

EVALUACION DE LA FERMENTACION EN LA PRODUCCION DE TOXINA DIFTERICA

EVALUATION OF THE FERMENTATION IN THE DIPHTHERIC TOXIN PRODUCTION

Gómez¹ A, Granados² J, Algecira³ N, Martínez⁴ R, Rozo⁵ C.

RESUMEN

Se realizaron cultivos de *Corynebacterium diphtheriae* en un biorreactor New Brunswick de cinco litros con el objetivo de hacer un estudio de prefactibilidad tecnológica. Se determinó por fermentación el perfil cinético de: biomasa, consumo de sustrato, producción de toxina, oxígeno disuelto y variación del pH; finalmente se evaluaron los coeficientes tecnológicos de rendimientos: biomasa/sustrato; toxina/sustrato; toxina/biomasa; productividad e intensidad del proceso de producción de toxina diftérica con la tecnología de fermentación. Las condiciones de cultivo fueron: cepa *C. diphtheriae* PW8 79 LA11, medio de cultivo Mueller -Stainer 4L/vaso de 5L, 0,5 % inóculo, 1,7 % de maltosa, 0,3% de fosfatos, 1,25% de cloruro de calcio, incubación a 35C durante 48 horas, agitación de 900 rpm y aireación 1 VVM. En cuanto a los perfiles cinéticos de fermentación se observó que la biomasa tiende a estabilizarse entre las 24 y 36 horas de cultivo y simultáneamente aumenta el consumo de sustrato y la producción de toxina, mientras que el pH aumenta gradualmente durante el tiempo de cultivo. La comparación de los coeficientes tecnológicos obtenidos en fermentación, cultivo agitado en erlermeyer y estático en placas de Povitsky mostró que la fermentación es una alternativa para la producción de toxina diftérica, ya que la productividad aumentó considerablemente debido al corto período de cultivo, pues de 168 horas en cultivo estático se pasa a 48 horas en fermentación.

Palabras claves: Productividad/ factibilidad tecnológica/ biorreactor/toxina diftérica

SUMMARY

This study was developed to find out the technological feasibility of fermentation culture of *Corynebacterium diphtheriae* in a bioreactor for production of diphtheric toxin. The fermentation process was studied in a 5L New Brunswick bioreactor. The following parameters were measured: biomass production, substrate consumption, toxin production, dissolved oxygen and pH variation during fermentation. The following indicators of the fermentation process were calculated: biomass/substrate, toxin/substrate, toxin/biomass, toxin produced/hour (productivity). *C. diphtheriae* PW8 79 LA11 strain was used. The composition of the growth media was: 4L of Muller- Stainer medium, 0,5% inoculum, 1,7% maltose, 0,3% phosphate, 1,25% calcium chloride. The conditions of incubation were: 35C, 48 hours, agitation at 900 rpm and aeration 1 VVM. The results showed that biomass production levels occurred between 24 and 36 hours of fermentation. Substrate consumption, toxin production and a pH increased simultaneously. It was concluded that fermentation is a useful process for the production of diphtheric toxin compared to the traditional static system. Fermentation is easier to control and the same yield of toxin is obtained in 48 hours instead of 168 hours in the static system.

Key words: Productivity/ technological feasibility/ bioreactor/diphtheric toxin

¹ Microbióloga Msc, Instituto Nacional de Salud, Av. El Dorado cra 50, zona 6

² Químico Farmacéutico, Instituto Nacional de Salud, Av. El Dorado cra 50, zona 6

³ Ingeniero Químico, Instituto Nacional de Salud, Av. El Dorado cra 50, zona 6

⁴ Químico Farmacéutico, Instituto Nacional de Salud, Av. El Dorado cra 50, zona 6

⁵ Químico PhD, Instituto Nacional de Salud, Av. El Dorado cra 50, zona 6

INTRODUCCION

La difteria es una enfermedad infecciosa exclusiva del hombre, especialmente de la población infantil, causada por la invasión local de *Corynebacterium diphtheriae* al tejido nasofaríngeo, produciendo una exotoxina (Collier 1975). La difteria es inmunoprevenible gracias a la vacuna existente, se trata del Toxoide Diftérico que se obtiene a partir del cultivo estático (en placas de Povitsky) de *C. diphtheriae*. Después de cosechar, el cultivo se centrifuga y filtra, el filtrado se detoxifica con formol para su conversión a toxoide, el cual conserva el poder antigénico de la toxina original. El producto es luego purificado, concentrado, esterilizado, adsorbido con hidróxido de aluminio y dosificado. El producto terminado cumple con las normas establecidas por la Organización Mundial de la Salud (Germanier 1984; Mendoza 1993; Plotkin et al. 1994).

En Colombia el Instituto Nacional de Salud (INS) lleva a cabo la importante tarea de producir, para el país, las vacunas toxoide diftérico y tetánico (Td) y la triple bacteriana: Difteria, Pertussis y Tétanos (DPT), para lo cual es necesario hacer cultivos de *C. diphtheriae* y obtener a escala industrial toxina diftérica para su posterior detoxificación, teniendo en cuenta la baja capacidad actual de producción es necesario pensar en aumentar la escala de producción, cultivando *C. diphtheriae* por la tecnología de fermentación.

La fermentación en términos de biotecnología es aplicada a cultivos puros bajo un equipo con controles que permita la producción a gran escala. La fermentación es considerada una tecnología fundamental y vital que integra la biotecnología moderna. En vacunas la tecnología de fermentación utiliza procesos continuos o discontinuos cuyas condiciones deben ser diseñadas con el objeto de optimizar la producción celular o de un producto en particular (Ward 1989).

La producción a nivel industrial de toxina diftérica es un proceso complejo y delicado que depende de muchos factores, entre los cuales se destacan principalmente la concentración de hierro y glucosa, rata de crecimiento bacteriano y cepa bacteriana; es importante tener en cuenta que los resultados experimentales pueden variar con el uso de diferentes lotes de medio de cultivo (N-Z Amina) aunque permanezcan iguales todas las demás condiciones de cultivo (Righelato y Van Hemert 1969; Stainer et al. 1968).

En el presente trabajo se hizo un estudio preliminar de prefactibilidad tecnológica para la producción de toxina diftérica por fermentación mediante la evaluación de los coeficientes tecnológicos: biomasa/sustrato; toxina/sustrato; toxina/biomasa; productividad e intensidad del proceso.

MATERIALES Y METODOS

La primera etapa consistió en estandarizar las técnicas de peso seco para la determinación de biomasa y determinación de azúcares totales, expresados como maltosa, por modificación del método colorimétrico de antrona (Montoya 1983). Luego se determinó el perfil cinético de biomasa, consumo de sustrato, producción de toxina, oxígeno disuelto y variación del pH de *C. diphtheriae* cultivado en un biorreactor New Brunswick de cinco litros. Finalmente se compararon los rendimientos del proceso de producción de toxina diftérica en cultivo estático, en cultivo agitado en erlenmeyer y en el fermentador.

Cepa

Corynebacterium diphtheriae PW8 79 LA11. Mantenido liofilizado en ampollitas. La ampollita se reconstituyó con 1,5 mL de medio líquido casamino al 10% y 0,5 mL sembrados en agar Loeffler (tubo inclinado) durante 24 horas a 35°C; el crecimiento fue utilizado como inóculo para la semilla.

Semilla

El cultivo se realizó en 100 mL medio Mueller- Stainer en erlenmeyer de 500 mL con tapón de gasa, se le adicionó 1,7% de solución maltosa monohidrato al 50%, antes de sembrar. El crecimiento del microorganismo en un tubo de agar Loeffler era el inóculo para la semilla. Luego de incubar durante 24 horas a 35°C y a 250 rpm se evaluaba la pureza del cultivo mediante tinción de Gram. Se utilizaron semillas con recuentos de 65 - 70 X 10⁷ UFC/mL. La preparación tanto del medio como de los reactivos aparecen reportadas por Stainer (1968).

Condiciones de cultivo

En fermentación se mantuvieron constantes las siguientes condiciones: 4L medio de cultivo: Muller-Stainer/vaso del fermentador con una capacidad para 5L, el porcentaje de inóculo fue de 0,5% de semilla, la temperatura de incubación de 35°C, tiempo de incubación 48 horas, velocidad de agitación de 900 rpm y aireación: 1 vvm. El equipo utilizado fue Bioflo III Batch/Continuous Fermentor - New Brunswick Scientific.

Antes de sembrar al medio se le adicionó 1,7% de solución de maltosa monohidrato al 50%; solución de fosfatos al 0,3% y solución cloruro de calcio: 1,25% (Bauers y Ziv. 1976; Fass et al. 1989; Mueller y Miller 1940; Plotkin et al. 1994; Righelato y Van Hemer 1969). Una vez estéril el fermentador se hizo la calibración del sensor de oxígeno (según manual del equipo) a 35 °C, se drenó el agua del vaso (con la cual se esterilizó) y se cargó el fermentador con medio y maltosa. Luego se adicionó el cloruro de calcio, se ajustó el pH, alrededor de 7,2, con NaOH 10N, posteriormente se adicionó la solución de fosfatos y se verificó que el pH estuviera en

7,2 ± 0,2, por último se adicionó el inóculo cuando el medio alcanzó los 35°C.

Toma de muestras y análisis

Se tomaron muestras aseptícamente, bajo cabina de flujo laminar con material estéril, en los tiempos establecidos (ver tabla 1). De cada muestra se realizó tinción de Gram para observar la morfología del microorganismo y verificar la pureza del cultivo. Se midió pH, se determinó biomasa, concentración de maltosa y título de toxina. Las muestras se dispensaron en tubos tapa rosca, se centrifugaron a 4000 rpm durante 30 minutos y se congelaron hasta el momento en que se iban a procesar.

Para la cuantificación de toxina se tomó el sobrenadante (toxina) y se procedió a realizar la floculación de Ramon (Carpenter 1965 y WHO. 1985). La cantidad de toxina se expresa en Lf/mL que significa la cantidad de toxina que al ser mezclada con una Unidad Internacional de antitoxina da una floculación de Ramon en el menor tiempo. El tiempo de floculación (en minutos) tomado desde el comienzo de la reacción hasta que aparece el flóculo se denomina Kf.

Curva de peso seco o biomasa seca

La determinación de biomasa por la técnica de peso seco se realizó por diferencia de pesos, utilizando frascos ampolla de vidrio tipo I secos y una suspensión concentrada del microorganismo. Las absorbancias se leyeron a 540 nm. Los valores de absorbancia y de pesos de biomasa seca fueron tabulados, se hizo una regresión lineal, se obtuvo la ecuación de la recta patrón.

Consumo de sustrato

El método de antrona había sido reportado para determinaciones de glucosa (Montoya, 1983) por lo que fue necesario hacer una modificación para determinar la maltosa monohidrato consumida por el microorganismo. La modificación consistió en encontrar la longitud de onda de lectura y ajustar los tiempos de reacción. La longitud de onda fue 625 nm y el tiempo de reacción de 35 minutos.

Las muestras se centrifugaron a 4000 rpm por 30 minutos, se tomó el sobrenadante que era mantenido a -20°C hasta el momento de ser procesado, luego se descongeló y se adicionó ácido perclórico 0,1N volumen a volumen, se dejó en hielo (mínimo 4 horas), las muestras tratadas se centrifugaron a 8000 rpm durante 20 minutos, se hizo dilución del sobrenadante 1/50 con agua destilada y se tomó 1 mL para adicionarle 5 mL de reactivo de antrona, se agitó muy bien y se dejó reaccionando en baño serológico a ebullición durante 35 minutos, a temperatura ambiente se leyó absorbancia a 625 nm.

RESULTADOS

Tabla 1. Resultados promedio de mediciones de ensayos en fermentación.

Muestra No.	Tiempo Incubación (horas)	Morfología	Biomasa g/L	pH	OD (%)	Concentración maltosa g/L	Toxina (Lf/mL)	Kf (minutos)
1	0	-	1,426	7,03	71,4	10,501	ND	
2	6	pequeño	1,724	7,14	60,1	8,014	ND	
3	12	pequeña	2,1585	7,24	55,8	7,972	ND	
4	18	normal	2,4250	7,21	48,2	7,142	ND	
5	24	normal	2,775	7,47	32,6	6,767	ND	
6	30	normal	2,883	7,58	23,3	6,183	5	20
7	36	normal	3,027	7,74	17,1	3,754	15	15
8	42	grande	3,0945	7,76	17,6	1,513	25	15
9	48	grande	3,1340	7,99	29	1,149	65	10

ND : No determinada

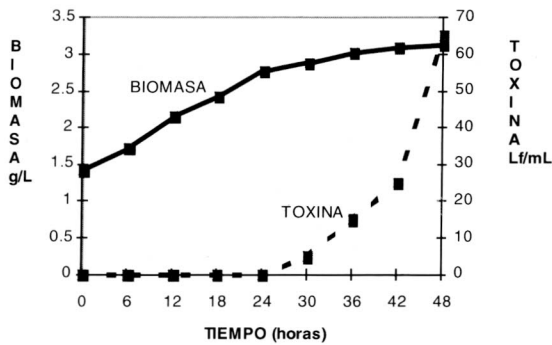
ANALISIS DE RESULTADOS

Al observar los valores de biomasa (Tabla 1) y al realizar la curva de crecimiento se evidencia que no hay un período de adaptación del inóculo, sino que el microorganismo continúa en fase logarítmica, hacia las 36 horas de cultivo comienza la fase estacionaria y así permanece hasta las 48 horas, con lo cual se confirma que la toxina diftérica es un metabolito secundario (Gráfica 1).

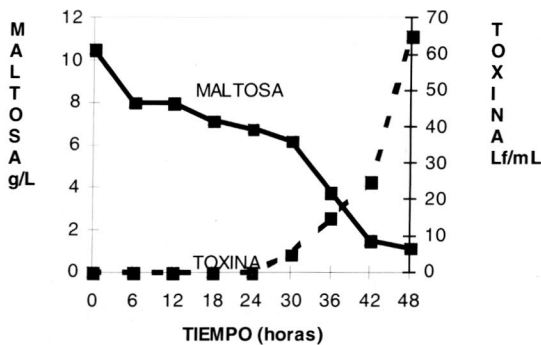
El medio de cultivo Muller-Stainer es un digerido pancreático de caseína al cual debe adicionarse una solución de minerales, vitaminas y fosfatos, solución de L-cistina y como fuente energética se adiciona maltosa monohidrato que es degradada lentamente por el microorganismo evitando la acumulación de ácido láctico, propiónico y acético (Germanier, Rene 1984). El consumo neto de maltosa monohidrato por el microorganismo durante las 48 horas de cultivo fue de 9,352 g/L (Gráfica 2). En el momento en que comenzó la producción de toxina 30 - 36 horas el consumo de maltosa aumentó (Tabla 1).

El pH presenta un aumento gradual que está posiblemente relacionado con el aumento de biomasa en el cultivo (Tabla 1). Se supone que durante el crecimiento hay liberación de amoníaco (NH₃) y otros metabolitos a partir de algunos aminoácidos y la formación gradual de CO₂ y otros ácidos a partir de la maltosa, la cual parece ser oxidada completamente. Si estos dos procesos toman lugar uniformemente hay poco cambio en el pH y por tanto, el resultado es bueno (Mueller 1940). En los resultados obtenidos el pH no se mantuvo constante sino que aumentó lo cual puede significar que la maltosa fue suministrada en cantidad adecuada, disminuyéndose la formación de ácidos, con una continua liberación de amoníaco por parte del microorganismo (Gráfica 3).

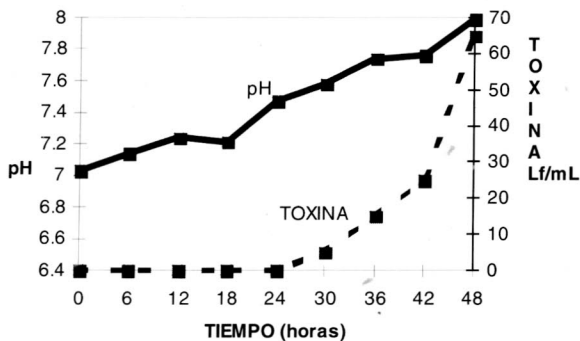
Grafica 1. Perfil Cinético Biomasa - Toxina De *C. diphtheriae* En Fermentacion



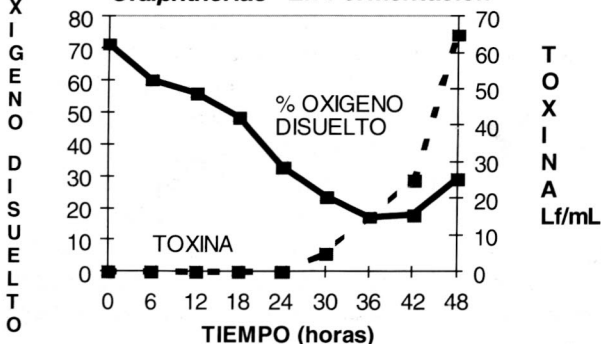
Grafica 2. Perfil Cinético De Sustrato - Toxina De *C. diphtheriae* En Fermentacion



Grafica 3. Perfil Cinético De Ph - Toxina De *C. diphtheriae* En Fermentacion



Grafica 4. Perfil Cinético De Oxígeno Disuelto - Toxina De *C. diphtheriae* En Fermentacion



En cuanto al oxígeno disuelto se observó un mayor descenso entre las 18 y 36 horas (Tabla 1) que corresponde a la etapa final de la fase exponencial y a toda la fase estacionaria, con tendencia a incrementarse hacia el final del cultivo lo cual indica que hacia las 48 horas la actividad microbiana disminuye notablemente (Gráfica 4).

Es interesante destacar el cambio morfológico, especialmente de tamaño, que presenta el microorganismo durante el tiempo de cultivo en el fermentador: en la fase inicial del cultivo y aproximadamente hasta las quince horas es muy pequeño, presentando una morfología similar a la cocobacilar, entre las 18 y 36 horas aumenta de tamaño, mostrando su morfología típica bacilar encurvada, hacia el final del cultivo se observa una morfología degenerada bacilos largos y anchos en los que se observan grandes gránulos metacromáticos. A pesar del cambio morfológico, durante todo el tiempo conserva su arreglo característico en "letras chinas". Figura 1.

Los valores presentados en la Tabla 2 corresponden a los rendimientos: biomasa/toxina, sustrato/biomasa y sustrato/toxina y a los valores de productividad e intensidad del proceso. Los valores de rendimientos tienen dos aplicaciones útiles e importantes: primero, en análisis económicos preliminares al escalado, y segundo, porque suministra las relaciones estequiométricas del proceso, por lo cual se pueden predecir valores finales, aproximados, conociendo los iniciales.

Los resultados de rendimientos muestran que la agitación favorece el rendimiento toxina/biomasa y desfavorece biomasa/sustrato y toxina/sustrato, no por mucha diferencia, lo cual está indicando que en fermentación se consume mayor cantidad de sustrato tanto para la formación de biomasa como para la producción y/o liberación de toxina. Teniendo en cuenta el perfil cinético de biomasa-toxina se puede apreciar que el mayor consumo de sustrato se registra en el momento que se detecta toxina en el medio. Este resultado también lleva a pensar la posibilidad de que el metabolismo microbiano en un cultivo agitado se realiza a mayor velocidad que en estático lo que implica un mayor desgaste energético para la bacteria.

En cuanto a la productividad del proceso de producción de toxina diftérica se encontró que en cultivos realizados en erlemeyer con agitación, la productividad aumentó 3,5 veces con relación a la productividad de los cultivos estáticos. La mayor productividad en cultivo agitado se debe posiblemente a las condiciones homogéneas que ofrece éste sistema.

Al aumentar la escala de trabajo en agitación, empleando el fermentador, la productividad aumentó 12,5 veces con

Tabla 2. Coeficientes tecnológicos evaluados en los sistemas de cultivo de estudio.

COEFICIENTES TECNOLÓGICOS	CULTIVO ESTÁTICO	CULTIVO ERLERMEYER	CULTIVO FERMENTADOR	ECUACION UTILIZADA PARA EL CALCULO DEL COEFICIENTE TECNOLÓGICO
Biomasa/Sustrato (g biomasa/g sustrato)	0,5	0,28	0,19	$\frac{\text{biomasa final} - \text{biomasa inicial}}{\text{sustr. inicial} - \text{sustr. final}}$
Toxina/Sustrato (Lf/g sustrato)	12,20	10,98	7,08	$\frac{\text{toxina final} - \text{toxina inicial}}{\text{sustr. inicial} - \text{sustrat. final}}$
Toxina/Biomasa (Lf/ g biomasa)	24,91	38,56	36,05	$\frac{\text{toxina final} - \text{toxina inicial}}{\text{biomasa final} - \text{biomasa inicial}}$
Productividad (Lf/hora)	120,53	437,5	5416,6	$\frac{\text{tox. final} - \text{tox. inicial} \times \text{volumen}^*}{\text{tiempo de cultivo}}$
Intensidad (Lf/L *hora)	401,8	1458,3	1354,2	$\frac{\text{tox. final} - \text{tox. inicial} \times 1000}{\text{tiempo de cultivo}}$

Las ecuaciones para los cálculos de los coeficientes tecnológicos fueron tomadas de Aldana-Ballén (1996).

*Volumen de trabajo

Observaciones sobre los resultados de la tabla 2:

- Rendimiento biomasa/sustrato: en cultivo estático se produce el doble de biomasa/sustrato que en cultivo agitado, siendo menor la producción de biomasa por fermentación.
- Rendimiento toxina/biomasa: los coeficientes en cultivo agitado son mayores que en cultivo estático, lo cual implica que hay mayor producción de toxina/g de biomasa en cultivo agitado; sin embargo, no es estadísticamente significativa la diferencia entre los tres sistemas evaluados.

respecto a cultivos en erlernmeyer. El aumento en productividad se debe al aumento en el volumen de trabajo ya que la cantidad de toxina producida/mL fue similar en los cultivos de erlernmeyer y fermentador en el mismo tiempo de cultivo.

Comparando cultivo estático con la fermentación en términos de Lf/mL producidas unidad de tiempo se obtienen títulos promedios muy similares en siete y dos días respectivamente (67,5 Lf/mL/ 7 días y 65 Lf/mL/ 2 días). Al escalar y optimizar el proceso de producción de toxina diftérica por fermentación se podrían lograr rendimientos muy ventajosos a nivel industrial.

En cuanto a la productividad e intensidad se puede decir

que estos dos coeficientes tecnológicos se ven favorecidos por la agitación, lo cual se debe en primer lugar, a que el tiempo de cultivo en agitación es de tan sólo 48 horas, mientras que en estático es de 168 horas, y en segundo lugar a que en los tres sistemas de cultivo la producción de toxina es similar. Aparentemente la relación superficie/volumen no afecta la producción de toxina diftérica, los valores de superficie volumen fueron: placa de Povitsky (estático): $9,5 \times 10^{-5} \text{ m}^2/\text{mL}$; erlernmeyer 1L (agitado): $2,6 \times 10^{-5} \text{ m}^2/\text{mL}$ y fermentador $0,53 \times 10^{-5} \text{ m}^2/\text{mL}$.

Durante las 48 horas del proceso de fermentación el cultivo consumió 9,35 g/L de maltosa, con una producción de biomasa y toxina de 1,708 g/L y 65 Lf/mL respectivamente.

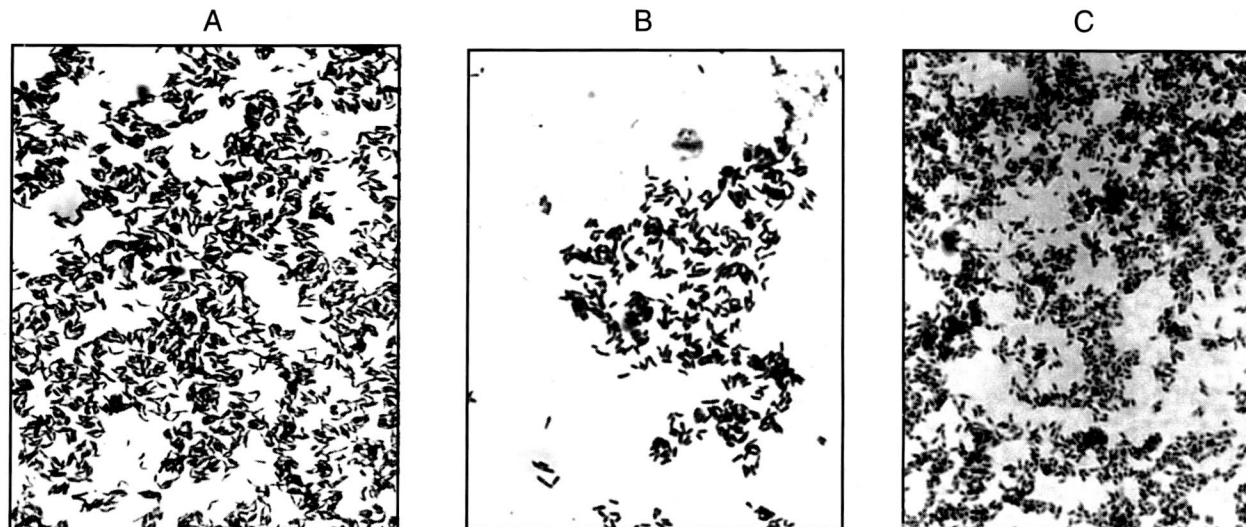


Figura 1. Cambio morfológico de *C. diphtheriae* cultivado por fermentación. a) reportado como morfología pequeña semejante a la cocobacilar; b) reportado como bacilos finos encurvados y de apariencia característica del género y c) reportado como bacilos largos y anchos encurvados, morfología degenerada.

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta el conjunto de coeficientes tecnológicos metabólicos determinados en el estudio resulta evidente que el cultivo de *C. diphtheriae* por fermentación se podría constituir en una alternativa apropiada para la producción industrial de toxina diftérica, porque aunque el consumo de sustrato es superior en la fermentación, que en el estático éste se suministra en la misma cantidad en ambos procesos.

Además por funcionalidad a nivel industrial, el sistema

de fermentación ofrece mayores ventajas: régimen más sencillo y seguro de operación y el corto tiempo de cultivo.

Con estos resultados se establece que el cultivo de *C. diphtheriae* sumergido podría ser una excelente alternativa de producción de toxina diftérica, y teniendo en cuenta que el objetivo es la producción a escala industrial resulta más funcional trabajar con un fermentador que con erlrmeyer. Sin embargo sería relevante continuar con la evaluación de todos los aspectos involucrados en la producción industrial de la toxina por fermentación.

BIBLIOGRAFIA

- Aldana, N.J., Ballen, L.D.** 1996. Estudio preliminar de la influencia de la concentración inicial de *Clostridium tetani* en la producción de toxina tetánica. Universidad Nacional de Colombia. Tesis Facultad de Ingeniería, Departamento de Química. Colombia.
- Bauer, S. Y E., Ziv.** 1976. Dense growth of aerobic bacteria in a bench scale fermentor. *Biotechnol. Bioeng.* 18:81-94.
- Carpenter, Philip L.** 1965. Inmunología y Serología. W.B: Saunders Company. Philadelphia. 285.
- Collier, Jhon.** 1975. Diphtheria Toxin: Mode of Action and Structure. *Bacteriological Reviews*, 39:54-85.
- Fass, R., Clem, T.R. Y Shiloach, J.** 1989. Use of a novel air separation system in a fed-batch fermentative culture of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1305-07.
- Germanier, Rene.** 1984. *Bacterial Vaccines*. Academic Press, Inc. Florida. 5.
- Mendoza, Guillermo.** 1993. *Vademecum*. Instituto Nacional de Salud. Colombia. 17, 211.
- Montoya, Dolly.** 1983. Producción de eritromicina por células de *Streptomyces erythreus* inmovilizadas. Tesis para obtener título Maestro en Ciencias. México D.F. 152.
- Mueller, J.H. Y Miller, P.** 1940. Production of diphtheric toxin of high potency (100 Lf) on a reproducible medium. *J. Immunol.* 40: 21-32.
- Plotkin, Stanley Y Mortimer, Edward.** 1994. *Vaccines*. W.B. Saunders Company. Philadelphia. 41.
- Righelato, R.C. Y Hemert, P. A. Van.** 1969. Growth and toxin synthesis in batch and chemostat cultures of *Corynebacterium diphtheriae*. *J. gen. Microbiol.* 58:404-10.
- Stainer, D.W., Corkill, J.R. Y Scholte, M.J.** 1968. Preparation and properties of diphtheria toxoids in submerged culture. III Development of a new semisynthetic medium. *Canadian J. microbiol.* 14:1155-60.
- Ward, Owen P.** 1989. *Biotecnología de la Fermentación*. Editorial Acribia. México. 13.
- World Health Organization. WHO.** 1985. Manual for the production and control of vaccines: diphtheria toxoid. Ginebra. 1.