

ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN POR FERMENTACIÓN DE TOXINA TETÁNICA STUDY OF THE TETANUS TOXIN PRODUCTION BY FERMENTATION

Quintero J^{1.}, Granados J^{2.}, Buitrago G^{3.}

RESUMEN

El objetivo central de este trabajo consistió en estudiar algunas variables de la fermentación con *Clostridium tetani* para reducir el tiempo de fermentación e incrementar los rendimientos de la producción de toxina tetánica, a partir de las condiciones de producción del Instituto Nacional de Salud (INS). En este trabajo se estudió el efecto de la concentración inicial de glucosa y glutamato en el medio de cultivo, el tiempo de esterilización y la aireación superficial como factores que determinan los niveles de producción de toxina tetánica en cultivos por lotes de *Clostridium tetani*. El efecto de la concentración de glucosa y del tiempo de esterilización se estudiaron simultáneamente en cultivos sin agitación de 200 mL, en los intervalos 0 y 10 g/L, para 10 y 60 minutos respectivamente. Un cultivo desarrollado en un medio con 6 g/L de glucosa y esterilizado por 20 minutos a 121° C, produce la mayor cantidad de toxina respecto a los otros valores evaluados, con un promedio de 85 unidades de opacidad por mililitro (Lf/mL).

Se realizaron fermentaciones en un reactor de tanque agitado de 5 L, variando la concentración inicial de glutamato entre 0 y 16 g/L. Se encontró que este factor no afecta la concentración final de toxina en la fermentación, induce incrementos en la biomasa producida y en la velocidad

específica de crecimiento y reduce el tiempo de fermentación un 41% comparado con cultivos sin glutamato. La aireación superficial se estudió en cultivos con y sin agitación, se observó un aumento cercano al 50% en la producción de toxina en cultivos aireados no agitados, mientras que en cultivos agitados este efecto no fue significativo.

Palabras clave: fermentación, vacuna, glutamato, glucosa, esterilización.

SUMMARY

The main goal of this study was to reduce time and increase yields of the *Clostridium tetani* fermentation. In this work, factors that affect tetanic toxin production such as the initial concentration of glucose and glutamate, fermentation span, sterilization time and the superficial aeration were analysed. Initial glucose concentration and the sterilization time were studied simultaneously in 200 mL cultures without agitation. The initial concentration's values were between zero and 10 g/L and the times between 10 and 60 minutes. Our results showed that cultures growing in medium containing 6g/L of glucose and sterilized by 20

¹ I. Q. Msc. Subdirección Industrial, Instituto Nacional de Salud, Av. Dorado-Cra.50 Can, Santafé de Bogotá D.C, Colombia

² Q. F. Subdirección Industrial, Instituto Nacional de Salud, Santafé de Bogotá D.C, Colombia

³ I.Q. Msc. Instituto de Biotecnología - Universidad Nacional de Colombia, AA 14490, Santafé de Bogotá D.C., Colombia

minutes at 121°C produced the highest toxin amount, with an average of 85 Lf/mL.

To test the effect of the glutamate, fermentations were carried out in a stirred reactor with initial concentrations between zero and 16 g/L. Our data suggested that glutamate does not affect the yield of the toxin. However, it did increase biomass production and the rate of growth. Therefore, the fermentation span with the glutamate decreased in 41% compared with the fermentation without it. We used cultures with and without shaking to evaluate the superficial aeration. The production of the toxin increased 50% in aerated cultures without shaking while it was not affected in cultures with shaking.

Key words: fermentation, vaccine, glutamate, glucose, sterilization.

INTRODUCCIÓN

La necesidad de satisfacer la demanda de vacuna antitetánica en Colombia cumpliendo con las Buenas Prácticas de Manufactura, impone la necesidad de mejorar la productividad y la tecnología de la fermentación del *Clostridium tetani* para la producción de toxina tetánica. El *Clostridium tetani* es el agente causal del tétanos, enfermedad que desde la antigüedad ha cobrado víctimas por infecciones producidas en heridas que favorecen la germinación de la espora del microorganismo, el cual produce una potente toxina.

Según Reyes (1986), alrededor del siglo XIV ya existían informes en Europa de la existencia de la enfermedad. En 1885 Nicolaier descubrió que la enfermedad era causada por el *Cl. tetani*. En 1889 Faber demostró que una toxina era la sustancia que producía la enfermedad y ese mismo año, Behring y Kitasato descubrieron la antitoxina tetánica en el suero de animales inmunes a la enfermedad. En 1920 Descomby preparó un toxoide tetánico (toxina tratada con formaldehído y calor) y demostró que podía estimular la formación de anticuerpos en animales de experimentación.

Mueller y colaboradores (1940) informaron sobre la producción de toxina tetánica por fermentación del *Cl. tetani* en un medio semi-sintético con extracto de carne y un digerido de caseína. Latham y colaboradores (1962), modificaron el medio desarrollado por Mueller eliminando el extracto de carne.

Durante las décadas del 40 al 60 muchos investigadores

se dedicaron a identificar los factores más importantes en el crecimiento y producción de toxina del *Cl. tetani*, y a experimentar diferentes técnicas de fermentación (Thomson, 1957; Hepple, 1965; Nielsen, 1965; Zacharias, 1968). Mueller (1948) realizó ensayos en tubos de laboratorio con cultivos aireados y sin aireación, e informó un incremento en la producción de toxina en los cultivos aireados, posiblemente debido a una mejor eliminación de los gases inhibitorios producidos por el metabolismo del microorganismo (H_2S , NH_3 , principalmente). Mueller (1945), Lettl (1964), Hepple (1965) entre otros, indicaron que posiblemente existe la formación de un complejo entre la glucosa y la cistina, durante el proceso de esterilización por calor, que actúa como inductor en la formación de toxina. Por otra parte, Mellamby (1968) informó que el glutamato acelera el crecimiento del *Cl. tetani*, pero la producción de toxina disminuye substancialmente.

Desde finales de los 60s se presenta una disminución de las publicaciones asociadas a la producción por fermentación del toxoide tetánico, solo algunos países como México, Brasil, Venezuela y ahora Colombia, están haciendo estudios de manera aislada para mejorar sus procesos. (Milá de la Roca et al, 1978; Fratelli et al, 1993; Prado et al, 1993; Ballén, 1995).

En este trabajo se evaluaron y validaron algunos de los anteriores resultados y se estudió el comportamiento del cultivo en un reactor de tanque agitado de 5 litros, para complementar las bases tecnológicas e implementar un nuevo proceso de producción de toxina tetánica por fermentación a escala industrial, en el laboratorio de tétanos del Instituto Nacional de Salud, en Santafé de Bogotá, Colombia. Se evaluó el efecto de la glucosa, el glutamato, la aireación superficial y el tiempo de esterilización sobre la producción de toxina tetánica en cultivos del *Cl. tetani*, buscando generar información que incremente los rendimientos en la fermentación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se empleó la cepa de *Clostridium tetani* Massachusset segundo pase liofilizada y mantenida a 4°C. El inóculo se desarrolló en medio tioglicolato fluido (Merck) y en la fase experimental se empleó el medio Mueller modificado por Latham (1962), denominado medio L-M.

La biomasa se determinó de manera indirecta leyendo la densidad óptica a una longitud de onda de 540 nm de una suspensión de células, empleando un espectrofotómetro (Génesis 5-Milton Roy). La concentración de biomasa en g/L de peso seco se calcula mediante la ecuación de calibración obtenida correlacionando valores experimentales de suspensiones celulares a diferentes concentraciones:

Biomasa (g/L) = 0.414 (absorbancia) - 0.0031.

La glucosa se determinó siguiendo la técnica colorimétrica para azúcares reductores que emplea el ácido dinitrosalicílico (DNS) desarrollada por Miller (1959). La densidad óptica se lee a 540 nm y la concentración de glucosa en g/L se determina según la ecuación de calibración: Concentración de glucosa (g/L) = 1.925 (absorbancia) - 0.0496, obtenida por correlación de datos experimentales y correspondientes a tres réplicas con soluciones patrón.

La toxina tetánica medida en Lf¹/mL se determinó por la técnica de floculación de Ramón descrita en el manual de W.H.O. (1978). Se realizó un análisis de muestras por quintuplicado, encontrándose un error de 7.4% que será extensible a todas las determinaciones.

El inoculo corresponde a un cultivo de *Cl. tetani* en medio tioglicolato incubado a 35°C por 24 hr; el volumen de inoculo empleado fue del 1% del total del cultivo para cada ensayo (Ballén, 1995).

Con el fin de tener un patrón de comparación con los experimentos planteados, se hicieron evaluaciones preliminares, por quintuplicado, del comportamiento cinético de la biomasa, pH, toxina y glucosa en los cultivos de producción del Instituto Nacional de Salud, realizados en jarros de vidrio con 10 litros de medio de cultivo L-M y sin agitación.

Para la determinación del efecto de la glucosa y el tiempo de esterilización sobre la producción de toxina, los ensayos se realizaron por duplicado, en frascos de vidrio de 250 mL con un volumen de trabajo de 200 mL. Las concentraciones de glucosa fueron: 0, 2, 4, 6, 8 y 10 g/L, y para el tiempo de esterilización se evaluaron 10, 20, 40 y 60 minutos, siendo la temperatura de esterilización 121°C.

Para evaluar el efecto de la aireación superficial se desarrollaron cultivos sin agitación a diferentes escalas de trabajo: 60 mL, 3L, 9L y 60L, estableciendo la producción de toxina en cultivos sin aireación superficial y en cultivos con aireación superficial a una relación constante de 1/9 min.⁻¹ (flujo de aire / volumen de cultivo).

Los ensayos para estudiar el efecto del glutamato se realizaron por duplicado en un fermentador agitado de 5L a 100 r.p.m. (New Brunswick, Bioflo IIc). Las concentraciones de glutamato estudiadas fueron: 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 8.0 y 16.0 g/L.

RESULTADOS

La Figura 1 muestra la cinética de fermentación del *Cl. tetani* en los recipientes de cultivo de 10 litros empleados actualmente en la producción de la toxina tetánica en el INS. El *Cl. tetani* presenta una curva de crecimiento de tipo diáuxico, observándose disminución en la

concentración de glucosa en el segundo período de crecimiento, lo que puede indicar que el microorganismo tiene la información necesaria para producir enzimas glucolíticas, pero posiblemente su síntesis se vea reprimida por un nutriente más fácilmente degradable, el cual soportaría la primera etapa de crecimiento. Dicho fenómeno es conocido como «represión catabólica».

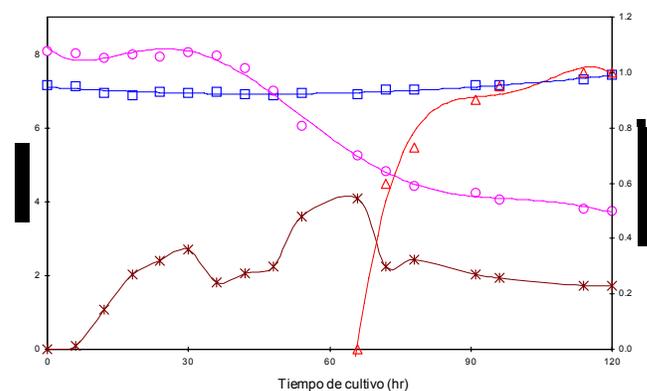


Figura 1. Cinética de fermentación del *Cl. tetani* en jarros de producción. (□) pH; (○) glucosa g/L; (Δ) toxina Lf/mL; (*) biomasa g/L

En la primera etapa de crecimiento el microorganismo degrada aminoácidos como glutamato o histidina, presentes en el digerido de caseína, como se ha sugerido en la literatura (Barker, 1981; Bergey's Manual, 1984). El pH del medio varía muy poco a lo largo de la fermentación, desde 7.1 en promedio luego de la esterilización hasta aproximadamente 6.6 cerca de las 50 horas, lo que coincide con el final de la primera etapa de crecimiento, en la cual posiblemente se consume algún aminoácido presente en el sustrato, de cuya degradación se producen ácidos débiles como acético y butírico. Posteriormente el pH aumenta lentamente para llegar cerca de 7.3 a las 120 horas. La toxina tetánica se detecta en el medio partir las 65 horas de cultivo, momento en que se inicia la lisis celular y la segunda etapa de crecimiento; en esta se observa un rápido aumento en la concentración de la toxina que se libera por efecto de la lisis. La producción de toxina es de 100 Lf/mL.

Efecto de la glucosa y el tiempo de esterilización: En la Figura 2 se observa que para un nivel constante del tiempo de esterilización, al aumentar la concentración de glucosa la producción de toxina aumenta hasta un máximo en 85 Lf/mL con 6 g/L de glucosa; para valores mayores del carbohidrato, la producción de toxina comienza a disminuir. Al aumentar el tiempo

¹ Lf (Límite de floculación), cantidad de toxina o toxoide que mezclada con una 1 UI (Unidad Internacional: Actividad específica de una cantidad establecida de un estándar internacional, definido por el Comité de Expertos en Estandarización Biológica de la Organización Mundial de la Salud), de floculación (antitoxina) produce un floculo en el menor tiempo.

de esterilización se observa un incremento en los niveles de producción de toxina alcanzándose el máximo con 20 minutos de esterilización, siendo menores los rendimientos para tiempos de esterilización de 10, 40 y 60 minutos.

El aumento en la producción de toxina que se observa en la Figura 2 se debe posiblemente al efecto de interacción glucosa-cistina que se hace más importante con el aumento en la concentración de glucosa; el descenso en la producción de toxina en los ensayos con concentraciones de glucosa de 8 y 10 g/L, puede deberse a inhibición por sustrato. Se observa un comportamiento similar en cuanto al efecto del tiempo de esterilización, por debajo de 20 minutos se presenta una baja producción de toxina debido principalmente a una leve interacción glucosa - cistina, por el corto tiempo de esterilización, cuando el tiempo de esterilización es mayor de 20 minutos, para esta escala de trabajo, los sustratos se degradan térmicamente y la producción también se ve afectada.

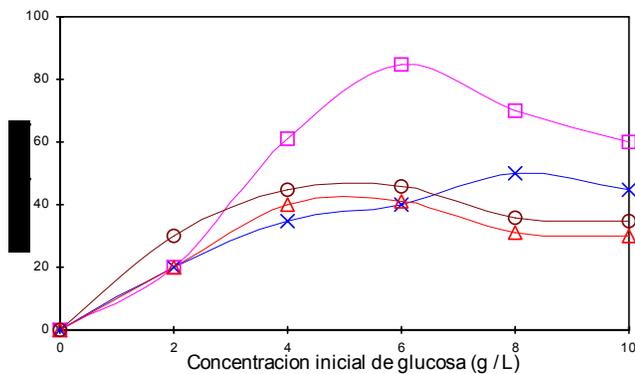


Figura 2. Efecto de la glucosa y el tiempo de esterilización en la producción de toxina del *Cl. tetani*.

Tiempo de esterilización: (*) 10; (□) 20; (Δ) 40; (O) 60 minutos.

Con las mejores condiciones encontradas en este estudio, concentración de glucosa (4, 6 y 8 g/L) y tiempo de esterilización (20, 40, 60 minutos) se desarrolló un modelo matemático para la producción de toxina tetánica (Y) en Lf/mL, como función de la concentración inicial de glucosa (X1) en g/L y el tiempo de esterilización (X2) en minutos (ecuación 1), con un error máximo de predicción del 7% respecto a los valores experimentales. En la Tabla I se muestran los resultados correspondientes al modelo y a las observaciones experimentales.

$$Y = 50 - 2.5 (X_1 - 6)^2 - (X_2 - 40) + 0.05 (X_2 - 40)^2 - 0.094 (X_2 - 40) [(X_1 - 6) - (X_1 - 6)^2] 6.667 \quad (\text{ec.1})$$

Este modelo representa el comportamiento a la

escala que se trabajó, y es útil para diseñar experimentos de cambio de escala, determinando valores de estas variables que permitan incrementar los rendimientos en la producción de toxina.

Tabla 1. Comparación de los resultados observados y del modelo en el estudio del efecto de la glucosa y el tiempo de esterilización sobre la producción de toxina tetánica.

Glucosa g/L	T. esterl. min.	Valor observado Lf/mL	Valor predicho Lf/mL	Residuo Lf/mL
4	20	63	62.0	1.0
4	40	40	33.3	6.7
4	60	45	44.6	0.4
6	20	85	83.3	1.7
6	40	40	43.3	-3.3
6	60	45	43.3	1.7
8	20	68	69.6	-1.6
8	40	30	33.3	3.3
8	60	35	37.1	2.1

Efecto de la aireación superficial: El efecto de la aireación superficial sobre la producción de toxina tetánica se muestra en la Figura 3 para diferentes escalas de trabajo en cultivos sin agitación. En los cultivos aireados se observa un incremento del 50% en la producción de toxina respecto de los cultivos no aireados, puesto que el flujo de gas limpia la superficie del líquido constantemente, así se incrementará la desorción de los gases. Por otro lado, la facilidad de desorción depende del área superficial del líquido. La Figura 3 muestra este efecto como la relación volumen de cultivo/área superficial del mismo con respecto a la producción de toxina. Para los cultivos de 3, 9 y 60 litros, la producción de toxina decrece cuando esta relación se incrementa.

El efecto de la aireación fue evaluado en el fermentador agitado de 5 litros; en este caso no se observó una diferencia significativa en los valores de producción de toxina con y sin aireación superficial. Esto sugiere que la agitación favorece la salida de los gases del medio de cultivo de manera tan eficiente como la aireación superficial. Este resultado posiblemente no se mantendrá para cultivos a gran escala, pues como se sabe el nivel de agitación debe disminuir; por tanto a mayores escalas será necesario utilizar los beneficios de la agitación y la aireación superficial simultáneamente.

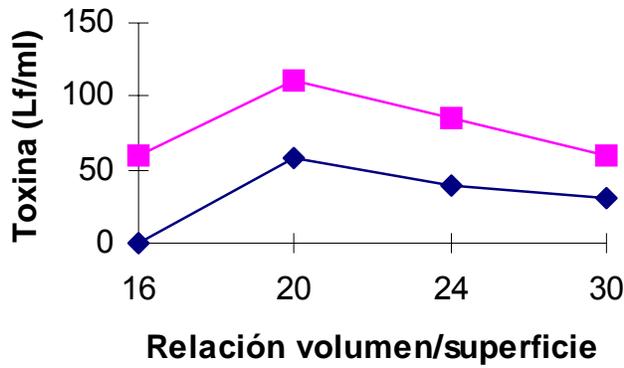


Figura 3. Efecto de la aireación superficial y la relación volumen /superficie en la producción de toxina. (□) No aireación; (■) aireación .

Efecto del glutamato: En la Figura 4 se observa el efecto de la concentración inicial de glutamato sobre el crecimiento y la producción de toxina tetánica. El aumento en la concentración de glutamato produjo un incremento en la concentración máxima de biomasa, en la velocidad específica de crecimiento y en la reducción del tiempo de fermentación de 120 horas sin glutamato a 70 horas con 1.5 g/L como se muestra en la Figura 5.

En el fermentador de tanque agitado no se observó el crecimiento de tipo diauxico encontrado en los cultivos sin agitación (Figura 6), este cambio se debe, entre otros factores, al cambio en las condiciones de transferencia de masa.

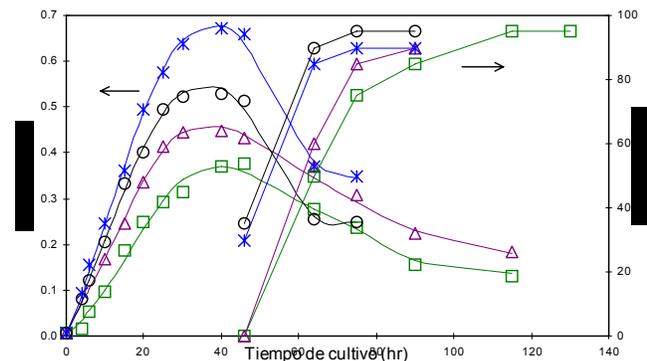


Figura 4. Efecto del glutamato en el crecimiento y producción de toxina del *Cl. tetani*. Concentración de glutamato: (O) 0 g/L; (Δ) 0.5 g/L; (□) 2 g/L; (*) 16 g/L.

CONCLUSIONES

Se observó en los cultivos estáticos un descenso significativo en la concentración de glucosa durante el segundo período de crecimiento, lo que indica que el *Clostridium tetani* (cepa Massachusetts 2^{do} pase) tiene la capacidad metabólica para metabolizar glucosa.

Como el microorganismo presenta un buen crecimiento en medio L-M sin adición de glutamato,

se puede inferir que dicho nutriente proviene en estos medios del digerido de caseína (NZ-case), en los cuales puede estar presente en forma libre o de péptidos.

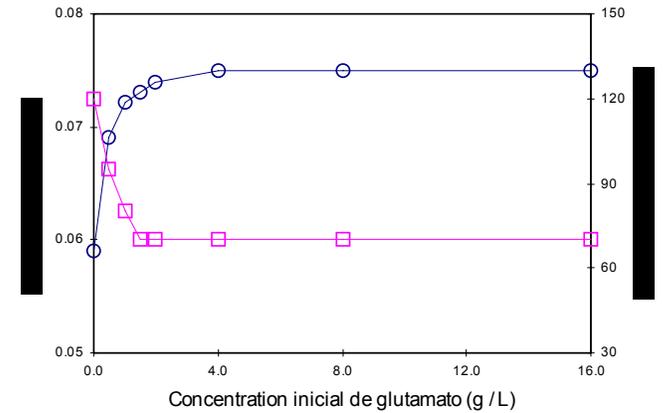


Figura 5. Efecto del glutamato en la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de cultivo del *Cl. tetani*. (o) velocidad específica de crecimiento; (□) tiempo de cultivo.

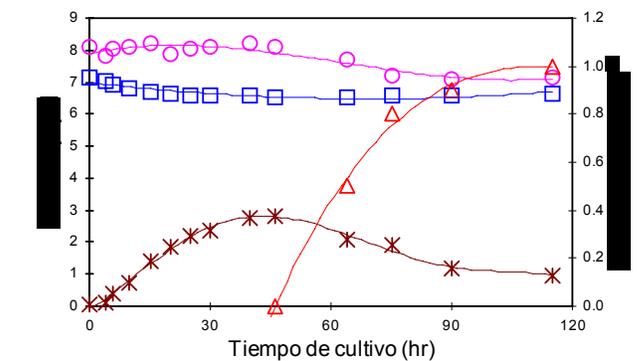


Figura 6. Cinética del *Cl. tetani* en un fermentador agitado de 5L. (□) pH; (o) glucosa g/L; (Δ) toxina Lf/mL; (*) biomasa.

El crecimiento diáuxico observado en los cultivos no agitados, se debe fundamentalmente a problemas de transferencia de masa, ocasionando baja homogeneidad en la concentración de nutrientes y acumulación de metabolitos en sectores del bioreactor.

Se observa un efecto significativo de la concentración de glucosa en el medio y del tiempo de esterilización sobre la producción de toxina, encontrándose que en cultivos de 200 mL los valores que producen mayores rendimientos en la producción de toxina son de 6 g/L para la glucosa y 20 minutos en el tiempo de esterilización.

El modelo matemático propuesto sugiere un importante grado de interacción entre la glucosa y el tiempo de esterilización.

La aireación superficial en cultivos sin agitación produce un efecto muy importante en la producción de toxina tetánica, al igual que la relación volumen de cultivo/ superficie expuesta del mismo. La agitación es fundamental en estos cultivos y se hace mas crítica a medida que aumenta el volumen de cultivo en los que puede ser aún mas marcada la interacción de estos dos factores.

La presencia de glutamato en el medio de cultivo produce efectos sobre la biomasa y la velocidad

específica de crecimiento del *Cl. tetani*. Así mismo, reduce el tiempo de producción de toxina sin afectar la cantidad producida.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración del Dr. Camilo Roza, Subdirector Industrial del Instituto Nacional de Salud, al personal de Grupo de Tétanos del INS y a la Ing. Nubia Moreno del IBUN.

BIBLIOGRAFÍA

- Ballén, L. y Aldana, N.** 1995. Estudio Preliminar de la Concentración Inicial de Células en la Producción de Toxina por Fermentación del *Clostridium tetani*. Santafé de Bogotá. Trabajo de grado (Ingeniería Química). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química.
- Barker, H.A.** 1981. Amino acid degradation by anaerobic bacteria. Annual Review of Biochemical, 50. 23-40.
- Bergey's manual of systematic bacteriology.** 1984. *Clostridium tetani*. 2. 1195-1196.
- Fratelli et al.** 1993. Toxina tetánica: Produção e Purificação em escala industrial. Bol. Biotecnology. 4. 19-29.
- Hepple, J. R.** 1965. Large-scale Cultivation of *Clostridia*. Journal of Applied Bacteriology. 28.1. 52-55.
- Hepple, J.R.** 1968. Large scale production of *Clostridium tetani*. Chemistry and Industry. 25. 670-674.
- Latham, W. C.; Donald, F. B. and Leo, L.** 1962. Tetanus Toxin Production in the Absence of Protein. Applied Microbiology. 10 146-152.
- Letti, A. et al.** 1964. Effects of Products of Heat Degradation of Glucose on Growth and on Formation of Soluble Antigens of *Clostridium tetani*, Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology. 8. 301-306.
- Mellanby, J.** 1968. The Effect of Glutamate on Toxin Production by *Clostridium tetani*. Journal of General Microbiology. 54. 77-82.
- Milá de la Roca, Y. et.al.** 1978. Fermentador Caracas. Revista del Instituto Nacional de Higiene. XI. Nos. 3 y 4. Caracas. Venezuela.
- Miller, G.L.** 1959. Use of DNS for Determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31. 426-428.
- Mueller, J. H. and Miller, P. A.** 1948. Factors Influencing the Production of Tetanal Toxin. Journal of Immunology. 56. 143-147.
- Mueller, J. H. and Miller, P. A.** 1940. Tetanus Toxin Production on a Simplified Medium. Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine. 43. 389-390.
- Mueller, J. H. and Miller, P. A.** 1945. Production of Tetanal Toxin. Journal of Bacteriology. 50.377-384.
- Nielsen, P.A.** 1965. Growth and toxin production by *Clostridium tetani*. Symp.Series Immunology Standar. 3. 207-216.
- Prado, S. et al.** 1993. Otimização do processo de purificação industrial de toxoide tetânico por gel filtração. Bol.Biotecnology. 4. 3-8.
- Reyes, H. y Flores, M. E.** 1986. Tétanos. Manual Moderno. México.
- Thomson, R.O.** 1957. A semi-continuous method for the large-scale production of tetanus toxin. Nature. 180. 1126-1127
- World Health Organization.** 1978. Manual for the Production and Control of Vaccines : «Tetanus Toxoid» .
- Zacharias, B. , Bjorklund, M.** 1968. Continuous production of *Clostridium tetani* toxin. Applied Microbiology. 16. 1. 69-72