

# ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE LIOFILIZACION PARA UNA CEPA DEL GENERO CELLULOMONAS

H. Rodríguez, T. Moreira y B. García

Dirección de Biotecnología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido: 7 de noviembre de 1986

Recibido: 17 de octubre de 1987

**ABSTRACT.** The influence of the freeze-drying conditions on the viability of *Cellulomonas* sp. Ilbc was studied by means of a  $2^3$  factorial design. The 3 assayed variables, as well as most of their interactions were found to be significant over the viability after 24 h of lyophilization. The best conditions for the process were the sucrose-gelatin (10% : 1%) as the suspension medium, a semi-slow way of freezing and the synthetic "MO" for rehydration. Good survival levels were attained after 9 month storage for the two best variants of the plan. The growth characteristics of the strain on bagasse pith were not affected by the freeze-drying process with the different variants of the plan.

**RESUMEN.** La influencia de las condiciones de liofilización en la viabilidad de la cepa *Cellulomonas* sp. Ilbc fue estudiada empleando un diseño factorial  $2^3$ . Se encontró que las 3 variables estudiadas y la mayoría de sus interacciones fueron significativas sobre la viabilidad a las 24 h de liofilización, obteniéndose como las mejores condiciones la sacarosa-gelatina (10% : 1%) como medio de suspensión, la congelación semilenta, y el medio salino "MO" como medio de rehidratación. Las mejores variantes del plan presentaron buenos niveles de sobrevivencia al cabo de 9 meses de almacenamiento. La cepa, por otra parte, conservó su capacidad para crecer en meollo después de la liofilización con las diferentes variantes del plan.

## INTRODUCCION

Las bacterias del género *Cellulomonas* son de potencial aplicación industrial en la producción de proteína unicelular a partir de materiales lignocelulósicos.<sup>1-3</sup> De ahí la importancia de lograr condiciones adecuadas de conservación que aseguren además, la preservación de su habilidad celulolítica y sus características de crecimiento fundamentales.

La liofilización ha sido uno de los métodos más empleados en los últimos tiempos para la conservación de cultivos microbianos.

Sin embargo, es necesario un estudio de las condiciones a emplear en los casos particulares (al menos a nivel genérico) para lograr buenos resultados de viabilidad y conservación de las características del microorganismo.

En estudios en bacterias se han dado a conocer en la literatura distintos efectos de las condiciones de liofilización sobre la viabilidad y otros aspectos celulares en diferentes géneros.<sup>4-6</sup>

El empleo de diseños estadísticos resulta un método sumamente útil en el estudio simultáneo de diferentes variables en procesos biológicos. En particular, los diseños factoriales han sido empleados por algunos autores en el estudio de las condiciones de liofilización de diferentes levaduras.<sup>7-8</sup>

En este trabajo se realizó el estudio de algunas variables fundamentales en la liofilización de una cepa del género *Cellulomonas*, mediante el empleo de diseños matemáticos.

**Preparación de la suspensión celular.** La cepa fue crecida en cuñas de agar-meollo<sup>9</sup> durante 72 h, las cuales fueron resuspendidas en una solución de lactosa 0,5% con el fin de lograr una concentración final de aproximadamente  $1 \cdot 10^9$  células/mL, la que fue mezclada con los correspondientes medios de suspensión en proporción de 2 volúmenes de medio por 1 volumen de suspensión celular.

**Condiciones de liofilización.** Para estudiar el efecto de las condiciones de liofilización en la viabilidad de la cepa se empleó un diseño factorial  $2^3$ , según Bacon y Henson.<sup>10</sup> Las variables ensayadas y sus niveles máximos fueron los siguientes:

VARIABLE	NIVELES	
	-1	+1
$X_1$ (medio de suspensión)	leche descremada	sacarosa-gelatina (10% : 1%)
$X_2$ (velocidad de congelación)	semi-lenta	rápida
$X_3$ (medio de rehidratación)	"MO"	caldo nutritivo

## MATERIALES Y METODOS

**Microorganismos.** Se utilizó la cepa *Cellulomonas* sp. Ilbc.<sup>1</sup>

La matriz del plan experimental correspondiente es la siguiente:

$$D = \begin{matrix} & X_1 & X_2 & X_3 \\ \begin{matrix} -1 & -1 & -1 \\ 1 & -1 & -1 \\ -1 & 1 & -1 \\ 1 & 1 & -1 \\ -1 & -1 & 1 \\ 1 & -1 & 1 \\ -1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{matrix} \end{matrix}$$

El cálculo de los coeficientes del polinomio que relaciona las variables independientes con la variable dependiente (nivel de sobrevivencia) se realizó de acuerdo a la expresión siguiente:<sup>10</sup>

$$B = TY$$

donde:

B matriz de los coeficientes

T matriz de regresión

Y matriz de los rendimientos experimentales

Para la estimación de los coeficientes significativos se utilizó un estimado interno de la varianza del error puro, calculado por repeticiones en un punto del plan experimental.

Se asumió como criterio de significancia el coeficiente cuyo valor fue menor que 2 veces su desviación estándar. La varianza del error puro fue de 12,49 y la varianza de los coeficientes de 1,56.

La congelación rápida se llevó a cabo mediante inmersión en nitrógeno líquido. La congelación semi-lenta fue realizada en un congelador a -40 °C. La figura 1 representa la curva de enfriamiento obtenida para este caso. Un tiempo de 40 min resultó apropiado para alcanzar una temperatura de -34 °C, condiciones estas que fueron mantenidas en todas las experiencias.

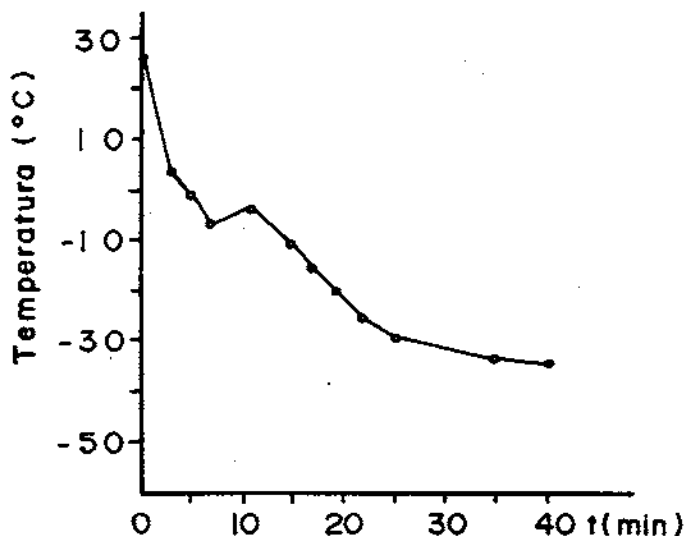


Fig. 1. Curva de enfriamiento durante la congelación semi-lenta en congelador a una temperatura de -40 °C

La liofilización se llevó a cabo en un equipo de laboratorio marca Edwards, a una presión de 0,665 Pascals durante 20 h. Se emplearon ampullas de vidrio que contenían 0,2 mL cada una, las cuales fueron selladas al vacío después de terminada la operación. Posteriormente fueron conservadas a 10 °C, realizándose muestreos al cabo de 24 h (el que se consideró como el tiempo 0), así como de 1; 6 y 9 meses después de la liofilización, para determinar la viabilidad.

La rehidratación se llevó a cabo añadiendo 0,5 mL del medio de rehidratación en cada ampulla, agitando la suspensión durante 1 min y dejándola en reposo 15 min antes de proceder a la dilución y siembra en placas de agar-nutriente, donde se realizó el conteo de viables a las 72 h de sembradas.

La composición de los medios de rehidratación fue la siguiente:

Medio MO (g/L):<sup>2</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O, 10,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,5; NH<sub>4</sub>Cl, 2,0; NaCl, 0,25; MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, 0,25.

Medio caldo nutriente (producto Oxoid) (g/L): polvo Lab-Lemco, 10,0; Peptona, 10,0; NaCl, 5,0.

Pruebas de crecimiento. Con las distintas variantes liofilizadas se realizaron cultivos en zaranda recíprocante en tubos que contenían 10 mL del medio "MO" suplementado con tiamina (0,001 %), empleando meollo pre-tratado como fuente de carbono y energía (5 g/L). El contenido de un ampulla liofilizada y rehidratada fue empleado para inocular cada tubo. Los cultivos se realizaron a 32 °C y 100 golpes por minuto, durante 72 h.

Al final del crecimiento se midió la absorbancia a 600 nm, así como la biomasa seca producida y el sustrato consumido, de acuerdo a los procedimientos descritos con anterioridad.<sup>3</sup>

## RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla I se muestran los niveles de sobrevivencia de cada una de las variantes del plan 2<sup>3</sup> obtenidas para el tiempo 0 (24 h de liofilizadas).

TABLA I

Niveles de sobrevivencia de las distintas variantes del plan 2<sup>3</sup>, determinados a las 24 h de liofilizadas

Variante	Medio de suspensión	Velocidad de congelación	Medio de hidratación	Nivel de sobrevivencia (%)
1	leche descremada	semi-lenta	MO	41,3
2	sacarina-gelatina	semi-lenta	MO	100,0
3	leche descremada	rápida	MO	54,3
4	sacarina-gelatina	rápida	MO	77,0
5	leche descremada	semi-lenta	caldo nutriente	25,1
6	sacarina-gelatina	semi-lenta	caldo nutriente	100,0
7	leche descremada	rápida	caldo nutriente	16,8
8	sacarina-gelatina	rápida	caldo nutriente	87,2

Los coeficientes obtenidos se muestran en la Tabla II.

Finalmente, se obtuvo el polinomio siguiente:

$$Y = 62,71 + 28,34 X_1 - 3,89 X_2 - 5,44 X_3 - 5,06 X_{12} + 3,94 X_{123}$$

Las 3 variables y la mayoría de sus interacciones resultaron significativas sobre la viabilidad de la cepa. Esto es indicativo de que los procesos desarrollados durante la liofilización son altamente sensibles a estos factores. Se observa sin embargo, un mayor peso de la variable X<sub>1</sub>, es decir, que la sacarina-gelatina resultó mucho más adecuada que la leche descremada como medio de suspensión, y además juega un papel importante en la interacción con el resto de las variables.

**TABLA II**

Valores de los coeficientes obtenidos para el polinomio del plan 2<sup>3</sup>

Coefficiente	Valor	Significación
b <sub>0</sub>	62,71	-
b <sub>1</sub>	28,34	sí
b <sub>2</sub>	-3,89	sí
b <sub>3</sub>	-5,44	sí
b <sub>12</sub>	-5,06	sí
b <sub>13</sub>	7,99	sí
b <sub>23</sub>	-1,39	no
b <sub>123</sub>	3,94	sí

El signo (-) para la variable X<sub>2</sub> indica que la congelación semi-lenta permitió una sobrevivencia superior a la rápida. Es conocido que durante la congelación rápida se forma hielo intracelular que rompe las células, mientras que durante la congelación lenta sólo se forma hielo extracelular, por lo cual se ha señalado por varios autores la ventaja de esta última en la congelación y liofilización de microorganismos.<sup>11,12</sup>

En cuanto al medio de rehidratación, éste resulta uno de los factores más importantes en el proceso, ya que en este paso las células tienen la oportunidad de reparar y recuperar las funciones que pudieron ser afectadas durante la liofilización.<sup>13</sup> En el caso estudiado, el medio salino "MO" resultó superior al medio de caldo nutriente para la viabilidad de las células. Esto pudiera deberse a la presencia de M2+g en el medio MO, el cual se ha planteado como un importante elemento estabilizador sobre la membrana celular con relación al efecto osmótico, y también respecto al RNA endógeno.<sup>14</sup>

El efecto significativo encontrado en la mayoría de las interacciones entre las 3 variables coincide con señalamientos de numerosos autores sobre la interacción de estos parámetros. Por ejemplo, Heckly<sup>13</sup> señaló que las sustancias protectoras del medio de suspensión varían su efecto cuando la congelación es rápida o lenta. En dependencia del medio utilizado, la velocidad de congelación puede afectar en diferente grado la forma de los cristales y el agua libre remanente.

De acuerdo con los resultados del plan factorial, las variantes de mejores resultados (2 y 6, Tabla I) fueron estudiadas en relación con los niveles de viabilidad con el tiempo de almacenamiento. Los resultados se muestran en la figura 2.

La mayor pérdida de viabilidad se observa en los primeros 6 meses, siendo la velocidad de muerte menor entre el sexto y el noveno mes del almacenamiento. Se observó un comportamiento semejante entre ambas variantes, con una ligera superioridad en la 6. Fateeva y col.<sup>7</sup>, en la liofilización de cepas de levaduras, encontraron también una mayor muerte celular en los primeros meses de conservación.

Después de 9 meses de almacenamiento a 10 °C, se obtuvo un 10 % de sobrevivencia para la variante 2 y un 18 % para la variante 6, lo cual constituye un buen resultado en ambos casos.

Un nivel de sobrevivencia del 0,1 % es considerado satisfactorio en la conservación de cultivos bacterianos después de un período adecuado de almacenamiento.<sup>15</sup>

Es conocido que las características bioquímicas de los microorganismos pueden alterarse temporal o permanentemente por efecto de la congelación y el secado.<sup>15</sup> Por ello se procedió a comprobar la capacidad de la cepa para crecer en medio selectivo (sustrato lig-

nocelulósico). Los resultados del crecimiento de la cepa liofilizada según las distintas variantes en comparación con la cepa sin liofilizar, en medio mínimo y medio 0,5 % se muestran en la Tabla III.

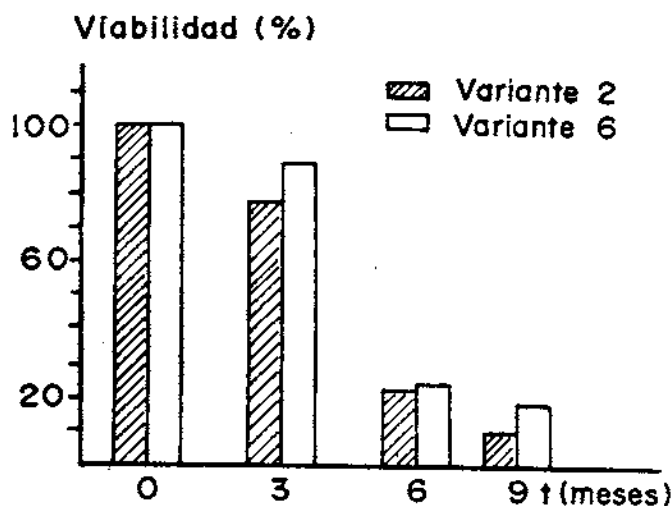


Fig. 2. Niveles de viabilidad a diferentes tiempos de almacenamiento para ampulas liofilizadas según las variantes 2 y 6

**TABLA III**

Crecimiento de la cepa *Cellulomonas* sp. llbc antes y después de liofilizada en medio salino MO + meollo 0,5 %

Variante	Absorbancia final	Masa seca (g/L)	Consumo de sustrato (%)
1	1,2	1,0	58,1
2	1,1	0,9	59,0
3	1,3	1,1	61,1
4	1,1	1,0	60,2
5	1,4	1,1	60,4
6	1,4	1,2	61,2
7	1,1	1,0	59,3
8	1,0	0,9	58,9
sin liofilizar	1,3	1,0	60,1

No existieron diferencias significativas entre los parámetros evaluados para la cepa liofilizada en comparación con la cepa sin liofilizar. Por ende, al parecer, las características de crecimiento no se afectaron por la liofilización.

## CONCLUSIONES

De acuerdo con las variantes analizadas, las mejores condiciones de liofilización resultaron la sacarosa-gelatina como medio de suspensión, la congelación semi-lenta y la rehidratación en medio salino MO. La variante 6 (sacarosa-gelatina, congelación semi-lenta y medio de rehidratación caldo nutriente) también ofreció buenos resultados.

Después de 9 meses de almacenamiento a 10 °C la viabilidad en las ampulas liofilizadas con las mejores variantes se mantuvo en buenos niveles (18 y 10 %).

La capacidad de crecimiento de la cepa en meollo no se afectó después de la liofilización, en ninguna de las variantes empleadas.

## RECONOCIMIENTOS

Se agradece la colaboración de los compañeros del Departamento de Microbiología del ICIDCA al brindar las facilidades para la utilización del liofilizador "Idwards" en la realización de este trabajo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Osman H.G., Herrera A., Casado G., Llana F. y Bell A. Ciencia, Serie 5, No. 9, abril 1972.
2. Enríquez A. Tesis para optar por el grado de Candidato a Dr. en Ciencias, Praga, 1978.

3. Rodríguez H., Enríquez A. and Volfová O. Folia Microbiol., 28, 163, 1983.
4. Ray B., Jezeki J.J. and Busta F.F. Appl. Microbiol., 22, 184, 1971.
5. Heckly R.J. and Quay J. Cryobiology, 18, 592, 1981.
6. Tsevtkov T.S. and Brankova R. Cryobiology, 20, 318, 1983.
7. Fateeva M.V., Nikitina T.N., Lisenkov A.N., Kodkid G.J., y Sherman F.B. Microbiología, XLV, 906, 1976.
8. Moreira T. y Delgado R. Reprint Commission C1. XVI Congrès International du Froid, 63-67, Paris, France, 1983.
9. Rodríguez H. Tesis para optar por el grado de Candidato a Dr. en Ciencias, Praga, 1983.
10. Bacon D.W. and Henson T.L. Statistical Design and Model Building. Dept. Chem. Eng. Queen's Univ., Canadá, 1971.
11. Nei T., Araki T. and Matsuka T. En: Cellular Injury Resistance in Freezing Organisms. Vol. 2, 157, Inst. Low Temp. Sci., Sapporo, 1967.
12. Speck M.L. and Cowman R.A. En: Freezing and Drying of Microorganisms, 39, Univ. Tokyo Press, 1969.
13. Heckly R.J. Adv. Appl. Microbiol. 3, 1, 1981.
14. Strange R.E. Nature, 203, 1 304, 1964.
15. Webb S.J. En: Freezing and Drying of Microorganism, 153, Univ. Tokyo Press, 1969.

# PRIMERA CONFERENCIA LATINOAMERICANA DE APLICACIONES DE LA MATEMATICA Y LA COMPUTACION A LA BIOLOGIA

29 de octubre al 2 de noviembre de 1990

Ciudad de La Habana, Cuba

## ACTIVIDADES PROGRAMADAS

Las sesiones científicas del evento se organizarán sobre la base de conferencias, mesas redondas y la presentación de los trabajos recibidos, lo cual se hará principalmente en forma de posters una vez que hayan sido aprobados por el Comité Organizador. Además se realizarán otras actividades como exposiciones, visitas técnicas y una actividad final.

## IDIOMAS OFICIALES

Español e Inglés

## INVITADOS

Varias conferencias serán impartidas por destacados científicos de prestigio internacional, especialmente invitados a participar en el evento por el Comité Organizador.

## PARTICIPACION

La participación en el evento será como conferencista, ponente u observador. La cuota de inscripción será de USD 100,00 la cual podrá ser abonada directamente en efectivo o mediante cheques de viajero en la oficina de la Conferencia en el momento de la acreditación. Esta cuota

incluye la participación en las actividades científicas, la adquisición de toda la documentación del evento y el disfrute de meriendas y un cocktail de bienvenida.

## INSTRUCCIONES PARA LA ENTREGA DE LOS RESUMENES

Los resúmenes se entregarán mecanografiados a dos espacios en papel de 8 1/2" X 11" y tendrán una extensión no mayor de 150 palabras. Deberán incluir el nombre y los apellidos del autor y los coautores, así como las instituciones y direcciones respectivas. Los títulos de los trabajos tendrán 120 caracteres como máximo.

## CORRESPONDENCIA

Luis Sastre Vidal  
Centro Nacional de Investigaciones Científicas  
Avenida 25 y 158, Cubanacán, Playa  
Ciudad de La Habana, Cuba  
Apartado Postal 6990  
Télex 51 1582 CNIC CU  
FAX 21 9446