

# PRODUCCION DE SUSPENSIONES DE *Bordetella pertussis* POR FERMENTACION

## PRODUCTION OF *Bordetella pertussis* SUSPENSIONS BY FERMENTATION

Algecira N., Dueñas A., Parra L., Granados J<sup>1</sup>.

### RESUMEN

En este trabajo se estudió la producción de suspensión de *Bordetella pertussis* por fermentación para obtener el ingrediente activo de la vacuna contra tosferina. Se probaron diferentes medios de cultivo para el proceso, seleccionando el medio Stainer-Scholte adicionado con 3 g/L de casaminoácidos, el cual permite obtener altas concentraciones de células y suspensiones de buena calidad. Se estudió también la cinética de consumo de glutamato de sodio, producción de biomasa y evolución del pH. El crecimiento fue descrito por un modelo logístico. Se compara la tecnología de cultivo estacionario con el cultivo en fermentador presentándose esta última como la mejor alternativa de producción.

**Palabras Claves:** *Bordetella pertussis*, vacuna, medio de cultivo, cinética, fermentación.

### SUMMARY

*Bordetella pertussis* suspensions are used to prepare Whooping Cough Vaccine. This work studied the production by fermentation of *Bordetella pertussis* suspensions. After several media were tested, the Stainer-Scholte medium supplemented with 3g/L of casaminoacids was used as a fermentation medium. High cell concentrations and good quality suspensions were obtained with this medium. During the process sodium glutamate intake, biomass

production and pH were also determined. The culture followed a growth Logistic Model. A comparison between the stationary culture and the fermentation process was done. The last one was a better production alternative.

**Keywords:** *Bordetella pertussis*, vaccine, culture media, kinetic, fermentation.

### INTRODUCCION

Una vacuna es un producto rico en antígenos, elaborados a partir de un microorganismo patógeno o una de sus fracciones o subproductos, capaz de desencadenar en el organismo humano la formación de los correspondientes anticuerpos que confieren inmunidad contra aquel microorganismo.

La tosferina es una enfermedad causada por la bacteria *Bordetella pertussis* y puede prevenirse con uso de vacunas. Estas pueden ser células de *B. pertussis* muertas o vacunas acelulares que se preparan a partir de uno o varios factores de virulencia que produce el microorganismo (Manclark y Cowell, 1984).

El primer aislamiento exitoso del agente causal de tosferina fue logrado por Bordet y Gengou en 1906, empleando un medio rico en sangre. Desde entonces el desarrollo de la vacuna contra la tosferina ha sido un proceso evolutivo. Los pasos iniciales para el desarrollo de una vacuna se dieron por la época de la primera guerra mundial y se realizó en forma empírica, dado que no se tenía un conocimiento de la anatomía del organismo y su relación con la patogénesis de la enfermedad. Estas primeras vacunas fueron notoriamente crudas y de contenido incierto; ellas algunas veces incluyeron flora respiratoria mezclada con *B. pertussis* y fue usada para tratamiento como también para la profilaxis. La segunda era se inició con el refinamiento de los métodos de

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Salud. Subdirección Industrial. Santafé de Bogotá

producción y culminó con la vacuna usada ampliamente recuperada con células completas, preparada en forma estándar. La tercera era dió origen a las vacunas acelulares actuales. La anticipada cuarta era es la de las vacunas fabricadas utilizando ingeniería genética (Manclark y Cowell, 1984).

La bacteria *B. pertussis* se ubica en la familia Bordetellae, género Bordetella, especie pertussis. Es un microorganismo Gram negativo, aerobio estricto y tiende a sufrir variaciones genotípicas, de las cuales se conocen las llamadas fase I, fase II, fase III y fase IV. La fase I posee características virulentas y es un cocobacilo pequeño provisto de pili. La fase IV tiene un crecimiento polimórfico, no posee pili ni características virulentas (Bergey, 1984).

El medio de cultivo es de gran importancia pues debe suministrar, entre otros, los requerimientos mínimos suficientes de fuentes de carbono, nitrógeno, vitaminas y factores de crecimiento. No debe contener compuestos que inhiban el crecimiento o la producción de las proteínas de interés. La principal actividad metabólica de *B. pertussis* es la oxidación de glutamato, aunque otros aminoácidos como prolina, serina, alanina, ácido aspártico, asparagina, histidina y lisina también pueden ser metabolizados. Se ha encontrado que el glutamato es la principal fuente de carbono, nitrógeno y energía (Bergey, 1984). En los trabajos de Cohen y Wheeler (1946) y Stainer y Scholte (1971) se demuestra que *B. pertussis* puede crecer en un medio conteniendo una mezcla de algunos aminoácidos, factores de crecimiento y sales. Una revisión de los requerimientos para el crecimiento de *B. pertussis* y condiciones para el cultivo se encuentra en los trabajos de Rowatt, (1957) y Parker, (1976).

En el laboratorio de producción de vacunas bacterianas del Instituto Nacional de Salud, tradicionalmente se ha utilizado el método de cultivo unitario estacionario en la producción de vacuna pertussis, el cual tiene varias desventajas: tiempos de proceso largos, heterogeneidad por la cantidad de recipientes de cultivo empleados y control de las condiciones de cultivo menos estrictas que en fermentador. Se tiene el propósito de desarrollar el proceso de producción de vacunas utilizando la tecnología de fermentación para aumentar la producción de vacuna y mejorar su calidad. El objetivo general de este trabajo fué estudiar la obtención de la suspensión de *B. pertussis* en un fermentador Bioflo III New Brunswick Scientific, de 5L. Se plantearon como objetivos específicos: seleccionar el medio de cultivo apropiado para el cultivo de *B. pertussis*; determinar la cinética de consumo de glutamato de sodio, producción de

biomasa y evolución del pH; y comparar el proceso en fermentador con el cultivo unitario estacionario.

## MATERIALES Y METODOS

### Microorganismo.

Se utilizó *B. pertussis*, cepa 137, suministrada por el Instituto Butantan de Brasil, la cual es utilizada en la producción por fermentación y posee las características biológicas apropiadas para la producción de vacunas. La cepa se conserva liofilizada y se almacena a 4°C.

Con el propósito de verificar la ausencia de contaminación se realizaron observaciones al microscopio empleando la tinción de Gram. En el microscopio se deben observar cocobacilos Gram negativos.

### Procedimiento con los cultivos.

La preparación del inóculo de *B. pertussis* se inicia seleccionando un liofilizado del microorganismo. El contenido de la ampolleta se resuspende en condiciones asépticas con 1,5 mL de solución de casaminoácidos al 1%, se siembra en cajas de Petri con medio Bordet-Gengou e incuba a 35°C durante 72 horas, verificando la pureza del cultivo por tinción de Gram y observación al microscopio. Si el cultivo es puro se hace un subcultivo en tubo inclinado con medio Bordet-Gengou, se incuba a 35°C durante 48 horas, se verifica nuevamente la pureza, se recolecta asépticamente el microorganismo utilizando solución de casaminoácidos (INS, 1995). A continuación, la suspensión se siembra en erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo de producción, se mantiene a 35°C en agitación a 200 rpm durante 24 horas. Para verificar la pureza del cultivo, se hace un nuevo subcultivo en erlenmeyer de 1000 mL con 250 mL de medio de producción, utilizando como inóculo la suspensión obtenida en el paso anterior en un porcentaje del 10% v/v. Este mismo porcentaje de inóculo se continua utilizando en adelante y se mantiene a 35°C con agitación a 250 rpm durante 24 horas. Una vez verificada la pureza del cultivo, con esta suspensión se inocula el fermentador de 5 L.

### Medios de cultivo.

El medio de Bordet-Gengou (Difco Laboratories) se utilizó para la recuperación de los liofilizados del microorganismo y en esta forma tener un profuso y rápido crecimiento de este. Para la producción por fermentación se utilizaron los medios Cohen-Wheeler (Cohen y Wheeler, 1946); FGP-1 (Medina y Reyes, 1981); Stainer-Scholte (Stainer y Scholte, 1971) y modificaciones a este último. En la Tabla 1, se presentan los medios de cultivo que diferentes investigadores han desarrollado para el crecimiento de *B. pertussis*.

## EQUIPOS

- **Incubadora.** Marca New Brunswick Scientific, NBS

(U.S. patent 3002.895); con capacidad para quince erlenmeyer, con control de agitación de 0 a 500 r.p.m. y temperatura de 0 a 60 °C, empleado en la selección del medio de cultivo con erlenmeyers de 1000 mL.

**- Fermentador.** Se realizaron los ensayos en un sistema de fermentación Bioflo III - NBS, con 5L de capacidad, el cual es apropiado para el cultivo de microorganismos en forma continua y discontinua. Permite un amplio rango de condiciones de operación. Posee la instrumentación necesaria para el control de temperatura, pH, agitación, oxígeno disuelto y espuma (NBS, 1993). Se verificaron los medidores del fermentador en cuanto a su buen funcionamiento, siguiendo las instrucciones del manual de operación del fermentador (NBS, 1993). El sensor de pH fue calibrado usando soluciones buffer de pH 4 y 7 antes de esterilizar el equipo.

**TECNICAS ANALITICAS**

**Determinación de Biomasa.** El método empleado para determinar el peso seco de biomasa, obtenida durante el crecimiento del microorganismo fue el nefelométrico. La medición se hace por espectrofotometría, previa elaboración de una curva patrón según el procedimiento mostrado por Gomez, (1997) y las unidades de medida son la absorbancia, cantidad de luz retenida por las células la cual es proporcional al número de estas presentes (Caicedo, 1996).

Para la determinación de la concentración celular obtenida en la cosecha de cultivos de *B. pertussis* la OMS recomienda utilizar un método opacimétrico. La unidad de opacidad es la medición de opacidad determinada por comparación con un estandar internacional de referencia para la opacidad (OMS, 1979).

**Determinación de glutamato de sodio.** La determinación de glutamato en el medio de cultivo se realizó con el sistema kit Sigma Cell Culture Reagents, Glutamine/Glutamate determination-Stock No.GLN-1. Los isómeros D, no son detectados por este método. Pueden determinarse tanto el ácido glutámico como sus sales.

**Tabla 1. Composición de medios para cultivar *B. pertussis***

COMPUESTO (g/L)	Stainer & Scholte	FGP-1	Cohen & Wheeler
Glutamato	10.70	10.70	
Casamino			10.00
L-Prolina	0.24	0.24	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.50	0.50	0.50
KCl	0.20	0.20	
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.10	0.10	0.40
CaCl <sub>2</sub>	0.02	0.02	0.01
Tris 121	1.52	1.52	3.00
NaCl	2.50	2.50	2.50
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.01		0.01
L-cistina	0.04	0.04	
A. ascórbico	0.02	0.02	
Niacina	0.004	0.004	
Glutation	0.10	0.10	
Ext. levadura		0.50	12.50
Almidón		1.50	

**PROGRAMACION EXPERIMENTAL**

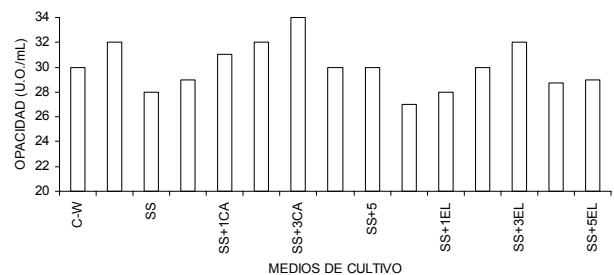
**Selección del medio de cultivo.** Según se reporta en la literatura, existen diferentes medios apropiados para la producción por fermentación en suspensión de *B. pertussis*, (Cohen y Wheeler, 1946, Stainer y Scholte, 1970; Medina y Reyes, 1981 y Rodriguez et al, 1993). Teniendo esto como consideración inicial se realizaron cultivos en erlenmeyer de 1000 mL con *B. pertussis* cepa 137 en los siguientes medios de cultivo: Stainer-Scholte, Cohen-Wheeler, FGP-1 y Stainer-Scholte modificado con la adición de 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 g/L de extracto de levadura o casaminoácidos para establecer la producción medida en U.O./mL en estos medios y seleccionar el mejor medio de cultivo para el proceso. Se usaron 250 mL de medio, 10% de inóculo, bajo condiciones de agitación a 250 rpm, 35°C y tiempo de cultivo de 24 h. La suspensión obtenida se evaluó con el título en unidades de opacidad (UO)/mL y por la tinción de Gram. Con los resultados se procedió a seleccionar el medio que permite obtener los mayores rendimientos.

**Determinación de la cinética de producción de biomasa, consumo de glutamato y cambios en el pH.**

La *B. pertussis* se cultivo en un fermentador de 5L Bioflo III, NBS, sin deflectores, sin usar antiespumantes, con 3.5 L del medio de cultivo seleccionado previamente, 10% de inóculo, temperatura 35 °C, pH inicial 7.6, aireación superficial, velocidad de agitación 900 rpm y velocidad de aireación de 1 volumen de aires por volumen del medio en minuto (vvm). La biomasa se determinó por peso seco, el consumo de glutamato de sodio por medición espectrofotométrica vía deshidrogenación y reducción de NAD+ con el kit para la determinación de glutamato/ glutamina (Sigma Cell Culture Glutamine/Glutamate determination - Stock No.GLN-1) y los cambios del pH con un potenciómetro Ingold, parte NBS P0720-5021. Los anteriores análisis se realizaron por triplicado.

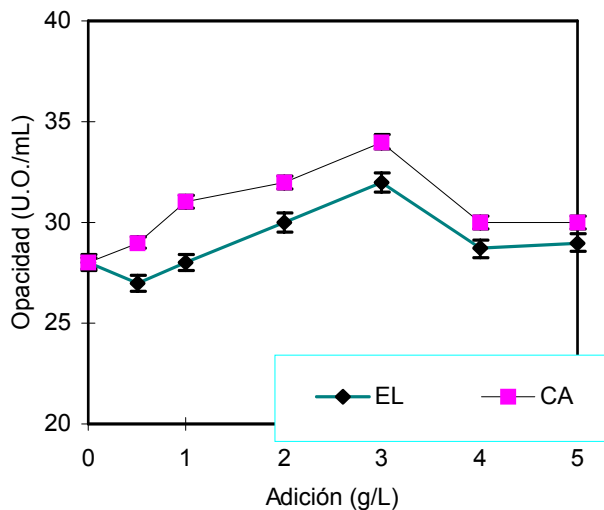
**3. RESULTADOS Y DISCUSION SELECCION DEL MEDIO DE CULTIVO**

En la Figura 1, se muestra la opacidad obtenida para el cultivo en erlenmeyer en diferentes medios de cultivo utilizados para la producción por fermentación en suspensiones de *B. pertussis*.



**Figura 1. Resultados de crecimiento para *Bordetella pertussis* cepa 137, obtenidos con diferentes medios de cultivo. Condiciones: 250 mL de medio en erlenmeyer de 1 l, 10 % del inóculo, 250 rpm, 35 C.**

Los medios de cultivo ensayados son apropiados para el crecimiento del microorganismo. El medio Stainer-Scholte (SS), si bien cuenta con los requerimientos nutricionales mínimos para el microorganismo y la opacidad obtenida con este medio es alta, los ensayos realizados demuestran que la adición de fuentes semisintéticas de aminoácidos como el extracto de levadura (EL) y casaminoácidos (CA) incrementan la producción de biomasa. En las Figuras 1 y 2 se presentan resultados de la opacidad, medida en unidades de opacidad, leídas en cultivos de 24 horas de edad. En la Figura 1 se muestran los resultados de la adición de extracto de levadura (EL) y casaminoácidos (CA) entre 0 y 5 g/L, así como la opacidad obtenida con los medios de Cohen y Wheeler (C-W) y FGP-1. Los mayores valores se obtuvieron con la adición de 3 g/L de CA y EL al medio SS y una mayor opacidad del medio FGP-1 comparado con el medio C-W. Los resultados obtenidos concuerdan con los obtenidos previamente por Rodríguez y colaboradores, (1994) y Medina y Reyes, (1981). Sin embargo, la concentración de EL que reportan para lograr la mayor producción es diferente, en el primer caso es de 0.75 g/L de extracto de levadura y en el segundo caso de 0.5 g/L de extracto de levadura. En el Instituto Butantan al medio Stainer-Scholte se le adiciona 0.5 g/L de casaminoácidos, obteniéndose en todos los casos opacidades similares a las alcanzadas en este trabajo. Este resultado puede deberse a diferencias en las cepas del microorganismo utilizadas en los diferentes trabajos, a los sistemas de cultivo empleados y a los lotes de materia prima utilizados en la preparación del medio de cultivo.



**Figura 2. Influencia de la adición de casaminoácidos (CA) y extracto de levadura (EL) en la producción de biomasa *Bordetella pertussis* cepa 137. Condiciones: 250 mL de medio en erlenmeyer de 1 l, 10 % del inóculo, 250 rpm, 35 C.**

Los resultados permiten prever la importancia de enriquecer el medio de cultivo Stainer-Scholte cuando es utilizado en producción, y también encontrar para cada lote de materia prima cual es la adición de casaminoácidos

o extracto de levadura que proporciona la máxima producción de biomasa. El medio Cohen-Wheeler es un medio apropiado para la producción de suspensión de *B. pertussis*, y concuerda con la experiencia previa de nuestro laboratorio, pues tradicionalmente ha usado este medio de cultivo para la producción de *B. pertussis* en cultivo estático.

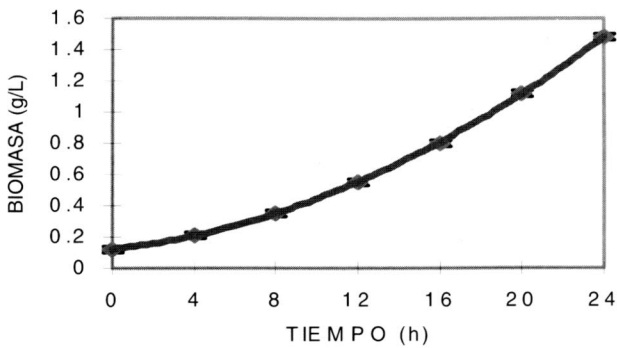
Las suspensiones de *B. pertussis* obtenidas en medio Stainer-Scholte y variantes de éste presentan una mejor apariencia, son más homogéneas y limpias, en cambio las obtenidas con el medio Cohen-Wheeler son de color crema claro, tienden a ser ligeramente grumosas, y se presenta formación de residuos negruzcos. Estas características afectan la calidad del producto final, particularmente si se piensa que en la producción a escala industrial podrían presentarse problemas, puesto que se requerirían sistemas de recuperación de células de mayor capacidad, como centrifugación continua y filtración, en las cuales la formación de grumos puede disminuir la eficiencia y rendimiento de estas operaciones a pesar de no haberse presentado problemas en nuestro laboratorio, puesto que los niveles de producción son bajos y la purificación y detoxificación del producto se hace en centrífugas y placas agitadoras de baja capacidad y permiten garantizar la obtención de un buen producto sin mayores dificultades. Adicionalmente, la presencia de grumos en la suspensión puede conducir a la obtención de producto tóxico porque al interior del grumo pueden quedar células no expuestas a la acción del agente detoxificante. Para lograr la homogeneidad de la suspensión se requiere una fuerte acción mecánica; sin embargo, esta puede deteriorar las células y disminuir su potencial inmunógeno.

En la preparación del medio Cohen-Wheeler se requiere la adición de carbón activado, el cual permite inactivar inhibidores del crecimiento como ácidos grasos y sulfuros. En medio sólido el carbón forma parte del medio, en medio líquido se filtra para retirar el carbón (Rowatt, 1957 y Stainer, 1988). Para las siguientes etapas de este trabajo se seleccionó como medio de cultivo el Stainer-Scholte suplementado con 3 g/L de CA como fuente de aminoácidos.

#### CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA, CONSUMO DE GLUTAMATO Y pH

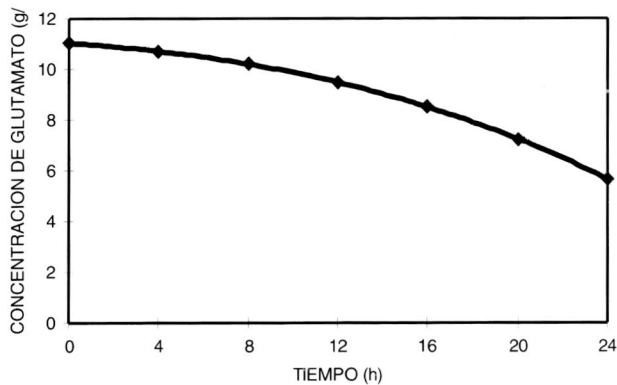
Los perfiles cinéticos de biomasa, consumo de glutamato y pH para el cultivo de *B. pertussis* son mostrados en las Figuras 3, 4 y 5.

En la Figura 3, se observa que el cultivo inicia en la fase de crecimiento exponencial y se presenta un descenso en la concentración de glutamato (Figura 4) lo cual confirma que efectivamente este aminoácido es metabolizado por el microorganismo, (Bergey, 1989). El pH (Figura 5) se incrementó en el cultivo hasta valores entre 8.0 y 8.2, (Stainer, 1988).

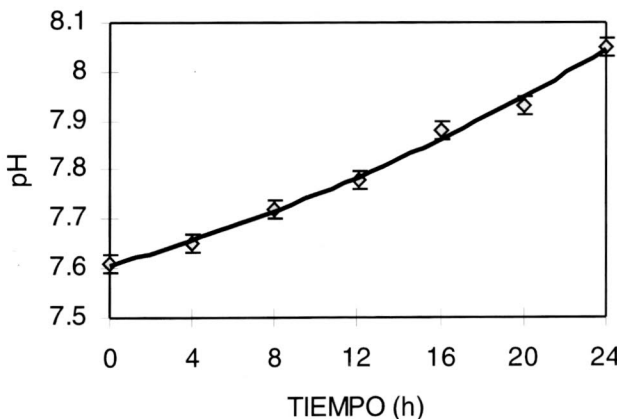


**Figura 3. Perfil de crecimiento de *Bordetella pertussis* cepa 137, 3,5 L de medio SS + 3 g/L CA en fermentador de 5 L, 10 % de inóculo, 900 rpm, 1 vvm, 35 C.**

En la Figura 3, se observa que el cultivo inicia en la fase de crecimiento exponencial y se presenta un descenso en la concentración de glutamato (Figura 4) lo cual confirma que efectivamente este aminoácido es metabolizado por el microorganismo, (Bergey, 1989). El pH (Figura 5) se incrementó en el cultivo hasta valores entre 8.0 y 8.2, (Stainer, 1988).



**Figura 4. Perfil del consumo de glutamato de sodio en el cultivo de *Bordetella pertussis* cepa 137.**



**Figura 5. Perfil cinético de la evaluación de pH en el cultivo de *Bordetella pertussis* cepa 137.**

El perfil de biomasa (Figura 3) se ajusta a una curva de tipo sigmoide y se puede describir por medio de un modelo logístico:

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \frac{a}{1 + e^{(b-ct)}} \quad \text{Ec. 1}$$

Donde X y X<sub>0</sub> son concentraciones de biomasa en g/L; en cualquier instante de tiempo y en el tiempo inicial respectivamente, t es el tiempo en horas; a = 2.511, b = 2.323, y c = 0.225 son constantes de ajuste. Estas constantes no tienen sentido biológico, pero si el modelo es adecuadamente manipulado se puede transformar en una ecuación con parámetros biológicos como lo muestra Zwietering et al, (1990) con la ecuación:

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \frac{A}{1 + e^{\left(\frac{4\mu_m}{A}(\Theta_d - t) + 2\right)}} \quad \text{Ec. 2}$$

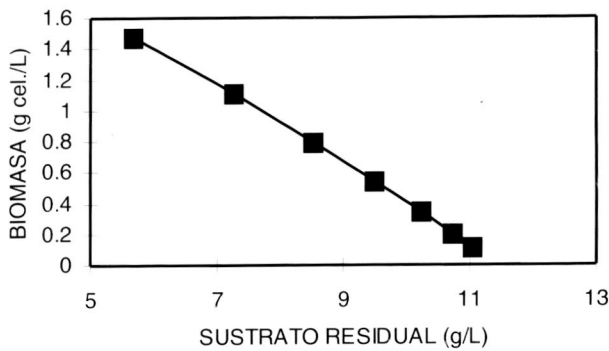
Donde μ<sub>m</sub> es la máxima velocidad específica de crecimiento; A, el máximo valor de Ln(X/X<sub>0</sub>) que alcanzaría el cultivo y q<sub>d</sub> el tiempo de la fase lag del cultivo. Comparando las dos ecuaciones anteriores se encuentra μ<sub>m</sub> = 0.141 h<sup>-1</sup>, A = 2.511 y q<sub>d</sub> = 1.43 h y X = 1.5187 g células/L = 43 U.O./mL.

La concentración de glutamato en el medio de cultivo versus tiempo (Figura 4) se ajustó a un modelo polinómico de orden 3, según la siguiente ecuación:

$$S = a + bt + ct^2 + dt^3 \quad \text{Ec. 3}$$

Donde S es la concentración de glutamato en el medio de cultivo en g/L; a = 11.018, b = -0.056, c = -5.15x10<sup>-3</sup> y d = -7.46 son constantes de ajuste del modelo. Se observa que en 24 h de cultivo no se ha consumido totalmente el glutamato de sodio.

Se graficó la concentración de biomasa versus concentración de sustrato residual en el medio de cultivo (Figura 6) obteniéndose de la pendiente de ésta el rendimiento observado biomasa/sustrato y<sub>x/s</sub> = 0.254 g cel./g glutamato. Como esta gráfica se ajusta muy bien a la ecuación de una línea recta, se puede decir que este coeficiente de rendimiento permanece aproximadamente constante durante el cultivo. Rodriguez y colaboradores (1993) investigaron la cinética de crecimiento de *B. pertussis*, en un cultivo continuo limitado por glutamato, encontrando para el rendimiento teórico (y' <sub>x/s</sub>) un valor de 0.33 g cel/g glutamato y el coeficiente de mantenimiento (m<sub>s</sub>) de 0.07 g glutamato por g de biomasa por hora.



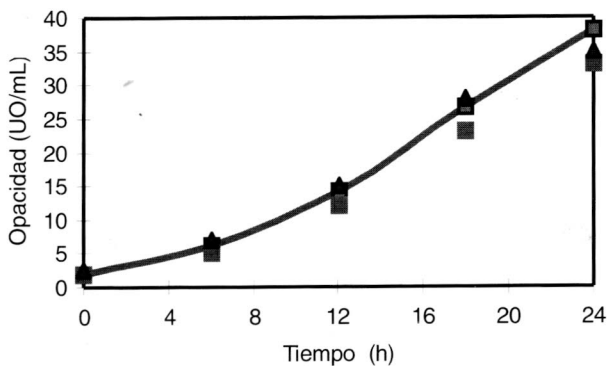
**Figura 6. Curva de ajuste de biomasa vs sustrato en cultivo de *Bordetella pertussis* cepa 137.**

En el cultivo de *B. pertussis* el pH se va incrementando desde 7.6 hasta aproximadamente 8.2 (Figura 5). La evolución del pH en función del tiempo se ajustó a un modelo cuadrático, según la siguiente ecuación:

$$pH = a + bt + ct^2 \quad Ec. 4$$

Donde a = 7.6, b = 0.011, c = 0.00028 son constantes de ajuste del modelo. La elevación del pH durante el cultivo se debe, principalmente a que el microorganismo consume aminoácidos y que posiblemente se genera amoníaco durante el cultivo (Stainer, 1988).

En la Figura 7 se muestran los resultados obtenidos en dos cultivos realizados en fermentador de 5L Bioflo III, NBS en las mismas condiciones de operación de los ensayos realizados para determinar la cinética de producción de biomasa, consumo de glutamato y cambios del pH con el propósito de confrontar la capacidad del modelo cinético de representar la producción de biomasa en términos de opacidad del cultivo. Se observa que el modelo describe bien la producción de biomasa.



**Figura 7. Ensayo de comprobación. Cultivo de *Bordetella pertussis* cepa 137, 3,5 l de medio SS + 3 g/l de CA en fermentador de 5L, Modelo, ensayo 1, ensayo 2.**

Las opacidades finales de estos dos cultivos de *B.*

*pertussis* en fermentador fueron 33 y 35 UO/mL. Con estos resultados se puede hacer una comparación entre la producción en fermentador y el cultivo estático en botellas de Roux que corresponde a la tecnología utilizada actualmente en nuestro laboratorio. En la Tabla 2, se presentan los resultados obtenidos en lotes de producción en cultivo estático de *B. pertussis* cepa 137 en nuestro laboratorio de Vacunas Bacterianas.

**Tabla 2. Resultados de la producción de suspensión de *B. pertussis* en cultivo estático en botellas de Roux.**

Grupo	No. Placas (*)	Opacidad de la suspensión (**)
1	22	460
2	29	810
3	28	660
4	29	660
5	26	610
6	29	610
7	26	510
8	26	510
9	30	960
10	30	1010
11	30	960

\* Cada grupo lo conforman 30 botellas placas sembradas, este número corresponde a botellas no contaminadas en el grupo.

\*\* Opacidad en UO/mL, en un volumen final de suspensión de 200 mL.

Para comparar las dos tecnologías se utilizaron los indicadores intensidad y productividad. Se define la intensidad como las unidades de opacidad producidas por unidad de volumen en la unidad de tiempo (Gómez, 1997), de esta manera en el proceso estático una suspensión con una opacidad promedio de 705.4 UO/mL en un volumen de 200 mL equivale a una producción de 141.080 UO/grupo. Para cada grupo se utilizan 30 placas con 200 mL de medio y el cultivo requiere 72 h por lo tanto la intensidad del cultivo es de 0.326 UO/mLh. La productividad corresponde a las unidades de opacidad producidas por unidad de tiempo (Gómez, 1997), en la producción normal se cultivan 9 grupos semanales obteniéndose una productividad de 1'269.720 UO/semana. Para el cultivo en fermentador se obtiene una opacidad promedio de 34 UO/mL en 48 horas de cultivo en un fermentador de 5L con un volumen de trabajo de 3.5L lográndose una intensidad de 0.705 UO/mLh y una productividad de 118.440 UO/semana solamente haciendo un ciclo de fermentación a la semana. Al escalar el proceso y produciendo suspensiones con la misma opacidad en un fermentador de 50 L con un volumen de trabajo de 35 L, en un solo ciclo de fermentación se puede lograr la misma producción de 9 grupos en cultivo estacionario. Con los valores de intensidad para las dos tecnologías se prevee que para lograr la misma productividad de 1'269.720 UO/semana, en cultivo estático se consumen 54 L de medio de cultivo mientras

que en fermentador se requieren solamente 38 L. Estas comparaciones son válidas no obstante que los medios de cultivo para los datos comparados son diferentes, sin embargo el medio de Cohen-Wheeler da resultados no muy lejanos del medio seleccionado aquí para el cultivo en fermentador. Mediante estos indicadores se puede apreciar que es más favorable implementar la tecnología de producción de suspensión de *B. pertussis* en fermentador. Los resultados de la Tabla 2 muestran que el nivel de pérdida de producto por contaminación es alto con la tecnología actual, este aspecto puede controlarse mejor en el cultivo en fermentadores mientras se cuente con unas instalaciones apropiadas para la producción de biológicos y con el personal idóneo para trabajar en este tipo de industria (OPS-INS, 1996).

## CONCLUSIONES

Los medios de cultivo Cohen-Wheeler y Stainer-Scholte y sus modificaciones con adición de casaminoácido y extracto de levadura son apropiados para el cultivo de *B. pertussis* porque producen suspensiones con alta opacidad. Además los microorganismos presentan una morfología típica de la fase I, sin pleomorfismo y/o polimorfismo de las células, adecuada para la producción de vacuna.

La adición de fuentes semisintéticas al medio Stainer-Scholte incrementan la opacidad final de los cultivos de *B. pertussis*. Con 3 g/L de casaminoácidos se alcanza hasta 21% de incremento y con 3 g/L de extracto de levadura 14%. Lográndose así suspensiones de mejor apariencia frente a las suspensiones obtenidas en medio Cohen-Wheeler.

La cinética de crecimiento de *B. pertussis* en medio Stainer-Scholte adicionado de 3 g/L de casaminoácido

puede ser descrita por un modelo de tipo logístico. Según esta ecuación la velocidad específica de crecimiento máxima es 0.141 h<sup>-1</sup> y la máxima concentración de células es 1.518 g/L equivalente a aproximadamente 43 UO/mL. Los ensayos de comprobación mostrados en la Figura 7 permiten corroborar la bondad del modelo.

Se corrobora que *B. pertussis* tiene la capacidad de metabolizar aminoácidos tal como fue reportado por Rowatt, (1957); Lane, (1970); Stainer, (1970); Parker, (1976); Bergey, (1984).

El cultivo se inicia con un pH de 7.6 y finaliza con valores entre 8.0 a 8.2. El pH se incrementa durante el cultivo debido a que no se controla y la bacteria *B. pertussis* utiliza oxidativamente glutamato y otros aminoácidos con producción de amoníaco y dióxido de carbono (Bergey, 1984).

Al comparar la intensidad del proceso en cultivo estático con el cultivo en fermentador se obtiene para el estático 0.326 UO/mLh y en fermentador 0.705 UO/mLh. La productividad del cultivo estático es 1'269.720 UO/semana, que en fermentador puede ser alcanzada en un ciclo con un fermentador de 50L. Estos resultados consolidan el proceso de obtención de suspensión de *B. pertussis* en fermentador como la mejor alternativa frente a la tecnología de cultivo estático. Sin embargo, se requiere hacer pruebas biológicas que permitan determinar si la suspensión de *B. pertussis* obtenida en fermentador reúne los requerimientos técnicos de la OMS para la formulación de vacunas con este antígeno.

## AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Gustavo Buitrago, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia por sus valiosas orientaciones.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bergey D.** 1984/86/89. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins. Vol 4.
- Caicedo L.** 1996. Curso de Biotecnología - Magister en Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia.
- Cohen S.M. Y Wheeler M.W.** 1946. Pertussis vaccine prepared with phase I cultures grown in fluid medium. Amer. J. Publ. Hlthl, 36, 371-376.
- Gomez A.** 1997. Evaluación de la fermentación como un proceso alternativo de producción de toxina difterica. Tesis magister en microbiología, Pontificia Universidad Javeriana.
- INS.** 1995. Manual de producción de *Bordetella pertussis*. Subdirección Industrial - INS.
- Lane A.G.** 1970. Use of Glutamic Acid to suplement Fluid Medium for Cultivation of *Bordetella pertussis*. Applied Microbiology, 512-520.
- Manclarck C.Y Cowell.** 1984. J. Pertussis, En: Germanier, Rene. Bacterial vaccines, Academic Press, Londres.
- Medina A, M. T. Y Reyes E.** 1981. "Estudio comparativo de los medios de cultivo HBP-2 y FGP-1 en la producción de *Bordetella pertussis* por fermentación". Salud Pública de México, Vol XXIII, N° 6, 575-584.
- NBS.** 1993. Manual of operation fermentator Bioflo III, Edison N.J.
- OMS.** 1979. Manual para la producción y control de vacunas- *Bordetella pertussis*.
- OPS-INS.** 1996. Taller de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM). Santafé de Bogotá.
- Parker C.C.** 1979. The genetics and physiology of *Bordetella pertussis*. En: Third International Symposium on Pertussis. (Eds. C. R. Manclark, J. C. Hill), DHEW Publ. No. NIH 79-1830, Washington, DC., 65-69.
- Rodriguez M.** 1993. "Effect of hydromechanical forces on the production of filamentous haemagglutinin and pertussis toxin of *Bordetella pertussis*". Journal of Industrial Microbiology, 12, 103-108.
- Rowatt E.** 1957. The growth of *Bordetella pertussis*: a review. J. Gen. Microbiol., 17, 297-326.
- Stainer D.** 1988. Growth of *Bordetella pertussis*. En: Wardlaw, A., Parton, R. Pathogenesis and immunity in Pertussis. De. John Wiley, Glasgow, 19 - 32.
- Stainer, D. Y Scholte.** 1971, M. "A simple chemically defined medium for the production of phase I *Bordetella pertussis*". Journal of General Microbiology, 63, 211-220.
- Zwietering, M.H.** 1990. Modeling of the bacterial growth curve. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 56, No.6, 1875-1881.