

DEZAGREGAREA MASEI CELULARE

3.1. SUSCEPTIBILITATEA LA RUPERE A CELULELOR

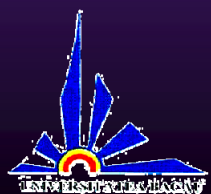
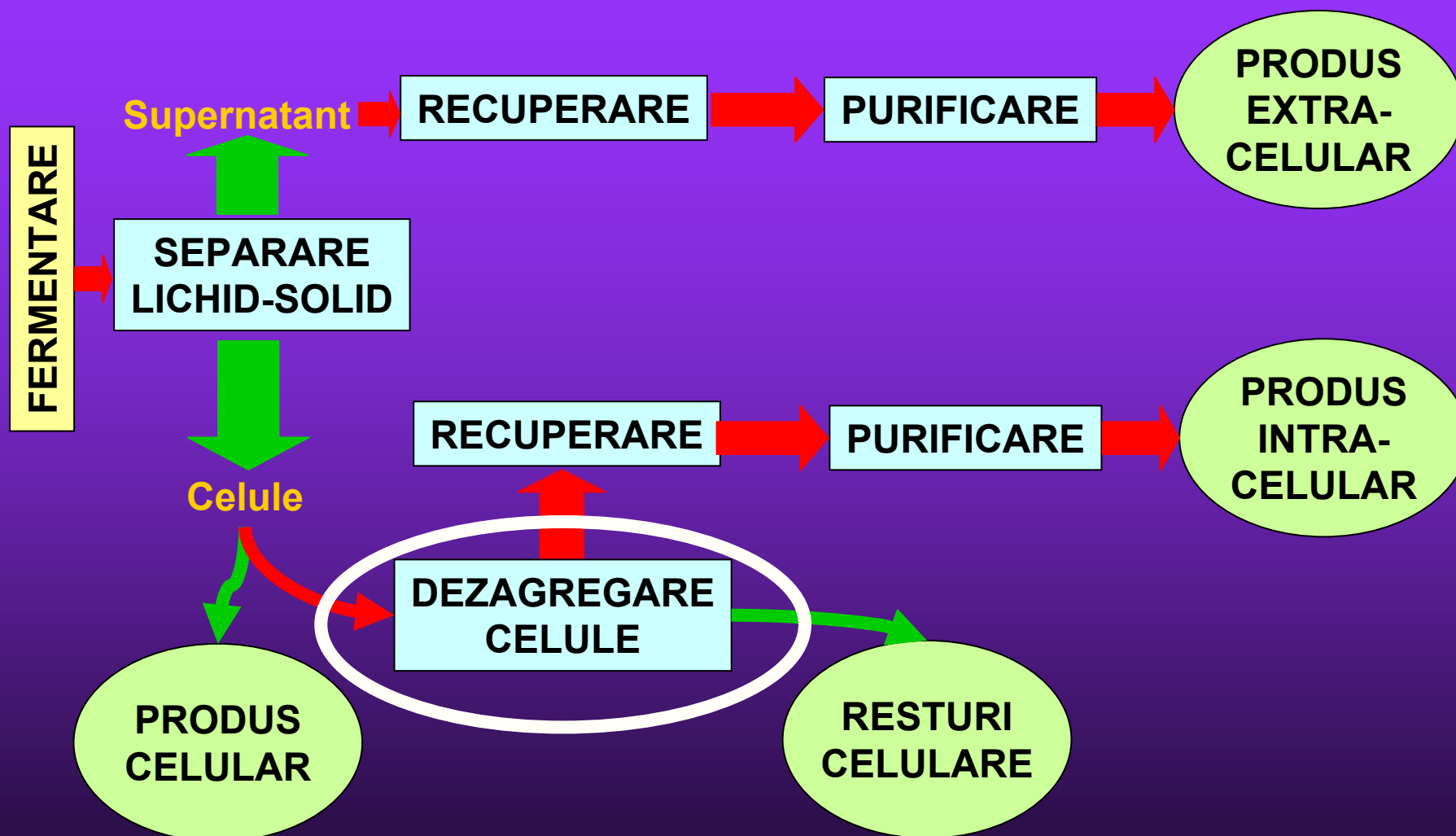
3.2. METODE DE DEZAGREGARE A CELULELOR

3.2.1. Metode mecanice de dezagregare a celulelor și țesuturilor

3.2.2. Metode nemecanice de dezagregare a celulelor și țesuturilor

3.3. INFLUENȚA DEZAGREGĂRII ASUPRA PROCESELOR ULTERIOARE





- Pentru a izola produsele intracelulare este necesară distrugerea membranei și a pereților celulari, proces cunoscut drept **dezagregarea celulelor (cell disruption)**.
- Procedul utilizat pentru dezagregarea la scară industrială depinde de:
 - susceptibilitatea celulelor la rupere,
 - caracteristicile de stabilitate ale produsului,
 - ușurința extracției produsului din resturile celulare,
 - viteza metodei,
 - costurile asociate.



SUSCEPTIBILITATEA LA RUPERE A CELULELOR

- Forma și rezistența celulelor → natura lor
- Celulele prezintă o mare varietate de

- morfologii,
- structuri,
- mărimi,

Funcție de:

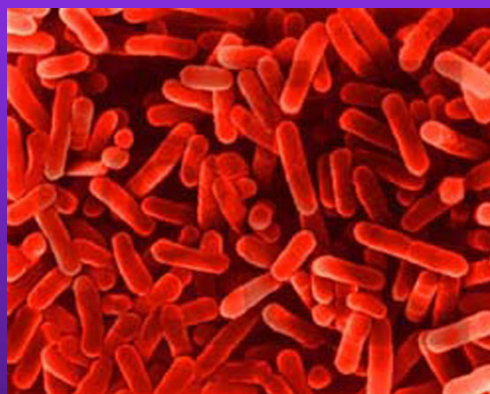
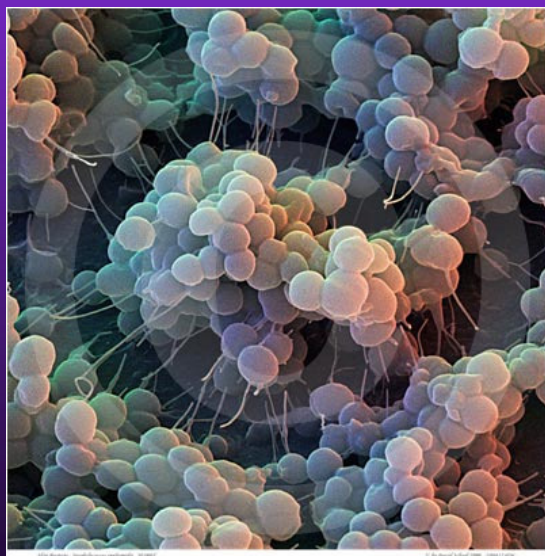
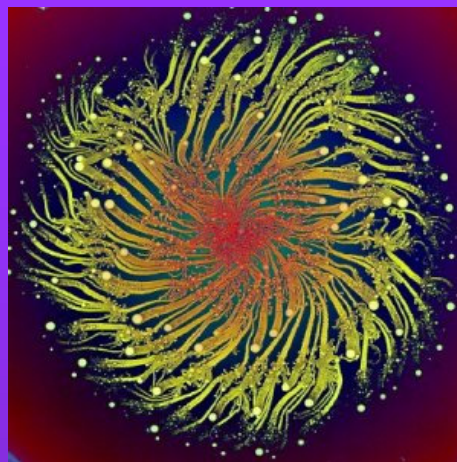
- vârstă
- condițiile de cultură

- **EXEMPLE:**

- Bacteriile: sfere, baghete, elici, filamente.
- Fungiile: de tip micelar, pseudomicelar, unicelular.

- Rezistența, rigiditatea și forma celulelor este dată de **PERETII CELULARI**.



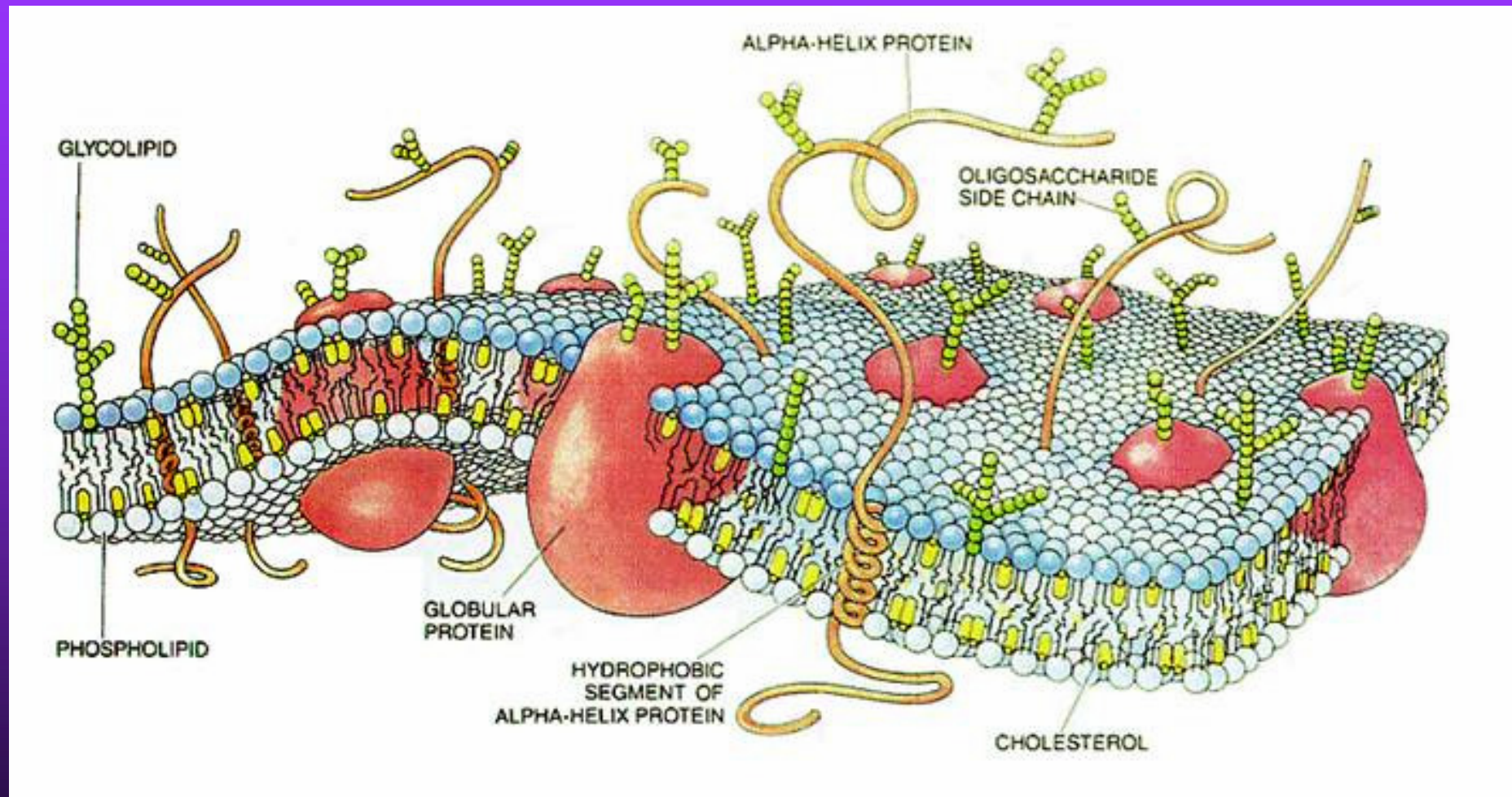


Celule animale

- caracterizate de lipsa pereților celulari
- prezintă o membrană celulară alcătuită dintr-un strat dublu de lipide
- Lipsa peretelui celular rigid:
 - permite dezvoltarea unei mari diversități de celule, țesuturi și organe;
 - permite dezintegrare ușoară a unor astfel de celule.
- Celulele animale fiind relativ mari (1 - 100 μm), sunt foarte vulnerabile la forfecare.

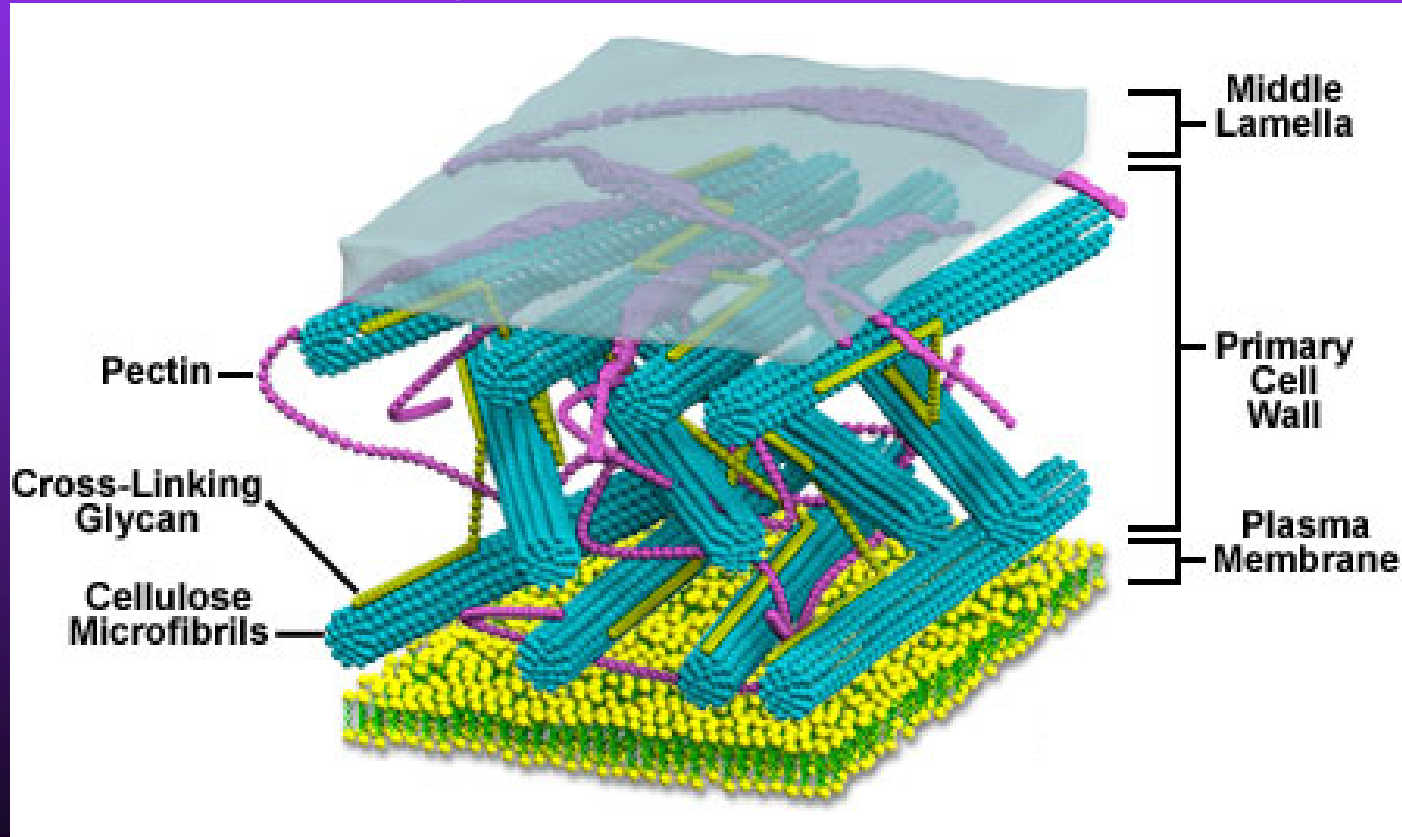


Celule animale – membrana celulara

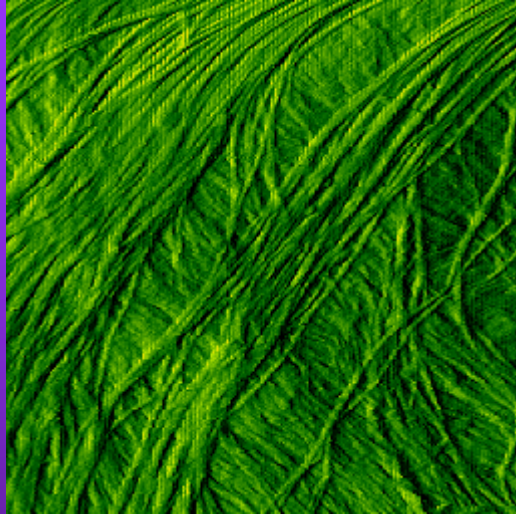


Celule vegetale

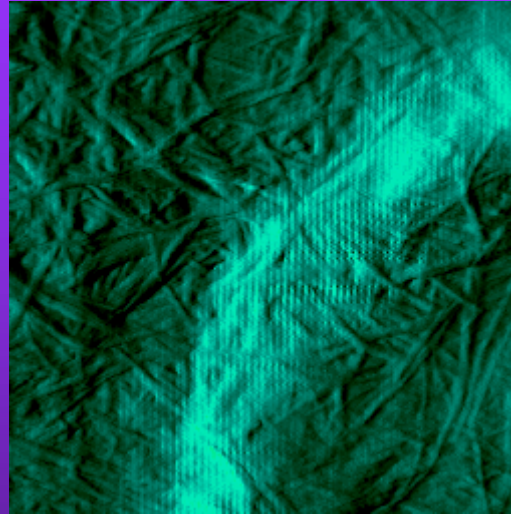
- Au pereții constituiți din carbohidrați complecși insolubili (celuloză și hemiceluloze), lignină și ceară care înconjoară membrana plasmatică:



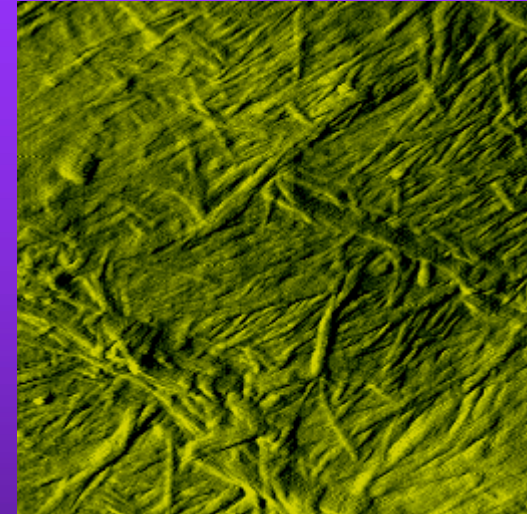
Imagine microscopică a peretelui celular



castan de apă



cartof



morcov

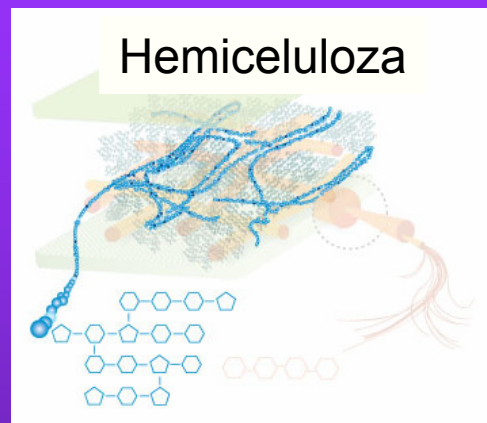
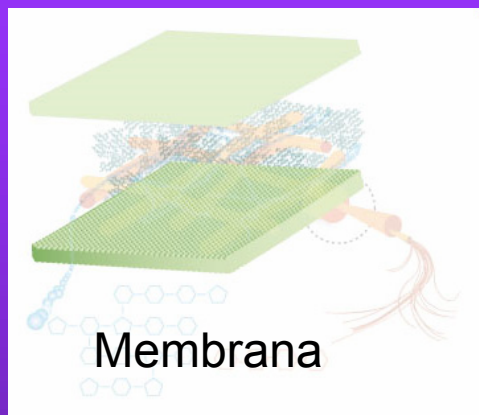


Celule vegetale

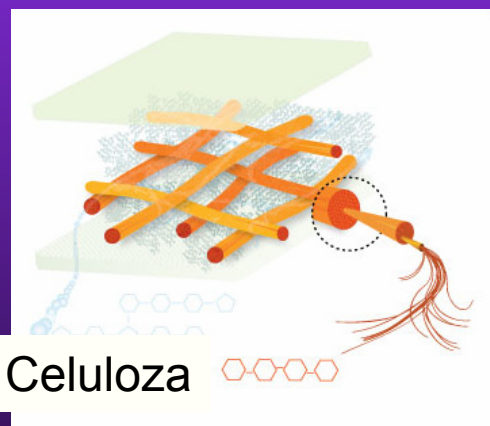
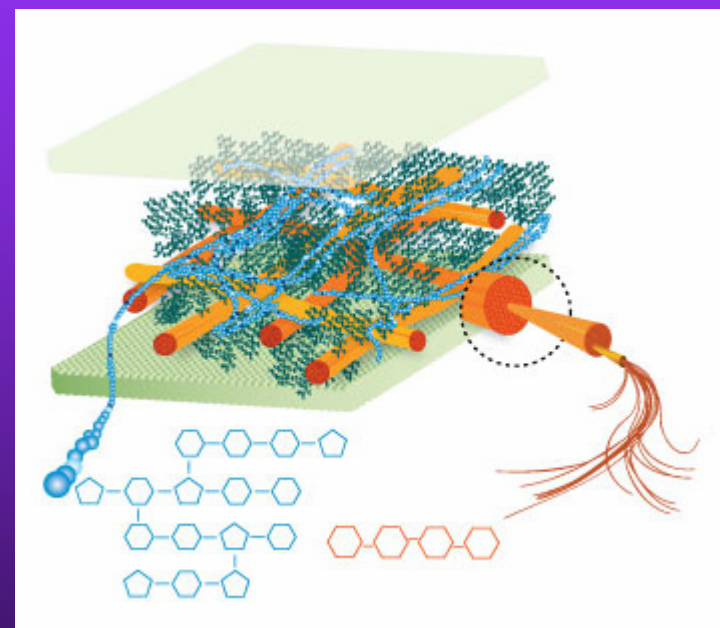
- Microfibrilele celulozice care acoperă membrana plasmatică într-o manieră întâmplătoare conferă acestor celule o oarecare protecție la forfecare.
- Dacă celulele sunt de dimensiuni mari, vulnerabilitatea lor la forfecare crește.
- Proteinele din aceste celule pot fi legate și inactivate de către compușii fenolici care fac parte din unitățile ligninice.



Perete celular vegetal



Perete celular complet



Sursa: <http://www.ceres.net/AboutUs/AboutUs-Biofuels-Carbo.html>



Fungii și drojdii

- Ca și celulele mamiferelor, fungiile sunt eucariote cu ADN-ul organizat în cromozomi în interiorul nucleului.
- Peretele celular al fungiilor filamentoase și al drojdiilor este compus din circa 80 - 90% polizaharide.
- În fungiile filamentoase chitina este încrucișată cu glucani,
- În fungiile inferioare și în drojdii există un amestec conținând manan și glucan.
- Fungiile mature nu au o structură discretă a peretelui celular.

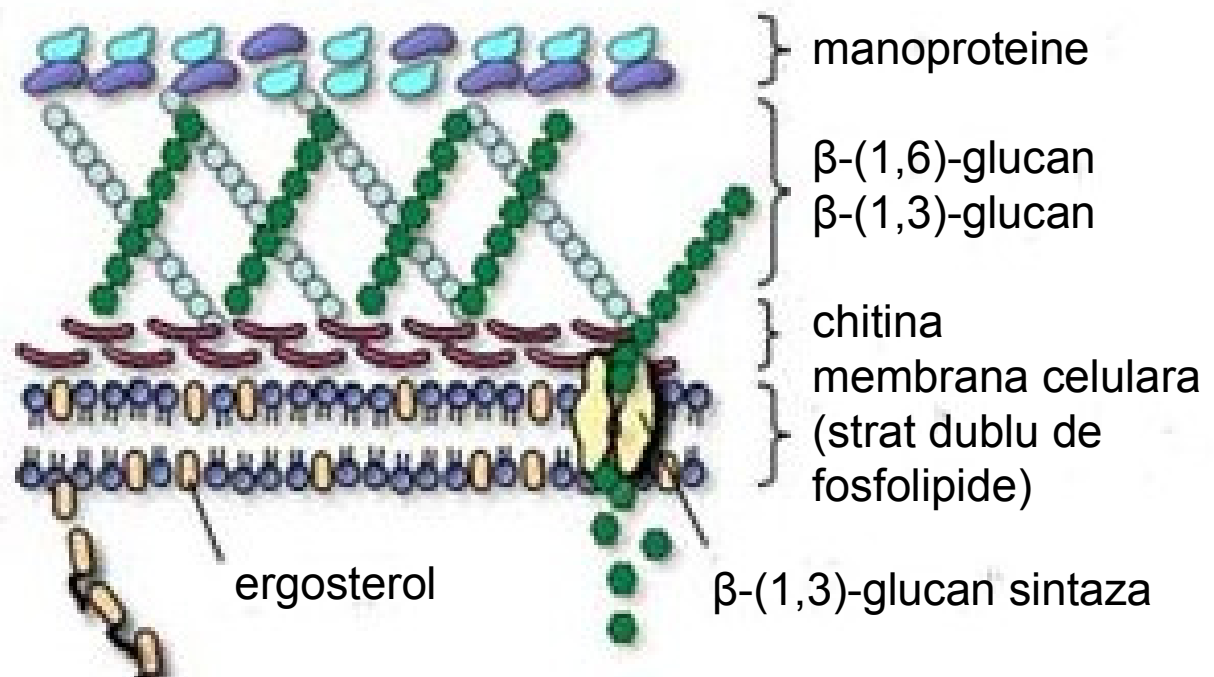


Structura peretelui celular al fungiilor

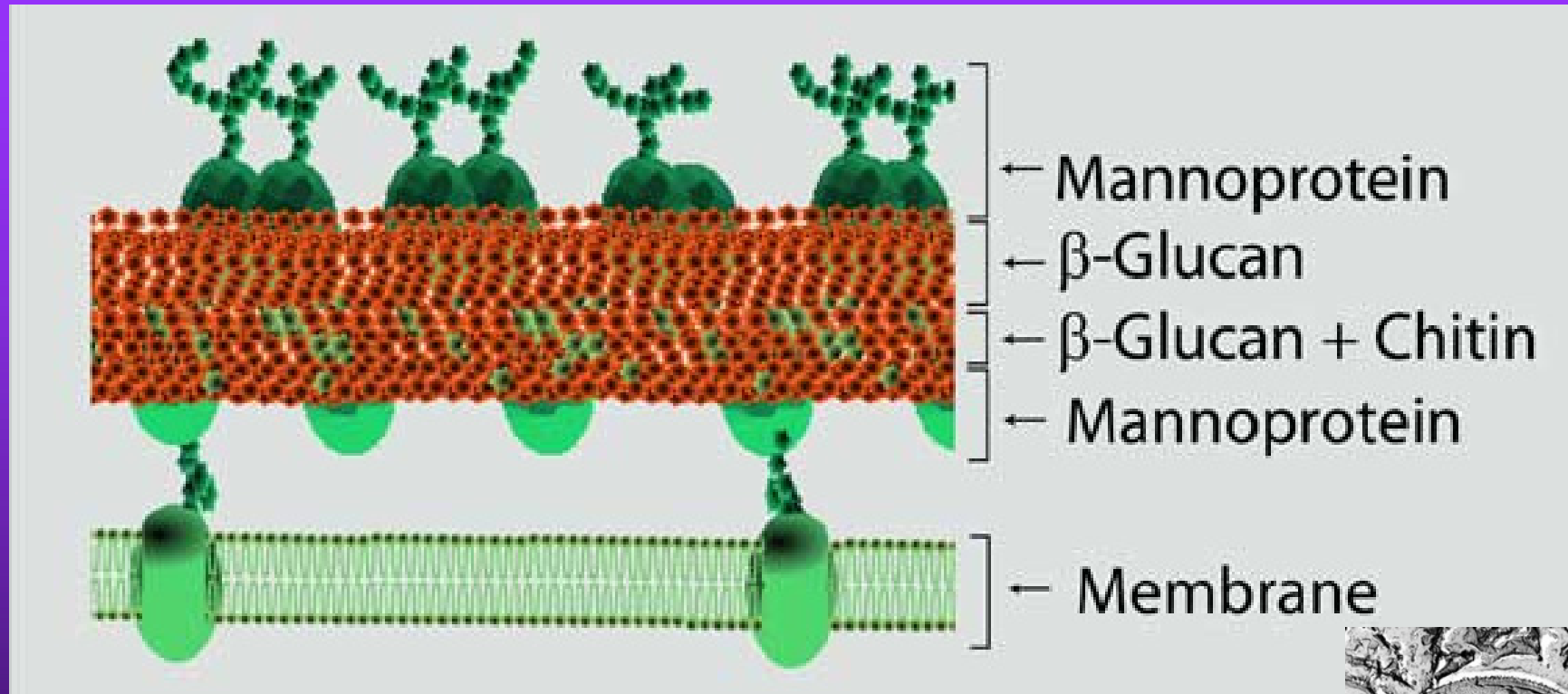
Celula de fungie



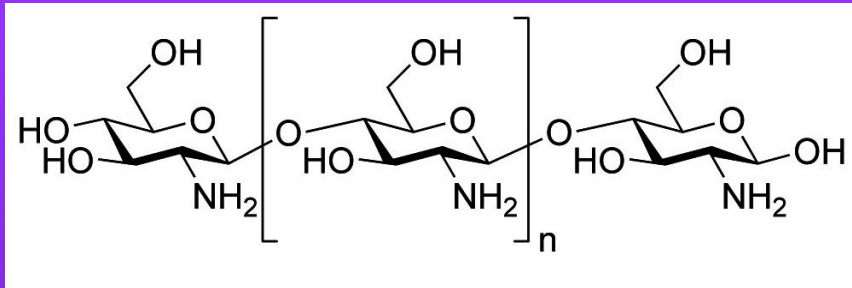
Membrana si peretele celular



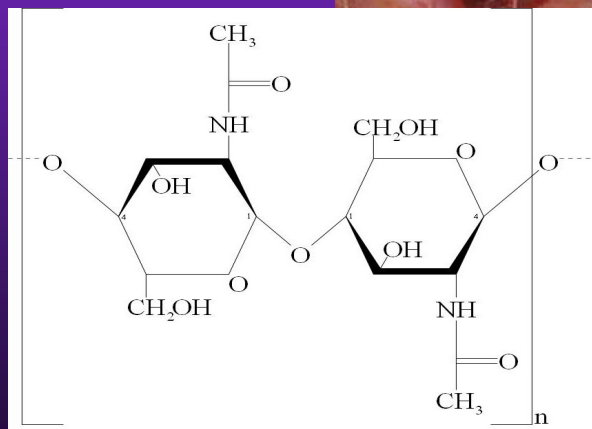
Structura peretelui celular al drojdiilor



Polizaharide



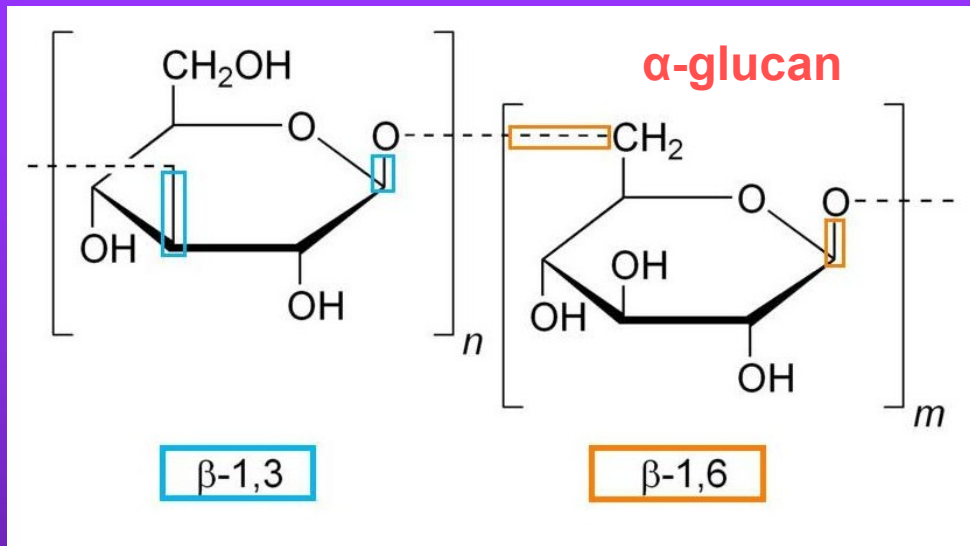
Chitosan



Chitina

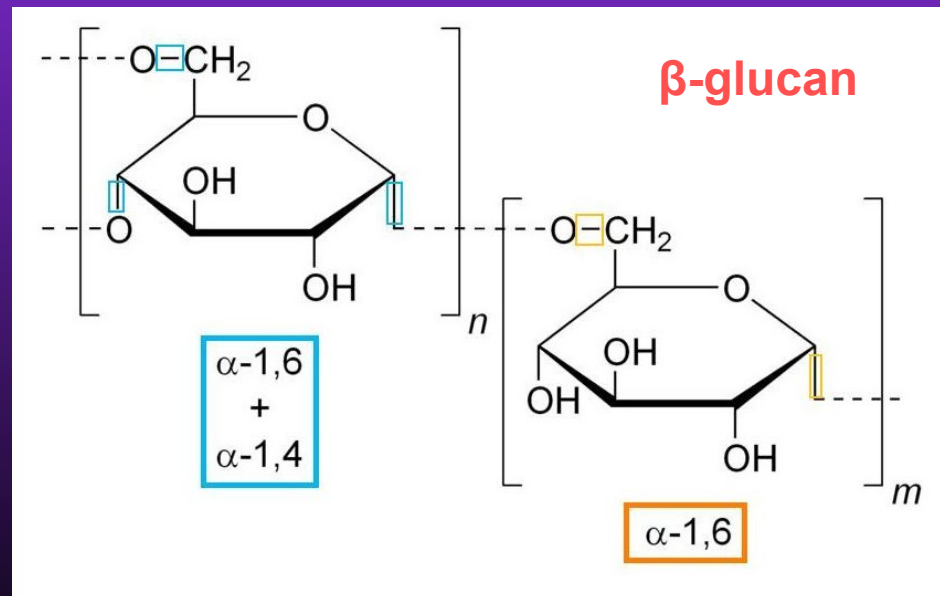


Polizaharide

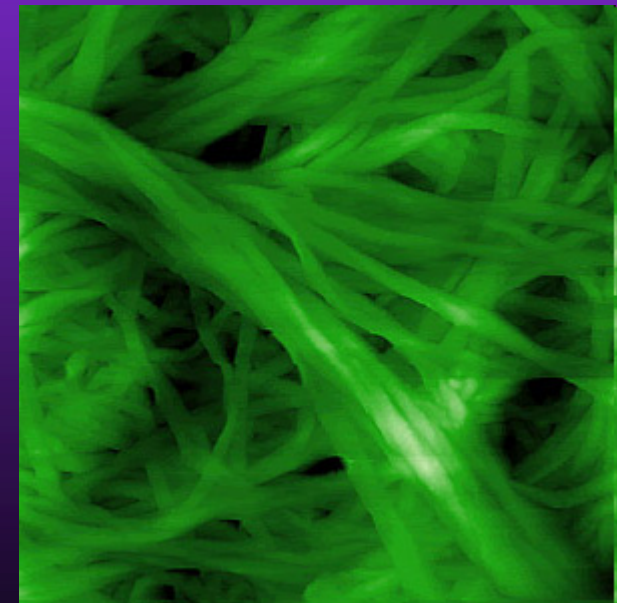
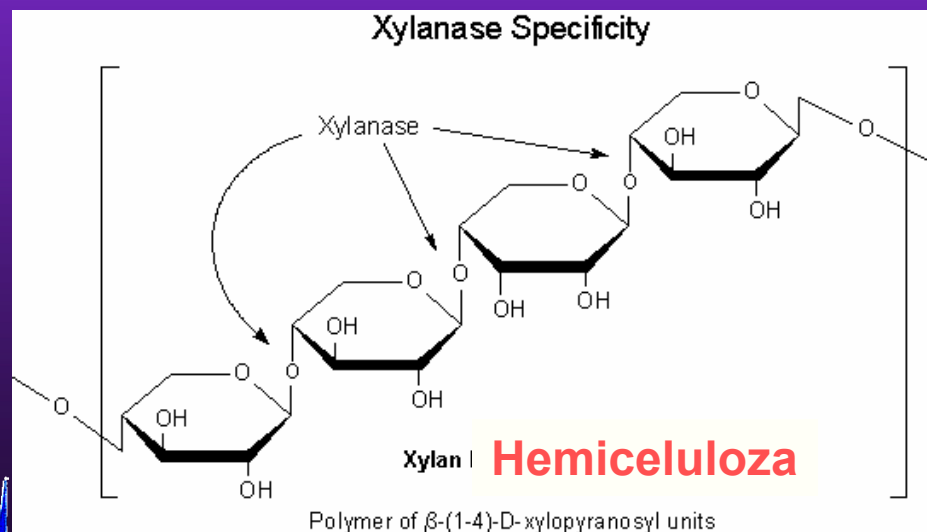
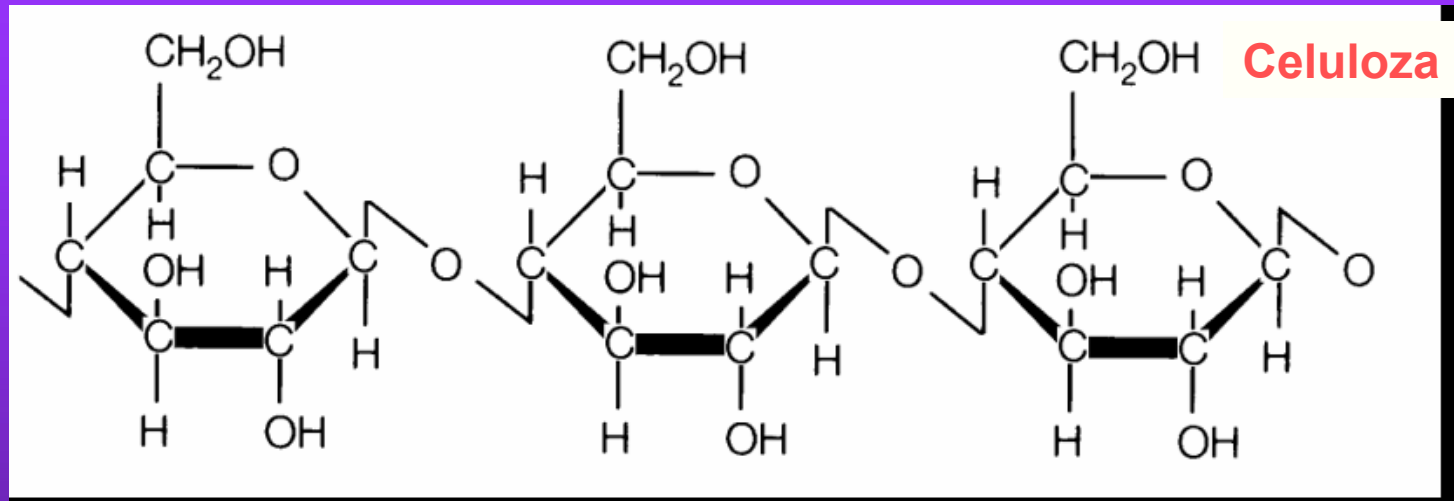


dextran, α-1,6-glucan
glycogen, α-1,4- and α-1,6-glucan
pullulan, α-1,4- and α-1,6-glucan
starch, α-1,4- and α-1,6-glucan

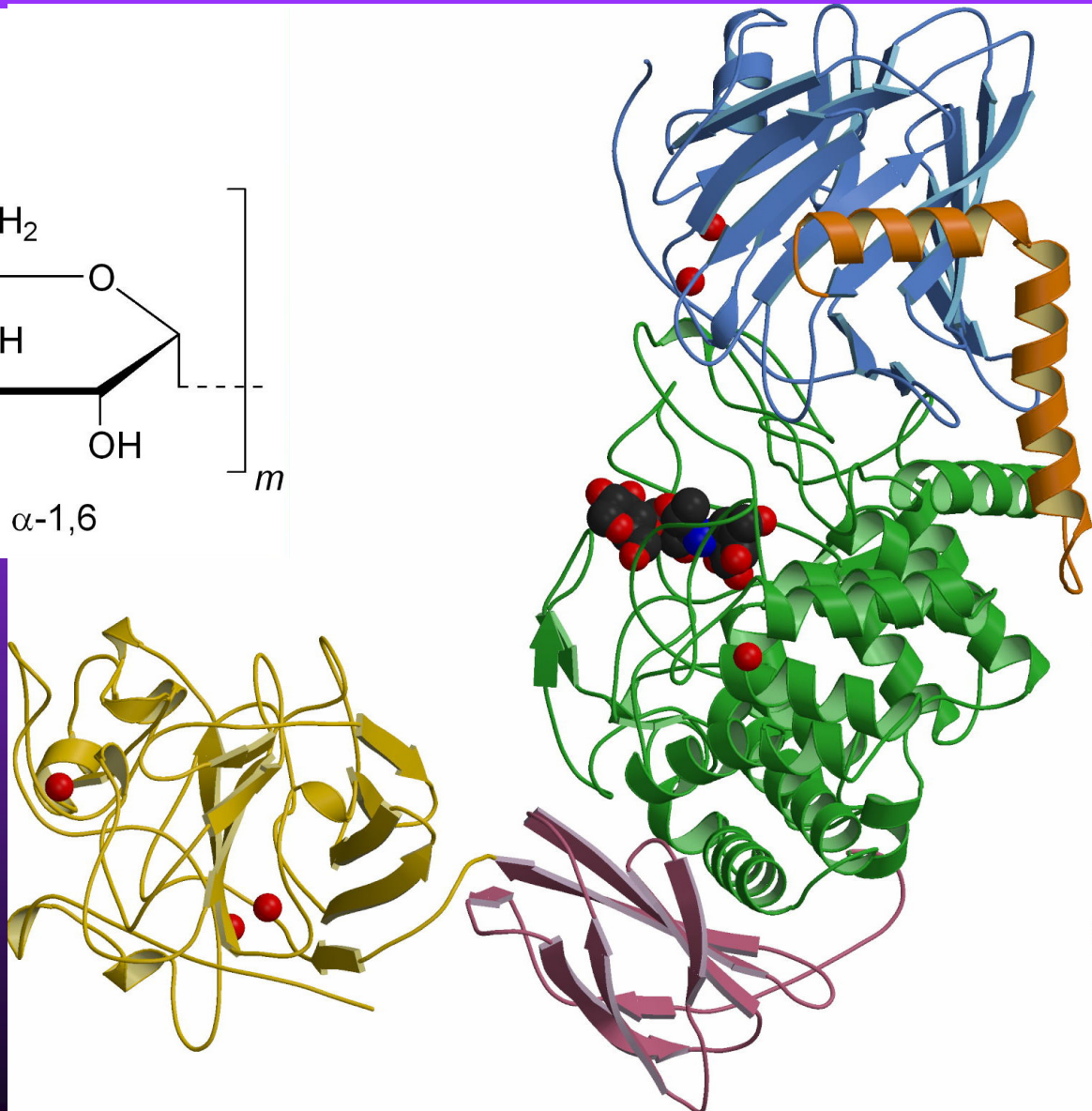
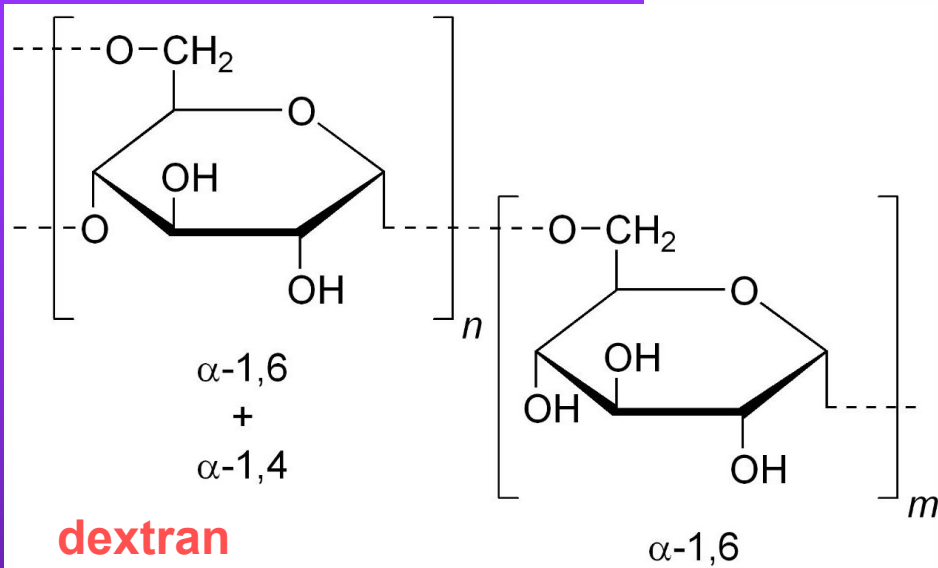
cellulose, β-1,4-glucan
curdlan, β-1,3-glucan
laminarin, β-1,3- and β-1,6-glucan
chrysolaminarin, β-1,3-glucan
lichenin, β-1,3- and β-1,4-glucan
zymosan, β-1,3-glucan



Polizaharide



Polizaharide



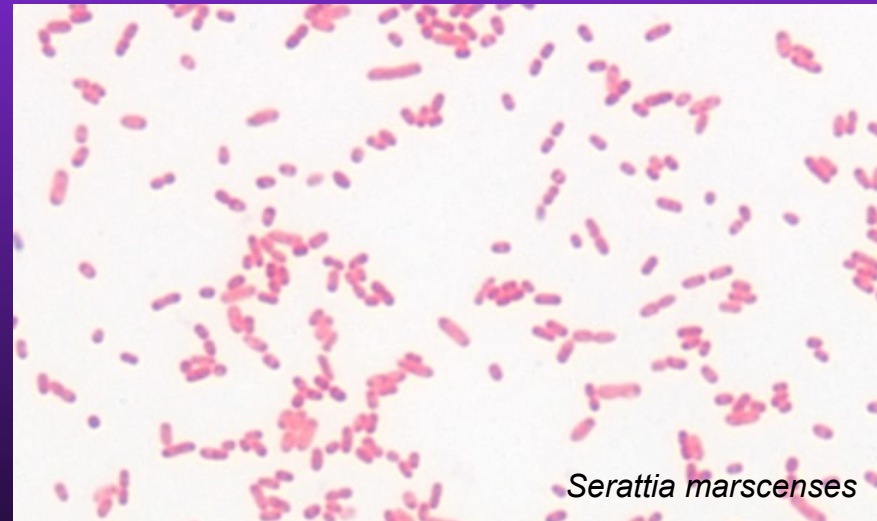
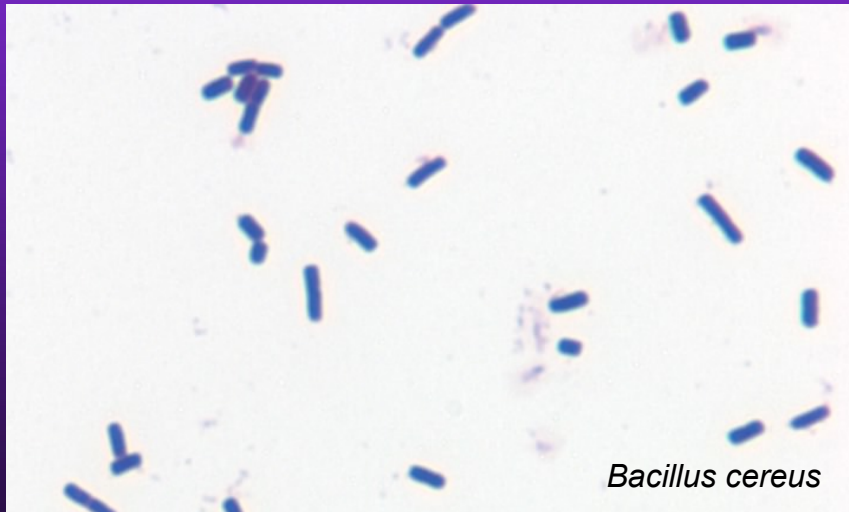
Bacterii

- Structura pereților celulari ai procariotelor este unică, mulți dintre compuși identificați în aceștia negăsindu-se altundeva în natură.
- Există două tipuri structurale de bază pentru pereții celulari care au fost studiate detaliat:
 - cele ale bacteriilor Gram pozitive,
 - cele ale bacteriilor Gram negative.
- Între cele două tipuri de pereți celulari există deosebiri majore.

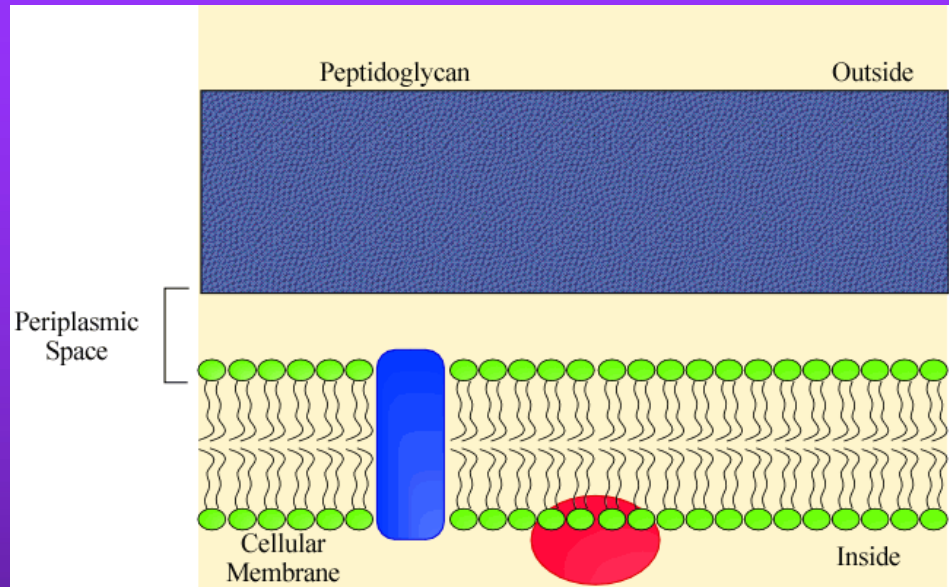


Bacterii

- **Celulele Gram pozitive** apar netede la microscopia electronică de baleiaj, având un singur strat de peptidoglucan.
- **Celulele Gram negative** au o suprafață ondulantă, peretele celular fiind alcătuit din trei straturi.

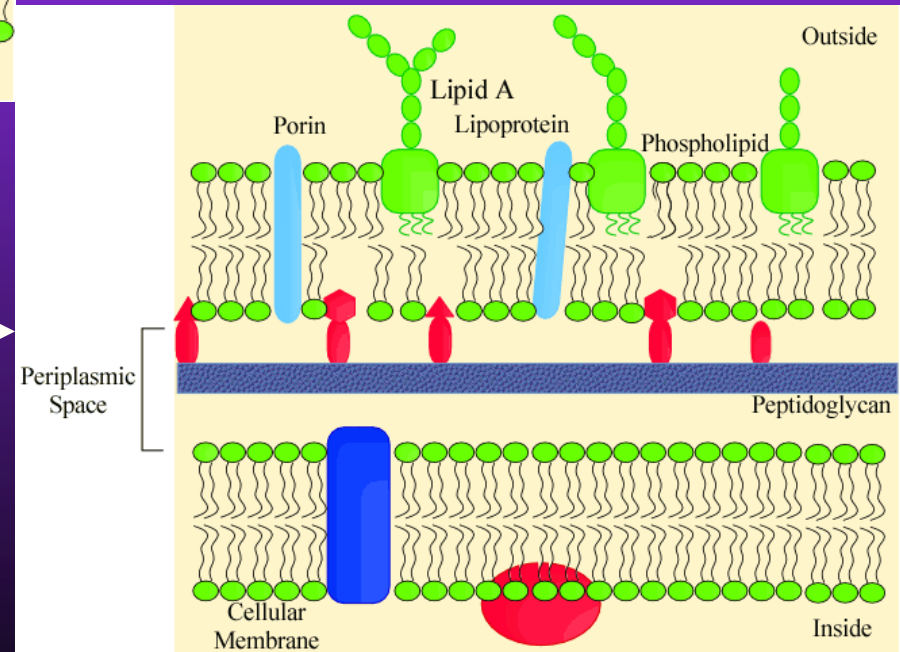


Structura peretelui celular



bacterii gram-pozitive

bacterii gram-negative



Bacterii

- Diferențele dintre pereții celulari ai bacteriilor gram-pozitive și gram-negative influențează hotărâtor comportarea acestor bacterii;
- Implicit și condițiile de dezagregare necesare fiecărui tip de bacterii vor fi diferite.



Proprietățile pereților celulari

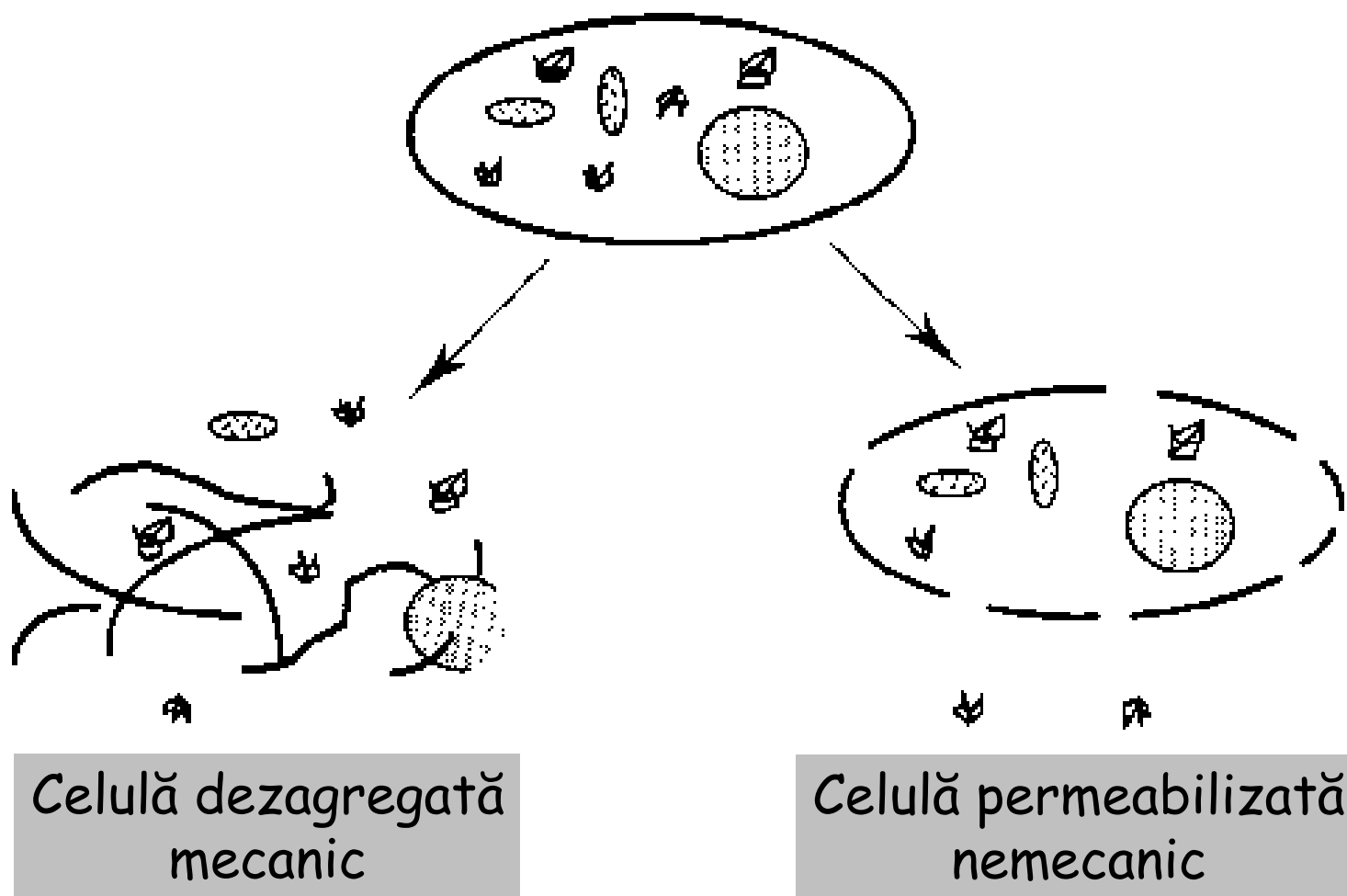
Proprietate	Gram Pozitiv	Gram Negativ
Grosimea peretelui, nm	20 - 80	10
Numărul de straturi al peretelui	1	2
Conținutul de peptidoglukan, %	Peste 50	10 - 20
Acid teihoic în perete	Da	Nu
Conținut de lipide și lipoproteine, %	0 - 3	58
Lipopolizaharide, %	0	13
Sensibilitate la penicilină	Da	Mai puțină
Digerat de lizozimă	Da	Puțin



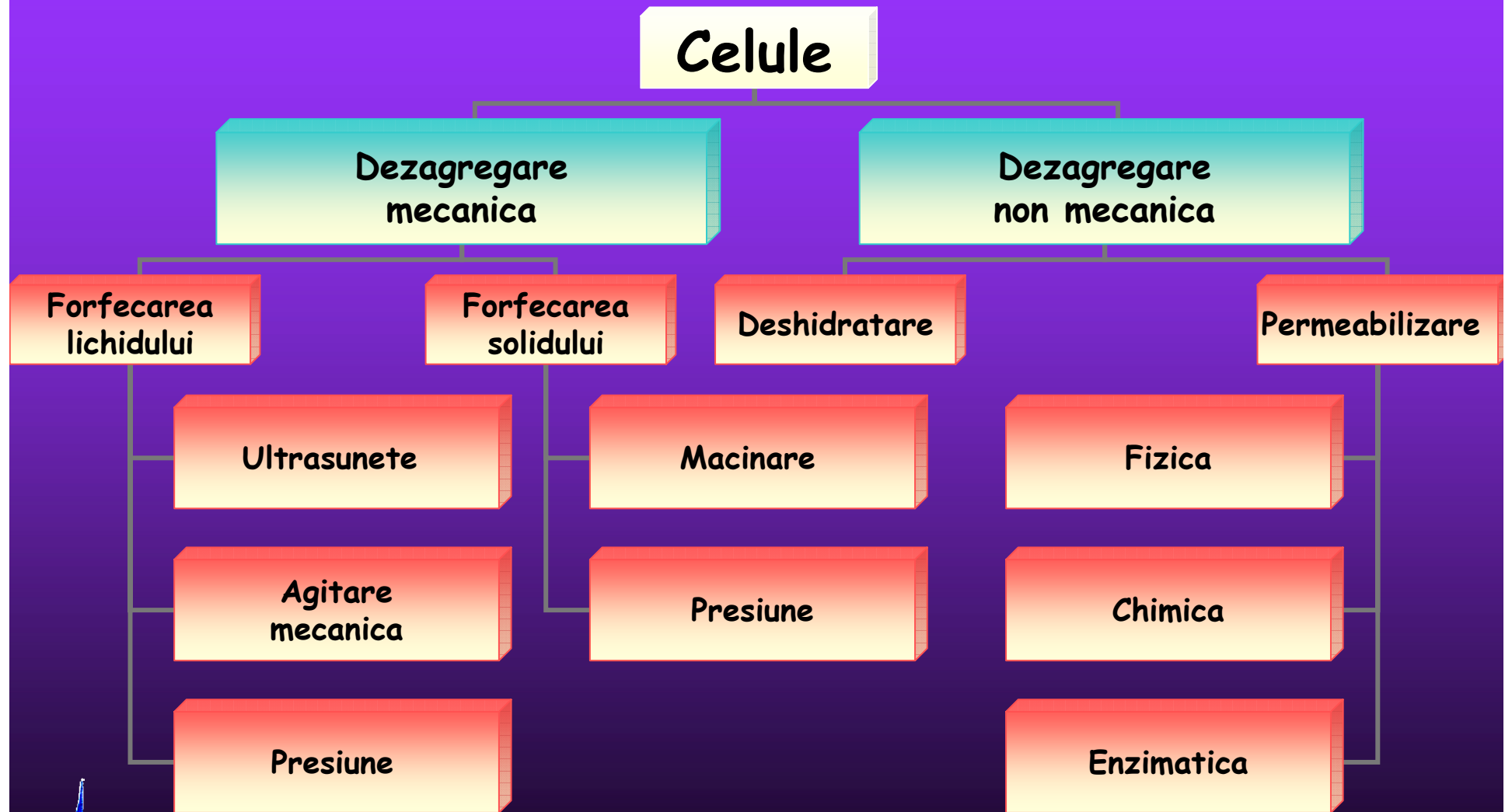
METODE DE DEZAGREGARE A CELULELOR



Dezagregarea mecanică și permeabilizarea nemecanică a celulelor



Clasificarea metodelor de dezagregare a celulelor



Metode mecanice de dezagregare a celulelor și țesuturilor

- Larg utilizate:
 - productivitate ridicată,
 - eficiența sporită.
- **Principiul metodelor:**
 - aplicarea unor tensiuni de forfecare ridicate:
 - lichidului în care este dispersată masa celulară,
 - masei celulare însăși.
- Întrucât o parte din energia mecanică introdusă în sistem este disipată sub formă de căldură, trebuie asigurată o răcire corespunzătoare a masei celulare pentru a evita degradarea produselor datorită încălzirii excesive.



Forfecarea lichidului cu ajutorul ultrasunetelor

- US cu $\nu = 20 - 50$ kHz aplicate solutiilor produc "cavitatia sonora". Bulele de gaz care colapseaza produc o unda de soc care conduce la dezagregarea celulelor;
- Bune rezultate la culturile microbiene;
- Dezagregarea depinde de alegerea corespunzatoare a:
 - pH-ului,
 - temperaturii,
 - tarii ionice a mediului.



Forfecarea lichidului cu ajutorul ultrasunetelor

- Unde de înaltă frecvență sunt generate electronic, iar energia mecanică este transmisă lichidului prin intermediul unei sonde metalice care oscilează cu aceeași frecvență.



Forfecarea lichidului cu ajutorul ultrasunetelor

- **Sonda** este plasată în **recipientul** care conține masa celulară, iar oscilațiile de înaltă frecvență produc o presiune înaltă localizată care conduce la cavitație și impact.
- Unda de șoc formată conduce la dezagregarea celulelor.



Forfecarea lichidului cu ajutorul ultrasunetelor

- eliberarea proteinelor pare a fi proportionala cu consumul de putere si independenta de conc. celulelor;
- dezagregarea celulelor crește exponențial cu timpul de expunere la ultrasunete;
- cinetica procesului este descrisă de ecuația:

$$1 - X = \exp(-kt)$$

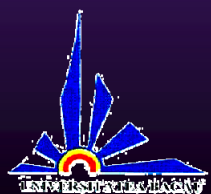
$$k \propto (W - W_0)^{0,9}$$

- t = timpul de ultrasonare,
- X = fracția de proteine eliberate,
- W = puterea acustică,
- W_0 = puterea de cavitație.



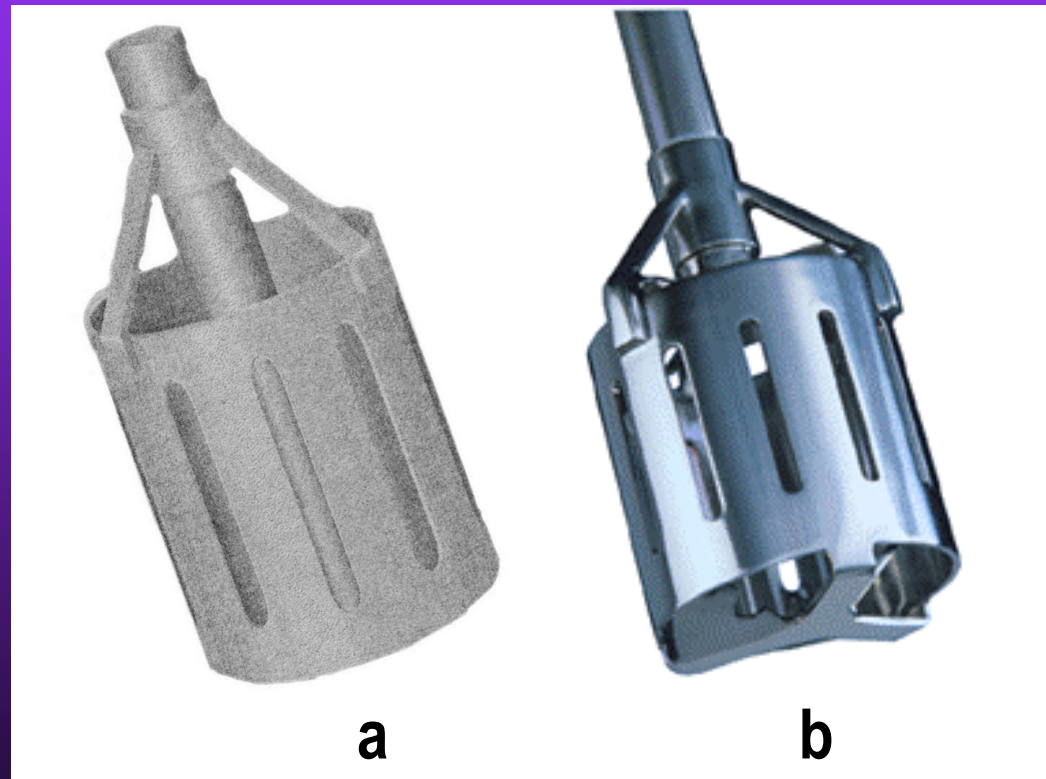
Forfecarea lichidului cu ajutorul ultrasunetelor

- Generarea de căldură provoacă degradarea proteinelor;
 - nu se recomandă folosirea pastelor celulare cu conc. > 200 g/L,
 - ultrasonarea se face în etape de max. 30 de secunde, concomitent cu menținerea pe gheață a pastei celulare.
- Alte dezavantaje:
 - nivel ridicat de zgomot în timpul procesării (este necesară protecția auditivă a personalului),
 - randament variabil,
 - generarea de radicali liberi care pot reacționa cu alte molecule,
 - consumurilor energetice ridicate,
 - ultrasunetele pot provoca denaturarea proteinelor și enzimelor.
- Deși procesul se poate realiza în regim continuu, aplicabilitatea la scară industrială este limitată.



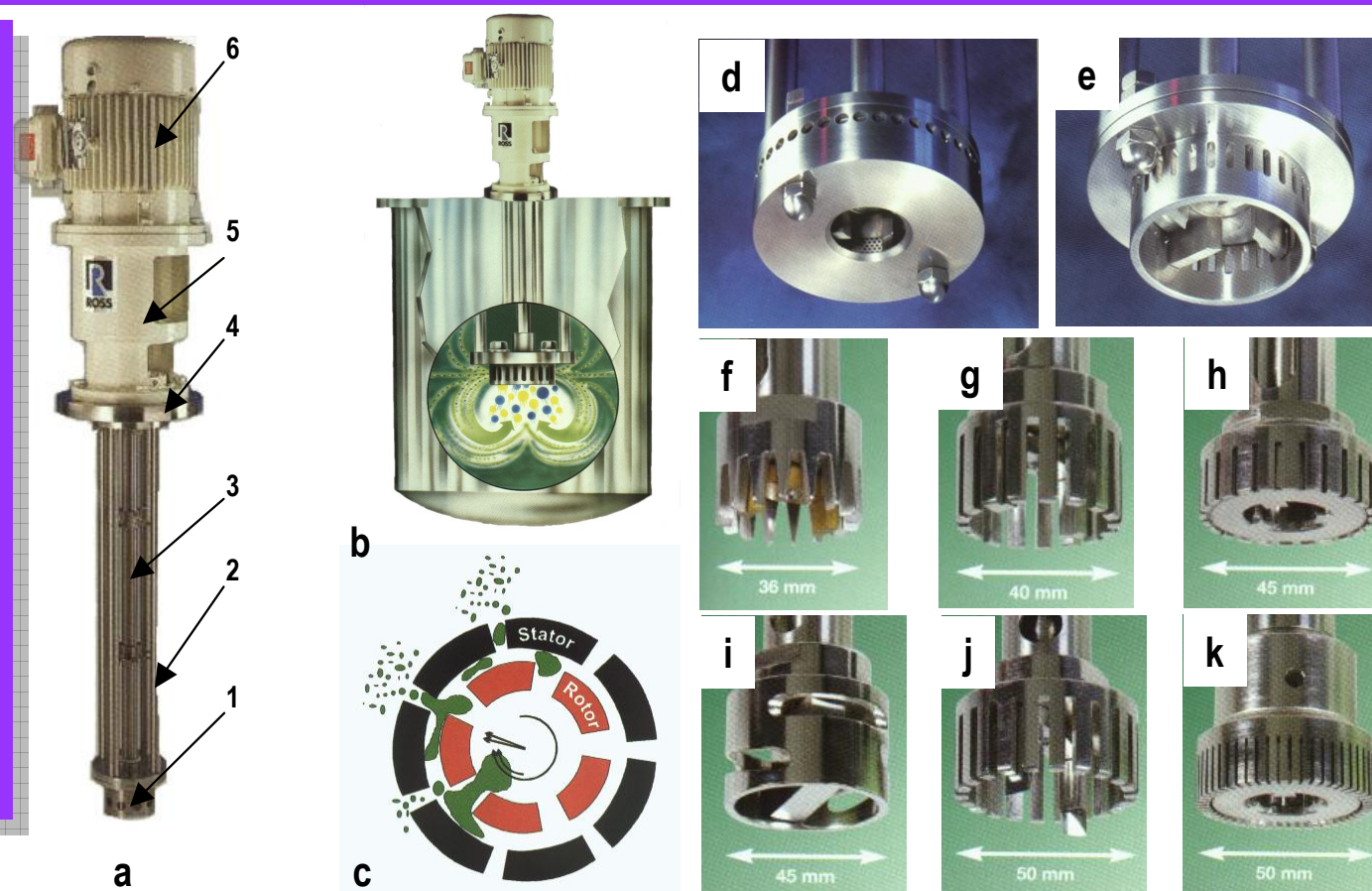
Forfecarea lichidului prin agitare mecanică

- Se utilizeaza mixere si blendere de diverse constructii, diferentiat pentru:
 - Tesuturi "moi":
 - Ficat
 - Creier
 - Glande endocrine
 - Tesuturi "tari":
 - Muschi
 - Inima



Forfecarea lichidului prin agitare mecanică

Amestecătoarele cu ansamblu rotor-stator = altă posibilitate de a provoca în lichid tensiuni de forfecare mari.

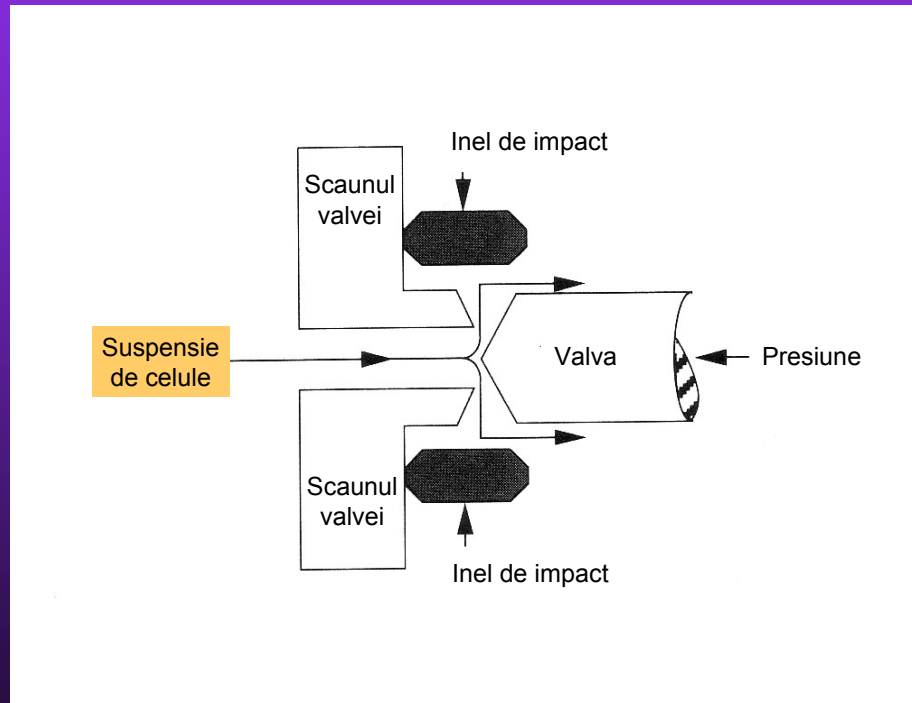


Agitatoare cu rotor și stator: a - vedere generală (1 - ansamblu rotor - stator; 2 - tije susținere stator; 3 - ax rotor; 4 - flanșă de prindere pe recipient; 5 - cuplaj; 6 - motor de antrenare rotor); b - spectru de curgere în zona agitatorului; c - principiu de funcționare; d ... k - tipuri constructive de ansambluri rotor - stator.



Forfecarea lichidului prin presurizare

- Trecerea suspensiei de masă celulară la presiuni de 50 - 200 MPa printr-o valvă cu un orificiu îngust, urmată de o depresurizare bruscă, care induce în lichid o tensiune de forfecare capabilă de a distruge celulele.
- În plus, la ieșirea din valvă, celulele întâlnesc un inel de impact.
- Prin lovirea acestuia, precum și datorită schimbărilor bruște de direcție la trecerea prin valvă se completează procesul de dezagregare.



Forfecarea lichidului prin presurizare

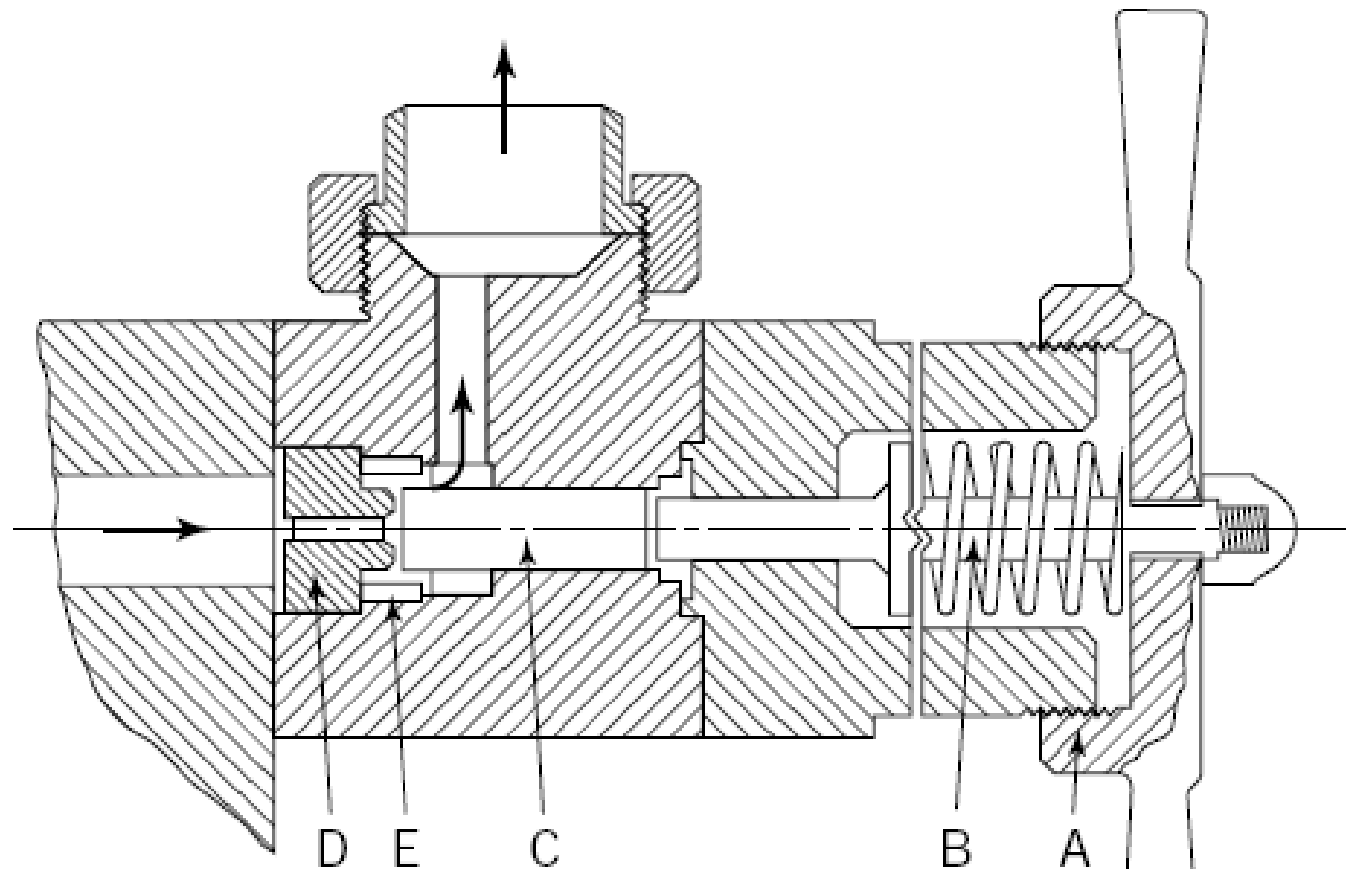
- Utilaje bazate pe astfel de dispozitive sunt utilizate pentru dezagregarea celulelor la scară industrială.
- Aceste utilaje sunt cunoscute sub diferite denumiri:
 - omogenizator de înaltă presiune,
 - omogenizator Manton-Gaulin,
 - presă franceză.



Forfecarea lichidului prin presurizare

Valvă de descărcare:

A – dispozitiv manual de reglare a presiunii de descărcare;
B – resort;
C – valva;
D – scaunul valvei;
E – inel de impact.



Forfecarea lichidului prin presurizare

- Eficiența dezagregării depinde de:
 - presiunea de operare
 - numărul de treceri al masei celulare prin aparat
 - configurația valvelor
 - natura microorganismelor supuse dezagregării
 - compoziția mediului pe care au fost cultivate microorganismele



Forfecarea lichidului prin presurizare

- Ecuatia care leaga gradul de dezagregare al celulelor de parametrii de operare in "presa franceza":

$$\ln\left(\frac{R_m}{R_m - R}\right) = \ln\left(\frac{1}{1 - X}\right) = k \cdot N \cdot P^\alpha$$

3.3.

- R_m - cant. max. de proteina care poate fi eliberata;
- R - cant. de proteina eliberata dupa N treceri prin aparat;
- k - constanta de viteza dependenta de temp.;
- P - presiunea de lucru;
- α - exponent care reda rezistenta la dezintegrare a celulelor, dependent de tipul de organism si de conditiile de multiplicare ($\alpha = 2,9$ pt. *Saccharomyces Cerevisiae*;
 $\alpha = 2,2$ pt. *Escherichia Coli*)



Forfecarea lichidului prin presurizare

- O analiză bazată pe teoria turbulenței propune ecuația:

$$R = 1 - \exp \left\{ - \left[\frac{P - P_0}{z} \right]^\beta \right\}$$

3.4.

- R = cantitatea de proteină eliberată,
- P = presiunea de lucru,
- P_0 = presiunea de referință,
- z = constantă,
- β = parametru care depinde de concentrația celulelor



Forfecarea lichidului prin presurizare

- Pentru dezagregarea *E. coli* într-un omogenizator de tip Microfluidizer:

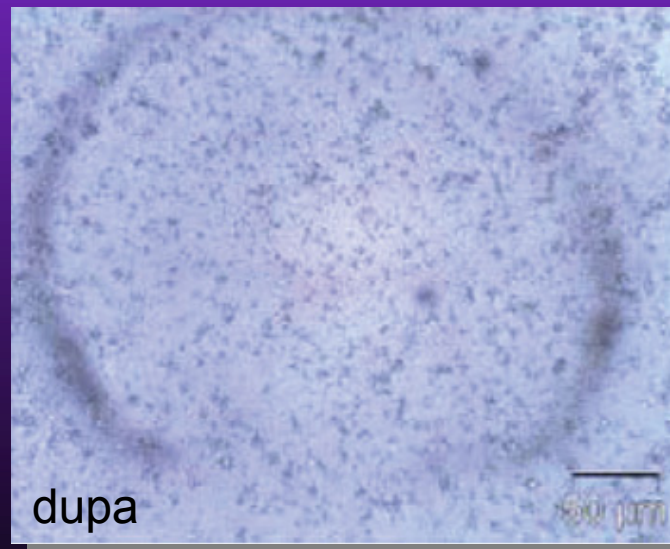
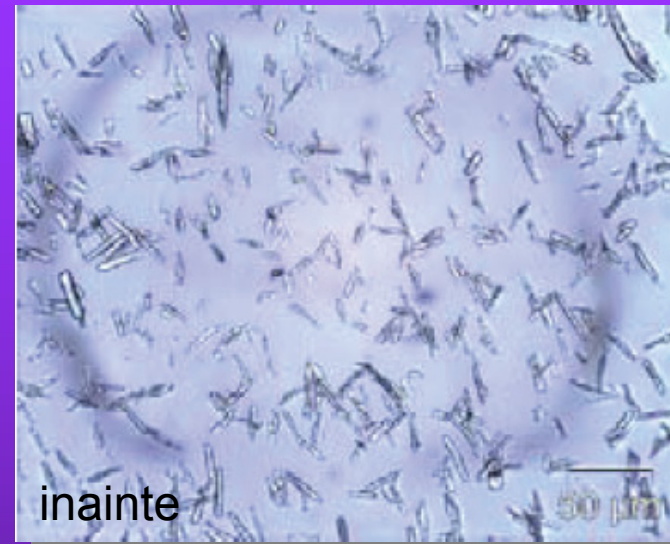
$$\ln\left(\frac{1}{1-X}\right) = k \cdot N^b \cdot P^\alpha$$

3.5.

- b - depinde de concentrația celulelor și de viteza specifică de creștere a acestora



Omogenizator de înaltă presiune tip Microfluidizer



Forfecarea lichidului prin presurizare

- Ecuațiile 3.3 – 3.5 includ câte un termen care indică o dependență exponențială a gradului de dezagregare de temperatură.
- La fiecare creștere cu 10 MPa a ΔP , T crește cu 2 – 3 °C,
- Creșterea temperaturii:
 - favorizează dezagregarea celulelor,
 - conduce la denaturarea produselor.
- Suspensia celulară trebuie răcită înainte și după trecerea prin omogenizator și nu trebuie lăsată să depășească temperatura de 30 °C.
- Răcirea se poate realiza:
 - cu azot răcit în prealabil,
 - prin injectare de dioxid de carbon în interiorul valvei.

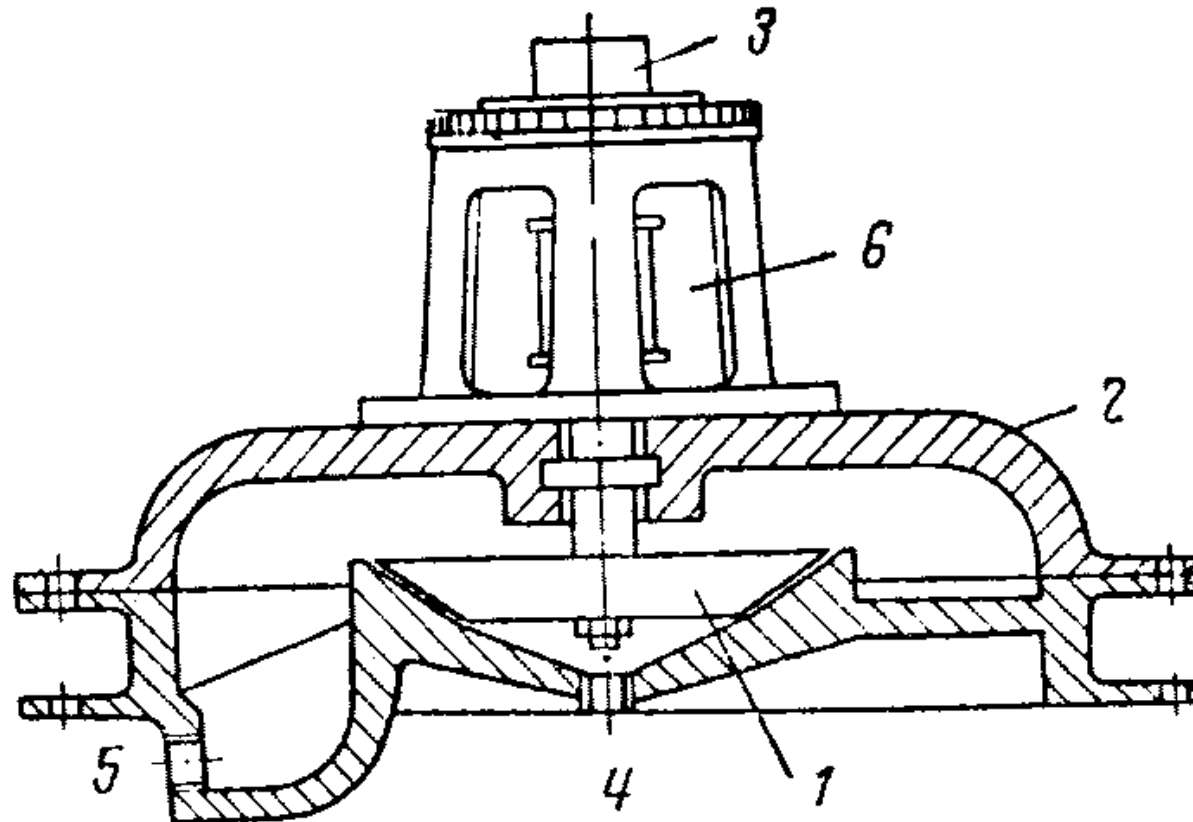


Forfecarea lichidului prin presurizare

- **Moara coloidala**
- similara dpdv constructiv amestecătoarelor cu ansamblu rotor - stator montate în flux.
- cantitatea de fluid reținută în zona de lucru este mai mare,
- în fluid se introduce mai multă energie per trecere.
- sunt prevăzute cu un dispozitiv care permite reglarea distanței dintre rotor și stator, permițând astfel un control îmbunătățit al vitezelor de forfecare și al timpului de retenție a materialului prelucrat în moară.



Forfecarea lichidului prin presurizare



Moara coloidala verticală Premier:

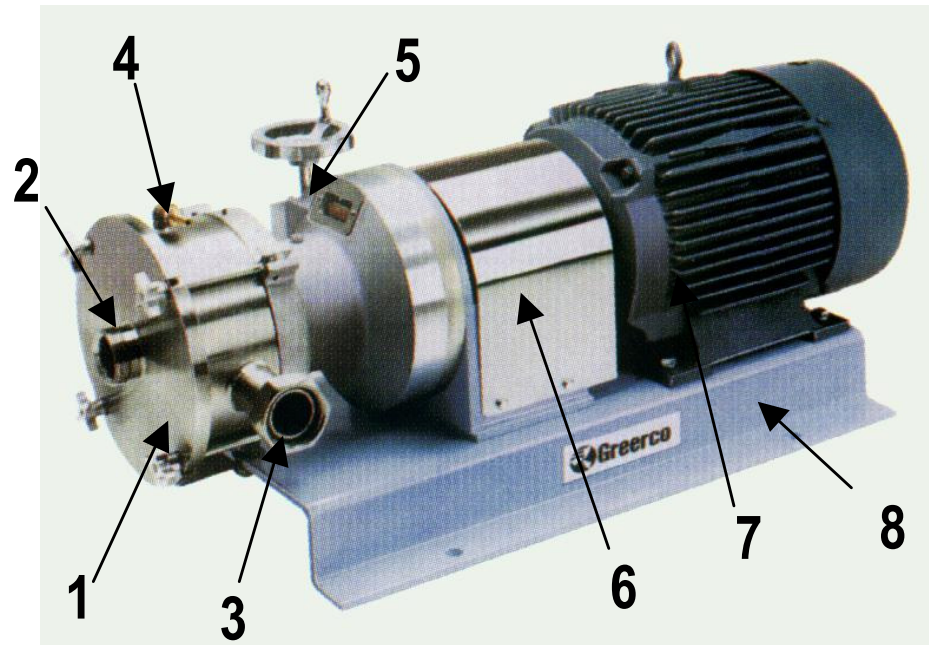
1 - rotor; 2 - carcasă; 3 - șurub reglare distanță rotor - carcasă; 4 - alimentare; 5 - evacuare; 6 - roată de transmisie.

Caracteristicile morilor coloidale Premier

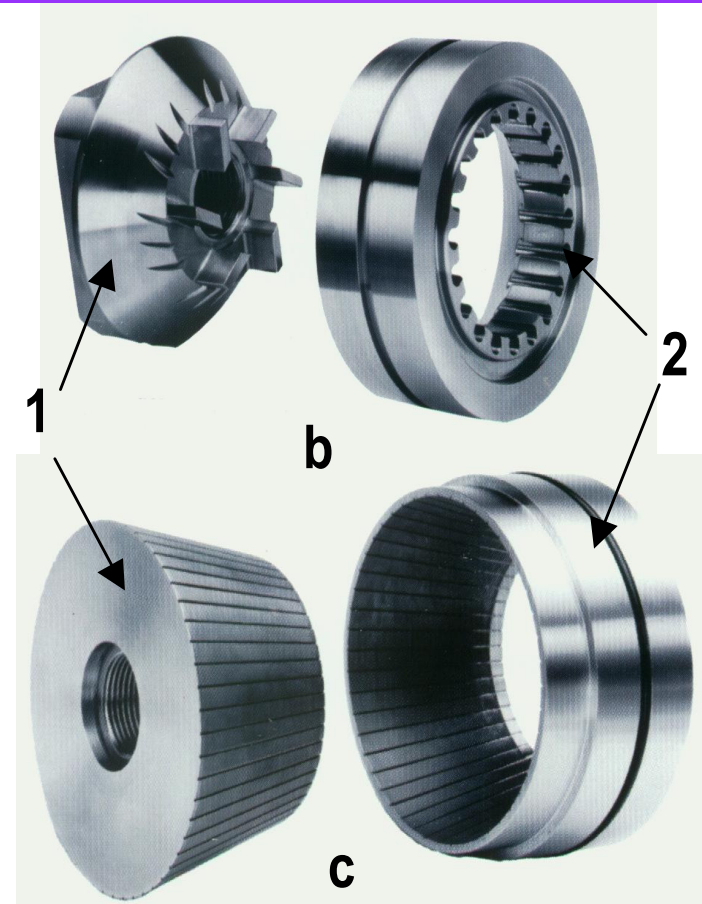
Caracteristica	Mori	
	industriale	mici
Diametru maxim rotor [mm]	150 - 400	75 - 100
Turație rotor [rot/min]	3600	7200 - 17000
Debit de material prelucrat [m ³ /h]	max. 6,8	0,023 - 0,70
Putere necesară [kW]	max. 75	-
Distanța minimă rotor - carcasă [mm]	0,04 - 1,0	



Moara coloidală W250HB (Chemineer, Inc.)



a

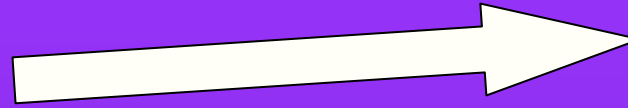


c

a - vedere de ansamblu: 1 - carcasa; 2 - alimentare; 3 - evacuare; 4 - racord pentru spălare; 5 - dispozitiv pentru reglarea distanței rotor-stator; 6 - cuplaj; 7 - motor de antrenare; 8 - batiu; b - ansamblu rotor (1) - stator (2) standard; c - ansamblu rotor (1) - stator (2) cu caneluri.

Forfecarea fazei solide prin macinare

- In mojar cu pistil:
 - Operatie manuala, laborioasa;
 - Uneori se adauga la biomaterial alumina sau nisip, pentru facilitarea eliberarii componentelor intracelulare.
- In flacoane continand abrazivi, supuse scuturarii
- In mori cu bile



Forfecarea fazei solide prin macinare

- Metoda cea mai convenabilă (laborator, pilot, industrială): **măcinarea în mori cu bile.**
- Procedul = amestecarea la turații ridicate a suspensiei de biomasă cu bile confecționate din diferite materiale;
- Distrugerea celulelor este cauzată de:
 - forțele de forfecare mari,
 - coliziunea celulelor cu:
 - corpurile de măcinare;
 - pereții morii.



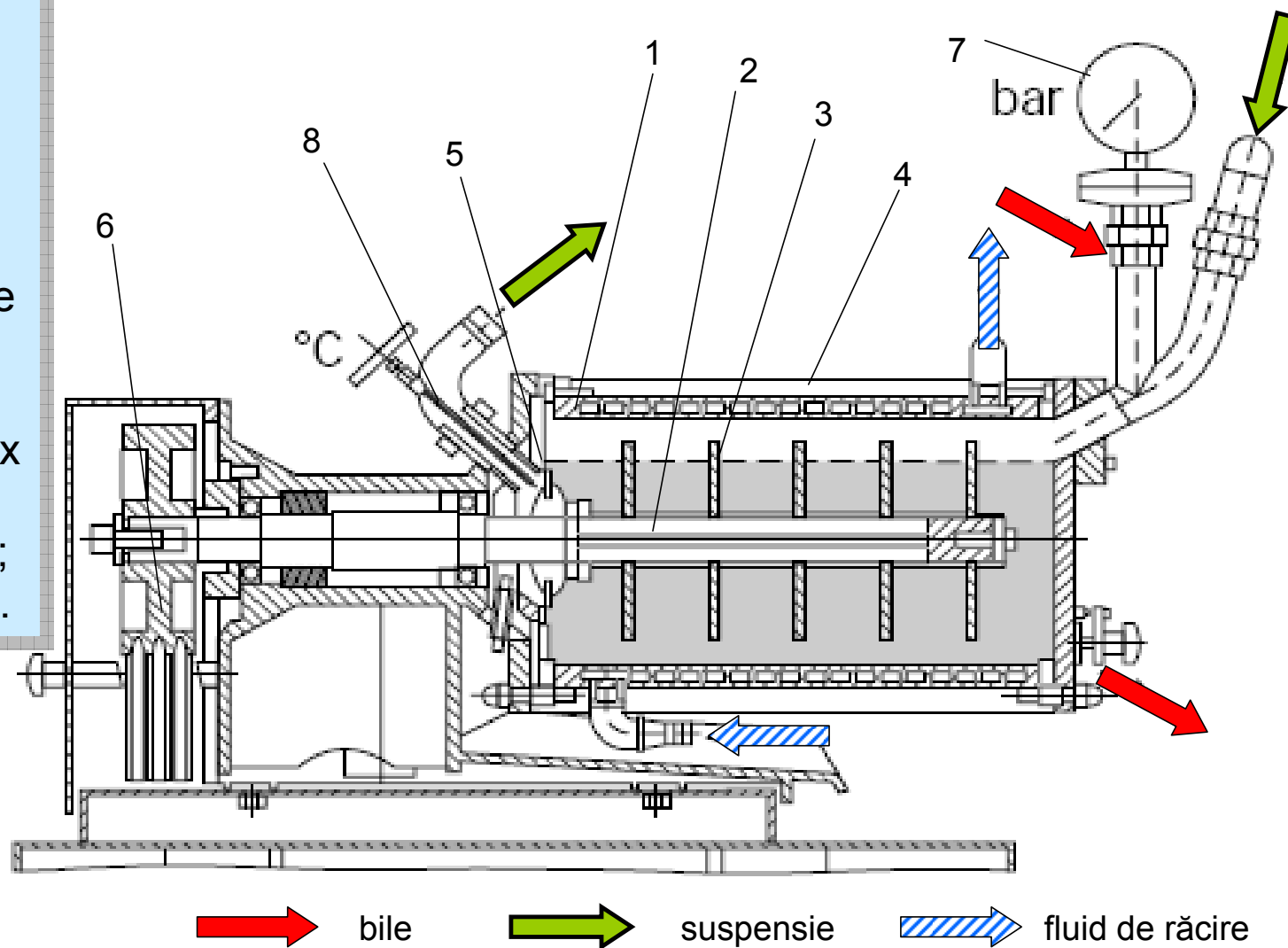
Forfecarea fazei solide prin macinare

- Morile cu bile sunt disponibile în diferite configurații și capacități:
 - mori discontinue de laborator cu capacitate de 40 mL,
 - mori continue:
 - până la 200 kg/h suspensii de drojdii;
 - până la 20 kg/h suspensii de masă celulară bacteriană.



Moară cu bile Dyno-Mill

- 1 – carcasa cilindrică;
- 2 – ax agitator;
- 3 – discuri;
- 4 – manta de răcire;
- 5 – dispozitiv de reținere a bilelor;
- 6 – antrenare ax agitator;
- 7 – manometru;
- 8 – termometru.



Mori cu bile

- O moară cu bile este alcătuită dintr-o carcasă cilindrică orizontală sau verticală, în interiorul căreia se învâрте un agitator cu discuri dispuse concentric sau excentric.
- În carcasa în care s-au introdus în prealabil corpurile de măcinare (bilele), se introduce sub presiune pasta de celule care se supune dezagregării.
- Evacuarea pastei de celule se face printr-un dispozitiv prevăzut cu site, site vibratoare sau disc rotativ, cu rolul de a reține bilele în utilaj.
- Pentru prevenirea degradării termice a masei celulare, carcasa morii este prevăzută cu o manta prin care circulă un agent de răcire.

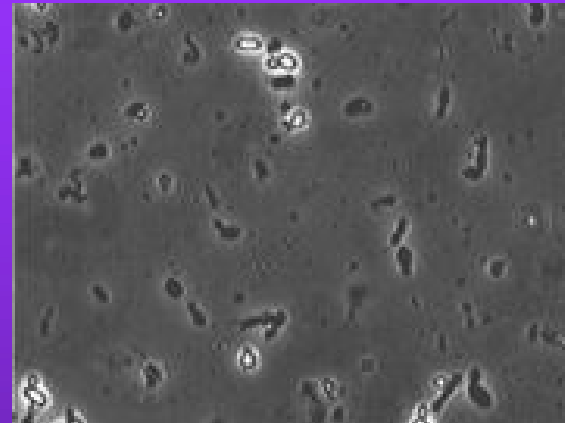
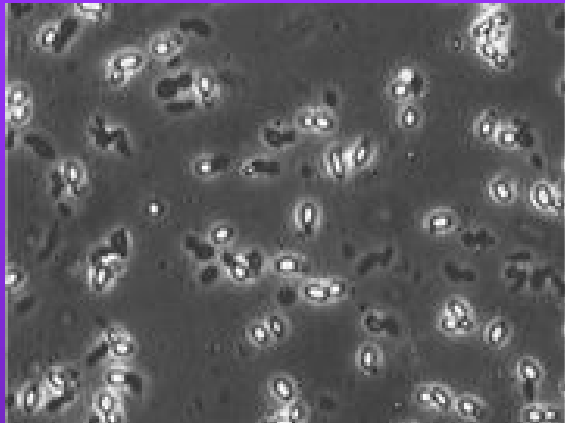
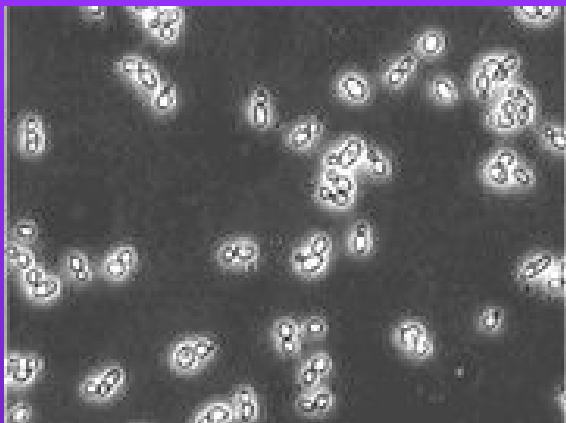


Mori cu bile

- Bilele pot fi confecționate din: sticlă, metal, ceramică.
- Există anumite restricții de folosire. De exemplu, în industria alimentară și farmaceutică nu este permisă utilizarea bilelor din sticlă cu conținut de plumb.
- Prezența bilelor este esențială: în absența lor dezagregarea celulară nu are loc.



Mori cu bile



Măcinare timp de 10 min într-o moară fara bile; celulele de drojdie rămân intacte (petele luminoase)

După 5 min de măcinare cu bile din sticlă cu $\varnothing = 0,4$ mm, circa 30% din celule sunt dezagregate (petele întunecate).

După 10 min de măcinare, aproape toate celulele au fost dezintegrate



Mori cu bile

- Pentru ca o moară cu bile să fie eficientă, aceasta trebuie să realizeze:
 - un grad de dezagregare celulară cât mai ridicat,
 - cu un consum minim de energie.
- Acești doi parametrii cheie ai morilor cu bile sunt influențați de un număr foarte mare de factori, atât constructivi, cât și funcționali.



Mori cu bile

- Gradul de dezagregare depinde de:
 - caracteristicile constructive ale morii:
 - volumul și geometria camerei de măcinare,
 - numărul de discuri pe unitatea de volum de moară,
 - geometria și materialul de construcție al discurilor.
 - parametrii de operare ai morii:
 - viteza agitatorului,
 - concentrația masei celulare,
 - mărimea bilelor,
 - concentrația bilelor,
 - temperatura și debitul suspensiei.



Mori cu bile

- Mecanismul dezagregării - foarte complex:
 - Relatii de calc. grad de dezagregare la operare
 - în regim discontinuu,
 - operarea continuă - curgere cu deplasare totală:

$$\ln\left(\frac{R_m}{R_m - R}\right) = \ln\left(\frac{1}{1 - X}\right) = k \cdot t \quad (3.6)$$

- operarea continuă tinand cont de un anumit grad de amestecare inversă:

$$\frac{R_m}{R_m - R} = \frac{1}{1 - X} = 1 + \left(\frac{k \cdot \theta}{n}\right)^n \quad (3.7)$$



Mori cu bile

- R_m = cantitatea maximă de proteină care poate fi eliberată din celulă,
- R = cantitatea de proteină eliberată în timpul t ,
- $X = R/R_m$ = fracția de celule dezagregate (conversia, gradul de dezintegrare),
- k = viteza specifică a procesului de dezagregare celulară,
- $\theta = V/Q$ = timpul mediu de staționare,
- V = volumul liber total al camerei de măcinare,
- Q = debitul suspensiei de celule prin moară



Mori cu bile – parametri optimi de operare

- viteza agitatorului = 5 - 15 m/s
- concentrația masei celulare = 40 - 50% (masă umedă)
- mărimea bilelor =
 - 0,2 mm în aplicațiile de laborator
 - 0,4 mm în aplicațiile industriale în regim continuu
- fracția volumică a bilelor = 80 - 90%
- temperatura = 5 - 40 °C
- debitul suspensiei = se recomandă operarea morilor cu bile la debite mari, scăderea conversiei putând fi contracarată prin recircularea parțială a suspensiei prin camera de măcinare



Mori cu bile – consumuri energetice specifice

Microorganism	Grad de dezintegrare [%]	Concentrația biomasei [% s.u.]	Consum energetic specific [J/g]
<i>Saccharomices cerevisiae</i>	40	13,5	180
	42	13,5	800
	65	13,5	430
	80	6,0	1960
	80	11,0	900
	80	16,0	900
	85	10 – 20	930
	95	17,0	720 – 790
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	95	17,0	720 – 790
<i>Candida utilis</i>	85 – 90	17,0	930 – 1190



Forfecarea fazei solide prin presurizare

- Implica extruderea la presiune ridicata (pana la 550 MPa) a unei paste de celule inghetate printr-un orificiu ingust;
- Fortele de forfecare si proprietatile abrazive ale cristalelor de gheata distrug celulele
- Metoda excelenta pentru obtinerea proteinelor intracelulare din bacterii
- Este influentata de catre:
 - temp.,
 - tipul si conc. pastelor celulare

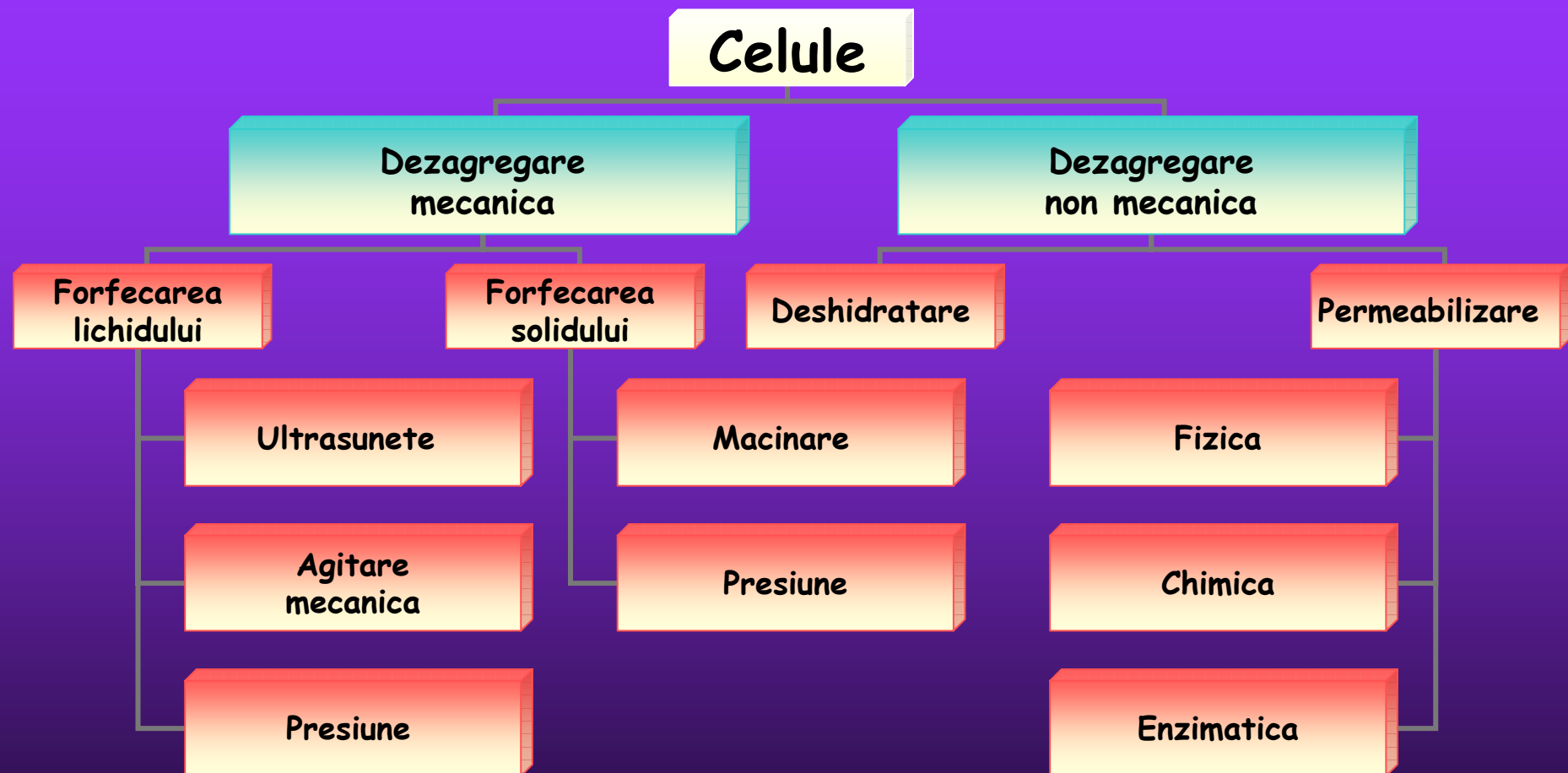


Forfecarea fazei solide prin presurizare

- Pentru realizarea practică a procesului sunt cunoscute două dispozitive care generează presiuni de 150 - 230 MPa :
 - presa Hughes:
 - poate fi utilizată doar la scară de laborator în regim discontinuu
 - presa X:
 - poate fi operată semicontinuu și se pretează la transpunere la scară pentru nivele pilot și industriale



Metode nemecanice de dezagregare a celulelor și țesuturilor



Metode nemecanice de dezagregare a celulelor și țesuturilor

- Metodele nemecanice nu distrug complet peretele celular, ci doar îl permeabilizează, permițând difuzia în exteriorul celulei a anumitor componente.
- Deși metodele nemecanice au consumuri energetice inferioare metodelor mecanice de dezagregare a masei celulare, majoritatea lor sunt dezvoltate și aplicate la nivel de laborator sau, cel mult, de pilot.



Dezagregarea celulelor prin deshidratare

- Îndepărtarea apei din celulă provoacă deteriorarea membranei citoplasmice, crescându-i astfel permeabilitatea.
- Deshidratarea se poate realiza prin:
 - liofilizare,
 - uscare prin pulverizare,
 - uscare în aer,
 - uscare sub vacuum.
- Îndepărtarea apei se poate realiza și prin adăugarea la materialul celular a unui solvent cu afinitate mare pentru apă: etanol, metanol sau acetonă.
- Deshidratarea prezintă dezavantajul că poate cauza denaturarea unor molecule proteice sau a altor componenți intracelulari utili.



Permeabilizarea celulelor prin metode fizice

- Metodele fizice de permeabilizare au o eficiență relativ redusă, chiar după un număr mare de cicluri.
- Principalele metode utilizate sunt:
 - tratarea termică,
 - înghețarea - dezghețarea,
 - decompresia explozivă,
 - șocul osmotic.



Permeabilizarea celulelor prin metode fizice

- Tratarea termică este utilizabilă doar în cazul produselor rezistente la temperatură, de exemplu în extracția enzimelor termostabile din bacterii.
- Viteza autolizei scade cu temperatura, în funcție și de tipul de organism utilizat.



Permeabilizarea celulelor prin metode fizice

- Înghețarea - dezghețarea este o tehnică în care suspensia de celule este înghețată într-o baie răcită cu un amestec de CO_2 solid (zăpadă carbonică) și etanol, iar apoi este dezghețată la temperatura camerei.
- Prin repetarea ciclului membranele celulare sunt distruse de către cristalele gheață care încep să crească din interiorul celulei.
- Durata procesului este destul de mare, iar unii componenți intracelulari pot fi sensibili la astfel de tratamente.
- Procedul poate fi aplicat anumitor celule microbiene și eucariote din care se eliberează proteinele periplasmice și intracelulare.
- Procesul este influențat de:
 - natura celulelor,
 - temperatura finală de congelare,
 - viteza proceselor de încălzire și de răcire.
- Multe organisme sunt rezistente la un astfel de tratament datorită acumulării intracelulare a unor compuși care previn înghețarea.



Permeabilizarea celulelor prin metode fizice

- Decompresia explozivă („bomba celulară”) necesită mai întâi saturarea masei celulare cu azot sau alt gaz inert.
- Procesul decurge la presiuni ridicate, de până la 175 MPa.
- Prin depresurizare bruscă, gazul dizolvat în interiorul celulelor este eliberat rapid, bulele de gaz formate provocând ruperea pereților celulari și a membranelor.
- Pentru a preveni denaturarea proteinelor spumarea trebuie redusă la minimum.
- Procesul poate fi aplicat doar celulelor ușor de dezagregat, cum sunt celulele animale.
- *E. coli*, drojdiile, fungiile și sporii nu pot fi dezagregate corespunzător prin această metodă.



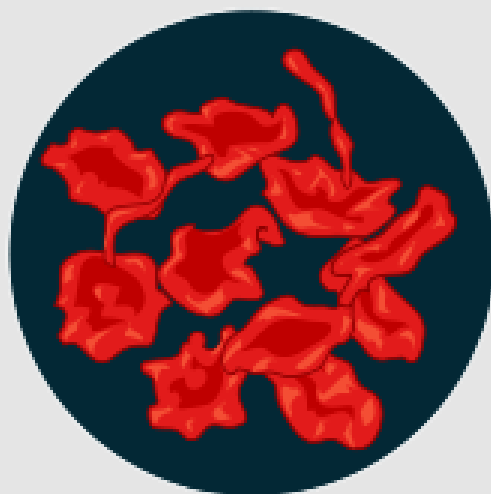
Permeabilizarea celulelor prin metode fizice

- Șocul osmotic apare ca urmare a modificării rapide a concentrației sărurilor din mediu.
- Mecanismul distrugerii = capacitatea celulelor de a echilibra rapid concentrația lor internă cu cea a mediului extern, prin osmoză.
- Deși insuficient pentru distrugerea celulei, șocul osmotic
 - poate elibera anumite proteine,
 - poate fi o metodă de intensificare a procesului de autoliză.

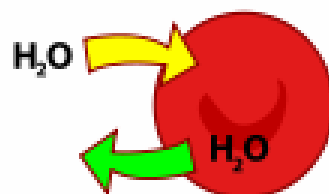
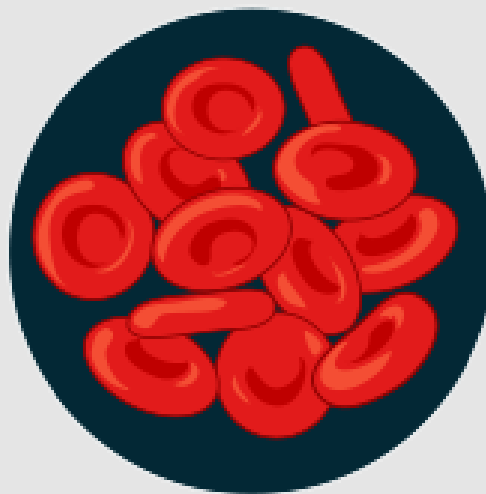


Şocul osmotic

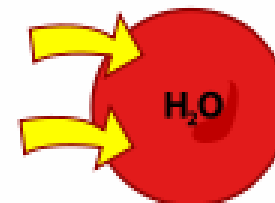
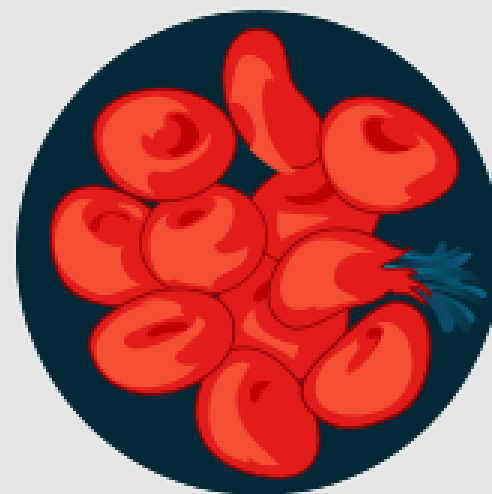
Hypertonic



Isotonic



Hypotonic



Permeabilizarea celulelor prin metode fizice

- De exemplu, celulele sunt incubate timp de 30 min într-o soluție cu presiune osmotică ridicată (20% zaharoză, de. ex.), după care sunt centrifugate și resuspendate în apă.
- Pătrunderea rapidă a apei în celulă (pentru echilibrarea concentrației interne de zaharoză - 20% cu cea externă - 0%) produce o presiune hidrostatică (șoc osmotic) care produce liza celulară.
- Metoda este utilizabilă pentru celule vegetale, animale, precum și pentru unele bacterii Gram negative.



Permeabilizarea celulelor prin metode chimice

- Permeabilizarea sau liza chimică este utilizată:
 - pentru distrugerea pereților celulari,
 - pentru extracția unor componenți intracelulari.
- Principalul dezavantaj: introducerea în sistem a unor substanțe care ulterior trebuie îndepărtate, mărindu-se astfel costurile de producție.
- Alt dezavantaj: timpul îndelungat necesar realizării procesului.



Permeabilizarea celulelor prin metode chimice

- Tratarea cu solvenți organici (toluen, eter, fenil-etil alcool, dimetilsulfoxid, metanol, etc.) conduce la formarea de canale prin membrana celulară.
- O parte din acești solvenți pot crea probleme la separarea produselor eliberate, iar unii dintre ei sunt toxici.



Permeabilizarea celulelor prin metode chimice

- **Compușii tensioactivi:**
 - detergenți ionici - dodecilsulfat de sodiu
 - detergenți neionici - Triton X-100
- sunt eficienți pentru eliberarea enzimelor legate de membrana celulară.
- Acțiunea detergenților este puternic influențată de pH și de temperatură.
- Detergenții ionici sunt mai eficienți, însă pot determina și denaturarea moleculelor proteice eliberate.
- Alte dezavantaje: spumarea, precipitarea, costul ridicat al detergenților neionici, dificultatea îndepărtării din produsul final.



Permeabilizarea celulelor prin metode chimice

- Bazele - pot fi utilizate ca agenți ieftini de extragere a enzimelor intracelulare stabile la $\text{pH} > 11$, fără distrugerea peretelui celular.
- Metoda poate fi utilizată și la scară industrială.
- O pretratare alcalină a celulelor slăbește rezistența peretelui celular, facilitând dezagregarea mecanică cu consumuri energetice mai reduse.



Permeabilizarea celulelor prin metode chimice

- Acizii - realizează cel mai rapid hidroliza componentilor care alcătuiesc pereții celulari (6 - 12 h).
- Deși randamentele hidrolizei acide sunt ridicate, se produc pierderi în proteine, vitamine și compuși aromatici.



Permeabilizarea celulelor prin metode chimice

- Alți compuși utilizați în liza chimică:
 - sărurile,
 - zaharurile,
 - esterii acetici,
- compuși care induc plasmoliza, extrăgând materialul intracelular, în general fără denaturarea acestuia.
- Antibioticele pot fi de asemenea utilizate pentru distrugerea membranei celulare a unor microorganisme.



Permeabilizarea celulelor prin metode chimice

- În general, atunci când se urmărește transpunerea la scară a procesului de dezagregare celulară, **adăugarea de agenți chimici trebuie evitată**, în special în producția substanțelor proteice, în principal pentru a nu încărca excesiv costurile, atât cu chimicalele propriu-zise, cât și cu cheltuielile de îndepărtare a acestora.



Permeabilizarea celulelor prin metode enzimatiche

- Distrugerea enzimatică a pereților celulari - tehnică din ce în ce mai atractivă,
- Avantaje:
 - selectivitate ridicată pentru un anumit produs (cu efecte benefice în izolarea și purificarea produsului);
 - o viteză ridicată și un randament crescut în produsul eliberat;
 - deteriorare minimă a produsului eliberat;
 - posibilitatea utilizării unor condiții blânde de temperatură și pH;
 - absența producerii de resturi celulare.



Permeabilizarea celulelor prin metode enzimatic

- Aplicarea lizei enzimatic necesită:
 - selectarea enzimei sau sistemului enzimatic care să corespundă scopului propus;
 - stabilirea condițiilor în care liza este eficientă.
- Nici o enzimă nu este capabilă să degradeze complet pereții celulari, datorită compoziției complexe a acestora.
 - În cazul bacteriilor gram-pozitive, o singură enzimă poate liza celula, dar un amestec de enzime (glucozidaze și peptidaze) acționând sinergetic pot ajuta liza peptidogluconului.
 - În cazul bacteriilor gram-negative este necesară o pretratare cu un agent tensioactiv pentru îndepărtarea membranei exterioare.



Enzime importante în degradarea pereților celulelor microbiene

Organismul	Enzima
Bacterii	Glicozidaze
	Acetilmuramoil-L-alanil amidaze
	Peptidaze
Fungii, drojdii	β -(1,3)-glucanaze
	β -(1,6)-glucanaze
	Mananaze
	Chitinaze
Alge	Proteaze
	Celulaze



Permeabilizarea celulelor prin metode enzimatiche

- Principala constrângere în utilizarea lizei enzimatiche: **costul ridicat al enzimelor litice.**
- Singura enzimă litică disponibilă la scară comercială: lizozima extrasă din albușul ouălor de găină.
- O altă problemă - **impurificarea produsului.**
 - De ex., enzimele derivate din ouă pot provoca probleme dacă urme din acestea rămân în prod. terapeutice, știut fiind faptul că unele persoane sunt alergice la ouă.
- Enzimele extrase din drojdii sau din sistemul digestiv al gasteropodelor nu pot fi utilizate în procese transpuse la scară întrucât sunt **amestecuri de enzime.**
- Impurificarea produsului ar putea fi evitată prin folosirea de **enzime litice imobilizate** pe un suport macromolecular.



Permeabilizarea celulelor prin metode enzimatice

- Caz particular al lizei enzimatice = **autoliza**, proces în care celulele își produc singure enzimele litice.
- Autoliza - proces foarte lent, (zile) - inconvenient major.
 - Autoliza drojdiilor, proces realizat la scară industrială pentru obținerea autolizatelor de drojdie, necesită 12 - 24 h la 45 - 50 °C
- Procesul poate fi accelerat prin uscarea sau înghețarea - dezghețarea prealabilă a celulelor.
- Procesul de autoliză este influențat și de:
 - valoarea pH-ului,
 - componența și concentrația mediului de cultură,
 - stadiul de dezvoltare a microorganismului.



INFLUENȚA DEZAGREGĂRII ASUPRA PROCESELOR ULTERIOARE DE SEPARARE

- Separarea resturilor celulare este o operație dificilă, datorită dimensiunilor reduse ale particulelor și a viscozității ridicate a sistemului.
- Dezagregarea mecanică sau tratamentele litice produc resturi celulare de dimensiuni uneori sub $0,1 \mu\text{m}$, foarte dificil de separat.
- La astfel de dimensiuni, filtrarea și centrifugarea sunt puțin eficiente.



- **Centrifugarea** - separarea resturilor celulare > 0,5 μm .
 - Sub această valoare, în medii viscoase în special, este necesară o floculare prealabilă a resturilor celulare.
- **Filtrarea cu adjuvant** în filtre celulare rotative este o metodă utilizată pentru separarea resturilor celulare de drojdii.
- **Microfiltrarea în curent încrucișat** are avantajul că previne formarea stratului de precipitat și nu necesită adjuvanți costisitori. Dificultăți majore:
 - murdărirea membranelor
 - apariția polarizării de concentrație,
- **Extracția în sisteme bifazice apoase** - metodă atractivă pentru separarea celulelor și resturilor celulare din soluțiile de proteine:
 - este costisitoare
 - recuperarea reactanților este dificilă.



- Alegerea metodelor de dezagregare, dar și a condițiilor de realizare a dezagregării reprezintă o provocare:
 - cantitatea de proteine intracelulare eliberată crește cu creșterea gradului de mărunțire al resturilor celulare,
 - pe măsură ce dimensiunile resturilor celulare se micșorează, separarea lor devine din ce în ce mai dificilă.
- Particulele submicronice:
 - trec ușor în supernatant după centrifugare,
 - întârzie precipitarea fracționată,
 - au tendința de a colmata coloanele cromatografice sau membranele utilizate în separările ulterioare.

