas, las cuales se expanden y colapsan contra las células causando la ruptura de su membrana. Este fenómeno llamado cavitación puede incrementarse adicionando al medio finísimas esferas de vidrio.



IV. ULTRASONIDO / SONIFICACION

En gran escala se usa solo para:

- homogeneizar suspensiones
- ruptura de aglomerados

- Se usa solo en escala de laboratorio



IV. ULTRASONIDO / SONIFICACION

- *Cantidad de muestra*

Poca muestra

- *Temperatura*

Control riguroso de la temperatura

Se trabaja por intervalos de tiempo

Ruptura depende de Potencia/ volumen



IV. ULTRASONIDO / SONIFICACION

El Sonicador tiene dos forma de operar, por

Pulsos: Las Vibraciones de ultrasonido pueden transmitirse en una solución en un rango de 0,1 a 0,9 pulsos por segundo, permitiendo una adecuada sonicación sin generación importante de calor y

Continuo: Puede ser usado de forma continúa por hasta 15 minutos. Con este sistema se puede lograr la ruptura de levaduras entre 3 y 10 minutos o de E.Coli con 40 segundos.



Congelación

Requiere de periodos prolongados de tiempo (hasta 36 horas) para el congelamiento y descongelamiento.

El líquido al congelarse a -56°C forma cristales muy finos que rompen la célula cuando esta se descongela rápidamente a 37°C .

Tejidos animales, vegetales y masas microbianas pueden congelarse con nitrógeno líquido y molerlos en mortero común. Aparato fracturador: pulverizador de tejidos Bessman. Fragmenta 10 mg -10 g de tejido. Procedimiento largo (36 h).



VENTAJA DE LOS METODOS MECÁNICOS SOBRE LOS QUÍMICOS

- No hay agregado de compuestos ajenos al sistema.
- Económicos.
- Fáciles de operar a gran escala.

DESVENTAJAS DE LOS MÉTODOS MECÁNICOS SOBRE LOS QUÍMICOS

- Control de temperatura.
- Control de espuma produce desnaturalización y oxidación.
- Liberación de DNA.



METODOS DE MEDIDA DE LA RUPTURA PRODUCIDA

- Por DO
- Por valoración de proteínas liberadas
- Por medida de la actividad enzimática



SEPARACION DE LOS ORGANELOS

De acuerdo a la ley de Stokes, también podemos separar las organelas de acuerdo a sus densidades relativas con respecto a un gradiente de densidades.



SEPARACION DE LOS ORGANELOS

DENSIDADES DE ALGUNOS ORGANELOS TIPICOS

COMPONENTE	DENSIDAD (g/cm³)
RETICULO ENDOPLASMICO RUGOSO	1,20
VESICULAS DE GOLGI	1,14
MEMBRANA PLASMATICA	1,12



MARCADORES ENZIMATICOS:

ACTIVIDAD ENZIMATICA EN ALGUNOS ORGANELOS

ORGANELA

MITOCONDRIAS
PEROXISOMAS
LISOSOMAS

ACTIVIDAD ENZIMATICA

CITOCROMO C
CATALASA
FOSFATASA ALCALINA