



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

Mejoramiento de la producción de ácido clavulánico mediante el cultivo de *Streptomyces clavuligerus* en fermentación extractiva, usando biorreactores operados en lote alimentado.

Jeferyd Yepes García

Universidad de Antioquia

Departamento de Ingeniería Química

Facultad de Ingeniería

2020



Mejoramiento de la producción de ácido clavulánico mediante el cultivo de *Streptomyces clavuligerus* en fermentación extractiva, usando biorreactores operados en lote alimentado.

Jeferyd Yepes García

Trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Ingeniería

Asesor:

Rigoberto Ríos Estepa, PhD.

Tecnología de las Fermentaciones

Grupo de Bioprocesos

Universidad de Antioquia

Departamento de Ingeniería Química

Facultad de Ingeniería

2020

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero darle los agradecimientos a mi familia por apoyarme en todo este camino. También quiero agradecer muy especialmente a mis asesores León Felipe Toro Navarro, Laura Inés Pinilla Mendoza y Rigoberto Ríos Estepa. Por último, expreso mis agradecimientos al grupo de Bioprocesos, a la Universidad de Antioquia y a Colciencias por la financiación recibida para el desarrollo de mis estudios.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	9
NOMENCLATURA	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN.....	13
1. OBJETIVOS.....	17
1.1 Objetivo general.....	17
1.2 Objetivos específicos.....	17
2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	18
2.1 El Ácido Clavulánico (AC) en la lucha contra las bacterias resistentes a los antibióticos	18
2.2 Una visión general del mercado actual del Ácido Clavulánico: panorama en Colombia	19
2.3 <i>Streptomyces clavuligerus</i> , productor de una amplia variedad de metabolitos secundarios.....	23
2.4 Requerimientos nutricionales de <i>Streptomyces clavuligerus</i> y su relación con la síntesis de Ácido Clavulánico	24
2.5 Condiciones operativas del fermentador requeridas para la biosíntesis de Ácido Clavulánico	27
2.6 Producción de Ácido Clavulánico en reactor de tanque agitado operado en lote alimentado	28
2.7 Factores químicos y físicos asociados a la degradación del AC en soluciones acuosas.....	31
2.8 Adsorción de Ácido Clavulánico como estrategia de recuperación del producto de fermentación	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS	36
3.1 Microorganismo, condiciones operativas y de medio de cultivo.....	36
3.2 Evaluación de medios de fermentación a escala de matraz	36
3.3 Estudio del efecto de la temperatura y niveles de sustrato inicial sobre la síntesis de Ácido Clavulánico	38
3.4 Estandarización de las condiciones operativas para la síntesis de Ácido Clavulánico a escala de reactor	38
3.5 Cultivos en reactor operado en lote y lote alimentado	40
3.6 Evaluación de la degradación de Ácido Clavulánico	41
3.7 Establecimiento de condiciones de adsorción.....	43
3.7.1 Pretratamiento de la resina	43
3.7.2 Pretratamiento del caldo de fermentación y efecto de variables operativas sobre el proceso de adsorción	43
3.7.3 Isotermas de adsorción.....	44
3.7.4 Cinética de adsorción de Ácido Clavulánico.....	45
3.7.5 Cinética de desorción de Ácido Clavulánico.....	45
3.8 Fermentación extractiva a escala de matraz y reactor	46
3.9 Técnicas analíticas	48
3.9.1 Cuantificación de Ácido Clavulánico	48
3.9.2 Determinación de aminoácidos.....	48

3.9.3 Cuantificación de biomasa.....	49
3.9.4 Determinación de glicerol.....	49
3.9.5 Cuantificación de fosfato.....	49
3.9.6 Determinación de amonio.....	50
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
4.1 Estudio de medios de cultivo a nivel de matraz para el cultivo de <i>Streptomyces clavuligerus</i>	51
4.2 Estudio del efecto de la temperatura y concentración inicial de sustrato en cultivos a nivel de matraz.....	54
4.3 Estandarización de condiciones operativas a escala de reactor.....	57
4.4 Cultivos a escala de reactor.....	59
4.4.1 Cultivo en reactor operado en lote.....	59
4.4.2 Experimentos en reactor operado en lote alimentado, usando pulsos de sustrato.....	63
4.4.3 Ensayos en reactor operado en lote alimentado a flujo semi–continuo.....	64
4.4.4 Comparación de estrategias de operación a escala de reactor.....	68
4.5 Degradación de Ácido Clavulánico.....	70
4.6 Cinéticas de adsorción y desorción de Ácido Clavulánico.....	73
4.7 Isotermas de adsorción.....	74
4.8 Efecto del pH y relación sólido/líquido en la adsorción de Ácido Clavulánico.....	77
4.9 Fermentación extractiva a escala de matraz y reactor.....	80
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	84
5.1 Conclusiones.....	84
5.2 Recomendaciones.....	85
REFERENCIAS.....	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ruta de síntesis del AC. Tomado de Ser y col. [22].	19
Figura 2. Evolución de ventas de Augmentin® en todo el mundo para los últimos seis años	21
Figura 3. Porcentaje de participación de diferentes importadores con respecto a la posición arancelaria N° 3004201900 para el año 2015.	22
Figura 4. Morfología de <i>Streptomyces clavuligerus</i> bajo microscopia óptica (izq.) y microscopia electrónica de barrido (der.) durante fermentaciones sumergidas.	24
Figura 5. Reacción de derivatización del AC. Tomado de Ramírez y col. [29].	32
Figura 6. Representación esquemática de procedimientos realizados para la implementación de fermentación extractiva con <i>Streptomyces clavuligerus</i> a escala de matraz o reactor.	47
Figura 7. Comparación de niveles de producción de AC y formación de biomasa durante el cultivo con <i>Streptomyces clavuligerus</i> , usando diferente composición de nutrientes.	53
Figura 8. Cinéticas de síntesis de AC, formación de biomasa y consumo de glicerol, durante el cultivo de <i>Streptomyces clavuligerus</i> a escala de matraz. Arriba: Temperatura de cultivo = 20°C y abajo: Temperatura de cultivo = 28°C.	56
Figura 9. Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, k_{La} , a partir del método dinámico [800 rpm-1 vvm].	58
Figura 10. Perfiles de concentración de AC, formación de biomasa y consumo de glicerol, obtenidos durante el cultivo con <i>Streptomyces clavuligerus</i> en reactor, expuesto a diferentes concentraciones iniciales de sustrato, S_0 .	61
Figura 11. Microscopia óptica de <i>Streptomyces clavuligerus</i> luego de 72 h de cultivo en medio a base de ISP. Izq: escala de reactor y der: escala de matraz.	62
Figura 12. Dinámica de la síntesis de AC obtenido a partir del cultivo en reactor de <i>Streptomyces clavuligerus</i> , operado en lote alimentado con pulsos de sustrato. Arriba: BP2, medio: BP3 y abajo: BP4.	65
Figura 13. Dinámica de la síntesis de AC obtenido a partir del cultivo en reactor de <i>Streptomyces clavuligerus</i> , operado en lote alimentado con flujo semi-continuo. Arriba: FB1 y abajo: FB2.	67
Figura 14. Microscopia óptica de <i>Streptomyces clavuligerus</i> a las 72 h de cultivo a escala de reactor. Izq: FB1 y der: BP2.	68
Figura 15. Cinética de degradación de AC bajo dos matrices de almacenamiento, de AC libre (AC) y el complejo clavulanato/imidazol (AC/i). Arriba: 25°C, líneas continuas indican los valores predichos por el modelo exponencial y abajo: -80°C.	72
Figura 16. Cinéticas de adsorción y desorción de AC proveniente de cultivos de <i>Streptomyces clavuligerus</i> , a resina de intercambio iónico amberlita IRA 400.	74
Figura 17. Isotermas de adsorción de AC entre 10 y 30°C. Líneas continuas indican los valores estimados por el modelo Langmuir para cada condición de temperatura.	76

Figura 18. Gráfico de contorno de superficie de respuesta tridimensional para los efectos simultáneos de la relación S/L y pH inicial sobre el porcentaje de adsorción de AC.	79
Figura 19. Diagrama de Pareto estandarizado para el estudio de adsorción de AC.	80
Figura 20. Masa acumulativa de AC durante fermentación extractiva. Arriba: reactor y abajo: matraz.	81

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición de medios de cultivo para cultivos con <i>Streptomyces clavuligerus</i> a escala de matraz.	37
Tabla 2. Concentración de aminoácidos obtenida mediante hidrólisis ácida de los sustratos ISP, HS o casaminoácidos....	37
Tabla 3. Arreglo experimental para estudiar el efecto de la temperatura y concentración inicial de glicerol sobre la síntesis de ácido clavulánico.....	38
Tabla 4. Parámetros cinéticos de cultivo en reactor de <i>Streptomyces clavuligerus</i> operado en semi–continuo.....	41
Tabla 5. Parámetros cinéticos para cultivos en matraz de <i>Streptomyces clavuligerus</i> , haciendo uso de medios de diferente composición.....	53
Tabla 6. Parámetros de cultivo obtenidos durante fermentaciones de <i>Streptomyces clavuligerus</i> a escala de matraz, bajo diferentes temperaturas de incubación y concentración inicial de sustrato S_0	55
Tabla 7. Parámetros de cultivo obtenidos durante cultivos con <i>Streptomyces clavuligerus</i> a escala de reactor operado en lote, lote alimentado con pulsos, y semi–continuo.....	60
Tabla 8. Constantes de degradación y concentración inicial de AC a 25°C, bajo dos matrices de almacenamiento, para AC y el complejo clavulanato/imidazol (AC/i).....	70
Tabla 9. Parámetros cinéticos del ajuste de datos experimentales al modelo Langmuir, durante isothermas de adsorción de AC.....	75
Tabla 10. Análisis de varianza para modelo de efectos: efecto de la relación S/L y pH inicial sobre el porcentaje de adsorción de AC.....	79
Tabla 11. Parámetros de cultivo luego de la implementación de fermentación extractiva a escala de reactor y matraz.....	83

ABREVIATURAS

1. AC: Ácido clavulánico.
2. ADN: Ácido desoxirribonucleico.
3. ANOVA: Analysis of variance (Análisis de Varianza).
4. ATP: Adenosín trifosfato.
5. ATPS: Aqueous Two Phase System (Sistema acuoso de dos fases).
6. DNS: Ácido-3,5-dinitrosalicílico.
7. FE: Fermentación extractiva.
8. GSPG: medio químicamente definido a base de glicerol, sacarosa, prolina y ácido glutámico.
9. GSK: Compañía GlaxoSmithKline.
10. G3P: Gliceraldehído-3-fosfato.
11. HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta eficiencia).
12. HS: Harina de Soya.
13. INS: Instituto Nacional de Salud.
14. INVIMA: Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos.
15. IRA: Infección Respiratoria Aguda.
16. ISP: Isolated Soy Protein (Proteína aislada de soya).
17. LSD: Least significant difference (Diferencia Mínima Significativa).
18. MOPS: *3-(N-morpholino) propanesulfonic acid*.
19. POS: Plan Obligatorio de Salud.
20. QD: Medio de fermentación químicamente definido.
21. SM: Cultivo semi-continuo.
22. MI: Micelio primario de *S. clavuligerus*.
23. MII: Micelio secundario de *S. clavuligerus*.

NOMENCLATURA

1. F : Caudal de alimentación al fermentador (g/L).
2. S_0 : Concentración inicial de glicerol (g/L).
3. k_{1a} : Coeficiente de transferencia de oxígeno de la fase líquida por el área interfacial líquido-gas (h^{-1}).
4. C_{AL} : Concentración de oxígeno en el cultivo (mg O_2/L).
5. \bar{C}_{AL} : Porcentaje de oxígeno disuelto máximo luego de reestablecida la oxigenación.
6. C_{AL_i} : Porcentaje de oxígeno disuelto medido en un tiempo i .
7. N_A : Velocidad de transferencia de oxígeno (mg $O_2/L.h$).
8. C_{AL}^* : Concentración de equilibrio en la fase líquida o solubilidad del oxígeno (mg O_2/L).
9. Q_{O_2} : Velocidad de consumo de O_2 por parte de *S. clavuligerus*.
10. V_0 : Volumen inicial (L).
11. C_{gF} : Concentración de glicerol en la alimentación (g/L).
12. r_s : Velocidad volumétrica de consumo de glicerol (g/L.h).
13. V_f : Volumen final (L).
14. C_{AC} : Concentración de AC (mg/L).
15. C_{AC_0} : Concentración inicial de AC (mg/L).
16. k_d : Constante de degradación de AC (h^{-1}).
17. r_d : Velocidad volumétrica de descomposición de AC (mg/L.h).
18. m_{AC-ads} : Masa de AC adsorbida (mg).
19. C_{AC-i} : Concentración de AC en un instante i (mg/L).
20. V : Volumen (L).
21. V_i : Volumen del caldo en un instante i .
22. m_{AC-des} : Masa de AC liberada desde la resina (mg).
23. p_{AC-des} : Porcentaje de AC liberado desde la resina.
24. S/L : Relación sólido/líquido entre la resina y el sobrenadante (%).
25. q_e : Cantidad de AC adsorbida por gramo de resina (mg $_{AC}$ /g $_{resina}$).
26. m_{ads} : Masa del adsorbente (g).
27. q_m : Capacidad máxima de adsorción de AC por la resina (mg $_{AC}$ /g $_{resina}$).
28. k : Coeficiente de Langmuir (mg/L).
29. m_{AC-c_i} : Masa acumulativa de AC en un instante i (mg).
30. C_{AC-c_i} : Concentración acumulativa de AC en un instante i (mg/L).
31. μ , velocidad específica de crecimiento (h^{-1}).
32. $Y_{p/S}$: Rendimiento de sustrato en producto (mg $_{AC}$ /g $_S$).
33. $Y_{X/S}$: Rendimiento de sustrato en biomasa (g $_X$ /g $_S$).
34. $Y_{p/X}$: Rendimiento de biomasa en producto (g $_{AC}$ /g $_X$).
35. r_p : Velocidad volumétrica de formación de AC (mg $_{AC}$ /L.h).
36. $AC_{máx}$: Concentración máxima de AC (mg/L).
37. $X_{máx}$: Concentración máxima de biomasa (g/L).
38. OD_{min} : Porcentaje mínimo de oxígeno disuelto durante la fermentación.
39. AC/i : Complejo clavulanato/imidazol.
40. r^2 : Coeficiente de determinación.

RESUMEN

El ácido clavulánico (AC), es un potente inhibidor de enzimas β -lactamasas, y es obtenido mediante el cultivo del actinomiceto *Streptomyces clavuligerus* (*S. clavuligerus*) (Saudagar, Survase, & Singhal, 2008). La producción de AC a escala industrial es tradicionalmente llevada a cabo en biorreactores de tanque agitado, donde el modo de operación ha demostrado ser un factor determinante para la obtención de altos rendimientos de producto (Neto et al., 2005). El desarrollo de fermentaciones en reactores operados en lote alimentado ha sido reportado como la mejor estrategia para la síntesis de AC, alcanzando concentraciones mayores a 1000 mg/L (Bellao, Antonio, Araujo, & Badino, 2013); sin embargo, no existe un consenso acerca de las condiciones óptimas de operación tales como diseño de medios, velocidad de suministro de sustrato, agitación, temperatura y aireación, que permitan alcanzar una alta concentración de producto.

De otra parte, los elevados costos asociados a las operaciones de separación/purificación del producto dejan ver la necesidad de contar con alternativas económicas para la recuperación del AC. En este sentido, la inclusión de resinas de intercambio iónico en el proceso productivo, ha promovido altos porcentajes de extracción, lo que ayuda a prevenir su degradación (Costa & Colli, 2015). En el presente estudio, se determinaron las condiciones nutricionales y medioambientales que favorecen la biosíntesis de AC, al igual que las mejores condiciones de temperatura, agitación y aireación, en fermentaciones a escala de matraz y de reactor de laboratorio (operado en lote y lote alimentado). Asimismo, se realizaron ensayos de separación y purificación de AC mediante la resina amberlita IRA 400 y, a partir de un diseño experimental, fue posible conocer el efecto de variables como pH, temperatura (isotermas de adsorción), relación sólido/líquido, cinéticas de adsorción y desorción, sobre el porcentaje de separación de AC. Asimismo, se encontró que los medios a base de proteína aislada de soya y concentraciones de glicerol de al menos 15 g/L favorecen la síntesis de AC, permitiendo niveles de producción de hasta 340 mg/L, tanto en cultivos en matraz como en cultivos en reactor de laboratorio. Adicionalmente, el modo de operación por lote alimentado, mediante pulsos de glicerol o suministro semi-continuo, incrementó la producción de AC hasta 4 veces respecto a cultivos operados en lote. Por último, la implementación de una estrategia de fermentación extractiva permitió obtener un máximo porcentaje adsorción de AC cercano al 55%; la máxima desorción fue del 65%.

Finalmente, las isotermas de adsorción demostraron que, a bajas temperaturas (cercas a 10°C), se beneficia el proceso de recuperación de AC. De esta manera, la estrategia de operación de reactor de laboratorio en lote alimentado por pulsos o suministro semi-continuo constituye una alternativa promisoría para la producción de AC, usando medios de cultivo enriquecidos a base de proteína aislada de soya; igualmente, la estrategia de recuperación de producto usando resina de intercambio iónico, constituye una alternativa viable en la formulación de sistemas de producción-recuperación simultánea de ácido clavulánico.

Palabras clave: Ácido Clavulánico (AC), *Streptomyces clavuligerus*, lote alimentado, fermentación extractiva.

ABSTRACT

Clavulanic acid (AC) is a potent inhibitor of β -lactamase enzymes, and it is obtained by culturing the actinomycete *Streptomyces clavuligerus* (*S. clavuligerus*). AC production at industrial scale is traditionally carried out in stirred tank bioreactors, where the mode of operation has been proven to be a determining factor in obtaining high product yields. The development of fermentations in reactors operated in fed-batch has been reported as the best strategy for the synthesis of AC, reaching concentrations greater than 1000 mg/L; however, there is no consensus on the optimal operating conditions that allow reaching a high product concentration such as media design, substrate supply speed, agitation, temperature and aeration.

On the other hand, the high costs associated with the separation/purification operations of the product reveal the need for economic alternatives for the recovery of AC. In this sense, the inclusion of ion exchange resins in the production process has promoted high extraction percentages, which helps to prevent their degradation. In the present study, the nutritional and environmental conditions that favor CA biosynthesis were determined, as well as the best conditions of temperature, stirring and aeration, in flask and laboratory reactor scale fermentations (operated in batch and fed-batch). Likewise, AC separation and purification tests were carried out using the resin amberlite IRA 400 and it was possible to know the effect of variables such as pH, temperature (adsorption isotherms), solid/liquid ratio, and kinetics of adsorption and desorption, on the percentage of AC separation.

It was found that the media based on isolated soybean protein and glycerol concentrations of at least 15 g/L favor the synthesis of AC, allowing production levels of up to 340 mg/L, both in flask and reactor cultures. Additionally, the fed-batch mode of operation, by means of glycerol pulses or semi-continuous supply, increased AC production up to 4 times compared to batch-operated crops. Lastly, the implementation of an extractive fermentation strategy allowed obtaining a maximum AC adsorption percentage close to 55%; the maximum desorption was 65%.

Finally, the adsorption isotherms showed that, at low temperatures (close to 10°C), the AC recovery process was benefited. In this way, the operating strategy of a batch laboratory reactor fed by pulses or semi-continuous supply constitutes a promising alternative for the production of AC, using enriched culture media based on isolated soy protein; likewise, the product recovery strategy using ion exchange resin constitutes a viable alternative in the formulation of clavulanic acid production-simultaneous recovery systems.

Keywords: Clavulanic Acid (CA), *Streptomyces clavuligerus*, fed-batch, extractive fermentation.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas constituyen una de las diez causas de muerte más comunes en el mundo, debido principalmente a su fácil contagio y a las escasas condiciones de salubridad en las que viven las comunidades densamente pobladas, especialmente en el tercer mundo (Ríos, Mattar, & González, 2011). Tradicionalmente los tratamientos para el control de enfermedades infecciosas están basados en el uso de antibióticos, siendo los antibióticos de tipo β -lactámico los más comúnmente usados. Estos compuestos son metabolitos secundarios de bajo peso molecular; en el caso de los antibióticos β -lactámicos, interfieren en los procesos de síntesis de peptidoglicano, componente importante de la pared celular (de Lima Procópio, Reis da Silva, Kassawara Martins, de Azevedo, & de Araújo, 2012). El mercado de antibióticos factura anualmente más de 45 billones de dólares, de los cuales el 65% está representado por antibióticos β -lactámicos (Bush, 2004; Ozcengiz & Demain, 2013).

Una de las mayores preocupaciones relacionadas con el tratamiento de las enfermedades infecciosas es debida a la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos tradicionales, causada principalmente por el uso excesivo de antibióticos que promueven el desarrollo de mecanismos de resistencia por parte de los microorganismos patógenos, especialmente aquellos involucrados en el ámbito intrahospitalario (Sánchez De Rivas, 2006).

La inhibición de la acción de los antibióticos β -lactámicos es el principal mecanismo de resistencia de los patógenos, degradando el anillo *penam* por la excreción de enzimas β -lactamasas (Kong, Schneper, & Mathee, 2010). Dentro de los principales antibióticos β -lactámicos se encuentran el Sulbactam, el Tazobactam y el metabolito secundario Ácido clavulánico (AC), los cuales actúan como inhibidores competitivos uniéndose al sitio activo de enzimas tipo β -lactamasas (Saudagar et al., 2008). En consecuencia, el AC representa un compuesto de importancia médica e industrial que cuenta con un mercado anual de más de 1 billón de dólares (Elander, 2003). En Colombia, el costo de antibióticos a base de AC e.g., Curam®, Clavulin® y Clavutec®, provenientes de las compañías farmacéuticas GSK (GlaxoSmithKline), Sandoz GMBH, entre otras, es superior a \$65.000 COP, para presentaciones

de 14 tabletas (La Rebaja, 2017). Sin embargo, el sistema de salud colombiano subsidia la prescripción de AC únicamente en casos de neumonía para pacientes del Grupo I (según la escala CRB-65) con factores de riesgo tales como tabaquismo, alcoholismo y enfermedades concomitantes (Montúfar, 2013). Para el caso de la ciudad de Medellín, hasta el tercer período epidemiológico del año 2016, más de 155.000 personas recibieron una prescripción médica que posiblemente incluyó el AC para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Secretaría de Salud de Medellín, 2016).

Todo el AC obtenido industrialmente es producido por fermentación sumergida usando la bacteria *Streptomyces clavuligerus* (*S. clavuligerus*); estos cultivos se llevan a cabo en reactor de tanque agitado o en matraz (Higgins & Kastner, 1971), alcanzando niveles de producto de hasta 1.000 mg/L, usando medios de cultivo a base de derivados de soya y fuente de carbono como glicerol y lípidos (Domingues, Teodoro, Hokka, Badino, & Araujo, 2010; Efthimiou, Thumser, & Avignone-Rossa, 2008; Gouveia, Baptista-Neto, Badino Jr, & Hokka, 2001; Lee & Ho, 1996; Maranesi, Baptista-Neto, Hokka, & Badino, 2005; Teodoro, Araujo, Hokka, & Badino, 2010). La biosíntesis de AC inicia con la condensación del precursor C₃ proveniente de la ruta glucolítica, el gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y el aminoácido arginina, precursor C₅, que luego de sucesivas reacciones de óxido-reducción da lugar finalmente al AC (Ser et al., 2016). La importancia de las fuentes nutricionales complejas como proteínas, licor de maíz, extractos de soya, derivados del maní entre otras, es debida principalmente a su alto contenido de aminoácidos como glutamato, prolina y aspartato que favorecen la síntesis de arginina y de esta manera la acumulación de AC (Gouveia et al., 2001; Hamedi, Imanparast, Tirandaz, Laamerad, & Sadrai, 2011; Ortiz, Hokka, & Badino, 2007). En contraste, *S. clavuligerus* posee una inusual incapacidad de consumir glucosa, haciendo de lípidos y glicerol las fuentes de carbono preferidas, que proveen el precursor G3P para la síntesis de AC; G3P es también usado como metabolito intermediario para la generación de biomasa, producción de energía y síntesis de biomoléculas (Bushell, Kirk, Zhao, & Avignone-Rossa, 2006; Efthimiou et al., 2008; Lee & Ho, 1996; Maranesi et al., 2005).

Existen diferentes factores asociados al cultivo de *S. clavuligerus* que determinan la cantidad AC producido, entre ellos, composición y tipo de nutrientes usados, patrones de regulación

inherentes a la biosíntesis de producto, tipo de reactor y modo de operación (Saudagar et al., 2008). A lo largo de las últimas 2 décadas, se ha planteado la adición constante o intermitente de sustratos durante el cultivo tales como la fuente de carbono (glicerol) y precursores anabólicos como, arginina, treonina y ornitina (Domingues et al., 2010; Teodoro et al., 2010), en reactores operados por lote alimentado, la mejor estrategia reportada hasta ahora para la biosíntesis de AC (Bellao et al., 2013; Neto et al., 2005). En consecuencia, la velocidad de suministro de nutrientes, además de la fase de crecimiento en la que se encuentra la bacteria, representan aspectos importantes a considerar en ensayos en lote alimentado (Ser et al., 2016).

De otro lado, existen limitaciones para obtener altas concentraciones de AC usando cepas de laboratorio e.g., *S. clavuligerus* ATCC27064; para mejorar niveles de producción, se sugiere el uso de medios de cultivo y condiciones operacionales óptimas que, junto con el uso de cepas modificadas genéticamente, contribuyan a mejorar los niveles de producción en procesos a gran escala (Bellao et al., 2013; Korbekandi et al., 2010; Viana Marques, Carneiro Cunha, et al., 2011). Asimismo, existen limitaciones asociadas a la inestabilidad de la molécula de AC, mostrando cinéticas de degradación que dan lugar a la formación de subproductos no deseados [20]. La inestabilidad del AC se explica por su susceptibilidad a múltiples factores como la temperatura, el pH, la presencia de contaminantes y el propio microorganismo (Roubos, Krabben, De Laat, Babuška, & Heijnen, 2002).

El AC es degradado una vez sintetizado y excretado al medio fermentativo, incluso, se ha reportado su degradación en presencia de agentes acomplejantes como el imidazol, cuyo uso tiene como propósito la obtención de una molécula más fácilmente detectable durante la cuantificación por cromatografía líquida (Ramirez-Malule et al., 2016). La presencia del AC en el medio representa un reto importante en la optimización de las condiciones de cultivo a nivel experimental, haciendo necesaria la implementación de estrategias que combinan separación y purificación del AC, con el fin de disminuir su velocidad de degradación y así promover su acumulación y recuperación.

Algunos estudios han sido orientados al manejo de la inestabilidad de la molécula de AC y a obtener mayores porcentajes de producto recuperado; diversos trabajos han involucrado la

extracción de AC con solventes afines y su precipitación con compuestos como *t*-*octilamina*, favoreciendo la formación de las respectivas sales de sodio o potasio (D B Hirata et al., 2009, 2013; D Battaglia Hirata, de Oliveira, Ferreira, & Leão, 2009). Además, se ha descrito la remoción del AC que involucran técnicas de adsorción con resinas de intercambio iónico (amberlita o hidrotalcita calcinada), acoplados al cultivo, denominados procesos de fermentación extractiva (Costa & Colli, 2015; Cuel, Barboza, Hokka, & Kwong, 2011). Otras metodologías plantean la producción y separación simultánea de AC mediante ATPS (*Aqueous Two Phase System*, por sus siglas en inglés), donde, el medio de fermentación incluye componentes para la extracción a través de la interfase formada entre las fases insolubles (Polietilenglicol y *buffer* fosfato, por ejemplo) (Viana Marques, Pessoa-Júnior, et al., 2011). No obstante la implementación de las anteriores estrategias, la degradación del AC constituye aún un problema susceptible de ser tratado mediante el diseño de técnicas que combinen de una manera más eficiente las condiciones operativas de fermentación con sistema de recuperación simultánea.

Este trabajo tiene como objetivo desarrollar estrategias de operación que permitan el favorecimiento de la producción de AC, mediante el cultivo en lote alimentado usando la bacteria *Streptomyces clavuligerus*. La metodología usada incluyó el estudio de las condiciones del proceso fermentativo a escala de matraz, tales como composición del medio de cultivo, temperatura y niveles de la fuente de carbono; adicionalmente, usando un reactor de laboratorio (1L), se realizaron cultivos operados en lote y lote alimentado para evaluar su efecto sobre la acumulación de producto. Asimismo, en relación a la recuperación del AC producido, se realizaron fermentaciones extractivas, tanto a escala de matraz como de reactor, identificando las mejores condiciones de temperatura, pH y niveles de relación sólido/líquido con el fin de evaluar el efecto de la remoción de producto sobre la biosíntesis de AC.

En las siguientes secciones se presentan textualmente los objetivos del trabajo, además de aspectos teórico/experimentales que esbozan los cimientos sobre los cuales se desarrolla este estudio. Seguidamente se incluye el detalle de las técnicas analíticas usadas y diseños experimentales formulados, el análisis y la discusión de resultados y finalmente las conclusiones y recomendaciones.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

Desarrollar estrategias de producción que permitan optimizar la producción de ácido clavulánico, mediante el cultivo en lote alimentado de *Streptomyces clavuligerus*.

1.2 Objetivos específicos

- Establecer las mejores condiciones operativas para la síntesis de AC mediante fermentación extractiva a nivel de matraz, empleando resina aniónica como material de soporte y medios de cultivo a base de proteína aislada de soya.
- Estandarizar el proceso de producción de ácido clavulánico a nivel de reactor de laboratorio, usando la técnica de lote alimentado.
- Desarrollar un sistema de producción y separación simultánea de AC que combine las técnicas de cultivo en lote alimentado y fermentación extractiva en biorreactor de laboratorio.

2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

2.1 El Ácido Clavulánico (AC) en la lucha contra las bacterias resistentes a los antibióticos

El AC es un compuesto de origen microbiano, caracterizado como metabolito secundario extracelular, descubierto en los años 70 por científicos británicos (Reading & Cole, 1977); el AC posee una gran importancia médica e industrial; su estructura química cuenta, al igual que los antibióticos β -lactámicos, con un anillo *penam* que le confiere la capacidad de inhibir enzimas tipo β -lactamasas. Por tanto, el AC es empleado eficazmente en combinación con antibióticos como amoxicilina, en tratamientos de enfermedades infecciosas causadas por bacterias resistentes como *E. coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, entre otras (Saudagar et al., 2008). A su vez, el AC restringe el mecanismo de supervivencia desarrollado por las bacterias resistentes, permitiendo la acción del antibiótico impidiendo la síntesis del peptidoglicano de la pared celular (Ser et al., 2016).

Con respecto a la vía de biosíntesis de AC, el aminoácido L-arginina (precursor C₅) y el intermediario glucolítico, el gliceraldehído-3-fosfato (G3P), son precursores directos de la producción de AC (ver *Figura 1*). La reacción está mediada por la N₂-(2-carboxietil) arginina sintetasa (Ceas), produciendo el compuesto acíclico N₂-(2-carboxietil) arginina, que, después de sucesivas reacciones de oxidación-reducción, da lugar al ácido clavamínico, que difiere del AC en su estereoquímica. Este es uno de los metabolitos perteneciente al grupo de clavamas que *S. clavuligerus* y otras especies de *Streptomyces* acumulan, y que son ineficaces como inhibidores de β -lactamasas (Jensen, 2012). La conversión de ácido clavamínico en AC requiere la inversión de la estereoquímica del sistema de anillo para formar AC. Las similitudes estructurales entre el AC y las clavamas reflejan elementos compartidos de una vía biosintética común (Tahlan et al., 2007). Los pasos compartidos en las rutas biosintéticas se llaman "etapas tempranas", que conducen al último intermediario, el ácido clavamínico, mientras que las etapas específicas, utilizadas para la producción de clavamas o AC se denominan "etapas tardías" (Jensen, 2012).

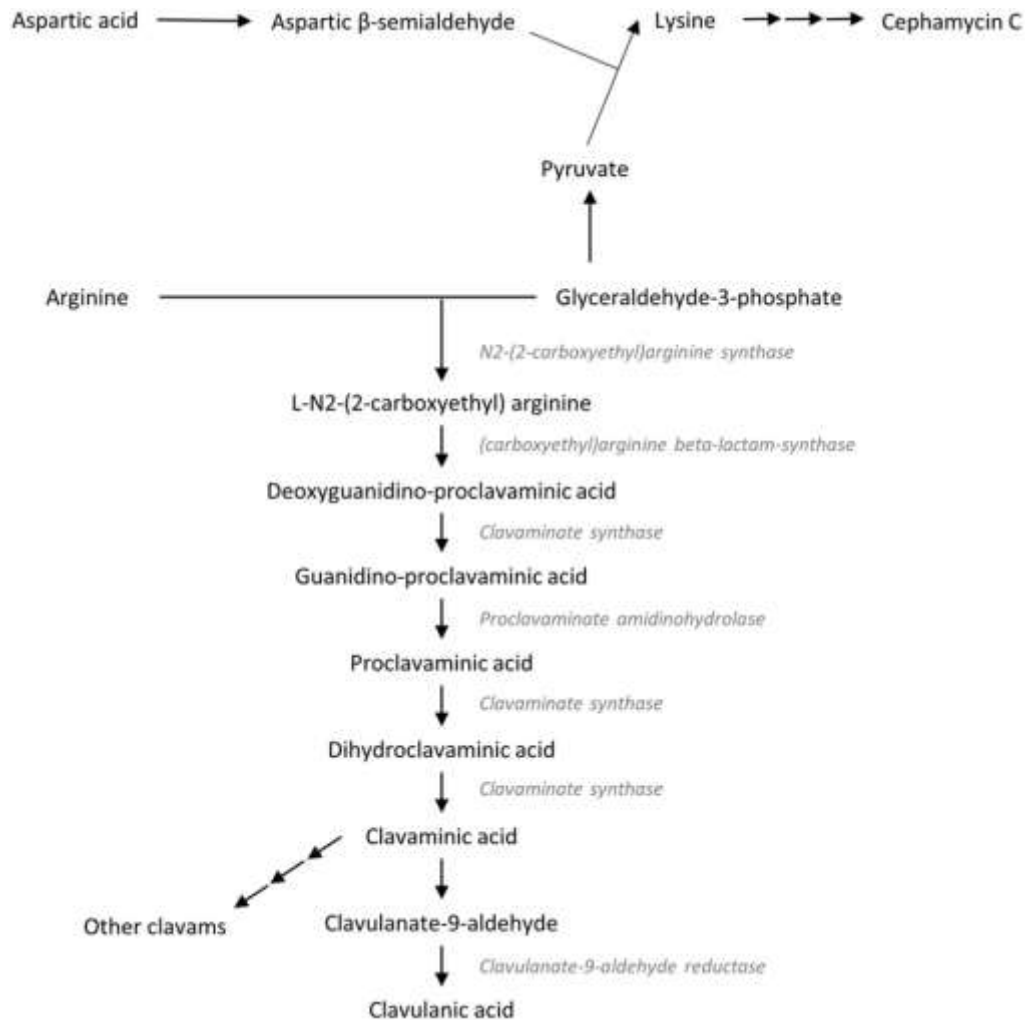


Figura 1. Ruta de síntesis del AC. Tomado de Ser y col. (Ser et al., 2016).

2.2 Una visión general del mercado actual del Ácido Clavulánico: panorama en Colombia

El mercado de medicamentos, y en especial el mercado de antibióticos, constituye un campo económico que anualmente reporta ganancias en billones de dólares (de Lima Procópio et al., 2012). Por ejemplo, los antibióticos durante el año 2015 reportaron ventas superiores a los 39 billones de dólares (Grand View Research, 2016), donde, los antimicrobianos denominados β-lactámicos constituyen al menos un 65% de las ventas, entre ellos las cefalosporinas, la penicilina y el AC (Ozcengiz & Demain, 2013).

La producción de antibióticos, como la penicilina –el antibiótico de mayor demanda y primero en ser descubierto– anualmente ronda niveles que superan las 60.000 toneladas a través de fermentaciones en tanques con un volumen que oscila entre 30.000 y 100.000 galones, en procesos que pueden tardar hasta 200 horas (Ozcengiz & Demain, 2013). En contraste, el AC en su forma de clavulanato de potasio, es resultado de un proceso costoso y complejo llevado a cabo en reactores que superan los 200 L con tiempos de hasta 200 h (Neves, Vieira, & Menezes, 2001), con altos costos asociados a la separación y purificación, debido a la dificultad que supone la inestabilidad de la molécula (Bersanetti, Almeida, Barboza, Araújo, & Hokka, 2005).

Por su parte, el Augmentin® (GlaxoSmithKline o GSK), antibiótico β -lactámico mezclado con AC ha sido el más vendido en el mundo y primero en comercializarse en el año 1981, para el año 2003 superó los 2.1 billones de dólares en ganancias (Demain, 2007). Sin embargo, tres años después de liberada la patente, en el año 2004, el mercado de Augmentin® cayó hasta los 107 millones de dólares, lo que generó la introducción en el mercado de variantes como Augmentin ES-600 y Augmentin XR, dicho escenario también ocasionó que GSK detuviera la comercialización de Augmentin® en Estados Unidos cediendo los derechos de comercialización a una empresa denominada Dr. Reddy's, debido a la alta oferta de medicamentos genéricos que involucraban la combinación de amoxicilina y AC, concentrándose en mercados como el europeo y las denominadas economías emergentes (IMS Health, 2013). Para el año 2010 las ventas a nivel mundial de Augmentin®, representadas en todas sus dosis y variantes, fueron de 966 millones de dólares, constituyendo casi el 45% de todo el mercado de ventas de antibióticos de GSK, donde, sólo en países emergentes se evidenciaron ventas por 450 millones de dólares, siendo uno de los antibióticos más vendidos, debido a que, luego del primer trimestre de ese año, GSK redujo el precio del fármaco en un 50% para enfrentar la amplia oferta de medicamentos genéricos. Adicionalmente, el panorama de ventas de Augmentin® para el año 2010 lo completa ventas por 371 millones de dólares en Europa y 17 millones de dólares en USA. Sin embargo, dicho monto de ventas para el año 2010 representó una caída del 6,3% en las ventas con respecto al año anterior, afectando la rentabilidad de GSK, la cual, para ese año disminuyó cerca de un 4,2%. La **Figura 2**, evidencia la tendencia de ventas de Augmentin® en todo el mundo para los últimos 6 años (Grand View Research, 2016).

Actualmente, la comercialización de AC en combinación con amoxicilina en Colombia es muy amplia debido al ingreso de múltiples fármacos genéricos por medio de diferentes importadoras. Ante el INVIMA cuentan con registro sanitario para importar y vender AC mezclado con amoxicilina más de 10 empresas, tales como: GSK, Sandoz GMBH, Aurobindo Pharma Colombia, BCN Medical, Okasa Pharma, Laboratorios IPCA, entre otros, con productos reconocidos como Curam®, Koact®, Sumivulin®, Clavutec®, Clavulax® y Clavulin®. Sólo una compañía colombiana cuenta con registro vigente para la fabricación del medicamento, registrada como Farmalógica S.A, aunque actualmente dicha empresa no oferta el fármaco dentro de su portafolio (Farmalógica, 2017). A la fecha algunas compañías colombianas manufacturan productos a base inhibidores de β -lactamasas, como Trifamox IBL, el cual consiste en la mezcla de ampicilina con Sulbactam, producido por Laboratorios BAGO (INVIMA, 2017).

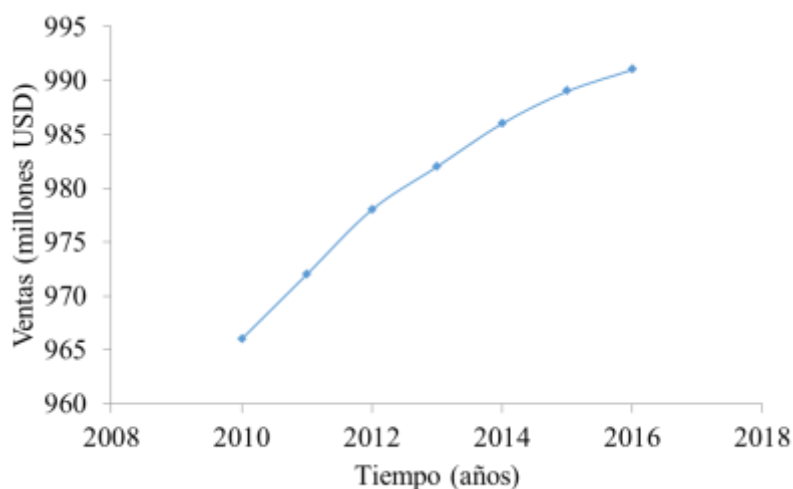


Figura 2. Evolución de ventas de Augmentin® en todo el mundo para los últimos seis años.

De otra parte, la importación a Colombia de medicamentos que contienen AC, es llevada a cabo bajo la posición arancelaria N° 3004201900 (los demás medicamentos que contengan otros antibióticos, para uso humano), donde, para el año 2015 se evidenció la importación de más de 600 toneladas correspondientes a más de 97 millones USD, provenientes de las principales empresas farmacéuticas, 40% corresponden al grupo de Pfizer, Merck, Roche y Novartis de Colombia. Para el año 2015 Pfizer reportó importaciones por más de 17 millones de dólares, equivalentes a 110 toneladas de fármacos. La **Figura 3** evidencia la participación de los

diferentes importadores en el total de importaciones para el año 2015, donde, al menos 65 empresas reportaron la entrada de medicamentos antimicrobianos al país (DANE, 2017).

En Colombia, la prescripción y dispensación de AC en combinación con amoxicilina por parte de las entidades prestadoras de servicios de salud para pacientes pertenecientes al POS (Plan Obligatorio de Salud), está restringida única y exclusivamente bajo diagnósticos de neumonía causada por agente bacteriano, y aunque alrededor del 90% de la población colombiana se encuentra cubierta por el POS (bajo régimen contributivo o subsidiado) el acceso a los servicios médicos sólo está garantizado para el 75% de la población (Ayala García, 2014). Sin embargo, pacientes no afiliados al POS, a los cuales se les prescriba amoxicilina más AC, deben adquirir el medicamento por cuenta propia bajo precios que oscilan entre \$65.000 y \$75.000 COP (caja por 14 tabletas de 500 ó 825 mg amoxicilina más 125 mg AC), lo que representa casi 8 veces el costo de la misma dosis de amoxicilina sin AC (La Rebaja, 2017).

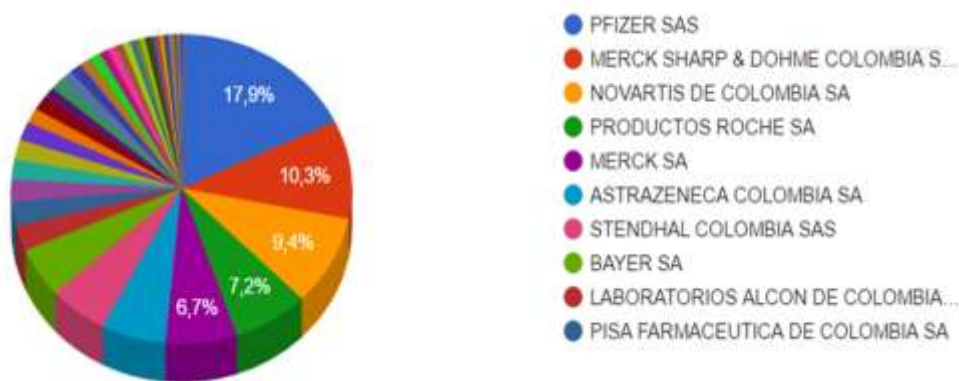


Figura 3. Porcentaje de participación de diferentes importadores con respecto a la posición arancelaria N° 3004201900 para el año 2015.

Según la Asociación Colombiana de Neumología y Cirugía de Tórax, la prescripción de AC + amoxicilina debe ser recomendada para pacientes catalogados en el Grupo I (según la escala CRB-65) que no tengan factores de riesgo como tabaquismo, alcoholismo y enfermedades concomitantes, es decir, la prescripción de AC está sugerida para pacientes con menores factores de riesgo; mientras que para los casos que sea necesaria la hospitalización o ingreso a UCI, se deben prescribir antibióticos mucho más potentes (Montúfar, 2013). En consecuencia, en nuestro país, el sector salud mostró un gasto de más de 25.000 millones de pesos en el año 2011 y al

menos un 4% de los egresos de los hospitales están relacionados por atención a pacientes con IRA (Infección respiratoria Aguda), donde la neumonía es una de las principales causas de muerte, con 13 fallecimientos por cada 100.000 habitantes (Ministerio de Salud y Protección Social, 2014). En Medellín solamente, hasta el tercer período epidemiológico del año 2016, se presentaron más de 162.000 casos asociados a IRA, 3.700 de esos casos requirieron hospitalización (Secretaría de Salud de Medellín, 2016), y según cifras del INS (Instituto Nacional de Salud), la prevalencia de enfermedades similares a la influenza e IRA está concentrada en un 50% en Antioquia, Bogotá y el Valle del Cauca (Moreno, 2015).

2.3 *Streptomyces clavuligerus*, productor de una amplia variedad de metabolitos secundarios

El género *Streptomyces* es productor del 80% de los antibióticos usados en el mundo (de Lima Procópio et al., 2012), lo que resalta su gran importancia médica e industrial; la especie *S. clavuligerus* por ejemplo, posee la habilidad para sintetizar metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana como cefamicina C y holomicina, compuestos con estructura clavama con propiedades antifúngicas y antitumorales además del inhibidor β -lactámico, el ácido clavulánico (AC) (Jensen, 2012; Robles Reglero, 2014; Saudagar et al., 2008). *S. clavuligerus* es una bacteria filamentososa, Gram + y con un gran contenido de Guanina-Citosina (entre 60% y 70%) en su genoma, encontrada principalmente en muestras de suelos (Higgins & Kastner, 1971).

Adicionalmente, el género *Streptomyces* posee un complejo ciclo de vida, que incluye la formación de micelio vegetativo o primario (MI) que permita el ensamblaje del micelio secundario o reproductivo (MII), que de manera análoga a los hongos filamentosos, finaliza en la generación de esporas en los extremos del micelio reproductivo (MII), inducido por el estrés nutricional (Rioseras, López-garcía, Yagüe, Sánchez, & Manteca, 2014). En la **Figura 4** se observa la morfología de *S. clavuligerus* a partir de fermentaciones sumergidas, encontrándose la presencia de hifas ramificadas, bastante comunes durante la formación del MI, además la aparición de compartimentos en el MII obtenido en fases tardías del cultivo.

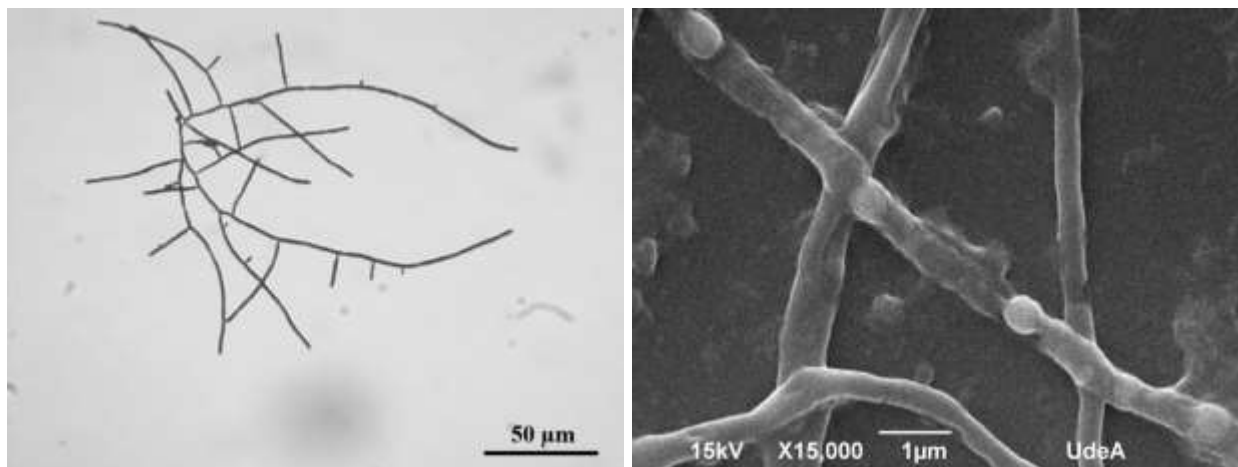


Figura 4. Morfología de *Streptomyces clavuligerus* bajo microscopía óptica (izq.) y microscopía electrónica de barrido (der.) durante fermentaciones sumergidas.

2.4 Requerimientos nutricionales de *Streptomyces clavuligerus* y su relación con la síntesis de Ácido Clavulánico

El cultivo de *S. clavuligerus* presenta requerimientos nutricionales específicos para la formación tanto de biomasa como de AC. Como fuente de carbono y energía, se ha reportado ampliamente el uso de glicerol, dada su facilidad de ingreso a las células, y su rápida velocidad de consumo y transporte (Saudagar & Singhal, 2007b; Saudagar et al., 2008); así mismo, se ha reportado el uso de fuentes de carbono alternativas como aceites de palma y oliva que soportan tanto el crecimiento como la producción de AC (Efthimiou et al., 2008; Lee & Ho, 1996), dada la incapacidad que presenta *S. clavuligerus* para el consumo de glucosa (Pérez-Redondo, Santamarta, Bovenberg, Martín, & Liras, 2010). El glicerol ha demostrado promover la formación del precursor C₃, el G3P (ver **Figura 1**) (Bushell et al., 2006), mientras los medios limitados en glicerol demuestran un bloqueo de la ruta biosintética de AC, señalando que al precursor C₃ como el limitante en la acumulación producto (Kirk, Avignone-Rossa, & Bushell, 2000). Por su parte, aunque Kuo-cheng y col. (Kuo-Cheng, Yun-Huin, Cheng-Min, Chen-Hao,

& Jer-Yiing, 2002) y Gouveia y col. (Gouveia et al., 2001) encontraron que, la mayor concentración de AC (1178 mg/L) se obtenía usando niveles de glicerol de al menos 15 g/L, Sánchez y col. (Sánchez Henao, Gómez Grimaldos, & Quintero Díaz, 2012) y Costa y Badino (Costa & Badino, 2012) obtuvieron concentraciones por encima de 500 mg/L usando niveles superiores a 30 g/L, lo que implica que no existe un consenso en cuanto a los verdaderos valores de fuente de carbono, a partir de los cuales se obtiene la mayor biosíntesis de AC.

Adicionalmente, en los cultivos de *S. clavuligerus* se han usado diferentes formulaciones de medio de cultivo que involucran fuentes de composición compleja, tales como derivados de soya o de maní, dado que, además de constituir fuentes de nitrógeno orgánico, aportan oligoelementos fácilmente asimilables por el sistema celular (Gouveia, Baptista-Neto, Azevedo, Badino-jr, & Hokka, 1999; Gouveia et al., 2001; Hamedi et al., 2011; Ortiz et al., 2007). En el caso de sustratos como la proteína aislada de soya (ISP) y la harina de soya (HS), han demostrado contener altas concentraciones de aminoácidos como prolina, asparagina, glutamato y arginina, necesarios tanto para el desarrollo de la bacteria como para la biosíntesis de AC (Gouveia et al., 1999; Ortiz et al., 2007). La presencia de aminoácidos como arginina (precursor C₅), y sus precursores (ver **Figura 1**) promueven la formación de ácido clavamínico y la posterior oxidación hasta AC. Trabajos realizados por Teodoro y col. (Teodoro et al., 2010), Kuo-cheng y col. (Kuo-Cheng, Yun-Huin, Jane-Yii, & Sz-Chwun, 2003) y Domínguez y col. (Domingues et al., 2010), han sugerido la adición de arginina y ornitina, durante la fase estacionaria para incrementar los rendimientos de producto, alcanzándose niveles de AC hasta de 1.6 g/L mediante la adición simultánea de ornitina y glicerol (Teodoro et al., 2010)

Sin embargo, debido a la naturaleza heterogénea de las fuentes complejas inherentes a su origen, pueden llevar a diferentes resultados en la producción de AC, explicado en la variación en los niveles de sus componentes, principalmente aminoácidos. En este aspecto, trabajos publicados por Gouveia y col. (Gouveia et al., 1999), usando HS o ISP como sustratos a diferentes niveles, mostraron que, niveles de AC hasta de 920 mg/L podían ser alcanzados usando una matriz de fermentación a base de ISP (27 g/L), glicerol (20 g/L) y peptona (10 g/L); y valores de AC de 472 mg/L, usando HS (80 g/L); además y Ortiz y col. (Ortiz et al., 2007) lograron un incremento en 360 mg/L de AC mediante el reemplazo de ISP (10.9 g/L) por HS (20 g/L). Sin embargo,

asociado al metabolismo de aminoácidos por *S. clavuligerus* inducido por las fuentes complejas, inducen la excreción y acumulación de amonio en el caldo de fermentación, el NH_4^+ es un subproducto reportado como tóxico para las células, además de disminuir la síntesis de AC (Saudagar et al., 2008; Teodoro, Baptista-Neto, Cruz-Hernández, Hokka, & Badino, 2006).

De otra parte, el oxígeno constituye un nutriente esencial tanto para el crecimiento de la bacteria como para la síntesis del producto, por lo que, durante los cultivos con *S. clavuligerus*, se ha establecido la necesidad de mantener un porcentaje de oxígeno disuelto de al menos un 20% (Rosa, Neto, Hokka, & Badino, 2005). La transferencia de oxígeno es afectada por la viscosidad del caldo de fermentación luego del crecimiento microbiano; además, la presencia de otros compuestos interfieren en el área disponible para el transporte de las moléculas de oxígeno a través de la interfase, dando como resultado, una limitación del agente oxidante que afecta negativamente la ruta biosintética de AC (Cerri & Badino, 2012; Rosa et al., 2005).

No obstante el grupo fosfato representa un nutriente importante para el crecimiento celular bacteriano como componente esencial de ácidos nucleicos, la formación de ATP y en procesos de fosforilación, se ha reportado inhibición de la síntesis de AC bajo concentraciones relativamente altas de fosfato (Gouveia et al., 2001; A Lebrihi, Germain, & Lefebvre, 1987; Romero, Liras, & Martín, 1984). Lebrihi y col. (Ahmed Lebrihi, Germain, & Lefebvre, 1987), y Saudagar y Singhal (Saudagar & Singhal, 2007b, 2007a), encontraron que niveles de fosfato iguales o superiores a 10 mM inhiben la formación de AC durante fermentaciones con *S. clavuligerus*; así, los cultivos con niveles limitados de fosfato como nutriente representan el mejor escenario para la producción del metabolito. Este aspecto ha sido validado experimentalmente a nivel de reactor continuo a bajas tasas de dilución (Bushell et al., 2006; Kirk et al., 2000). Así mismo, micronutrientes como magnesio, manganeso, hierro, zinc, calcio, molibdeno y cobalto también son necesarios para el crecimiento de *S. clavuligerus* (Domingues et al., 2010; Saudagar & Singhal, 2007a), (Sánchez Henao et al., 2012).

2.5 Condiciones operativas del fermentador requeridas para la biosíntesis de Ácido Clavulánico

A nivel operacional, la disponibilidad de oxígeno representa uno de los aspectos más importantes para lograr una alta viabilidad celular y acumulación de producto, por lo que, se ha estudiado la dependencia de los niveles de oxígeno disuelto y las tasas de aireación, agitación y propiedades reológicas del cultivo (Belmar-Beiny & Thomas, 1990; Yegneswaran, Gray, & Thompson, 1991a). En particular, la agitación del sistema además de estar involucrada en la homogenización de la mezcla, afecta de manera significativa la difusión de nutrientes a través de las diferentes interfaces, promoviendo la transferencia de masa a nivel de sustratos como el oxígeno; además, ofrece un ambiente de estrés hidrodinámico y mecánico que afecta la síntesis de AC (Belmar-Beiny & Thomas, 1990; Cerri & Badino, 2012; Rosa et al., 2005; Roubos, Krabben, Luiten, Verbruggen, & Heijnen, 2001; Yegneswaran, Gray, & Thompson, 1991b). Yegneswaran y Gray (Yegneswaran et al., 1991a), establecieron que durante la fase de crecimiento de la bacteria se deben establecer niveles de oxígeno disuelto superiores al 50% para mejorar la producción de antibióticos. Mientras que, Avignone–Rosa y col. (Rosa et al., 2005), reportaron que el porcentaje de oxígeno disuelto nunca debe ser inferior a 20%, para favorecer la síntesis de AC, durante fermentaciones en reactor.

Trabajos reportados por Roubos y col. (Roubos et al., 2001), evaluaron la viabilidad de las células de *S. clavuligerus* a altas velocidades de agitación debido al esfuerzo de corte a las que son sometidas empleando velocidades entre 200 y 900 rpm, por su parte, Belmar–Beiny y Thomas (Belmar-Beiny & Thomas, 1990), lograron concentraciones superiores a los 200 mg/L de AC, incluso cuando la velocidad de agitación era de 1300 rpm. Asimismo, Avignone–Rosa y col. (Rosa et al., 2005), reportaron la necesidad de someter las fermentaciones en tanque agitado a valores de agitación superiores a 800 rpm, para garantizar una producción de hasta 600 mg/L de AC, durante cultivos con 4 L de medio de cultivo. Por otro lado, Cerri y Badino (Cerri & Badino, 2012), estudiaron el efecto de la agitación sobre la concentración de oxígeno disuelto y la producción de AC, y obtuvieron concentraciones de AC 2 veces superiores, mediante el incremento de la agitación desde 600 rpm a 800 rpm, en fermentador de 4 L. No obstante, aun

cuando se ha reportado que el mezclado de los caldos de fermentación a altas velocidades genera un estrés mecánico que afecta la morfología y viabilidad de *S. clavuligerus*, no se ha logrado una correlación entre la fisiología de la bacteria y la síntesis de AC (Belmar-Beiny & Thomas, 1990; Kirk, 2000; Roubos et al., 2001; Ryu et al., 2004).

De otra parte, los reportes bibliográficos relacionados con el efecto de la temperatura sobre la producción de AC son variados, por ejemplo, Costa y Badino (Costa & Badino, 2012), reportaron que el desarrollo de fermentaciones a 20°C en comparación de 30°C favorecen la síntesis de AC, explicado en un mejor control del metabolismo del carbono, donde, la concentración máxima de producto fue superior a 1000 mg/L. Viana y col. (Marques et al., 2009; Viana et al., 2010; Viana Marques, Carneiro Cunha, et al., 2011), mediante un diseño experimental con superficie de respuesta, evaluaron el efecto de múltiples variables sobre la obtención de AC, entre ellas la temperatura de cultivo, donde encontraron que a 32°C, *S. clavuligerus* produce mayores rendimientos de producto a partir de sustrato (64.3 mg_{AC}/g_S) y concentraciones de AC que rondaron los 539 mg/L, debido al acelerado consumo del glicerol bajo esta condición térmica.

2.6 Producción de Ácido Clavulánico en reactor de tanque agitado operado en lote alimentado

La fermentación con *S. clavuligerus* en tanque agitado operada por lote alimentado ha sido reportada como mejor estrategia para el suministro de nutrientes y la subsecuente formación de metabolitos secundarios como AC (Neto et al., 2005) (Gray & Vu-Trong, 1987; Kuo-Cheng et al., 2002; Lynch & Bushell, 1995; Maiti, Lantz, Bhushan, & Wangikar, 2011; Ng, Ye, Zhang, Lu, & Jing, 2014). La operación en lote alimentado consiste en la adición controlada de sustrato al medio de cultivo una vez alcanzada la fase estacionaria de crecimiento celular, buscando que el microorganismo se vea expuesto a condiciones cercanas al estrés nutricional por deficiencia de carbono principalmente, favoreciendo la síntesis de AC a velocidad constante, al tiempo que se restringe el crecimiento celular. Dentro de las estrategias de suministro de nutrientes para la biosíntesis de AC, se destacan la adición por pulsos de soluciones concentradas de sustrato para

reestablecer la concentración inicial de sustrato en el cultivo (Costa & Badino, 2012), y la incorporación de nutrientes a un caudal constante, generando un efecto de dilución en el fermentador (Bellao et al., 2013).

A la fecha se han reportado una gran cantidad de trabajos en relación al modo de operación que permita obtener mayores concentraciones de AC, donde se ha sugerido que el suministro continuo de la fuente de carbono al sistema celular, una vez alcanzada la fase estacionaria, puede promover una mayor acumulación de producto. En este sentido, Kuo–cheng y col. (Kuo-Cheng et al., 2003), implementaron cultivos con pulsos de ornitina, arginina o glicerol, adicionando 2 mL de solución de nutrientes cada 12 horas; se evidenció que el suministro de glicerol intermitente (hasta las 160 horas), incrementó la concentración de AC en un factor de 3 comparado con los cultivos sin alimentación. Adicionalmente, la adición de ornitina, o glicerol y ornitina, incrementó la producción de AC hasta 200 mg/L contrastando con los resultados de la adición intermitente de arginina, donde no se evidenció incremento en los niveles de producto. Además, Domínguez y col. (Domingues et al., 2010), evaluaron la relación molar entre glicerol y ornitina en la alimentación de cultivos de manera intermitente usando una tasa de dilución de 0.005 h^{-1} , alcanzando niveles de AC de 350 mg/L, cuando se usó la relación 40:1 glicerol:ornitina.

De otro lado, Kuo–cheng y col. (Kuo-Cheng et al., 2002), compararon la formación de AC a escala de reactor, en operación por lote y semi–continuo, alcanzando una producción de 250 mg/L usando una tasa de alimentación de glicerol (100 g/L) a una velocidad de 0.01 L/h. De igual manera, Saudagar y Singhal (Saudagar & Singhal, 2007b), implementaron una estrategia de alimentación intermitente, con la adición de 2 mL de solución de glicerol (100 g/L), a partir de las 60 h de cultivo, cada 12 h hasta las 120 h de cultivo, y alcanzaron una concentración de AC de 1.3 g/L.

En relación a la fermentación alimentada por pulsos, Costa y Badino (Costa & Badino, 2012) estudiaron el efecto del número de pulsos sobre la biosíntesis de AC, en cultivos a 30°C con 1, 2, 3 ó 4 pulsos de glicerol, realizados, cada vez que la concentración de glicerol caía por debajo de

2 g/L. Se logró evidenciar, que el aumento en la cantidad de pulsos incrementó la concentración de AC hasta 440 mg/L cuando se usaron 4 pulsos de sustrato.

De otra parte, Neto y col. (Neto et al., 2005), compararon diferentes modos de operación a escala de reactor de laboratorio (lote, continuo y lote alimentado), para la producción de AC, y alcanzaron valores 2 veces superiores (440 mg/L) mediante fermentaciones en lote alimentado bajo un caudal de 0.08 L/h, frente a la operación por lote. Igualmente, Baptista-Neto y col. (Baptista-Neto, Teodoro, Cassiano Filho, Badino, & Hokka, 2005), implementaron un sistema continuo de producción de AC bajo condiciones de reactor con el reciclo de material celular, y lograron productividades hasta de 22.2 mg/L.h. Mayer y Deckwer (A F Mayer & Deckwer, 1996), lograron valores hasta de 500 mg/L de AC, por medio de fermentaciones en biorreactor de 10 L y alimentación de solución de glicerol (100 g/L), a una velocidad variable para mantener la concentración en el tanque entre 1 y 4 g/L, donde, el suministro de nutriente inició a las 26 h de cultivo.

Asimismo, Teodoro y col. (Teodoro et al., 2006), estudiaron diferentes velocidades de alimentación de glicerol, así como la concentración de sustrato en la alimentación, e incrementaron 2 veces la producción de AC con respecto a cultivos en lote, con parámetros de cultivo como un caudal volumétrico y una concentración de sustrato de alimentación de 0.001 L/h y 120 g/L, respectivamente. Bellao y col. (Bellao et al., 2013), realizaron diferentes experimentos para evaluar el efecto de la concentración de sustrato en la alimentación y el caudal de alimentación sobre la biosíntesis del ácido, y obtuvieron concentraciones hasta de 1 g/L de AC, mediante flujos 0.01 L/h y una concentración de glicerol en la alimentación de 88 g/L. Por último, Teodoro y col. (Teodoro et al., 2010), reportaron hasta ahora la que ha sido la mejor estrategia para la producción de AC, por medio de una cepa no mutante, a partir del cultivo de *S. clavuligerus* en medio a base de soya, a escala de reactor de laboratorio, alimentando una solución de glicerol y ornitina de 120 g/L y 3.7 g/L, respectivamente, a una tasa de 0.01 L/h, alcanzando una máxima concentración de AC de 1.6 g/L.

2.7 Factores químicos y físicos asociados a la degradación del AC en soluciones acuosas

La degradación del AC ha sido reportada como una de las grandes dificultades a la hora de implementar estrategias que mejoren su producción, esto debido a su desaparición de la matriz de fermentación una vez es sintetizado, como resultado de cambios en el pH, la temperatura además de la presencia de compuestos contaminantes, y al mismo microorganismo, lo cual impide la recuperación del producto en altos porcentajes (Brethauer, Held, & Panke, 2008).

Diversos trabajos han sido orientados hacia el estudio de variables de cultivo asociados a la inestabilidad del AC. Kuo–cheng y col. (Kuo-Cheng et al., 2002), evidenciaron el inicio de la degradación del AC, luego de 72 h de cultivo en lote; sin embargo, cuando se realizaron cultivos en lote alimentado, la tasa de degradación tuvo una notable reducción, lográndose niveles constantes de producto hasta las 130 h. Respecto al efecto del pH en la degradación de AC, Mayer y col. (A. Mayer, Anspach, & Deckwer, 1996) y Bersanetti y col. (Bersanetti et al., 2005) sugieren que el rango de pH comprendido entre 6.0 y 7.0 muestra las menores constantes de degradación (0.01 h^{-1}).

De otro lado, en relación con el efecto de temperatura sobre la estabilidad del producto, Bersanetti y col. (Bersanetti et al., 2005), demostraron mediante el ajuste de datos de desaparición de AC con la ecuación de Arrhenius obtenidos a temperaturas entre 10 y 30°C que, a altas temperaturas (30°C) la vida media de AC es de apenas 12.6 h, mientras que a 10°C la vida es de hasta 48 h lo que sugiere que los sistemas de producción deben incluir un estricto control de la temperatura que mantengan la estabilidad de producto. Usualmente las fermentaciones para la biosíntesis de AC suelen desarrollarse a temperaturas de 28°C (Bellao et al., 2013; Gouveia et al., 2001; Neto et al., 2005). Además, Vahdat y Sunderland (Vahdat & Sunderland, 2007), establecieron que la degradación del AC aparece incluso cuando se almacenan las muestras a temperaturas entre -7 y -13°C , sugiriendo que la acidez de la matriz incide en la estabilidad de la molécula; la vida media del AC fue hasta de 71.92 h usando una matriz de acetato almacenada a -13°C . Igualmente, se ha reportado la inestabilidad del AC luego de 6 horas de almacenamiento,

en matrices estériles a temperaturas de 5 ó 25°C, tales como solución NaCl 0.9% y glucosa 5% (Cielecka-Piontek et al., 2015).

Aunque los factores temperatura y pH han sido reportados como los más críticos sobre la estabilidad del AC, los componentes del medio de fermentación pueden ejercer un efecto adverso sobre la estabilidad del producto. Roubos y col. (Roubos et al., 2002) estudiaron el efecto de algunos componentes del medio de cultivo como NH_4^+ , PO_4^{3-} , glutamato, glicerol, FeSO_4 y MgSO_4 , sobre la degradación del AC, encontrando que, en presencia de NH_4^+ a una concentración de 2.6 g/L, se duplicó el valor de la constante de desaparición de AC. La adición de AC exógeno a las fermentaciones en curso con *S. clavuligerus*, redujo la velocidad específica de crecimiento y AC no fue degradado durante la fase exponencial.

Por último, la detección del AC es comúnmente llevada a cabo por medio de cromatografía líquida, mediante columnas empacadas de fase reversa; sin embargo, la molécula de AC no se retiene satisfactoriamente y exhibe una limitada absorbancia, por lo que se usa una reacción de derivatización previa usando imidazol para producir un cromóforo (complejo imidazol/clavulanato) que es retenido con una mayor eficiencia usando columnas C-18 y longitudes de onda del espectro UV (ver **Figura 5**) (Mark Foulstone & Reading, 1982). Sin embargo, luego del proceso de derivatización, la inestabilidad del AC es notable. Ramírez y col. (Ramírez-Malule et al., 2016), estudiaron patrones de desaparición del complejo clavulanato/imidazol, donde, se confirmó su baja estabilidad y obtuvieron valores de vida media entre 17.29 y 19.58 h.

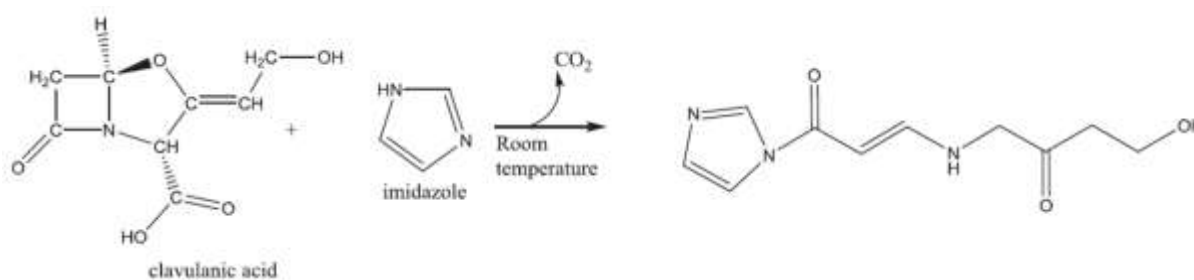


Figura 5. Reacción de derivatización del AC. Tomado de Ramírez y col. (Ramírez-Malule et al., 2016).

2.8 Adsorción de Ácido Clavulánico como estrategia de recuperación del producto de fermentación

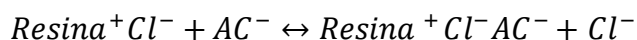
La adsorción del AC usando materiales como resinas de intercambio iónico, carbón activado, hidrotalcitas, zeolitas, e hidróxidos doble capa de Cr y Zn (Bruno, Forte, Cristina, Elias, & Pastore, 2011; Forte, Rodrigues, & Filho, 2011; Forte, Taviot-Guého, Leroux, Rodrigues, & Maugeri Filho, 2016), ha sido objeto de estudio por diversos autores durante la búsqueda de minimizar la degradación del producto en el caldo de cultivo por efectos térmicos, pH o la presencia de otros componentes (M Barboza, Almeida, & Hokka, 2002; Marlei Barboza, Almeida, & Hokka, 2002, 2003).

Uno de los materiales sobre los cuales se han realizado mayor cantidad de estudios acerca de su utilidad para la remoción de AC es la resina de intercambio aniónico de base fuerte, amberlita IRA 400 en forma de cloruro, compuesta por un grupo polar básico incorporado a una matriz de copolímero sintético de estireno-divinilbenceno, con un tamaño de partícula entre 600 y 750 μm y un rango de operación de pH entre 1 y 14. Para el proceso de intercambio iónico la amberlita IRA 400 cuenta con un grupo funcional amino cuaternario unido a un grupo cloruro, el cual es el encargado de liberarse para permitir la unión de los aniones a la resina (A. Mayer et al., 1996). La amberlita IRA 400, puede ser empleada para la adsorción de moléculas cargadas negativamente, tales como carbonatos, silicatos, sulfatos, nitratos, fosfatos, entre muchas otras moléculas o átomos que presenten el exceso de al menos un electrón en su estructura (Khan, Gautam, & Ganai, 2008).

A escala industrial, las resinas de intercambio iónico de base fuerte han sido empleadas para procesos de purificación y suavizado de aguas, eliminando carbonatos y silicatos, como parte de una columna de desionización en desmineralizadores o en lechos mixtos (Ferrero, 2010). A nivel investigativo, existe una gran cantidad de reportes para el uso específico la amberlita IRA 400, como procesos de obtención de ácido láctico, optimización de la producción de etanol, remoción de cromo proveniente de la industria del cuero, remoción de molibdeno y vanadio, recuperación de antibióticos como nonactina, y adsorción de inhibidores de enzimas tipo β -lactamasa a partir

de caldos de fermentación, como es el caso del AC (Almeida, Barboza, & Hokka, 2003; John, Nampoothiri, & Pandey, 2008; Mustafa, Ahmad, Naeem, Shah, & Waseem, 2010; Polowczyk et al., 2017; Yu & Christopher, 2017; Zhan & Zheng, 2016).

En general, el proceso de adsorción de AC a la resina de intercambio iónico está descrito de la siguiente manera:



En consecuencia, la adsorción se da principalmente como resultado de interacciones electrostáticas entre el AC cargado negativamente a pH neutro y la resina cargada positivamente. La reacción, es un proceso reversible que ocurre hasta alcanzar el equilibrio, donde, la velocidad de adsorción del AC es igual a la velocidad de desorción (Anne F. Mayer, Hartmann, & Deckwer, 1997). A partir de la capacidad de la resina para adsorber el AC, se ha estudiado el efecto de variables como la relación resina–sobrenadante, la concentración de AC en el caldo de cultivo, el pretratamiento tanto de la resina como del sobrenadante y el diseño de los sistemas de adsorción (Almeida et al., 2003; Costa & Colli, 2015).

Adicionalmente, la temperatura ha sido uno de los parámetros más evaluados en relación al proceso de adsorción del AC, mediante el desarrollo de isothermas de adsorción, los cuales consisten en la exposición de diferentes concentraciones iniciales del metabolito a una misma cantidad de resina a diferentes temperaturas constantes, donde, se mide la concentración de equilibrio entre el sobrenadante y el adsorbente (M Barboza et al., 2002). La adsorción muestra una cinética combinada de orden 1 y 0, en función de la concentración de AC, por lo que, inicialmente se observa una relación lineal entre la concentración del metabolito y la cantidad adsorbida, hasta alcanzar la condición de equilibrio, en la que mayores concentraciones de AC no aumentan la capacidad de adsorción de la resina (Almeida et al., 2003). Consecuentemente, a partir de datos experimentales, se ha reportado un ajuste por encima del 95% del proceso de adsorción del AC al modelo Langmuir (M Barboza et al., 2002; Marlei Barboza et al., 2002; Cuel et al., 2011). Además, Barboza y col. (Marlei Barboza et al., 2002) mediante el modelado de las limitaciones de transferencia de masa para la adsorción, determinaron la influencia de la temperatura sobre la adsorción y desorción del AC en experimentos a escala de matraz,

encontrándose que la remoción del AC es muy favorable a condiciones térmicas entre los 5 y 10°C, dado que el proceso de unión del AC a la resina es de tipo exotérmico.

De otra parte, el pH ha sido reportado como un factor crítico durante procesos de adsorción mediados por resinas de intercambio iónico (A. Mayer et al., 1996), uno de los principales inconvenientes radica en la baja estabilidad del AC y su marcada sensibilidad a cambios de pH (Bersanetti et al., 2005), por lo que, se ha reportado la necesidad de llevar a cabo el proceso a valores de pH entre 6.2 y 7.0 (M Barboza et al., 2002; A. Mayer et al., 1996). Sin embargo, en experimentos recientes se ha encontrado que durante el tiempo de adsorción el pH del sobrenadante se mantiene en valores cercanos a 6.5, lo cual es favorable para el proceso extractivo (Costa & Colli, 2015).

También, el proceso de adsorción de AC se ve afectado por la interferencia de otras sustancias en el sobrenadante, por lo que, se ha evaluado el efecto de la presencia de aminoácidos como lisina, histidina, prolina y tirosina, los cuales presentan una buena afinidad por los sitios cargados de la resina, y es necesario el desarrollo procesos previos de remoción de impurezas, como la centrifugación, el filtrado y en ocasiones el uso de ATPS (da Silva et al., 2012). De igual forma, es necesaria la remoción de iones cargados negativamente como las sales contenidas en los medios de fermentación, debido a su gran afinidad por la resina que interfiere directamente en el proceso de recuperación del AC (da Silva et al., 2012; A. Mayer et al., 1996).

Finalmente, los dispositivos empleados para llevar a cabo procesos de adsorción son diversos, aunque, el reactor más comúnmente usado es el matraz agitado, Almeida y col. (Almeida et al., 2003) plantearon un sistema de adsorción/desorción simultánea de AC empleando tanques agitados secuenciales, donde, el primer tanque opera a 10°C con NaCl 2% y el segundo a 30°C. De igual forma, se ha reportado el uso de columnas de empaquetamiento para flujos a presiones medias y bajas, de tipo XK 16 con resina a un flujo de 0.3 L/h (Cuel et al., 2011). Es importante mencionar que el uso de tanques secuenciales y columnas de empaquetamiento permiten el reciclaje de los sobrenadantes de fermentación y aumentando los porcentajes de adsorción del AC.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Microorganismo, condiciones operativas y de medio de cultivo

En este estudio se empleó la cepa comercial sin modificaciones genéticas *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064; la cepa fue almacenada en *stock* de micelio con glicerol 20% (v/v) a -80°C en viales de 1.5 mL.

Para la preparación del inóculo se usó un medio semilla con la siguiente composición (g/L): glicerol (15); peptona (10); extracto de malta (1); K_2HPO_4 (0.8); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.75); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.0001); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.001); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.001); y el *buffer* MOPS (21) con un pH de 6.8 (Rosa et al., 2005). El medio semilla se inoculó con 1 mL de microorganismo criopreservado (con 10 g/L de biomasa seca, durante 24 h, a 28°C y 220 rpm). Posteriormente, se transfirieron 5 mL de medio semilla (con 15 g/L de biomasa seca), a 45 mL de medio de inóculo con la siguiente composición (g/L): glicerol (15); ISP (25), K_2HPO_4 (0.8); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.75); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.0001); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.001); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.001); y el *buffer* MOPS (21) con un pH de 6.8 (Costa & Colli, 2015), y se incubaron a las mismas condiciones operativas. La concentración de inóculo para el cultivo a nivel de matraz o reactor fue del 10% v/v. Los cultivos a escala de matraz se llevaron a cabo usando erlenmeyers bafleados de 250 mL, incubados a 220 rpm, pH 6.8 y 28°C , excepto para los ensayos en los que se evaluó el efecto de la temperatura sobre la síntesis de AC. El muestreo fue realizado cada 24 h, tomando 1 mL del caldo de fermentación. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

3.2 Evaluación de medios de fermentación a escala de matraz

Se estudiaron diferentes medios de cultivo para determinar su efecto sobre el crecimiento de *S. clavuligerus* y su capacidad para producir AC; el tiempo de cultivo no superó las 120 h. La *Tabla 1* muestra la concentración de nutrientes usados en cada medio empleado.

Tabla 1. Composición de medios de cultivo para cultivos con *Streptomyces clavuligerus* a escala de matraz.

Componente	Concentración (g/L)				Componente	Concentración (g/L)
	Medio 1	Medio 2	Medio 3	Medio 4		Medio 4
ISP	10	10	-	25	Nitrato (NO ₃ ⁻)	< 0.00125
Harina de soya	-	-	15	-	Azúcares	< 0.1
Glicerol	15	15	50	50	Glucosa	0.733
K ₂ HPO ₄	2.5	-	-	0.8	Amonio (NH ₄ ⁺)	2.65
Extracto de levadura	1	1	-	-	Proteína soluble	6.24
Extracto de malta	10	10	-	-	ADN	< 0.01
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.001	-	-	0.001		
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.001	-	-	0.001		
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.001	-	-	0.0001		
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.75	-	-	0.75		
Casaminoácidos	-	-	5	-		
MOPS			21			

La composición del *Medio 1* fue propuesto por Cerri y Badino (Cerri & Badino, 2012), la formulación del *Medio 2* fue propuesta en el presente trabajo. Los componentes y concentraciones de los *Medios 3 y 4* fueron evaluados en los trabajos de Sánchez y col. (Sánchez Henao et al., 2012) y Costa y Badino (Costa & Colli, 2015), respectivamente. En la parte derecha se encuentran otros sustratos cuantificados para el *Medio 4*, donde, los azúcares fueron medidos a través del método de DNS y la proteína soluble mediante la metodología descrita por Lowry y col. (Lowry, Rosebrough, Randall, & Lewis Farr, 1951).

En la **Tabla 2** se presenta la composición de aminoácidos presentes en los diferentes medios de cultivo empleados. Los sustratos hidrolizados para la determinación de aminoácidos fueron: proteína aislada de soya (ISP), harina de soya (HS) e hidrolizado de caseína (casaminoácidos).

Tabla 2. Concentración de aminoácidos obtenida mediante hidrólisis ácida de los sustratos ISP, HS o casaminoácidos.

Aminoácido	Concentración (g/L)			
	Medio 1	Medio 2	Medio 3	Medio 4
Aspartato	4.32	4.32	6.04	10.8
Glutamato	9.62	9.62	13.95	24.0
Serina	2.80	2.80	3.35	7.00
Histidina	1.10	1.10	1.05	2.75
Glicina	3.22	3.22	2.43	8.05
Treonina	1.44	1.44	2.34	3.60
Arginina	2.69	2.69	2.73	6.73
Alanina	2.35	2.35	2.59	5.88
Tirosina	1.03	1.03	1.28	2.58
Valina	1.16	1.16	2.49	2.90
Metionina	0.28	0.28	0.09	0.70
Fenilalanina	1.36	1.36	2.07	3.40
Isoleucina	1.26	1.26	2.12	3.15
Leucina	3.55	3.55	4.46	8.88
Lisina	2.68	2.68	3.23	6.70
Prolina	2.87	2.87	4.84	7.18

3.3 Estudio del efecto de la temperatura y niveles de sustrato inicial sobre la síntesis de Ácido Clavulánico

Para estudiar el efecto de la temperatura de incubación y de los niveles de sustrato (glicerol) inicial sobre la producción de AC a escala de matraz, se llevó a cabo un diseño experimental simple con dos variables de proceso (temperatura y concentración de sustrato) a dos niveles cada una (ver **Tabla 3**). Los niveles para las variables de estudio se determinaron a partir de literatura y de un trabajo pre-experimental. La variable de respuesta fue la producción de AC. Adicionalmente, se estudió el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de producto, y se estimó la velocidad de degradación y la respectiva constante cinética (k_d), haciendo uso de la metodología descrita por Marques y col. (Marques et al., 2009).

Tabla 3. Arreglo experimental para estudiar el efecto de la temperatura y concentración inicial de glicerol sobre la síntesis de ácido clavulánico.

Experimento	Temperatura (°C)	S_0 (g/L)
<i>E1</i>	20	15
<i>E2</i>		50
<i>E3</i>	28	15
<i>E4</i>		50

3.4 Estandarización de las condiciones operativas para la síntesis de Ácido Clavulánico a escala de reactor

Se empleó el biorreactor Biostat® A plus, con volumen efectivo de 800 mL (Sartorius stedim, equipado con sensores Hamilton® Easyferm Plus K8 160 para la medición de pH y Oxyferm FDA 160 para el monitoreo de oxígeno disuelto).

Para la estandarización de condiciones de cultivo, se diseñó un arreglo experimental unifactorial con velocidad de agitación como variable de estudio a tres niveles (400, 600 y 800 rpm) y AC como variable de respuesta. La aireación se fijó en 1 vvm, verificando en todo momento que el

porcentaje de oxígeno disuelto no cayera por debajo de un valor mínimo del 20%, para evitar así la posible inhibición del crecimiento por limitaciones en el suministro de oxígeno como sustrato (Cerri & Badino, 2012; Rosa et al., 2005). Adicionalmente, se estimó el coeficiente de transferencia de oxígeno, k_La (h^{-1}) haciendo uso del método dinámico (Doran, 1995).

Para la determinación del k_La , se suspendió el suministro de aire al reactor, y se interrumpió la agitación; el porcentaje de O_2 disuelto se dejó decrecer hasta un valor del 20%. Posteriormente, se reanudó el suministro de oxígeno mediante el restablecimiento de la inyección de aire y la agitación, hasta alcanzar de nuevo el porcentaje de oxígeno disuelto máximo. El coeficiente de transferencia de oxígeno se calculó a partir de:

$$k_La = \frac{\ln \frac{(\bar{C}_{AL} - C_{AL1})}{(\bar{C}_{AL} - C_{AL2})}}{t_2 - t_1} \quad [\text{Ecuación 1}]$$

Donde, \bar{C}_{AL} corresponde al porcentaje de oxígeno disuelto máximo luego de reestablecida la oxigenación, C_{AL1} y C_{AL2} representan porcentajes de oxígeno disuelto medidos en tiempos t_1 y t_2 (en seg.) durante la reoxigenación. Una vez se calculó el k_La , se determinó la velocidad de transferencia de oxígeno (N_A , mg $O_2/L.h$) a partir de la siguiente expresión:

$$N_A = k_La * (C_{AL}^* - C_{AL}) \quad [\text{Ecuación 2}]$$

Donde, C_{AL}^* corresponde a la solubilidad de oxígeno en agua a condiciones normales (8.07 mg O_2/L) y C_{AL} es la concentración de oxígeno disuelto en el cultivo.

Para la operación en reactor se fijó un volumen de operación de 0.6 L, garantizando que el impulsor quedara totalmente sumergido. El valor de pH (6.8) fue controlado mediante la adición de NaOH 2 M y HCl 2 M, según corresponda; la formación de espuma se controló a partir de la adición de antiespumante 204 (Sigma Aldrich®) en una relación de 0.8 mL/L, al inicio del cultivo. La temperatura de operación del reactor se fijó en 28°C, por medio del uso de una manta térmica.

Para los diferentes ensayos a escala de reactor se empleó el *Medio 4* (ver **Tabla 1**), variando la concentración inicial de glicerol, según el arreglo experimental. Para cada caso, se calcularon los

valores de rendimiento de sustrato en producto ($Y_{p/s}$, mg_{AC}/gs), rendimiento de biomasa en producto ($Y_{p/x}$, mg_{AC}/gx), rendimiento de sustrato en biomasa ($Y_{x/s}$, gx/gs), velocidad específica de crecimiento (μ , h⁻¹), tiempo de duplicación (h) y productividad (mg/L.h) (Doran, 1995).

3.5 Cultivos en reactor operado en lote y lote alimentado

Los cultivos en lote fueron operados con un volumen inicial, $V_0 = 0.7$ L, incluyendo el volumen de inóculo. Se formuló un arreglo experimental unifactorial, con concentración inicial de glicerol como factor único ($S_0 = 10$ g/L (B1), 15 g/L (B2) y 50 g/L (B3)). Todos los cultivos se llevaron a 120 h.

Para los cultivos en lote alimentado, se usaron dos estrategias de operación; alimentación por pulsos, y operación en semi-continuo. Los pulsos de sustrato para los cultivos en lote alimentado, consistieron en la adición de 50 mL de solución de glicerol (100 g/L) (volumen inicial de cultivo, $V_0 = 0.6$ L). El primer pulso se suministró a las 48 horas de cultivo, tiempo en el cual la concentración de glicerol cae por debajo de 2 g/L; esta condición se utilizó como criterio para adicionar los demás pulsos (Costa & Badino, 2012). Al término de cada pulso, la concentración de glicerol en el reactor se reestableció en 10 g/L, aproximadamente (Costa & Badino, 2012). Los cultivos a escala de reactor operado en lote se denominan *B*, mientras que las fermentaciones operadas en lote alimentado con pulso de sustrato se representan como *BP*. Así, se realizaron cultivos con 2 (*BP2*), 3 (*BP3*) y 4 (*BP4*) pulsos de glicerol.

Para el caso de los ensayos en reactor operado en semi-continuo se fijó un caudal de alimentación constante de solución de glicerol, F , de 0.002 L/h, evaluando dos concentraciones de glicerol en ($C_{gF} = 100$ y $C_{gF} = 150$ g/L). Para cada caso se evaluó la velocidad de consumo de sustrato r_s (g/L.h) [Ecuación 3] (Bellao et al., 2013), y se comparó con aquellas obtenidas durante los cultivos en lote (B1) [Ecuación 4]:

$$r_s = F * \frac{C_{gF}}{V_f} \text{ [Ecuación 3]}$$

$$r_s = -\frac{dC_g}{dt} \text{ [Ecuación 4]}$$

Donde, V_f es el volumen final (L) que alcanzó el cultivo luego de 120 h (0.8 L) a una tasa de alimentación de 0.002 L/h.; bajo estas condiciones se obtuvo una tasa de dilución, D , de 0.0025 h^{-1} . Asimismo, para los ensayos con alimentación constante V_0 se fijó en 0.6 L; la alimentación inició a las 24 h de cultivo y se extendió hasta las 120 h (Bellao et al., 2013; Neto et al., 2005). Todos los parámetros relacionados con los experimentos en semi-continuo se describen en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de cultivo en reactor de *Streptomyces clavuligerus* operado en semi-continuo.

Cultivo	C_{gF} (g/L)	F (L/h)	r_s (g/L.h)	D (h^{-1})
FB1	100		0.025	
FB2	150	0.002	0.038	0.0025

Por último, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) para establecer diferencias significativas entre las estrategias de operación del reactor; adicionalmente se realizó una prueba de diferencia mínima significativa (LSD por sus siglas en inglés) con una significancia del 5% haciendo uso del software R versión R-3.2.2.

3.6 Evaluación de la degradación de Ácido Clavulánico

No obstante la inestabilidad de la molécula de AC ha sido ampliamente reportada, aún es incierto poder identificar las verdaderas causas de su degradación. En este trabajo se estudió el efecto de variables como temperatura de almacenamiento, condición de derivatización, composición del medio de cultivo y tiempo de exposición, sobre la velocidad degradación de AC. Para estudiar el efecto de los componentes del medio sobre la estabilidad de AC, se usaron dos matrices de almacenamiento (*Medio 4*, ver **Tabla 1**, y el medio químicamente definido GSPG (Gouveia et al., 2001)). La temperatura de almacenamiento se fijó en 25°C y -80°C, para las muestras centrifugadas y derivatizadas formando el complejo clavulanato/imidazol.

La estabilidad de la molécula de AC se determinó mediante su identificación y cuantificación usando HPLC. Para la condición de almacenamiento a 25°C, se estudió la estabilidad del complejo clavulanato/imidazol, inyectando 20 µL de una solución con AC previamente derivatizado (muestras no descartables), cada 2 horas durante las primeras 8 horas y posteriormente cada 12 horas hasta las 72 horas de *stock*. Para el caso del AC sin derivatizar, su estabilidad fue determinada usando alícuotas de 300 µL, a partir de una solución *stock* mantenida a 25°C; al momento de identificación y cuantificación, el AC fue derivatizado y analizado mediante cromatografía líquida.

De otra parte, para el estudio de estabilidad a -80°C, se almacenaron alícuotas de AC y alícuotas de complejo clavulanato/imidazol (usando las dos matrices), en ultracongelador marca *ThermoFisher Scientific*® modelo TSE240A. Luego del tiempo de observación deseado, las muestras fueron descongeladas en forma controlada; a cada muestra se le determinó la concentración de AC mediante HPLC. Es claro que una vez descongeladas, las alícuotas del complejo clavulanato/imidazol fueron directamente inyectadas, mientras las muestras de AC, requirieron de un tratamiento de derivatización con imidazol, previo. Las mediciones se realizaron cada 12 horas durante 7 días, y, posteriormente a los 30 días de almacenamiento. Cabe resaltar que para los ensayos a -80°C se usaron muestras descartables; todos los análisis se hicieron por triplicado. El pH inicial de todos los sobrenadantes usados fue 7.0.

Haciendo uso de las cinéticas de degradación observadas, se estimaron las constantes de degradación (k_d , h⁻¹) de AC a 25°C, de acuerdo con el siguiente modelo exponencial (Costa & Badino, 2012; Marques et al., 2009):

$$C_{AC} = C_{AC_0} * e^{-k_d*t} \text{ [Ecuación 5]}$$

Donde, C_{AC} y C_{AC_0} (mg/L) expresan la concentración en un tiempo t_i y la concentración inicial de AC, respectivamente; t representa el tiempo (h) (Costa & Badino, 2012). Los datos experimentales fueron ajustados mediante regresión no lineal usando el software Microsoft Excel versión 2010.

3.7 Establecimiento de condiciones de adsorción

3.7.1 Pretratamiento de la resina

Para todos los ensayos de adsorción/desorción se usó la resina de intercambio iónico amberlita IRA 400. La resina fue pretratada mediante un lavado con NaOH 10% p/v durante 10 minutos y 3 lavados con agua destilada durante 5 minutos cada uno; la resina tratada fue regenerada usando NaCl 10% p/v durante 10 minutos (Costa & Colli, 2015).

3.7.2 Pretratamiento del caldo de fermentación y efecto de variables operativas sobre el proceso de adsorción

El caldo de cultivo proveniente de fermentaciones con *S. clavuligerus* fue pretratado antes de la exposición a la resina de intercambio iónico con el fin de eliminar restos de biomasa y proteínas. Inicialmente, el caldo de fermentación fue centrifugado a 5000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, el sobrenadante fue acidificado con HCl 1 M, hasta un pH de 3.5 y luego centrifugado bajo las mismas condiciones (Cuel et al., 2011). Finalmente, el pH del sobrenadante fue restaurado hasta un valor de 6.2 con NaOH 1 M (a excepción de los experimentos en los que se evaluó el efecto del pH inicial) y separado mediante filtro de membrana de 0.2 µm, para iniciar los ensayos de adsorción (Cuel et al., 2011). Previamente y a partir de un trabajo pre-experimental, se verificó que la variación del pH durante el pretratamiento no daría lugar a la degradación de AC.

Para determinar el efecto del pH inicial y relación sólido/líquido (S/L) sobre el porcentaje de adsorción de AC, se formuló un diseño experimental factorial con 2 variables a 3 niveles (2^3), con 2 réplicas por experimento para un total de 27 ensayos. Los niveles de pH inicial del sobrenadante fueron de 5.0, 6.0 y 7.0, mientras que para la relación S/L se usaron niveles de 10%, 25% y 40% (p/v); estos valores se tomaron con base en la literatura. La variable de respuesta fue el porcentaje de adsorción de AC, luego de 30 minutos de incubación a 10°C. El

análisis de los datos se realizó mediante el software Statgraphics Centurion XV versión 15.2.06, para la obtención de un modelo de efectos fijos y su significancia estadística mediante el análisis de varianza.

3.7.3 Isotermas de adsorción

Para evaluar las condiciones operativas (condición térmica) más favorables para el proceso de adsorción, se evaluaron isotermas de adsorción a 10, 15, 20, 25 y 30°C, usando soluciones de AC entre 0 y 100 mg/L de AC; estas soluciones contienen caldo de cultivo pretratado y habían sido ajustadas usando agua destilada. Posteriormente, las soluciones fueron expuestas a la resina de intercambio iónico en una relación S/L de 20% (p/v) e incubadas durante 30 minutos; estas condiciones operativas se fijaron con base en un trabajo pre-experimental. La concentración de AC en el sobrenadante fue medida únicamente al inicio y al final de los ensayos. La cantidad de AC adsorbido por gramo de resina (q_e , mg_{AC}/g_{resina}) (Costa & Colli, 2015), se evaluó a partir de:

$$q_e = (C_{AC_0} - C_{AC_e}) * \frac{V_c}{m_{ads}} \quad [\text{Ecuación 6}]$$

Donde, C_{AC_0} y C_{AC_e} (mg/L) son las concentraciones de AC inicial y en equilibrio, respectivamente. Los datos experimentales se ajustaron al modelo Langmuir [Ecuación 7] (M Barboza et al., 2002; Marlei Barboza et al., 2002; Costa & Colli, 2015), previa linealización haciendo uso del procedimiento propuesto por Lineweaver–Burk [Ecuación 8] (Lineweaver & Burk, 1934).

$$q_e = q_m * \frac{C_{AC_e}}{k + C_{AC_e}} \quad [\text{Ecuación 7}]$$

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{q_m} + \left(\frac{k}{q_m} * \frac{1}{C_{AC_e}} \right) \quad [\text{Ecuación 8}]$$

Donde, q_m (mg_{AC}/g_{resina}) representa la capacidad de adsorción máxima y k (mg/L) denota el coeficiente de Langmuir.

3.7.4 Cinética de adsorción de Ácido Clavulánico

Todos los experimentos para la estandarización de condiciones de adsorción se llevaron a cabo en erlenmeyer liso de 100 mL, usando un volumen del caldo de cultivo pretratado de 10 mL, pH inicial 6.2. Los frascos fueron incubados en agitador orbital a 250 rpm, condición que también fue usada para ensayos de desorción y fermentación extractiva (Costa & Colli, 2015). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

La cinética de adsorción de AC fue estudiada para establecer el tiempo mínimo requerido para alcanzar la condición de equilibrio para la distribución de AC entre el sobrenadante y la resina. Para este propósito, el caldo de cultivo pretratado fue expuesto a la resina de intercambio iónico usando una relación sólido/líquido (S/L) de 20%; esta relación fue establecida con base en trabajo pre-experimental y reporte de literatura. La mezcla fue incubada durante 60 minutos a 10°C (M Barboza et al, 2002; Costa & Colli, 2015); se realizó un muestro de 300 µL cada 5 minutos para la determinación de AC no adsorbido, y al final de los ensayos se midió el pH del sobrenadante. Adicionalmente y a las mismas condiciones operativas, se incubaron frascos con caldo de cultivo pretratado, sin resina, como control negativo para estimar la degradación del AC. La masa de AC adsorbida m_{AC-ads} (mg) fue determinada mediante el balance de masa:

$$m_{AC-ads} = (C_{AC-a} - C_{AC-d}) * V_c \text{ [Ecuación 9]}$$

Donde, C_{AC-a} y C_{AC-d} (mg/L) son las concentraciones de AC antes y después de la extracción, respectivamente; y V_c (L) es el volumen del caldo de cultivo.

3.7.5 Cinética de desorción de Ácido Clavulánico

La desorción del AC retenido por la resina de intercambio iónico, se llevó a cabo mediante la filtración de la resina proveniente del proceso de adsorción y su posterior mezcla con solución de NaCl 10% (p/v), en una relación S/L de 40%. Los niveles para estas variables se determinaron mediante tratamiento pre-experimental y datos de la literatura (Marlei Barboza et al., 2003; Costa & Colli, 2015). La mezcla resultante fue incubada a 25°C, durante 90 minutos. Para

propósitos de muestreo se tomaron 300 μL cada 15 minutos; a cada muestra se le determinó el contenido de AC para estimar la masa de AC extraída (m_{AC-des} , mg):

$$m_{AC-des} = \frac{p_{AC-des}(\%)}{100} * m_{AC-ads} \quad [\text{Ecuación 10}]$$

Donde, $p_{AC-des}(\%)$ es la cantidad de AC removida desde la resina.

3.8 Fermentación extractiva a escala de matraz y reactor

Una vez determinadas las condiciones operativas para el proceso de adsorción, se implementó la estrategia de fermentación extractiva para cultivos a escala de matraz y reactor. Como criterio general, se estableció que el proceso de extracción se ejecutaría solo cuando la concentración de AC durante el cultivo fuese igual o superior a 200 mg/L. Atendiendo a esta restricción, se pretrató un porcentaje de medio de cultivo (50% para matraz, 30% para reactor), y se expuso a la resina pretratada atendiendo a una relación S/L del 40%; posteriormente se incubó a 10°C durante 30 minutos (la selección de estas condiciones de proceso, fueron el resultado de un trabajo pre-experimental). El sobrenadante fue separado de la resina usando un filtro con tamaño de poro de 0.2 μm , y retornado nuevamente al reactor. La biomasa separada y la resina contenido AC adsorbido, fueron usadas posteriormente para propósitos de desorción y recuperación de producto (ver **Figura 6**). Todos los procedimientos de extracción se realizaron bajo estrictas condiciones de asepsia.

Los ensayos de extracción de AC acoplada al cultivo se realizaron a las 96 y a las 120 h, en cultivos *E4 (E4-FE)* a escala de matraz, así como para ensayos *B3 (B3-FE)*, *BP2 (BP2-FE)* y *FBI (FBI-FE)* a nivel de reactor, donde, a dichos experimentos se les incluyó el sufijo (-FE) para diferenciarlos de las fermentaciones sin remoción de AC. Todos los cultivos contaron con 1 réplica.

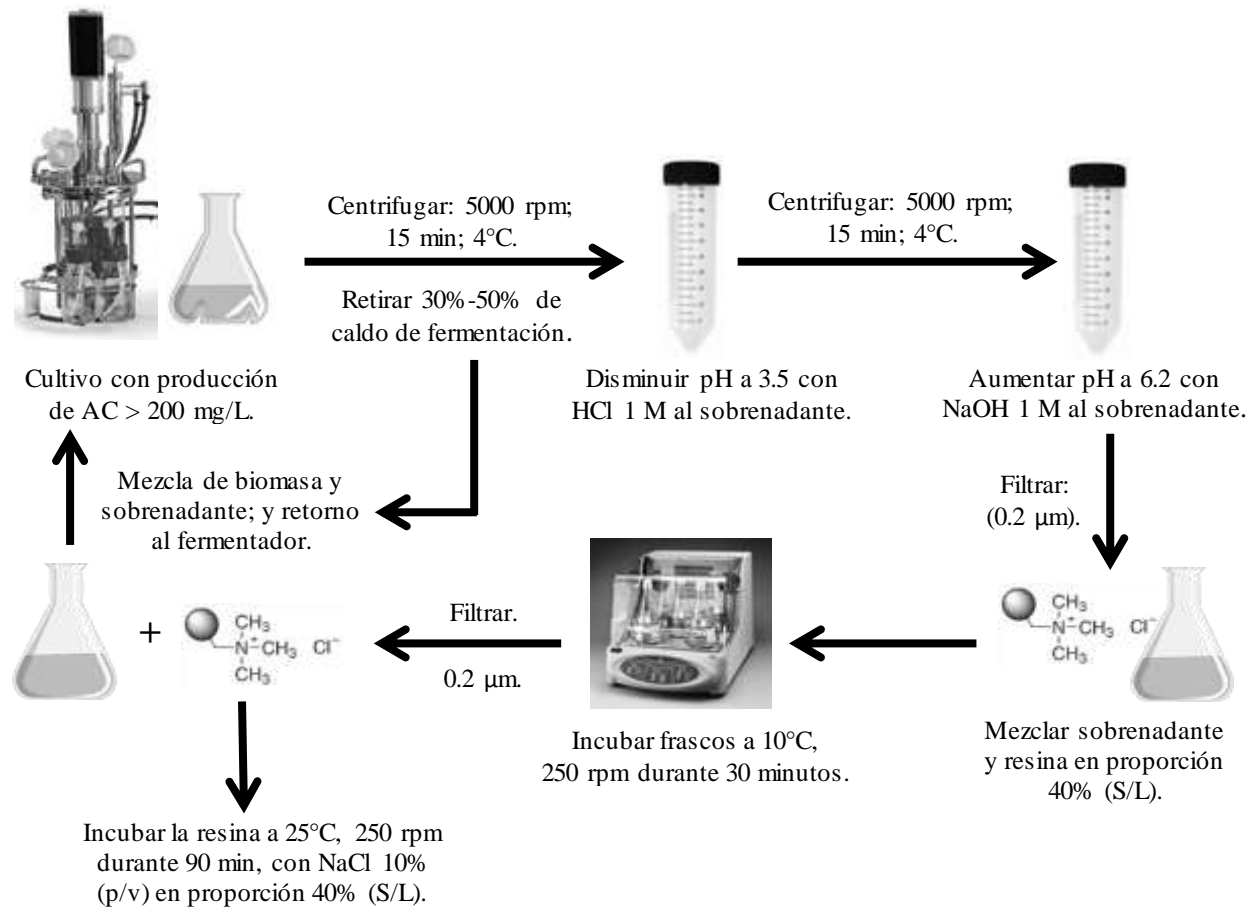


Figura 6. Representación esquemática de procedimientos realizados para la implementación de fermentación extractiva con *Streptomyces clavuligerus* a escala de matraz o reactor.

Para evaluar el efecto de la extracción de AC sobre el rendimiento del cultivo, se evaluó la masa acumulativa de AC (m_{AC-c_i} , mg) en un instante i , la cual incluye la masa de AC presente en el caldo de cultivo y la masa recuperada luego de cada procedimiento de extracción, (m_{AC-des_i} , mg), obtenido a partir de (Costa & Colli, 2015):

$$m_{AC-c_i} = C_{AC_i} * V_{b_i} + \sum_1^i m_{AC-des_i} \quad [\text{Ecuación 11}]$$

Donde, para un instante i , C_{AC_i} es la concentración de AC (mg/L) y V_{b_i} es el volumen (L) del caldo de cultivo antes de la extracción.

Finalmente, se estableció la concentración acumulativa de AC (C_{AC-c_i} , mg/L) en un instante i , como criterio de efectividad de la remoción de producto, la cual se calculó como la razón entre la m_{AC-c_i} y el volumen del caldo de fermentación luego de la extracción (V_{a_i} , L):

$$C_{AC-c_i} = \frac{m_{AC-c_i}}{V_{a_i}} \text{ [Ecuación 12]}$$

3.9 Técnicas analíticas

3.9.1 Cuantificación de Ácido Clavulánico

Para la derivatización de AC se usó 1 mL de caldo de cultivo; el medio se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se clarificó mediante filtro de jeringa con un tamaño de poro de 0.2 μ m. Seguidamente se tomaron 300 μ L de sobrenadante y se mezclaron con 100 μ L de solución de imidazol 3 M con pH de 6.8 y se incubaron a 25°C durante 15 minutos, a 220 rpm. Al cabo de este tiempo, la mezcla se congeló a -20°C durante 15 minutos para detener la reacción. Finalmente, la mezcla se descongeló durante 10 minutos a 25°C y se filtró nuevamente. Cabe resaltar que posterior al muestreo y entre procedimientos, el sobrenadante con AC se mantuvo en hielo para evitar la degradación.

La cuantificación de AC se realizó por cromatografía líquida, Agilent 1200 Series y Columna C – 18 XDB ZORBAX Eclipse, siguiendo el método propuesto por Foulstone y Reading (Mark Foulstone & Reading, 1982). La fase móvil contenía 94% Buffer Fosfato KH_2PO_4 50 mM con pH de 3.2 y 6% metanol; el flujo de operación se fijó en 0.7 mL/min. Como estándar se empleó el producto comercial Curam® (amoxicilina + clavulanato de potasio).

3.9.2 Determinación de aminoácidos

La concentración de aminoácidos presentes en la ISP, HS o casaminoácidos se realizó, luego de la hidrólisis de los sustratos en medio ácido con HCl, y se cuantificaron mediante cromatografía

líquida (Agilent 1200 Series y columna ZORBAX Eclipse Plus C18), como se describe en Henderson y Brooks (Henderson & Brooks, 2010).

3.9.3 Cuantificación de biomasa

La determinación de biomasa se llevó a cabo siguiendo el protocolo de determinación de ADN publicado por Waterborg y Matthews (Waterborg & Matthews, 1985); el método emplea el complejo colorimétrico formado con difenilamina, el cual se detecta a 599 nm. La concentración de ADN se correlacionó con biomasa seca como se describe en Gouveia y col. (Gouveia et al., 1999)), a fin de reportar datos de crecimiento celular en unidades de g/L de biomasa seca; dada la presencia de material en suspensión, cuando se usan medios proteína aislada de soya, no es posible usar el método de peso. Como estándar de ADN se usó esperma de salmón (Sigma Aldrich®).

3.9.4 Determinación de glicerol

La cuantificación de glicerol se realizó de acuerdo con la técnica desarrollada por Bok y Demain (Bok & Demain, 1977), basada en la oxidación de alditoles a formaldehído; el producto formado se analizó a 414 nm. Como estándar se empleó glicerol $\leq 99\%$ (Sigma Aldrich®).

3.9.5 Cuantificación de fosfato

Para la determinación de fosfato (K_2HPO_4) se hizo uso de la metodología propuesta por Hanson (Hanson, 1950), basada en la presencia de molibdato/vanadato; el fósforo presente reacciona para formar ácido fosfomolibdico, el cual se mide a 401 nm. Como estándar se utilizó K_2HPO_4 (JT Baker®).

3.9.6 Determinación de amonio

El amonio (NH_4^+) fue cuantificado mediante el reactivo de Nessler como se describe en Yuen y Pollard (Yuen & Pollard, 1954). Como estándar se utilizó NH_4Cl (JT Baker®).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estudio de medios de cultivo a nivel de matraz para el cultivo de *Streptomyces clavuligerus*

Inicialmente se evaluaron medios de cultivo a base de soya, reportados como promisorios para el cultivo del microorganismo y la síntesis de AC, dado su alto contenido de nutrientes, principalmente aminoácidos (Gouveia et al., 1999, 2001). La **Tabla 5** evidencia los diferentes parámetros cinéticos obtenidos. Los *Medios 1* y *2* presentan la más alta favorabilidad para la formación de biomasa de *S. clavuligerus* (15 g/L), y una baja producción de AC (65 mg/L). El *Medio 3* aportó los nutrientes necesarios para la formación de biomasa en altas concentraciones (17 g/L) y la obtención de niveles moderados de AC (190 mg/L). De acuerdo con Sánchez y col. (Sánchez Henao et al., 2012), el *Medio 3* favorece la producción de altos niveles de AC, dada la presencia de casaminoácidos (mezcla de aminoácidos provenientes del hidrolizado de la caseína) en su formulación. Es de anotar que los tiempos de máxima producción de AC fueron cercanos a las 120 h para los *Medios 3* y *4*, y los niveles de glicerol residual fueron de 10 g/L a las 168 h; para el caso de los *Medios 1* y *2*, la máxima concentración de AC se logró a las 96 h de cultivo, sin la detección de fuente de carbono residual, luego de 168 h de cultivo (ver **Figura 7**). Las características cinéticas del cultivo varían significativamente dependiendo, principalmente, de los componentes del medio usado; así, el tiempo de máxima producción en un cultivo en lote no necesariamente coincide para todos los casos de estudio.

Aparentemente, el *Medio 4* aporta las condiciones nutricionales más favorables para la producción de AC (343 mg/L; velocidad de formación de producto = 2.36 mg/L.h) y la más baja producción de biomasa ($Y_{X/S}$ (0.158 g_X/g_S)). Para este medio, la concentración inicial de glicerol (50 g/L) parece haber promovido la activación del metabolismo secundario; de acuerdo con Kirk y col. (Kirk et al., 2000), la limitación en fuente de carbono restringe la capacidad celular para activar el metabolismo anaplerótico, reduciendo la biosíntesis de AC. La **Tabla 5** deja ver el contenido de aminoácidos entre los que se destaca la presencia de glutamato y arginina, este

último es responsable de la disponibilidad del precursor C₅, que junto con el precursor C₃ (G3P) y a partir de una reacción de condensación, define la velocidad de formación de AC (Bushell et al., 2006; Gouveia et al., 2001; Kirk et al., 2000; Saudagar et al., 2008; Ser et al., 2016; Teodoro et al., 2010). En relación con el contenido de fosfato, se administraron niveles moderados (0.8 g/L); el fosfato debe suministrarse en concentraciones cercanas a 0.9 g/L, por su gran influencia en la activación de enzimas como la deacetoxicefalosporina C sintasa, y por ende un mayor flujo de carbono hacia la síntesis de cefamicina C (Gouveia et al., 2001; Ahmed Lebrhi et al., 1987; Maeda et al., 1995; Viana et al., 2010). La supresión total de este compuesto, *Medios 2 y 3*, o el suministro en altas concentraciones, *Medio 1*, no favorecen la producción de AC.

La presencia de nutrientes como extracto de levadura y extracto de malta, aun cuando favorecen el crecimiento de *S. clavuligerus*, parecen afectar negativamente la formación de AC. El uso de los *Medios 1 y 2*, dio lugar a una limitada biosíntesis de AC, favoreciendo el crecimiento de biomasa, $X_{m\acute{a}x}$; los extractos de levadura y de malta contienen nutrientes principalmente azúcares y carbohidratos que promueven el crecimiento celular; a su vez, el contenido de aminoácidos importantes en la síntesis de AC es inferior a los presentes en los medios IPS y HS. La composición del medio semilla para la activación de la cepa, luego de la crioconservación, incluye sustratos como extracto de levadura, extracto de malta y peptona, mientras que, para la formulación de los medios de fermentación se estos nutrientes no se incluyen y son sustituidos por nutrientes derivados de la soya (Costa & Badino, 2012; Costa & Colli, 2015; Ortiz et al., 2007; Panas et al., 2017; Teodoro et al., 2010; Viana et al., 2010).

Gouveia y col. (Gouveia et al., 1999, 2001) reportaron una mejor asimilación de nutrientes para la síntesis de AC cuando se suministra ISP en lugar de HS, en concentraciones superiores a 25 g/L. *S. clavuligerus* tiene preferencia por ISP dada su mayor solubilidad y digestibilidad, y la mayor disponibilidad de aminoácidos como arginina, glutamato, prolina, entre otros (Viana et al., 2010). Costa y Badino (Costa & Badino, 2012; Costa & Colli, 2015) emplearon ISP en cultivos celulares y alcanzaron concentraciones de AC superiores a 500 mg/L. Teodoro y col. (Teodoro et al., 2006) reportaron una concentración de AC de 380 mg/L, usando medios de cultivo con 20 g/L de ISP; los autores concluyeron que el uso de altos niveles de ISP podría contribuir a la formación de biomasa en detrimento de la síntesis de AC. En relación con el

medio HS, diferentes autores han reportado niveles competitivos de AC en cultivos con *S. clavuligerus* (Sánchez Henao et al., 2012), (Ortiz et al., 2007). Cabe resaltar que la variabilidad en los resultados de concentración de producto, incluido el presente trabajo, depende significativamente de la concentración de nutrientes, presentes en el medio, en las condiciones de almacenamiento de la bacteria (micelio o esporas), las características de activación de la cepa, luego de la crioconservación y el protocolo para la producción de inóculo, entre otros.

Tabla 5. Parámetros cinéticos para cultivos en matraz de *Streptomyces clavuligerus*, haciendo uso de medios de diferente composición.

Parámetro	Medio 1	Medio 2	Medio 3	Medio 4
$X_{m\acute{a}x}$ (g/L)	20.5	15.7	17.3	7.9
$AC_{m\acute{a}x}$ (mg/L)	31.5	62.7	194.2	343.2
$Y_{X/S}$ (g _X /g _S)	1.36	1.04	0.346	0.158
$Y_{p/X}$ (mg _{AC} /g _X)	3.05	2.00	11.22	43.44
$Y_{p/S}$ (mg _{AC} /g _S)	2.10	4.18	3.88	6.86
r_p (mg _{AC} /L.h)	0.26	1.19	2.63	5.93
Productividad (mg _{AC} /L.h)	0.32	0.64	1.61	2.36
Tiempo de cultivo	168			

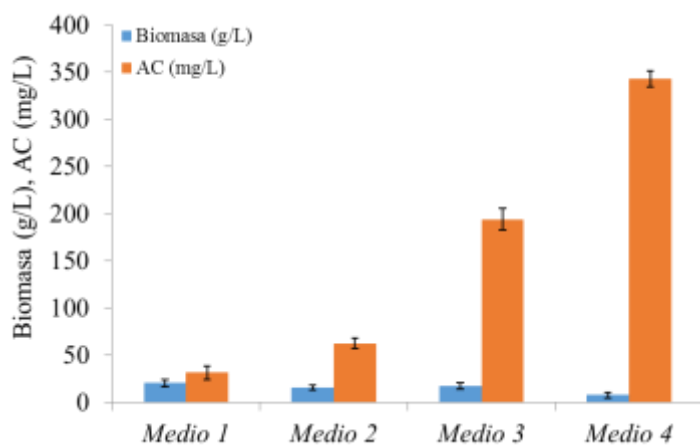


Figura 7. Comparación de niveles de producción de AC y formación de biomasa durante el cultivo con *Streptomyces clavuligerus*, usando diferente composición de nutrientes.

Finalmente, dado que el *Medio 4* favoreció la concentración de producto, $AC_{\text{máx}}$ y rendimiento de sustrato en producto, $Y_{p/S}$, se seleccionó para el desarrollo de todo el trabajo experimental.

4.2 Estudio del efecto de la temperatura y concentración inicial de sustrato en cultivos a nivel de matraz

La temperatura de incubación y la concentración inicial de glicerol son factores que influyen directamente sobre la síntesis de AC en cultivos de *S. clavuligerus* (Costa & Badino, 2012; Sánchez Henao et al., 2012; Viana Marques, Carneiro Cunha, et al., 2011), dado su efecto sobre el crecimiento, la eficiencia de la actividad metabólica y potencial degradación del AC una vez sintetizado. El estudio del efecto de la temperatura fue motivado por publicaciones recientes donde se recomienda el cultivo de la bacteria a 20°C [2]. En relación con el efecto de la concentración de sustrato sobre el comportamiento del cultivo, los niveles de la fuente de carbono se escogieron atendiendo a lo reportado con Kuo–cheng y col. (Kuo-Cheng et al., 2002), quienes reportaron inhibición en la síntesis de AC bajo niveles de glicerol por encima de 15 g/L; en contraste, el trabajo de Sánchez y col. (Sánchez Henao et al., 2012) reporta que la mayor concentración de AC fue alcanzada en cultivos con niveles de S_0 de 50 g/L.

En la *Figura 8* se muestra la cinética de producción de AC, formación de biomasa y el consumo de glicerol, para cultivos en matraz a 20°C y 28°C; a su vez, la *Tabla 6* presenta los parámetros cinéticos obtenidos. Se encontró un efecto favorable de la temperatura (28°C) sobre la síntesis AC; durante los ensayos *E2*, las concentraciones máximas de biomasa y AC fueron de 10.6 g/L y 117.9 mg/L, respectivamente, mientras que en los experimentos *E4* se alcanzaron niveles de biomasa y de AC de 13.6 g/L y 341.5 mg/L, respectivamente; los valores de $Y_{X/S}$ y $Y_{p/S}$ y $Y_{p/X}$, además de r_p , mostraron una mayor eficiencia metabolismo de la fuente de carbono de *E4* frente a *E2*. Sin embargo, durante cultivos *E1*, el crecimiento celular fue mucho más lento y la concentración máxima de biomasa fue 2.7 veces menor en comparación con las fermentaciones *E3*, causado principalmente por una reducción en la actividad metabólica; $AC_{\text{máx}}$ fue afín, con valores de 59.1 y 57.9 mg/L, respectivamente.

El incremento en la síntesis de AC, al aumentar la temperatura de fermentación, es altamente favorable; 28°C constituye una condición térmica más cercana a la que normalmente se encuentran las cepas del género *Streptomyces* en el suelo. Sin embargo, se ha reportado un incremento en la degradación (k_d) de AC, cuando las condiciones térmicas del medio cambian de 20 a 40°C (Costa & Badino, 2012; Marques et al., 2009). Este aspecto se vio reflejado principalmente en ensayos *E2* y *E4*; durante el experimento *E2*, k_d fue casi 3 veces superior luego de obtenida la máxima concentración de AC ($AC_{m\acute{a}x}$) por lo que, la reducción de temperatura contribuyó a disminuir r_d durante cultivos *E1* y *E2*. La degradación de AC también ha sido relacionada con factores como el tipo de microorganismo, la presencia de enzimas con actividad degradativa y de productos metabólicos con efectos tóxicos para la síntesis de producto como el amonio, dada su excreción al medio de cultivo durante el catabolismo de aminoácidos (Brethauer et al., 2008; Romero, Liras, & Martín, 1986; Roubos et al., 2002; Viana et al., 2010). Costa y Badino (Costa & Badino, 2012; Costa & Colli, 2015), reportaron que a 20°C se retrasa la tasa de muerte celular y se promueve la viabilidad celular, lo que contribuye a la disminución en la tasa de degradación y una mayor acumulación de AC. La condición térmica de 20°C sólo favoreció la disminución en los valores de k_d de los ensayos *E1* y *E2*, mientras que, a 28°C durante los experimentos *E4*, se promovió el flujo de carbono hacia el metabolismo anaplerótico y la formación del precursor C_5 .

Tabla 6. Parámetros de cultivo obtenidos durante fermentaciones de *Streptomyces clavuligerus* a escala de matraz, bajo diferentes temperaturas de incubación y concentración inicial de sustrato S_0 .

Parámetro	<i>E1</i>	<i>E2</i>	<i>E3</i>	<i>E4</i>
$X_{m\acute{a}x}$ (g/L)	7.4	10.6	20.6	13.6
$AC_{m\acute{a}x}$ (mg/L)	59.1	117.9	57.9	341.5
$Y_{X/S}$ (g _X /g _S)	0.49	0.21	1.37	0.272
$Y_{p/X}$ (mg _{AC} /g _X)	7.98	11.12	2.81	25.11
$Y_{p/S}$ (mg _{AC} /g _S)	3.94	2.35	1.15	6.83
r_s (mg _S /L.h)	0.068	0.123	0.302	0.268
r_p (mg _{AC} /L.h)	0.981	1.254	1.306	5.937
k_d (h ⁻¹)	0.00391	0.0043	0.0074	0.0111
μ (h ⁻¹)	0.013	0.019	0.032	0.029
Tiempo de duplicación (h)	53.3	36.48	21.6	23.9
Productividad (mg _{AC} /L.h)	0.30	0.81	0.87	2.36
Tiempo de cultivo (h)	240		168	

Viana y col. (Marques et al., 2009; Viana et al., 2010; Viana Marques, Carneiro Cunha, et al., 2011) estudiaron el efecto de la condición térmica de incubación sobre la producción de AC, además de otros factores. El desarrollo de cultivos a 32°C, favoreció el metabolismo de glicerol para sintetizar AC, y por ende se aumentaron los niveles de AC_{máx} hasta 539 mg/L.

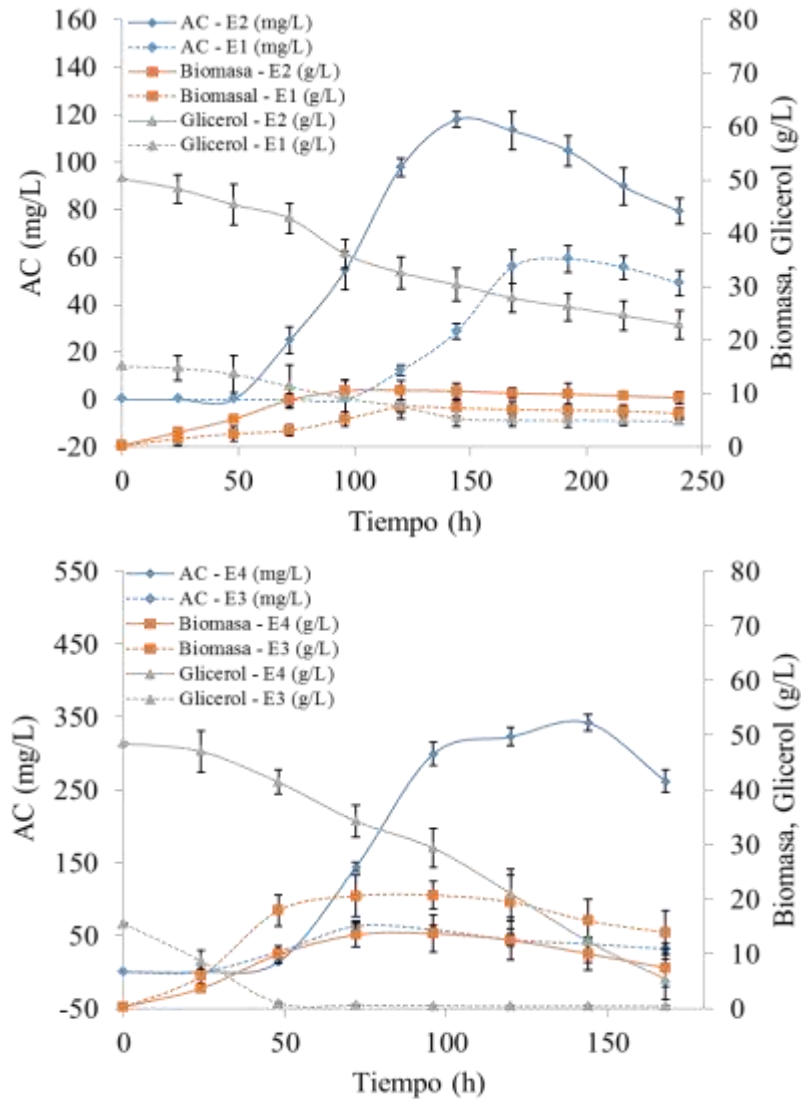


Figura 8. Cinéticas de síntesis de AC, formación de biomasa y consumo de glicerol, durante el cultivo de *Streptomyces clavuligerus* a escala de matraz. *Arriba:* Temperatura de cultivo = 20°C y *abajo:* Temperatura de cultivo = 28°C.

De otra parte, el aumento de S_0 tuvo un efecto favorable sobre la formación de AC, independiente de la condición de temperatura. Se obtuvo una diferencia en la producción de AC de más de 55 mg/L entre *E1* y *E2*, y durante *E4* se produjo más de 3 veces la concentración de AC alcanzada en los cultivos *E3*. En consecuencia, los valores de $Y_{p/X}$ y $Y_{X/S}$ fueron mayores para *E2* y *E4*, lo cual es acorde con los resultados de Sánchez y Col. (Sánchez Henao et al., 2012), quienes lograron niveles de AC superiores a 900 mg/L, usando cultivos con niveles de sustrato inicial de 50 g/L. En este sentido, aun cuando Bushell y col. (Bushell et al., 2006), y Kuo–cheng y col. (Kuo-Cheng et al., 2003) han sugerido que la disponibilidad del *pool* de G3P para participar en la reacción de condensación con arginina y la subsecuente formación de AC, está directamente limitada por la cantidad del glicerol que ingresa en la ruta glucolítica, autores como Kuo–cheng y col. (Kuo-Cheng et al., 2002) y Gouveia y col. (Gouveia et al., 2001), han establecido límites de suministro de fuente de carbono, donde, señalan la inhibición en la síntesis de AC en el desarrollo de fermentaciones con niveles de glicerol por encima de 15 ó 20 g/L.

Por último, de acuerdo con los resultados presentados en la **Tabla 6**, *S. clavuligerus* demostró un mejor desempeño durante los cultivos *E4*, por lo que, la condición térmica seleccionada para el desarrollo de los experimentos a escala de reactor fue de 28°C.

4.3 Estandarización de condiciones operativas a escala de reactor

El propósito de este apartado fue el de establecer las mejores condiciones de operación que permitieran obtener lo más altos rendimientos de producto a escala de biorreactor.

Para estimar las condiciones de suministro y consumo de oxígeno, se determinó el k_{LA} a partir del método dinámico, cuando el sistema fue operado en condiciones favorables de cultivo (800 rpm y 1 vvm, ver **Figura 9**). Cabe resaltar que, los niveles de agitación de 400 y 600 no favorecieron la transferencia eficiente de oxígeno, ni la síntesis de AC, y por tanto no se consideraron. El valor de k_{LA} obtenido fue de 156 h⁻¹, un valor aceptable y similar a los valores reportados por Cerri y Badino (Cerri & Badino, 2012) (137 h⁻¹) y Gómez (Gómez-Grimaldos, 2012) (140 h⁻¹). Brethauer y col. (Brethauer et al., 2008) reportaron valores más favorables (230 h⁻¹). En consecuencia, cuando el reactor se operó con un k_{LA} de 156 h⁻¹, se obtuvo una velocidad

de transferencia de oxígeno, N_A , de 1257.95 mg O₂/L.h; a su vez, para el sistema celular usado, y a partir de trabajos previos, [40], se había encontrado una demanda de oxígeno Q_{O_2} equivalente a 1092.764 mg O₂/L.h (Gómez-Grimaldos, 2012). Cuando se comparan los valores de oferta y demanda de oxígeno como nutriente, se observa que el cultivo siempre tuvo disponibilidad de oxígeno disuelto para el crecimiento y desarrollo de su actividad metabólica. Avignone–Rosa y col. (Rosa et al., 2005), reportaron que la producción de AC se ve favorecida en cultivo expuestos a niveles de agitación por encima de 600 rpm, que aseguren niveles de concentración de oxígeno disuelto superiores al 20% del valor de saturación, a lo largo del cultivo. Para todos los cultivos realizados en este estudio, los niveles de oxígeno siempre rondaron este valor como límite por lo que es posible afirmar que los cultivos siempre tuvieron disponibilidad de oxígeno como nutriente. Valores de agitación de 800 rpm, y aireación en niveles de al menos 0.5 vvm, han sido ampliamente usados por diversos autores para el estudio de cultivos con *S. clavuligerus* (Efthimiou et al., 2008; Neto et al., 2005; Ortiz et al., 2007; Teodoro et al., 2006). En consecuencia, las condiciones de operativas seleccionadas (800 rpm y 1 vvm) pudieron satisfacer los requerimientos de oxígeno como sustrato, durante los ensayos a escala de reactor.

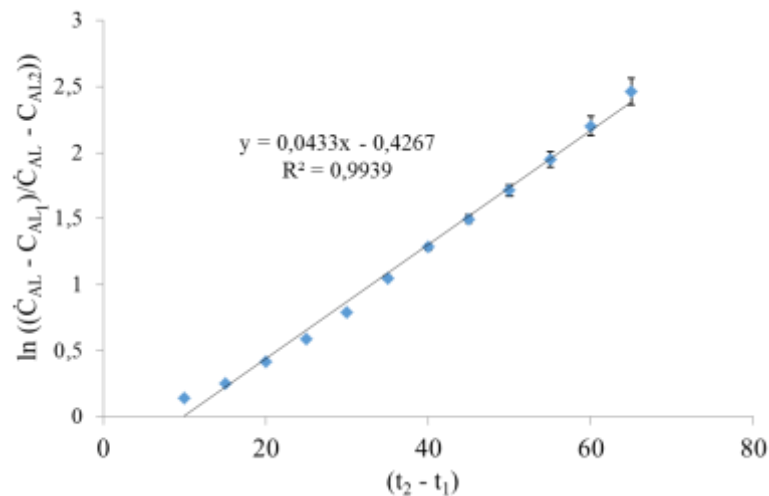


Figura 9. Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, k_{La} , a partir del método dinámico [800 rpm–1 vvm].

4.4 Cultivos a escala de reactor

Una vez definidas las condiciones operativas y nutricionales para el cultivo de *S. clavuligerus* en reactor, se estudió el efecto del modo operación sobre la producción de AC; los modos de operación estudiados fueron cultivos en lote y en lote alimentado. En el caso de lote alimentado, se evaluaron dos estrategias: alimentación de glicerol por pulsos o a flujo semi-continuo.

4.4.1 Cultivo en reactor operado en lote

Para el caso de cultivos reactor operado en lote (ver **Figura 10**), se evaluaron 3 concentraciones iniciales de glicerol como sustrato, obteniendo niveles de producción de AC similares a los alcanzados a escala de matraz; los ensayos *B3* permitieron alcanzar el mayor valor de $AC_{m\acute{a}x}$ (333 mg/L), así como un nivel máximo de biomasa $X_{m\acute{a}x}$ (8.27 g/L) ($Y_{p/S} = 6.66$ mg_{AC}/g_S; $Y_{p/X} = 40.26$ mg_{AC}/g_S) (ver **Tabla 7**). Estos valores coinciden con los reportados por Sánchez y col. (Sánchez Henao et al., 2012). En el presente estudio, se encontró que la alta disponibilidad de glicerol en los ensayos *B3* favoreció la síntesis de AC a diferencia de experimentos *B1* y *B2*, donde *S. clavuligerus* aparentemente dio prioridad a la formación de biomasa en detrimento de la síntesis de AC. Con la adición de glicerol se espera disponer mayormente de G3P, precursor C_3 de AC. Sin embargo, el precursor C_3 se encuentra comprometido en las distintas rutas del metabolismo central haciéndose necesaria la estrategia de lote alimentado para mantener un *pool* de G3P constante y suficiente, de manera que pueda beneficiar ambos procesos.

La presencia de glicerol residual al final de los cultivos *B3*, indica un posible estrés de tipo nutricional. Contrario a lo anterior, Gouveia y col. (Gouveia et al., 2001), alcanzaron niveles de AC cercanos a 1 g/L haciendo uso de medios a base de ISP, con 20 g/L de glicerol.

En relación con los rendimientos de cultivo, los valores de $Y_{p/S}$ y $Y_{p/X}$, fueron consistentes con los obtenidos por Sánchez y col. (Sánchez Henao et al., 2012), durante experimentos en reactor de 5 L, y con los valores reportados por Costa y Badino (Costa & Badino, 2012) en cultivos a 30°C. No obstante, los niveles de $Y_{p/S}$ resultaron inferiores a los presentados por Bellao y col. (Bellao et

al., 2013), lo cual pudo haber sido causa de diferencias en la fuente de nitrógeno, altamente comprometida en la síntesis del precursor C₅ de AC.

Tabla 7. Parámetros de cultivo obtenidos durante cultivos con *Streptomyces clavuligerus* a escala de reactor operado en lote, lote alimentado con pulsos, y semi-continuo.

Parámetro	Fermentación							
	B1	B2	B3	BP2	BP3	BP4	FB1	FB2
$X_{m\acute{a}x}$ (g/L)	16.70	24.89	8.27	22.6	20.0	19.3	9.8	12.8
$AC_{m\acute{a}x}$ (mg/L)	53 ^h	67 ^g	333 ^b	311 ^c	296 ^d	272 ^e	359 ^a	232 ^f
OD_{min} (%)	50	50	50	44	46	44	30	0
$Y_{X/S}$ (g _X /g _S)	1.67	1.65	0.16	0.95	0.625	0.53	0.31	0.29
$Y_{p/X}$ (mg _{AC} /g _X)	3.17	2.69	40.26	13.76	14.08	14.09	36.63	18.12
$Y_{p/S}$ (mg _{AC} /g _S)	5.3	4.46	6.66	13.09	9.86	7.50	11.39	5.33
r_s (mg _S /L.h)	0.195	0.3013	0.388	-	-	-	-	-
r_p (mg _{AC} /L.h)	0.954	2.55	6.52	3.32	3.12	2.89	6.31	3.79
μ (h ⁻¹)	0.033	0.032	0.019	0.025	0.027	0.028	0.029	0.036
Tiempo de duplicación (h)	21.0	21.6	36.4	27.7	25.6	24.7	23.9	19.2
Productividad (mg _{AC} /L.h)	0.73	0.93	4.62	2.59	2.05	2.26	4.98	3.22
Tiempo de cultivo (h)	120			192				

Cuando se comparan los resultados obtenidos a escala de matraz y reactor, se evidencia un aumento de r_p , y por ende, un marcado incremento de la productividad a escala de reactor, aun cuando $AC_{m\acute{a}x}$ permaneció invariable. Este aspecto da cuenta de la favorabilidad de las condiciones operativas elegidas para las fermentaciones *B*, *BP* y *FB*. De acuerdo con Brethauer y col. (Brethauer et al., 2008), la equivalencia entre los resultados a escala de matraz y reactor está relacionada con la eficiencia en la transferencia de masa gas-líquido, y aunque reportaron una superioridad en el valor de $k_{L,a}$ de reactor (230 h⁻¹), frente a un erlenmeyer bafleado (158 h⁻¹), el desempeño de los cultivos con *S. clavuligerus* fue análogo cuando la relación entre demanda bioquímica y velocidad de suministro de oxígeno como nutriente, son similares en ambas geometrías.

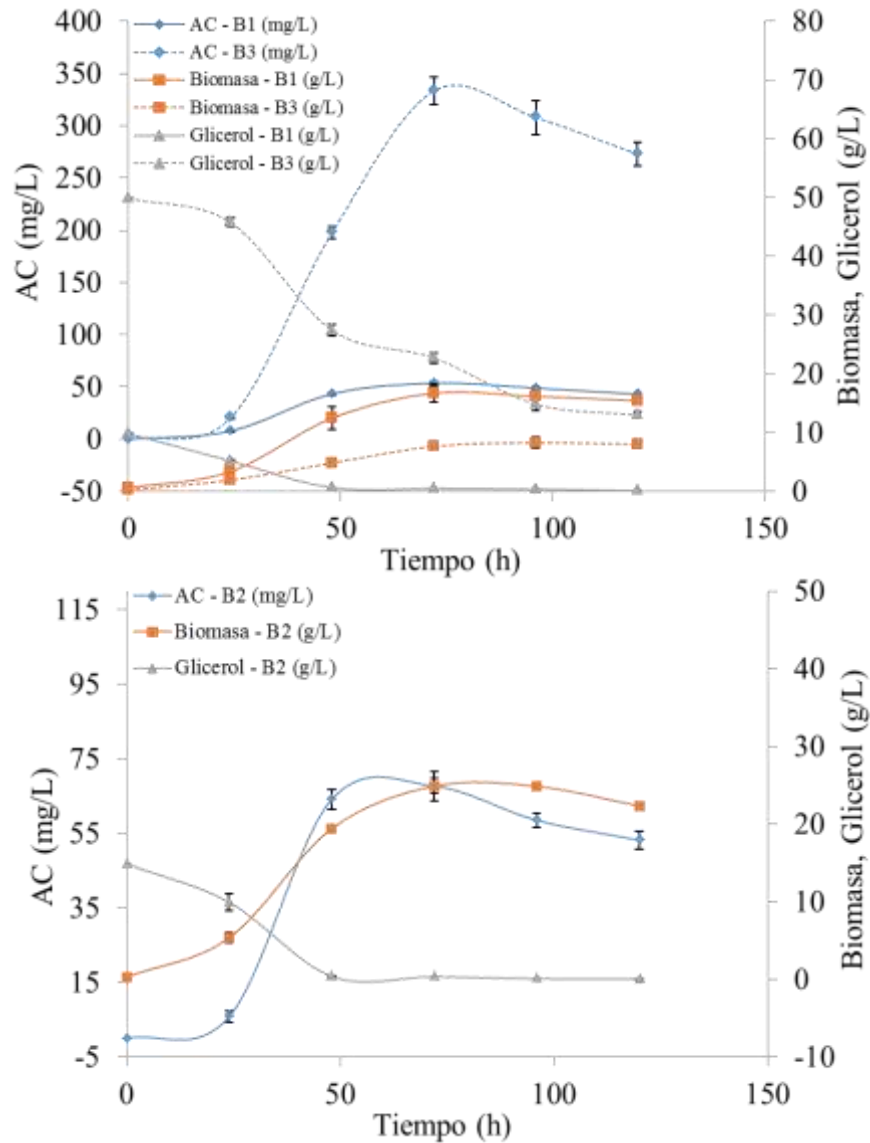


Figura 10. Perfiles de concentración de AC, formación de biomasa y consumo de glicerol, obtenidos durante el cultivo con *Streptomyces clavuligerus* en reactor, expuesto a diferentes concentraciones iniciales de sustrato, S_0 .

De otra parte, el análisis morfológico luego de 72 h de cultivo en erlenmeyer y en reactor, evidenció un estrés hidrodinámico mucho mayor en condiciones de reactor que en matraz. Dadas las características de agitación mecánica a escala de biorreactor, el micelio inició una fragmentación desordenada, y por ende, pérdida de viabilidad; a su vez, en matraz la bacteria pudo iniciar un proceso de muerte celular programada, con la subsecuente formación de compartimentos, a lo largo del micelio (ver **Figura 11**). No obstante, aunque los valores de

$AC_{m\acute{a}x}$ no se modificaron con el cambio de escala, r_p se vio aumentada ante tal variaci3n; as3, la morfolog3a del microorganismo estuvo relacionada con la velocidad a la cual se genera el producto. Aparentemente la presencia del agitador mecánico a nivel de reactor indujo una r3pida bios3ntesis de producto y posteriormente la fragmentaci3n del micelio; posterior a la ruptura la producci3n de AC disminuy3 e inici3 su degradaci3n. En este sentido, aunque se ha reportado una relaci3n entre la condici3n morfol3gica de *Streptomyces* y la s3ntesis de metabolitos secundarios (Olmos et al., 2013), la capacidad para sintetizar AC decrece r3pidamente (Belmar-Beiny & Thomas, 1990; Pinto, Vieira, Pons, Fonseca, & Menezes, 2004; Roubos et al., 2001; Sebastine, Stocks, Cox, & Thomas, 1999), y no se ha establecido una relaci3n clara que d3 cuenta del efecto de la condici3n morfol3gica de *S. clavuligerus* y su relaci3n con la bios3ntesis de AC. De esta manera, los resultados del presente trabajo son consistentes con el trabajo de Roubos y col. (Roubos et al., 2001) y Pinto y col. (Pinto et al., 2004), quienes reportaron la fragmentaci3n y lisis celular temprana del micelio, como consecuencia de altos niveles de agitaci3n. S3 bien la agitaci3n incide en la morfolog3a y rompimiento celular, y por ende en la s3ntesis de AC, en realidad la producci3n de AC est3 m3s relacionada con velocidad de consumo de glicerol durante la fase exponencial, y la velocidad de excreci3n del producto al medio (influenciadas por la agitaci3n), y no con el estado morfol3gico del microorganismo (Rosa et al., 2005).

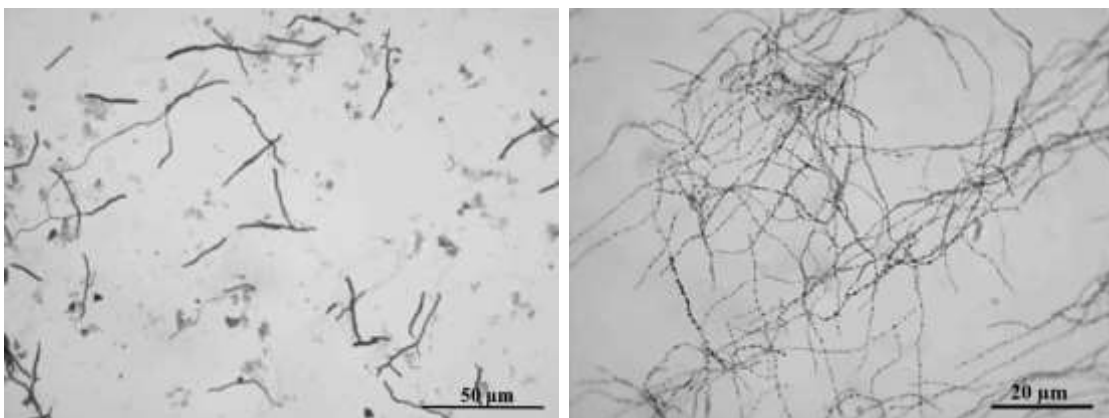


Figura 11. Microscopía óptica de *Streptomyces clavuligerus* luego de 72 h de cultivo en medio a base de ISP. Izq: escala de reactor y der: escala de matraz.

4.4.2 Experimentos en reactor operado en lote alimentado, usando pulsos de sustrato

La operación en lote alimentado con pulsos de glicerol resultó en un aumento significativo de al menos 4 veces en los niveles de AC, comparados con los cultivos *B2* (ver *Figura 12*). Entre los ensayos de lote alimentado con pulsos, con los experimentos *BP2* se logró alcanzar el mayor valor de $AC_{m\acute{a}x}$ (311 mg/L); sin embargo, los valores de μ , $X_{m\acute{a}x}$, $Y_{p/S}$ y $Y_{X/S}$ fueron similares en todos los experimentos usando pulsos. Estos rendimientos concuerdan con los valores alcanzados por Costa y Badino (Costa & Badino, 2012) para cultivos en lote alimentado con pulsos de sustrato (ver *Tabla 7*).

En principio se esperaba que el aumento en la disponibilidad de fuente de carbono por la presencia de pulsos de sustrato adicionales favoreciera la producción de AC; no obstante, el incremento del número de pulsos de glicerol (*BP3* y *BP4*) no permitió mejorar la síntesis de producto; por el contrario, la adición de sustrato fresco al medio gastado, tuvo un efecto adverso sobre la generación de AC, dando lugar a una disminución en $AC_{m\acute{a}x}$ durante *BP3* y *BP4*. Contrario a este estudio, Costa y Badino (Costa & Badino, 2012) lograron un incremento en la concentración de AC, luego de suministrar mayor número de pulsos durante cultivos a 30°C.

En la *Figura 12* se observa una alta actividad del sistema celular, dado que para todos los pulsos de glicerol suministrados, la bacteria los metaboliza hasta consumo total a niveles de r_s superiores a 0.3 g/L.h, sin que esto implique un aumento en la formación de biomasa ni un incremento en la síntesis de AC. Aparentemente el sustrato fresco constituyó una fuente importante para aquellos procesos demandantes de energía en el sistema celular, ya sean, el mantenimiento celular, el desarrollo de la muerte celular programada y/o la síntesis de otros productos del metabolismo secundario como cefamicina C y algunas clavamas, no cuantificadas en este estudio. *S. clavuligerus* es una cepa productora de cefamicina C y la disociación entre la producción de AC y cefamicina C no es posible; adicionalmente, el medio de fermentación contiene lisina, aportado por la ISP, el cual es un gran promotor de la formación de cefamicina C (Cavallieri, Baptista, Leite, & Araujo, 2016; Saudagar et al., 2008).

Costa y Badino (Costa & Badino, 2012) reportaron que altas velocidades de consumo de sustrato (0.25 g/L.h) inhiben la síntesis de AC y sostienen que la mejora en la actividad metabólica en presencia de pulsos se alcanza mediante la implementación de cultivos con control de la condición térmica entre la fase exponencial (30°C) y la fase estacionaria del crecimiento microbiano (20°C).

Es sabido que medios de cultivo con amonio en concentración de 2.6 g/L promueven la degradación de AC con un constante cinética k_d cercana a 0.0114 h^{-1} (Roubos et al., 2002). En los cultivos *BP* se evidenció la producción de amonio en concentraciones superiores a 10 g/L, por lo que, luego de sintetizado, el AC se descompuso rápidamente a una velocidad superior a la velocidad de formación, luego de alcanzar la fase estacionaria. Roubos y col. (Roubos et al., 2002), propusieron la posible presencia de una enzima relacionada con la degradación bajo condiciones de alta concentración de glicerol y amonio; no obstante, a la fecha no se dispone de reportes contundentes acerca de la acelerada descomposición de AC por efecto del amonio, por lo que una posible hipótesis de este comportamiento estaría relacionada con una reacción entre el AC cargado negativamente y el amonio cargado positivamente, para la formación de clavulanato de amonio. Hirata y col. (D Battaglia Hirata et al., 2009), emplearon soluciones acuosas y reactivos puros para sintetizar clavulanato de amonio con ayuda del intermediario *t-octilamina*. Esta aproximación dista en gran medida de las condiciones de cultivo en las cuales se propone se pudo presentar la reacción de precipitación entre el amonio y el AC.

4.4.3 Ensayos en reactor operado en lote alimentado a flujo semi-continuo

En el cultivo en lote alimentado con adición semi-continua de glicerol se evaluaron niveles de r_s de 0.25 y 0.375 g/L.h (ver *Figura 13*). En ambos casos, se encontró un efecto favorable en la formación de AC si se tiene en cuenta que la síntesis del ácido fue al menos 4 veces superior, en comparación con cultivos *BI*. Durante los ensayos *FB2* se presentó acumulación de sustrato, lo que pudo ser ocasionado por estrés nutricional relacionado con el suministro de sustrato a velocidades superiores a la velocidad de consumo, propia de la bacteria (Bellao et al., 2013), por lo que la producción de AC (232 mg/L) fue menor, en comparación con las fermentaciones *FBI*

(359 mg/L). Los valores de $Y_{p/S}$ y $Y_{p/X}$, muestran una mayor actividad de *S. clavuligerus* en el uso de la fuente carbono para la síntesis de AC en experimentos *FBI* (ver *Tabla 7*). No obstante, los niveles de $Y_{p/S}$ son al menos 3 veces inferiores que los obtenidos por Bellao y col. (Bellao et al., 2013), lo que podría atribuirse a las diferencias en la composición de la fuente de nitrógeno usada en ambos trabajos.

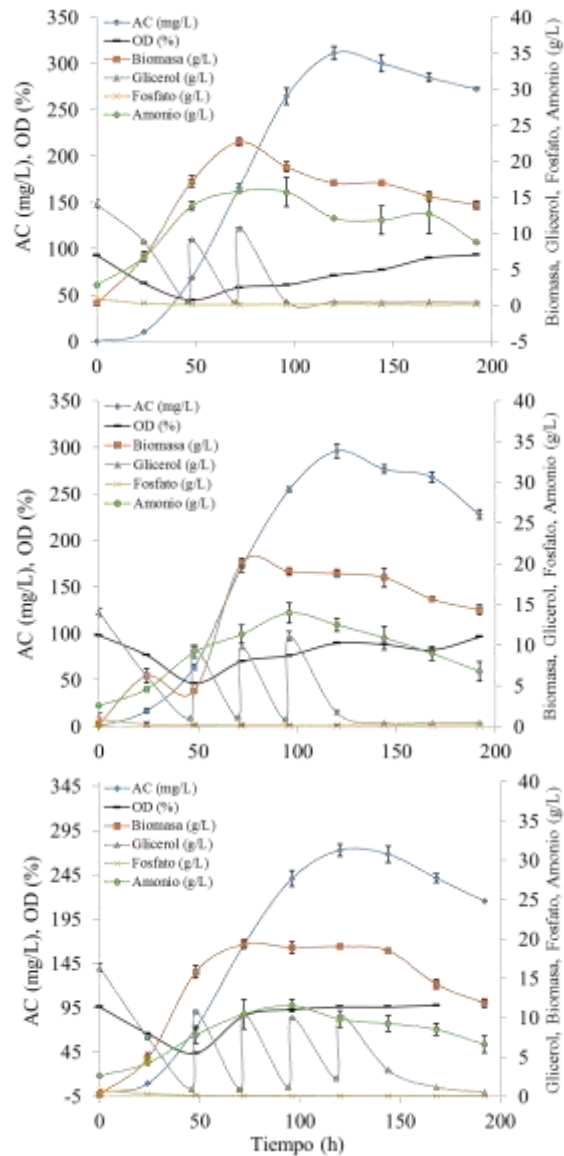


Figura 12. Dinámica de la síntesis de AC obtenido a partir del cultivo en reactor de *Streptomyces clavuligerus*, operado en lote alimentado con pulsos de sustrato. Arriba: BP2, medio: BP3 y abajo: BP4.

La operación en lote alimentado permitió retardar la degradación de AC al menos hasta las 144 h de cultivo; una vez alcanzada la fase estacionaria, la síntesis de AC continuó de manera tal que la velocidad de formación de producto fue aparentemente igual a la velocidad de degradación de AC. En realidad podría argumentarse que la cantidad de AC presente aumentó como consecuencia de la adición en forma semi-continua de sustrato; no obstante, esta condición no es observable si se toma en consideración el efecto de dilución por la corriente en semi-continuo. En consecuencia, la síntesis continua de AC durante las fermentaciones *FB*, pudo ser el resultado del control del metabolismo celular ejercido por el suministro de glicerol bajo valores de r_s que permiten alcanzar el estado “cuasi-estacionario”, y el estrés nutricional necesario para favorecer la producción de AC, como en el caso de los cultivos *FBI*. Un aspecto a resaltar es el consumo total de glicerol, luego de iniciada la alimentación. Para Bellao y col. (Bellao et al., 2013), el mejor desempeño de las fermentaciones en semi-continuo se produce bajo niveles de r_s cercanos a los valores de r_s experimentales; los ensayos con *FBI* fueron los más próximos a la condición experimental de $r_s = 0.195$ g/L.h, obtenida durante experimentos *BI*.

De otra parte, la viabilidad e integridad celular han sido señaladas como condiciones necesarias para la generación de AC (Costa & Badino, 2012), por lo que, el agotamiento de nutrientes, el estrés generado por la agitación mecánica del fermentador y la temperatura, son factores que contribuyen a la pérdida de viabilidad celular (Belmar-Beiny & Thomas, 1990; Rioseras, López-García, Yagüe, Sánchez, & Manteca, 2014; Roubos et al., 2001; Yagüe et al., 2014). En este sentido, durante los experimentos en lote alimentado con flujo semi-continuo (principalmente *FBI*), se logró disminuir la pérdida temprana de viabilidad celular por efectos de limitación en la fuente de carbono, luego de alcanzada la fase estacionaria; hasta las 72 h de cultivo, de acuerdo con la morfología observada, usando microscopía óptica, la integridad celular se mantuvo e incluso se visualizó la presencia de micelio primario (MI) con un diámetro de hifas de aproximadamente 2 mm; a partir de MI emerge el micelio secundario (MII) con un diámetro aproximado de 0.8 mm, encargado de la síntesis de antibióticos (Manteca, Sanchez, Jung, Schwämmle, & Jensen, 2010; Rioseras, López-garcía, et al., 2014); a diferencia de cultivos *B* o *BP*, donde, la presencia únicamente de hifas de MII fragmentadas y la posible condición activa de muerte celular programada del género *Streptomyces* (cuando se enfrenta a condiciones

desfavorables para su supervivencia (Rioseras, López-García, et al., 2014; Yagüe et al., 2014)), fueron apreciables desde las 48 h (ver **Figura 14**), además de una caída en la concentración de biomasa mucho más pronunciada luego de alcanzada la fase estacionaria (**Figuras 10 y 12**).

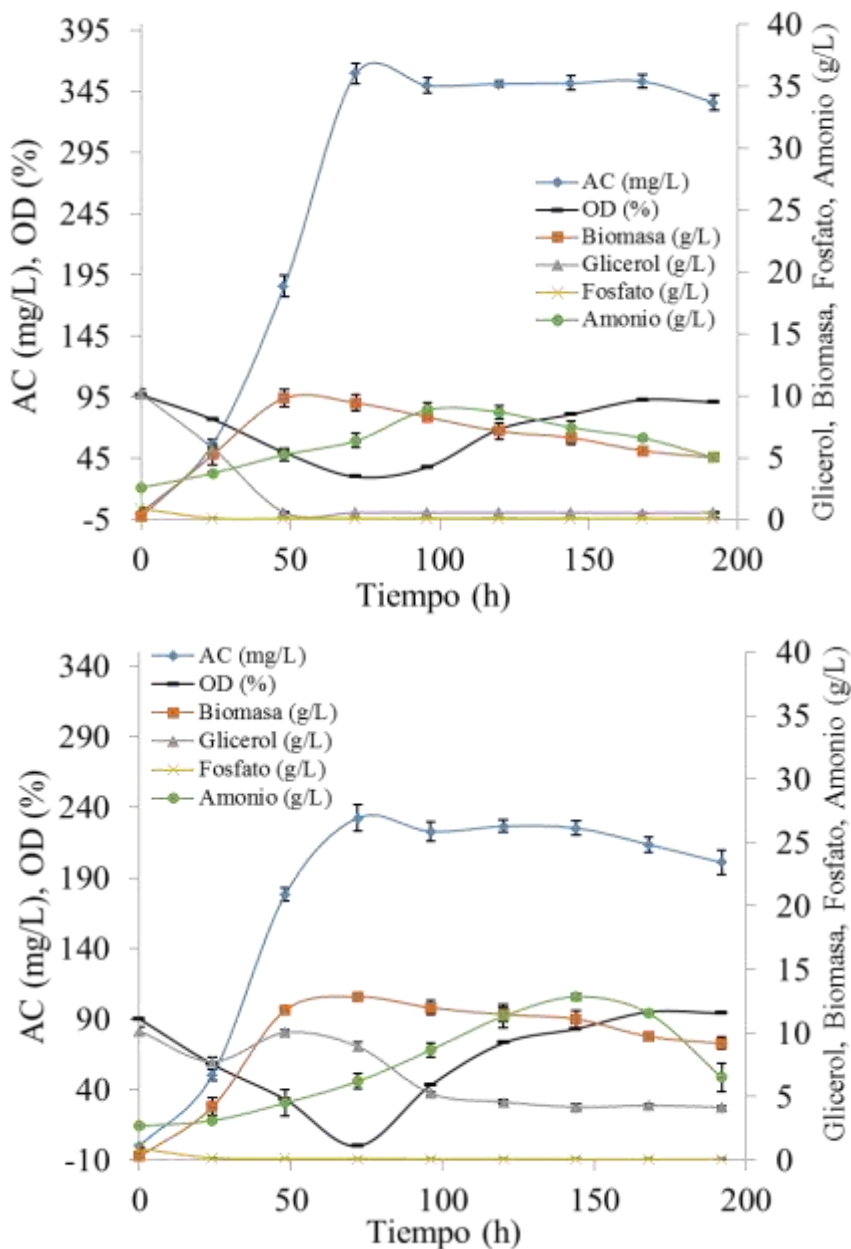


Figura 13. Dinámica de la síntesis de AC obtenido a partir del cultivo en reactor de *Streptomyces clavuligerus*, operado en lote alimentado con flujo semi-continuo. Arriba: FBI y abajo: FB2.

Asimismo, los resultados de formación de AC durante experimentos *BP*, donde, luego de suministrar sustrato adicional (*BP3* y *BP4*), no se generó biomasa o AC adicional, señalan la importancia de la viabilidad celular e integridad celular para la biosíntesis del ácido, dado que, cuando se administró fuente de carbono, el micelio de *S. clavuligerus* se encontraba fragmentado.

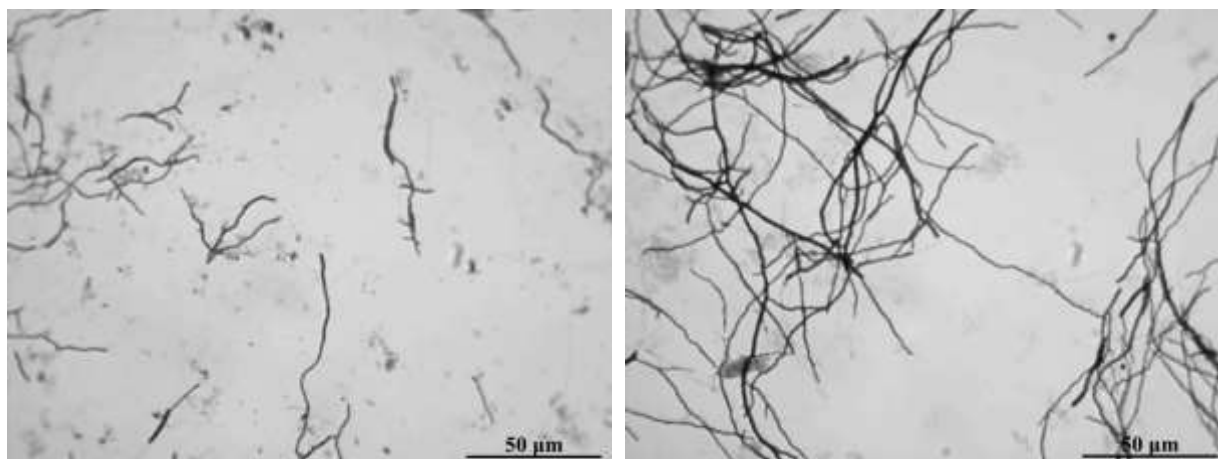


Figura 14. Microscopía óptica de *Streptomyces clavuligerus* a las 72 h de cultivo a escala de reactor. Izq: *FBI* y der: *BP2*.

4.4.4 Comparación de estrategias de operación a escala de reactor

A partir del análisis de parámetros cinéticos presentados en la **Tabla 7** es posible establecer un análisis comparativo del desempeño de las estrategias de operación usadas en el presente trabajo; se observa que los cultivos *BP2* y *FBI* fueron los ensayos donde *S. clavuligerus* utilizó de manera más eficiente el glicerol para generar AC, dados los valores de $Y_{p/s}$ de 13.09 mg_{AC}/g_S y 11.39 mg_{AC}/g_S, respectivamente. Dado que el AC es un metabolito secundario, el suministro de sustrato (glicerol) adicional, luego de la formación de biomasa, le permite al microorganismo metabolizar el sustrato y eventualmente favorecer el flujo de carbono para su incorporación en la estructura del AC (Kuo-Cheng et al., 2002; Teodoro et al., 2006). Sin embargo, de acuerdo con la estequiometría de reacción para la biosíntesis de AC, se encontró que durante los cultivos a escala de reactor, sólo un 0.755% de la masa de glicerol suministrado (ensayos *BP2*) se usó para

la estructuración de la molécula de AC, y, en comparación con otros estudios, la concentración de biomasa fue 2 veces superior (Baptista-Neto et al., 2005; Marques et al., 2009; Neto et al., 2005), lo que deja ver la limitación de *S. clavuligerus* para aprovechar globalmente el glicerol en la síntesis de AC, si se tiene en cuenta que AC no es prioridad metabólica para la célula.

Kuo–cheng y col. (Kuo-Cheng et al., 2002), Neto y col. (Neto et al., 2005) y Domingues y col. (Domingues et al., 2010) han resaltado la favorabilidad de la implementación de cultivos operadas en lote alimentado, para el control de la tasa de crecimiento celular, de manera que se prolongue la fase estacionaria y se genere un estrés nutricional adecuado para evitar tanto inhibición por sustrato como posible represión metabólica; esta estrategia ha permitido incrementar la productividad. No obstante, aunque Neto y col. (Neto et al., 2005), reportaron valores de productividad 2 veces superiores durante cultivos en lote alimentado frente a cultivos en lote, en el presente trabajo la productividad de AC no fue incrementada mediante el uso de cultivos operando en lote alimentado; una de las posibles razones es quizá el hecho de que el suministro de la fuente carbono adicional desplazó los tiempos de máxima de producción de AC, y, dadas las características propias de la cepa de *S. clavuligerus* y las condiciones de cultivo usadas, se requirió mayor tiempo de cultivo para alcanzar máxima producción de AC.

En cuanto a la comparación de las estrategias de operación del reactor, haciendo uso de un análisis de varianza, se encontraron diferencias significativas entre todas las condiciones empleadas. De acuerdo con la prueba LSD, bajo un nivel de significancia del 5%, los ensayos *FBI* constituyeron la mejor estrategia para la síntesis de AC, seguido por los experimentos *B3* y los cultivos *BP2* (ver **Tabla 7**). Este aspecto es consistente con reportes como el de Neto y col. (Neto et al., 2005) y Kuo–cheng y col. (Kuo-Cheng et al., 2002), quienes compararon 3 estrategias de operación (lote, lote alimentado y continuo), concluyendo que el suministro constante de fuente de carbono durante cultivos desarrollados bajo lote alimentado, le permite a *S. clavuligerus* extender su fase estacionaria, viabilidad celular y por ende aumentar los niveles de AC.

4.5 Degradación de Ácido Clavulánico

Se estudió la estabilidad de AC, tanto libre como formando el complejo imidazol/clavulanato (*AC/i*), en sobrenadantes de fermentación a 25°C y -80°C, con el fin de estimar constantes de degradación de AC y evaluar el efecto de productos metabólicos y componentes de medio de cultivo como sales y fuente de nitrógeno sobre la estabilidad de producto. Como resultado, se desea proponer condiciones de almacenamiento que permitan disminuir la tasa de degradación (ver *Figura 15*).

Bajo la condición térmica de 25°C se evidenció el proceso degradativo de AC tanto en sobrenadante en medio a base de ISP, como en sobrenadante de medio químicamente definido; los valores de k_d fueron iguales o superiores a 0.013 h⁻¹. Adicionalmente, *AC/i* resultó más estable en comparación con AC no derivatizado, principalmente en sobrenadante de medio QD; los valores de k_d de *AC/i* fueron inferiores a los valores de k_d de AC libre (ver *Tabla 8*).

Tabla 8. Constantes de degradación y concentración inicial de AC a 25°C, bajo dos matrices de almacenamiento, para AC y el complejo clavulanato/imidazol (*AC/i*).

Matriz y condición	C_{AC_0} (mg/L)	k_d (h ⁻¹)	r^2
ISP- <i>AC/i</i>	75.00	0.013	0.9244
ISP-AC	67.767	0.018	0.8639
GSPG- <i>AC/i</i>	37.825	0.013	0.8479
GSPG-AC	28.868	0.038	0.8545

Para el caso del AC libre y *AC/i* en sobrenadante de medio a base de ISP, se presentó un alto contenido de amonio (8 g/L), lo que contribuyó a altos valores de k_d . Roubos y col. (Roubos et al., 2002), identificaron un efecto del amonio sobre la tasa de degradación de AC, favoreciendo, aparentemente, la síntesis de una enzima con actividad degradativa sobre AC. Igualmente, se ha reportado un efecto negativo de la temperatura sobre k_d , donde, el incremento de la condición térmica favorece la degradación del ácido, en un rango entre los 10 y 30°C (Bersanetti et al., 2005). Los valores de k_d en sobrenadantes en medio a base de ISP evidenciados en el presente trabajo son inferiores a los estimados por Bersanetti y col. (Bersanetti et al., 2005), quienes observaron un valor de k_d de 0.0327 h⁻¹ a 25°C. Entre tanto, si se comparan los resultados

obtenidos en el presente estudio con los alcanzados por Costa y Badino (Costa & Badino, 2012), los valores de k_d a 25°C, en sobrenadantes en medio a base de ISP, del presente trabajo fueron mayores. En consecuencia, los sobrenadantes usados por Bersanetti y col. (Bersanetti et al., 2005), pudieron eventualmente contener mayor concentración de amonio, en comparación con los empleados por Costa y Badino (Costa & Badino, 2012); es importante disponer de estudios más detallados acerca de la producción de amonio durante el cultivo con *S. clavuligerus* y su relación con la degradación de AC.

El pH ha sido reportado como un factor influyente sobre k_d (Bersanetti et al., 2005; A F Mayer & Deckwer, 1996); los sobrenadantes usados para los ensayos de degradación tenían un pH de 7.0, lo que contribuyó a la degradación de AC. El AC presenta una mayor estabilidad en valores de pH alrededor de 6.0, dado que se presenta menor actividad catalítica ácida sobre la reacción de degradación; así, el AC se descompone más fácilmente en soluciones de carácter básico (Bersanetti et al., 2005; Costa & Colli, 2015; A F Mayer & Deckwer, 1996).

En el presente estudio, AC/i se degradó en los dos tipos de sobrenadantes a 25°C, lo que es consistente con Ramírez y col. (Ramírez-Malule et al., 2016), quienes demostraron la inestabilidad de AC/i a lo largo de 60 horas, con un tiempo de vida media de 18.43 h en promedio. Sin embargo, para el caso de sobrenadantes provenientes de medios QD, la reacción de derivatización redujo el valor de k_d , lo que sugiere una mayor estabilidad de AC/i frente a condiciones medioambientales como el pH, la temperatura y presencia de impurezas. Lo anterior confirma, una vez más, la falta de conocimiento acerca del proceso degradativo de AC; la formación de AC/i es comúnmente usada como estrategia para mejorar la cuantificación mediante cromatografía líquida, y no como mecanismo que mejore la estabilidad del ácido.

En relación con el almacenamiento de AC y AC/i a -80°C, se observó que ambas formas de AC permanecieron estables, independientemente de la composición del sobrenadante, hasta por 30 días, donde, sólo un 20% del AC inicial es degradado durante el proceso congelación/descongelación al que se ve expuesto. Este porcentaje de pérdida podría reducirse al implementar un sistema de congelación/descongelación controlado/lento. Al respecto, Vahdat y Sunderland (Vahdat & Sunderland, 2007), estudiaron la degradación de AC en condiciones de

temperaturas bajo cero. Dichos autores indicaron que incluso hasta los -13°C se presenta una desaparición del ácido con k_d cercanas a $1.46 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ y un tiempo almacenaje superior a las 70 h. No obstante, a -80°C , la desaparición del ácido no depende del tiempo, por lo que, los datos no se ajustaron al modelo exponencial de degradación; y la actividad del agua y enzimática es nula, así como la movilidad y actividad molecular. Por último, cabe resaltar que la condición de almacenamiento de -80°C para promover la estabilidad del AC no ha sido reportada a la fecha.

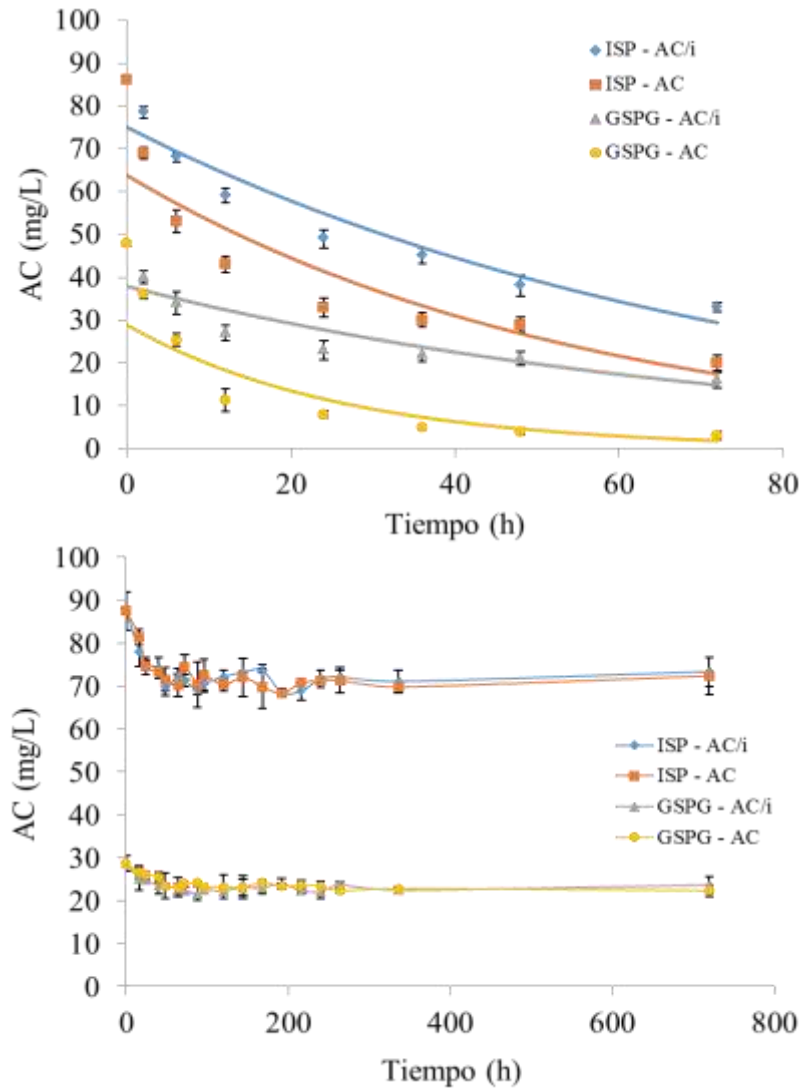


Figura 15. Cinética de degradación de AC bajo dos matrices de almacenamiento, de AC libre (AC) y el complejo clavulanato/imidazol (*AC/i*). Arriba: 25°C , líneas continuas indican los valores predichos por el modelo exponencial y abajo: -80°C .

4.6 Cinéticas de adsorción y desorción de Ácido Clavulánico

La cinética de adsorción tuvo como propósito evaluar la capacidad de adsorción de la resina y estudiar la incidencia de algunas variables de proceso como el cambio del pH del sobrenadante y su incidencia en la degradación del AC. Luego de 20 minutos de reacción, la concentración de AC en el sobrenadante fue invariable indicando una aparente condición de equilibrio; el porcentaje de adsorción de AC alcanzó su valor máximo (ver *Figura 16*). La característica de rápida adsorción de AC sobre amberlita IRA 400, ha sido reportada por algunos autores (M Barboza et al., 2002; Marlei Barboza et al., 2002; Costa & Colli, 2015; A. Mayer et al., 1996), y se ha señalado que dicha característica representa una ventaja operativa, dado que disminuye el tiempo de exposición del sobrenadante a condiciones externas, a diferencia de otros materiales de adsorción como las zeolitas, donde se requiere un tiempo mayor para lograr el equilibrio (Costa & Colli, 2015; Forte et al., 2011). El poco tiempo requerido para alcanzar el equilibrio entre la resina y el sobrenadante no permite la degradación del ácido, si se tiene en cuenta que durante los ensayos control, luego de 20 minutos de incubación, la concentración de AC permanece invariable.

El pH del sobrenadante incrementó levemente, luego de ser expuesto a la resina amberlita IRA 400. El pH final fue 6.6; el carácter básico de la resina no promovió la degradación de AC por efecto del pH, lo cual es favorable y consistente con lo reportado por Costa y Badino (Costa & Colli, 2015). Otros materiales propuestos para la remoción de AC como el carbón activado e hidrotalcitas calcinadas incrementan el pH del sobrenadante (Costa & Colli, 2015), lo que promueve la degradación de AC; en este ambiente, el AC puede sufrir hidrólisis alcalina como resultado de interacciones irreversibles con el adsorbente causando degradación en la fase sólida (Bersanetti et al., 2005; Vahdat & Sunderland, 2007).

En relación con la cinética de desorción de AC, su comportamiento fue similar a la cinética reportada por Barboza y col. (M Barboza et al., 2002). La mayor parte del ácido es liberada durante los primeros 60 minutos de incubación y luego de 120 minutos se detecta la máxima concentración de AC en la solución acuosa, donde el máximo porcentaje de desorción que se

alcanzó bajo las condiciones de los ensayos fue de 65%. Costa y Badino (Costa & Colli, 2015), señalaron la necesidad de incubar la mezcla resina-AC/solución de NaCl por al menos 90 minutos para alcanzar la máxima liberación posible del ácido (70%). Es importante señalar la superioridad del tiempo requerido para la desorción frente a la de adsorción, lo cual puede deberse a una gran fuerza de interacción iónica entre la resina y el AC, superior a la fuerza de unión resina-Cl⁻ (A. Mayer et al., 1996).

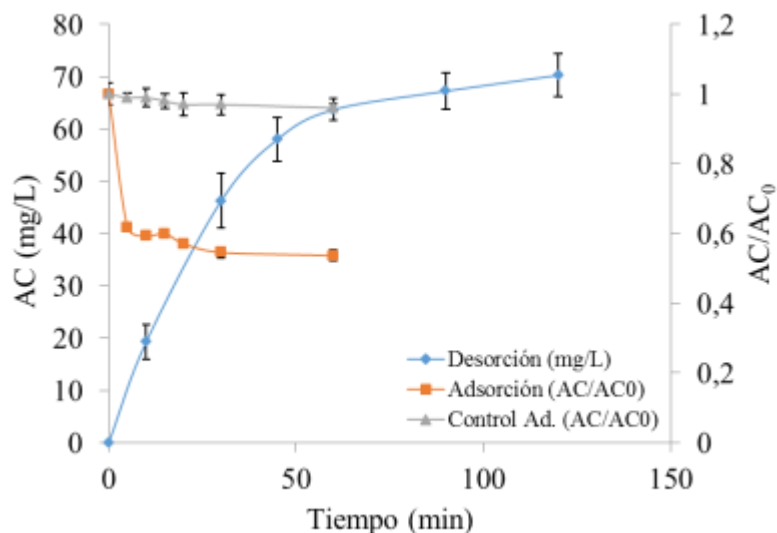


Figura 16. Cinéticas de adsorción y desorción de AC proveniente de cultivos de *Streptomyces clavuligerus*, a resina de intercambio iónico amberlita IRA 400.

4.7 Isotermas de adsorción

Se realizó un barrido de las condiciones térmicas entre 10°C y 30°C para estudiar el efecto de la temperatura sobre la capacidad de la resina para la recuperación de AC, así como la afinidad entre el adsorbente y el AC. En la **Figura 17** se presentan las cinéticas de adsorción de AC en función de C_{AC_e} , así como el ajuste de los datos experimentales al modelo Langmuir. De otra parte, a partir de los datos presentados en la **Tabla 9**, en la condición de 10°C se evidenció la mejor capacidad para la adsorción de AC (0.641 mg_{AC}/g_{resina}).

Tabla 9. Parámetros cinéticos del ajuste de datos experimentales al modelo Langmuir, durante isotermas de adsorción de AC.

Temperatura (°C)	q_m (mg _{AC} /g _{resina})	k (mg/L)	r^2
10	0.640	53.74	0.9806
15	0.380	41.75	0.9671
20	0.218	12.74	0.9566
25	0.271	12.27	0.9824
30	0.284	13.18	0.9361

La cinética de adsorción de AC en función de C_{AC_e} se ajusta adecuadamente al modelo Langmuir, el cual describe la interacción entre las moléculas iónicas como el AC y la resina, y permite la estimación de constantes de adsorción, principalmente a temperaturas inferiores a 20°C (Almeida et al., 2003; M Barboza et al., 2002; Marlei Barboza et al., 2002). En consecuencia, los datos experimentales se ajustaron al modelo Langmuir por medio de regresión lineal para la estimación de k (coeficiente de Langmuir, g/L) y q_m (capacidad máxima de adsorción, mg_{AC}/g_{resina}) (Almeida et al., 2003; Cuel et al., 2011), mediante la linealización de la ecuación de Langmuir con el método propuesto por Lineweaver–Burk (Lineweaver & Burk, 1934). Este modelo, de manera análoga al de Michaelis–Menten, indica una cinética combinada de orden 0 y orden 1, donde la cinética de orden 1 se presenta antes de lograr q_m bajo una relación lineal entre C_{AC_e} y q_e , y con una rápida adsorción del AC en los sitios disponibles que presenta la resina; a su vez, la cinética de orden 0 se establece luego de alcanzada q_m , ya que se presenta la saturación de todos los sitios disponibles para la adsorción de AC. Los valores obtenidos de q_m indican la favorabilidad de la adsorción con la disminución de la temperatura (proceso exotérmico) (Almeida et al., 2003; M Barboza et al., 2002; Marlei Barboza et al., 2002).

De otra parte, los valores de k señalan un efecto negativo de la temperatura sobre la adsorción de AC, dado que k constituye una medida de la afinidad de la resina por el AC, y el descenso en la temperatura resultó en la necesidad de incrementar la concentración de AC para alcanzar q_m . Sin embargo, el desarrollo de la extracción del ácido a 10°C, también puede prevenir la degradación de la molécula por efectos térmicos y mejorar la eficiencia en la remoción de AC del sobrenadante (Almeida et al., 2003; M Barboza et al., 2002; Marlei Barboza et al., 2002).

En consecuencia, los resultados del presente estudio difieren de trabajos como el de Barboza y col. (M Barboza et al., 2002; Marlei Barboza et al., 2002), quienes sostienen que el valor de q_m es independiente de la temperatura, puesto que los sitios disponibles para la unión del AC no se modifican frente a variaciones de temperatura, mientras que k depende linealmente de la condición térmica dado que el incremento de la temperatura de incubación promueve una mayor vibración de las moléculas iónicas como el AC, que debe unirse a los sitios cargados de la resina, y favorece la desorción; el ácido desaparece del sobrenadante como consecuencia del aumento de la temperatura (Bersanetti et al., 2005).

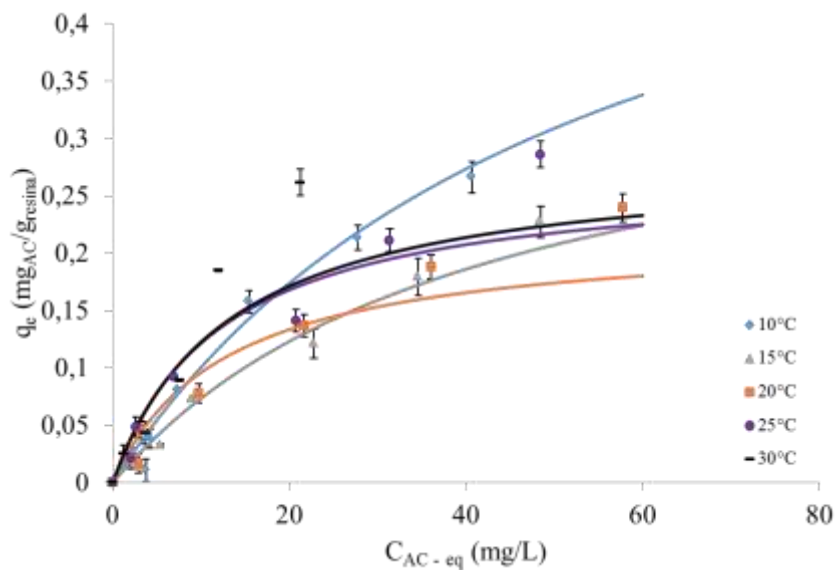


Figura 17. Isotermas de adsorción de AC entre 10 y 30°C. Líneas continuas indican los valores estimados por el modelo Langmuir para cada condición de temperatura.

En este sentido, las diferencias en los resultados del presente trabajo con respecto a Barboza y col. (M Barboza et al., 2002; Marlei Barboza et al., 2002) podrían explicar los bajos niveles de AC utilizados para el presente trabajo. Otros productos del metabolismo celular de *S. clavuligerus*, como clavamas y especialmente cefamicina C, presentan afinidad con resinas de intercambio iónico (De Baptista Neto et al., 2012); adicionalmente se ha reportado la interferencia de aminoácidos como tirosina, histidina, prolina y lisina en procesos de adsorción, por lo que, da Silva y col. (da Silva et al., 2012) implementaron un procedimiento de purificación

mediante un ATPS (*Aqueous Two Phase System* o Sistema Acuoso de Dos Fases) con PEG (Polietilenglicol) y *buffer* fosfato, previo a la extracción con amberlita IRA 400. Igualmente, los medios de fermentación cuentan con especies aniónicas provenientes de micronutrientes en forma de sales como el fosfato y el sulfato, donde, el fosfato se halló en una concentración cercana a 0.1 g/L en los sobrenadantes usados para los experimentos de adsorción. En resumen, compuestos como fosfato, sulfato, aminoácidos, pequeños péptidos, clavamas y cefamicina C pudieron unirse a la resina y su proceso de adsorción también se vio favorecido con el descenso de la temperatura, lo que disminuyó la afinidad de la amberlita IRA 400 por el AC. No obstante, a la fecha no se ha estudiado el efecto de compuestos interferentes como el fosfato o sulfato sobre la cinética de adsorción de AC y con el fin de aumentar el porcentaje de recuperación del ácido es necesario de implementar un proceso previo de purificación como extracción líquido-líquido por medio de ATPS.

La mejor condición térmica de adsorción (10°C) difiere de la temperatura de desorción (25°C), lo que, según Barboza y col. (M Barboza et al., 2002; Marlei Barboza et al., 2003), está relacionado con la entalpía tanto de formación como de descomposición del complejo resina-AC, ya que el proceso de unión del AC a la resina es exotérmico, y se ve favorecido a bajas temperaturas (10°C); a su vez, el proceso de liberación de AC es endotérmico, y requiere de altas temperaturas (25°C) para la disociación del complejo resina-AC.

Por último, cabe resaltar que durante los experimentos de fermentación extractiva, la concentración de AC fue superior al valor de k a 10°C, por lo que, el proceso de recuperación del ácido, siempre se desarrolló mediante la máxima capacidad de adsorción de la resina (q_m), bajo las condiciones establecidas en el presente trabajo.

4.8 Efecto del pH y relación sólido/líquido en la adsorción de Ácido Clavulánico

La relación sólido/líquido (S/L) constituye un factor importante durante el proceso extractivo de intercambio iónico del AC, dada su relación con la cantidad de sitios disponibles para la adsorción (Costa & Colli, 2015). Además, el pH ha sido reportado como una variable importante tanto por su influencia en el proceso de unión de AC a la resina (M Barboza et al., 2002; A.

Mayer et al., 1996), como por su efecto en la estabilidad de la molécula (Bersanetti et al., 2005). Atendiendo a lo anterior, se implementó un diseño experimental factorial 2^3 para evaluar el efecto de las variables pH inicial del sobrenadante y la relación S/L, sobre el porcentaje de adsorción de AC (variable respuesta); como resultado se obtuvo un modelo estadístico de efectos fijos, donde los valores de r^2 y r^2 ajustado por grados de libertad fueron de 0.9964 y 0.9955, respectivamente; así, el modelo obtenido explica en un 99% la variabilidad del porcentaje de adsorción de AC frente a los factores pH y relación S/L, y es posible su implementación como herramienta para predecir el comportamiento del porcentaje de adsorción de AC. La siguiente ecuación describe el modelo estimado:

$$\hat{y} = 39.06 - 8,78x_1 + 35.32x_2 - 5.42x_1^2 - 2.34x_2^2 + 7.97x_1x_2$$

Donde, \hat{y} constituye el porcentaje de adsorción de AC; y x_1 y x_2 representan el pH y relación S/L, respectivamente. Cabe resaltar que para la anterior ecuación las variables toman los valores en sus unidades originales.

Adicionalmente, se confirmó la significancia estadística del modelo mediante el análisis de varianza (ver **Tabla 10**), y se construyó una proyección gráfica tridimensional, a partir de la metodología de superficie de respuesta (RSM por sus siglas en inglés, ver **Figura 18**), donde se evidencia el efecto simultáneo del pH y la relación S/L, sobre el porcentaje adsorción de AC. De esta forma, el análisis estadístico demostró la significancia, con un nivel de confianza del 95%, de todos los efectos, dado que, el *valor-p* fue aproximadamente 0, a excepción de la interacción pH-S/L, donde el *valor-p* fue de 0.0155. La relación S/L presentó un efecto fuertemente lineal, y a pesar de que su factor cuadrático resultó significativo, constituyó el mayor efecto del modelo (ver **Figura 19**), mientras que, el pH presentó un efecto de curvatura más pronunciado, y en resumen el comportamiento global de los efectos no fue lineal, dado que, los factores cuadráticos resultaron significativos. Asimismo, el modelo de regresión predijo la máxima adsorción (55.56%) mediante el uso de una relación S/L de 40% y un pH de 5.92, por lo que el valor predicho es igual al valor experimental y confirma la validez del modelo obtenido.

Tabla 10. Análisis de varianza para modelo de efectos: efecto de la relación S/L y pH inicial sobre el porcentaje de adsorción de AC.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor - F	Pr(>F)
pH	1	346.986	346.986	297.76	0
pH ²	1	44.0827	44.0827	37.83	0
Relación S/L	1	5613.76	5613.76	4817.40	0
Relación S/L ²	1	8.24463	8.24463	7.08	0
pH * Relación S/L	1	190.642	190.642	163.60	0.0155
Bloques	2	0.40480	0.20240	0.17	0.8419
Error total	19	22.1409	1.16531		
Total (corr.)	26	6226.26			

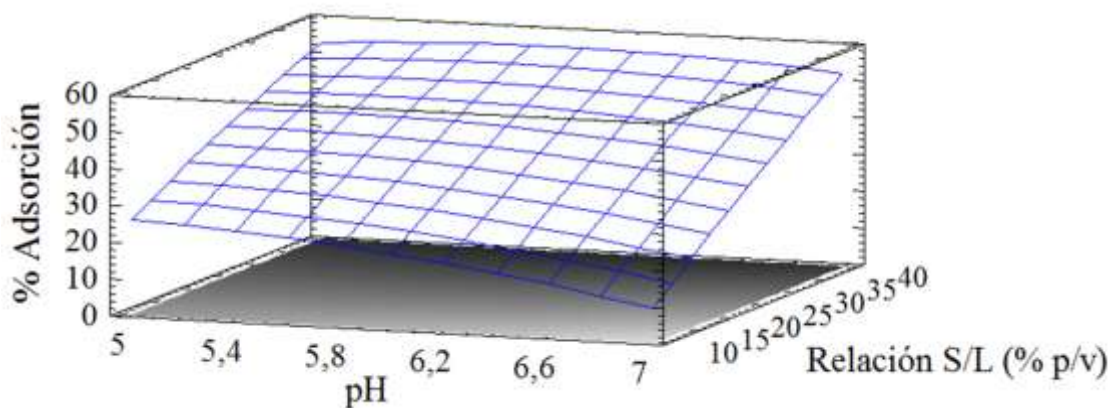


Figura 18. Gráfico de contorno de superficie de respuesta tridimensional para los efectos simultáneos de la relación S/L y pH inicial sobre el porcentaje de adsorción de AC.

Como resultado, el marcado efecto lineal de la relación S/L está relacionado con la presencia de compuestos inhibidores del proceso de unión del AC a la amberlita IRA 400, como fosfato, clavamas, cefamicina C (De Baptista Neto et al., 2012) y algunos aminoácidos como tirosina, histidina, prolina y lisina (da Silva et al., 2012), donde, la posible presencia de dichas impurezas hizo necesario el uso de una mayor cantidad de resina para mejorar la adsorción de AC. Costa y Badino (Costa & Colli, 2015) estudiaron el efecto de la relación S/L sobre C_{AC_e} , y determinaron que una relación S/L del 10% es suficiente para recuperar el 60% del AC presente en el sobrenadante, mientras que Barboza y col. (M Barboza et al., 2002) emplearon una relación S/L de 5% para la extracción hasta de un 75% del ácido de caldos de fermentación. Estos resultados

difieren de los resultados alcanzados en el presente estudio, debido probablemente a una mayor concentración de contaminantes en los sobrenadantes usados, por ejemplo fosfato, el cual estuvo en una concentración cercana a 0.1 g/L durante los ensayos de adsorción desarrollados en el presente trabajo.

Finalmente, el modelo de regresión indicó un valor óptimo de pH de 6.0; a niveles tanto por encima como por debajo de 6.0 disminuye el porcentaje de adsorción; Barboza y col. (M Barboza et al., 2002), compararon el efecto del pH sobre la unión de AC al adsorbente y lograron incrementar q_m y disminuir k mediante el aumento del pH desde 4.0 hasta 6.2, lo cual está relacionado con la estabilidad de la molécula de AC, ya que en la región de pH de 6.0–6.2 se encuentra su menor tasa de degradación (Bersanetti et al., 2005), y la difusividad efectiva, un parámetro que determina cómo al adsorbato puede llegar a ocupar los sitios disponibles para la adsorción y es favorecido a pH cercanos a 6.0; el pH en la matriz de la resina de intercambio iónico es al menos 1 unidad más alto, en comparación con el pH del sobrenadante, por lo tanto, la degradación del ácido es superior en la superficie de la resina que en la fase líquida (Efecto Donnan) (M Barboza et al., 2002). En consecuencia, durante el presente trabajo la máxima recuperación del ácido se alcanzó durante experimentos con sobrenadantes a pH 6.0.

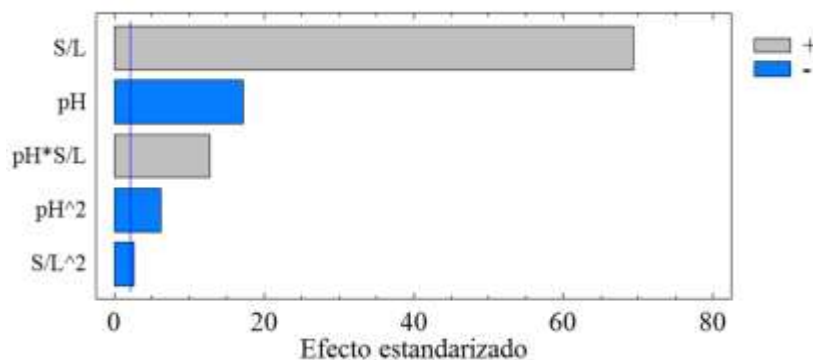


Figura 19. Diagrama de Pareto estandarizado para el estudio de adsorción de AC.

4.9 Fermentación extractiva a escala de matraz y reactor

La fermentación extractiva (FE) se implementó como una técnica que permitiera la producción y recuperación continua de AC mediante el uso de la resina de intercambio iónico amberlita IRA

400. A escala de matraz, la implementación de fermentación extractiva no permitió incrementar m_{AC-c} , puesto que la producción de AC no fue reactivada luego de la extracción; este aspecto se evidencia en la cinética $E4-FE$ con respecto a la cinética $E4$, donde m_{AC-c} cayó abruptamente luego de alcanzado su valor máximo, producto tanto de la extracción como de la degradación del ácido en el caldo de fermentación, y por ende el valor de C_{AC-c} fue igual a $AC_{máx}$ antes de la extracción (ver **Figura 20**).

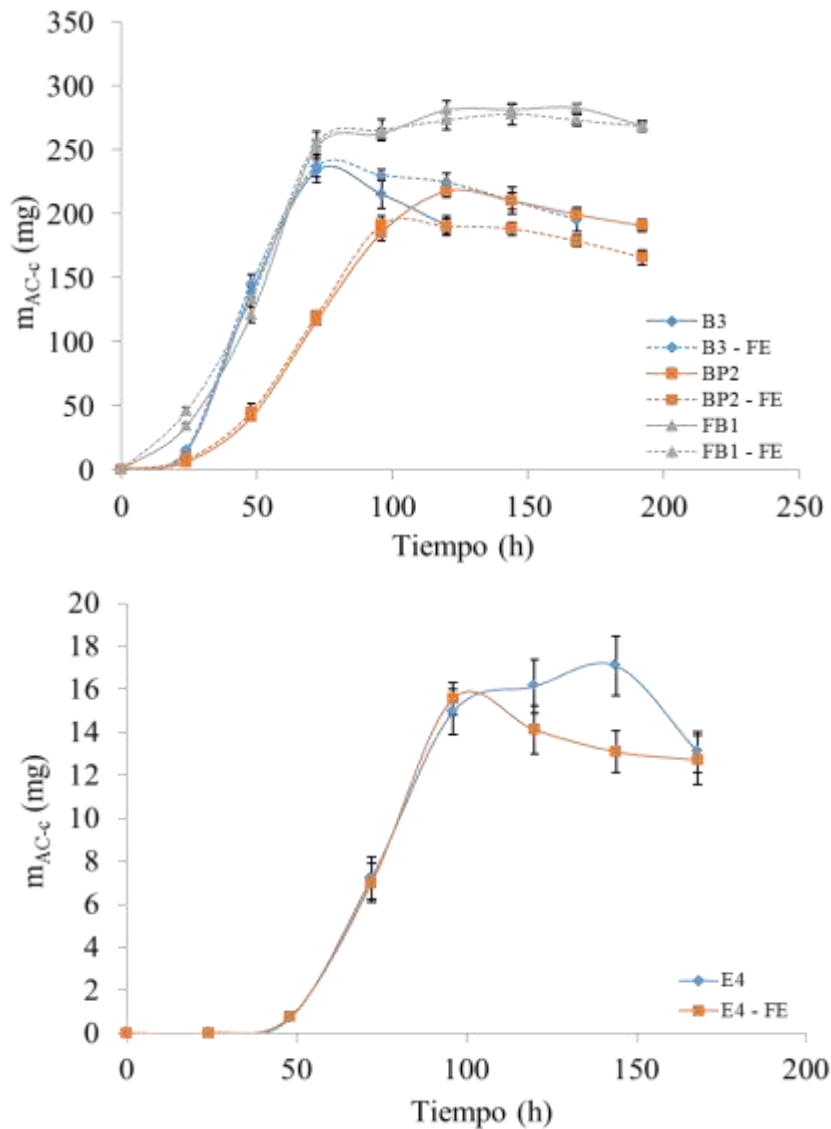


Figura 20. Masa acumulativa de AC durante fermentación extractiva. Arriba: reactor y abajo: matraz.

A escala de reactor, las fermentaciones *B3-FE*, *BP2-FE* y *FBI-FE* favorecieron m_{AC-c} ; se logró mantener la concentración del ácido en el caldo de fermentación por 24 h, luego de cada extracción, lo cual pudo deberse a la ausencia de componentes promotores de la degradación como el amonio, y/o el reinició la síntesis por parte de *S. clavuligerus*, dando lugar a una condición tal que r_p igualó a r_d , (ver **Figura 20**). En el caso de las fermentaciones *BP2-FE*, la primera extracción no se realizó en el punto de máxima concentración de AC, por lo que, aunque la cinética de m_{AC-c} indicó un efecto negativo de los cultivos *BP2-FE* frente a los ensayos *BP2*, en realidad los experimentos con *BP2-FE* permitieron mantener estable la concentración de AC.

Sí bien los cultivos *FBI* promueven la formación continua de AC durante la fase estacionaria, e incluso el aumento de la masa de AC, el desarrollo de cultivos *FBI-FE* no favoreció el incremento en la concentración de AC, luego de cada proceso extractivo, lo cual pudo deberse a la indeseable remoción de aminoácidos (arginina, ornitina, entre otros) durante la exposición del caldo de fermentación al adsorbente (da Silva et al., 2012), esenciales para la síntesis de producto.

Por su parte, aunque los cultivos *B3-FE* lograron aumentar levemente m_{AC-c} , frente a las fermentaciones *B3*, dicho aumento fue logrado gracias a que la concentración se mantuvo constante luego de la extracción y no a un incremento en la producción de AC. Los valores de C_{AC-c} no se mejoraron mediante el desarrollo de *B3-FE*, *BP2-FE* ó *FBI-FE*, y todos los valores de cada $C_{AC-c_{máx}}$ fueron iguales a su respectiva $AC_{máx}$, e incluso muy similares a los valores de $C_{AC-c_{máx}}$ y $AC_{máx}$ de los cultivos *B3*, *BP2* ó *FBI* (ver **Tabla 11**).

Finalmente, los resultados del presente estudio son diferentes a los alcanzados por Costa y Badino (Costa & Colli, 2015), quienes lograron incrementar la producción de AC, y superar la velocidad de degradación del ácido, mediante el desarrollo de fermentaciones con remoción continua del ácido con amberlita IRA 400. Costa y Badino (Costa & Colli, 2015) implementaron dichas fermentaciones a 20°C, y argumentaron que, bajo dicha condición térmica la bacteria mejora su metabolismo para una mayor eficiencia en la utilización de la fuente de carbono. La cepa usada en el presente trabajo no evidenció niveles aceptables de producción de AC a 20°C, por lo que los ensayos se llevaron a cabo a 28°C, donde la síntesis del ácido fue mayor; como

consecuencia de la operación a 28°C, la r_d fue mayor y se acentuó la pérdida temprana de viabilidad celular (Bersanetti et al., 2005; Marques et al., 2009). El desarrollo de cultivos a 28°C pudo contribuir a que luego de la remoción de AC, su concentración no aumentara y solamente se mantuviera constante. Asimismo, algunos trabajos acerca de fermentación extractiva, mediante adsorción sobre resinas de metabolitos como ϵ -poli-L-lisina y fenilalanina, indican la necesidad de extraer o disminuir la concentración del producto hasta una concentración umbral donde no ejerza inhibición en la producción por parte del microorganismo (Garrett, Srinivas, & Ahring, 2015; Kusunose & Wang, 2004; Liu, Wu, Zhang, & Mo, 2011). Este umbral debe ser estimado para la cepa *S. clavuligerus* usada, a fin de que durante la extracción se consiga remover AC hasta una concentración donde no inhiba el metabolismo de la bacteria, y así promover de nuevo la formación de AC para incrementar su concentración. En el desarrollo de los cultivos *E4 - FE*, *B3 - FE*, *BP2 - FE* ó *FBI - FE* no se identificó dicho umbral dentro los niveles a los que se redujo la concentración de AC por medio de la extracción.

Tabla 11. Parámetros de cultivo luego de la implementación de fermentación extractiva a escala de reactor y matraz.

Escala	Tipo de cultivo	Parámetro		
		$X_{\text{máx}}$ (g/L)	$AC_{\text{máx}}$ (g/L)*	$C_{AC-c_{\text{máx}}}$ (mg/L)
Matraz	<i>E4</i>	11.72	343	343
	<i>E4-FE</i>	14.05	311	311
Reactor	<i>B3</i>	8.27	333	333
	<i>B3-FE</i>	12.7	338	338
	<i>BP2</i>	22.6	311	311
	<i>BP2-FE</i>	24.7	272	272
	<i>FBI</i>	9.8	359	359
	<i>FBI-FE</i>	10.5	364	364

*Al tiempo de realizar la primera extracción.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Para el mejoramiento en la biosíntesis de Ácido Clavulánico se estudiaron diferentes variables operativas tanto a escala de matraz como a nivel de reactor, durante la estandarización de un proceso de fermentación extractiva empleando la resina de intercambio iónico amberlita IRA400.

La composición del medio de fermentación resultó determinante para la síntesis de AC; así, el *Medio 4* permitió alcanzar la mayor concentración de AC (343.2 mg/L). Igualmente, durante los experimentos *E4* se lograron los mayores niveles de producción de AC (341.5 mg/L), por lo que la temperatura y concentración de sustrato también son factores influyentes para la obtención del producto

A escala de reactor de laboratorio, se encontró que el modo de operación afecta significativamente la síntesis de AC. Los ensayos *FBI* representaron la mejor estrategia para la obtención del producto, donde $AC_{m\acute{a}x}$ fue 359 mg/L. Asimismo, las fermentaciones *FB* permitieron extender el tiempo de síntesis AC y prevenir la degradación de producto, además de alcanzar valores satisfactorios de productividad del ácido (superior a 3 mg_{AC}/L.h)

De otra parte, a 25°C, AC y AC/i desaparecen del sobrenadante bajo valores de k_d cercanos a 0.013 h⁻¹. No obstante, luego de 30 días de almacenamiento a -80°C, únicamente un 20% del AC o AC/i ha sido degradado. Cabe anotar que las condiciones de almacenamiento de AC o AC/i a -80°C para promover su estabilidad, no ha sido un tópicó abordado en la literatura relacionada.

El mayor porcentaje de recuperación de AC mediante su adsorción a la resina de intercambio iónico amberlita IRA 400 fue del 55%, y se logró bajo las siguientes condiciones: 10°C, relación S/L de 40% y pH de 6.0; mientras que, el mayor porcentaje de desorción del ácido fue del 65%.

Por último, la fermentación extractiva (FE) representó una estrategia, útil para disminuir la tasa de degradación de AC a escala de reactor, lo que permitió la acumulación del ácido, aun cuando

la velocidad de producción no fue reactivada luego de la extracción de manera que la concentración de AC aumentara. De esta manera, la FE puede implementarse como una estrategia para la producción/recuperación simultánea de AC.

5.2 Recomendaciones

De acuerdo con los resultados del presente trabajo, la producción de AC en lote, tanto a escala de matraz como de reactor, podría incrementarse mediante el estudio de la síntesis del ácido con niveles de fuente de carbono entre 15 y 50 g/L con el *Medio 4*. Asimismo, y con base en reportes bibliográficos, la biosíntesis de AC podría ser aumentada mediante el desarrollo de fermentaciones bajo temperaturas superiores a 28°C, como 32°C, puesto que, el incremento de la condición térmica de incubación resultó en una mayor concentración de AC. No obstante, debería considerarse el estudio de un rango más amplio de temperaturas, desde 20°C hasta 32°C, para el desarrollo de FE, debido a que se debe encontrar una temperatura que permita tanto la obtención de altos niveles de AC, como la reanudación del metabolismo de la bacteria, luego de la extracción, para incrementar nuevamente la concentración de AC en el fermentador.

Adicionalmente, se podría alcanzar una mayor producción de AC durante el desarrollo de fermentaciones en lote alimentado, usando pulsos de sustrato. Adicionalmente se recomienda la inclusión de aminoácidos, como ornitina o glutamato, en la solución a suministrar al fermentador, lo que mejoraría la disponibilidad de precursor C₅ para la condensación con el precursor C₃, una vez alcanzada la fase estacionaria y así evitar las limitaciones de ambos precursores durante la fermentación extractiva.

El proceso de recuperación de AC puede mejorarse mediante el uso de un procedimiento previo a la adsorción, como una extracción con ATPS, lo que permitiría un mayor porcentaje de adsorción, dada la remoción de impurezas y moléculas no deseadas. Además, la implementación de ciclos para el contacto entre la resina y el sobrenadante, o el desarrollo de sistemas tanques conectados o una columna empacada con resina, también podría incrementar la eficiencia del proceso extractivo.

Por último, el desarrollo de FE con la remoción de mayores cantidades de AC, podría permitir que *S. clavuligerus* reactive la velocidad de biosíntesis de AC, después de la extracción, de manera tal, que la concentración de AC en el fermentador incremente y por ende una mayor acumulación.

REFERENCIAS

- Almeida, R. M. R. G., Barboza, M., & Hokka, C. O. (2003). Continuous clavulanic acid adsorption process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 105–108(2), 867–879. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12721424>
- Ayala García, J. (2014). La Salud en Colombia: más cobertura pero menos acceso. *Documento de Trabajo Sobre Economía Regional, Banco de La República*. ISSN 1692-3715. <https://doi.org/ISSN 1692 - 3715>
- Baptista-Neto, Á., Teodoro, J. C., Cassiano Filho, L. C. M., Badino, A. C., & Hokka, C. O. (2005). Comparisons between continuous and batch processing to produce clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(SPEC. ISS.), 97–104. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000400012>
- Barboza, M., Almeida, R. M., & Hokka, C. O. (2002). Kinetic studies of clavulanic acid recovery by ion exchange chromatography. *Bioseparation*, 10(4–5), 221–227. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12233745>
- Barboza, Marlei, Almeida, R. M. R. G., & Hokka, C. O. (2002). Intrinsic Kinetic Parameters of Clavulanic Acid Adsorption by Ion-Exchange Chromatography. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 41(23), 5789–5793. <https://doi.org/10.1021/ie0201361>
- Barboza, Marlei, Almeida, R. M. R. G., & Hokka, C. O. (2003). Influence of temperature on the kinetics of adsorption and desorption of clavulanic acid by ionic exchange. *Biochemical Engineering Journal*, 14(1), 19–26. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00103-1](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00103-1)
- Bellao, C., Antonio, T., Araujo, M. L. G. C., & Badino, A. C. (2013). Production of clavulanic acid and cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* under different fed batch conditions. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 30(2), 257–266.
- Belmar-Beiny, M. T., & Thomas, C. R. (1990). Morphology and clavulanic acid production of *Streptomyces clavuligerus*: Effect of stirrer speed in batch fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 37(5), 456–462.
- Bersanetti, P. A., Almeida, R. M. R. G., Barboza, M., Araújo, M. L. G. C., & Hokka, C. O. (2005). Kinetic studies on clavulanic acid degradation. *Biochemical Engineering Journal*, 23(1), 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.10.007>
- Bok, S. H., & Demain, A. L. (1977). An Improved Colorimetric Assay for Polyols. *Analytical Biochemistry*, 81, 18–20. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90593-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90593-0)
- Brethauer, S., Held, M., & Panke, S. (2008). High concentrations of clavulanic acid but not of its degradation products decrease glycerol consumption and oxygen uptake rates in cultures of *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(3), 439–447.
- Bruno, M., Forte, S., Cristina, É., Elias, L., & Pastore, H. O. (2011). Evaluation of Clavulanic Acid Adsorption in MgAl-layered Double Hydroxides: Kinetic, Equilibrium and Thermodynamic Studies, 1(1), 65–81.
- Bush, K. (2004). Antibacterial drug discovery in the 21st century. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 10–17. <https://doi.org/10.1111/j.1465-0691.2004.1005.x>
- Bushell, M., Kirk, S., Zhao, H., & Avignone-Rossa, C. (2006). Manipulation of the physiology of clavulanic acid biosynthesis with the aid of metabolic flux analysis. *Enzyme Microb Technol*, 39, 149–157.
- Cavallieri, A. P., Baptista, A. S., Leite, C. A., & Araujo, M. L. G. da C. (2016). A case study in flux balance analysis: Lysine, a cephamycin C precursor, can also increase clavulanic acid production. *Biochemical Engineering Journal*, 112, 42–53.

<https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.03.012>

- Cerri, M. O., & Badino, A. C. (2012). Shear conditions in clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in stirred tank and airlift bioreactors. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(6), 977–984.
- Cielecka-Piontek, J., Szymanowska-Powalowska, D., Paczkowska, M., Lysakowski, P., Zalewski, P., & Garbacki, P. (2015). Stability, compatibility and microbiological activity studies of meropenem–clavulanate potassium. *The Journal of Antibiotics*, 68(1), 35–39.
- Costa, C., & Badino, A. (2012). Production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* in batch cultures without and with glycerol pulses under different temperature conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 69, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.08.005>
- Costa, C., & Colli, A. (2015). Overproduction of clavulanic acid by extractive fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(3), 154–160.
- Cuel, M., Barboza, M., Hokka, C., & Kwong, W. (2011). Heterogeneous model of the process of clavulanic acid purification by ionic exchange in a fixed-bed column. *Chemical Product and Process Modeling*, 6(1). <https://doi.org/10.2202/1934-2659.1454>
- da Silva, C. S., Cuel, M. F., Barreto, V. O., Kwong, W. H., Hokka, C. O., & Barboza, M. (2012). Separation of clavulanic acid from fermented broth of amino acids by an aqueous two-phase system and ion-exchange adsorption. *New Biotechnology*, 29(3), 428–431. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.05.012>
- DANE. (2017). Importaciones y Comercio Exterior. Retrieved from <http://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/comercio-internacional/importaciones>
- De Baptista Neto, Á., Bustamante Condori, M. C., Luiz De Oliveira, J. H. H., Granato, A. C., Bellao, C., Colli Badino, J. A., ... Hokka, C. O. (2012). Preliminary studies for cephamycin C purification technique. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(1), 208–221. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9417-6>
- de Lima Procópio, R. E., Reis da Silva, I., Kassawara Martins, M., de Azevedo, J. L., & de Araújo, J. M. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(5), 466–471. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014>
- Demain, A. L. (2007). The business of biotechnology. *Industrial Biotechnology*, 3(3), 269–283. <https://doi.org/10.1089/ind.2007.3.269>
- Domingues, L. C. G., Teodoro, J. C., Hokka, C. O., Badino, A. C., & Araujo, M. L. G. C. (2010). Optimization of the glycerol-to-omithine molar ratio in the feed medium for the continuous production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. *Biochemical Engineering Journal*, 53(1), 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.05.006>
- Doran, P. M. (1995). *Bioprocess Engineering Principles*. London: Academic Press Limited.
- Efthimiou, G., Thumser, A. E., & Avignone-Rossa, C. A. (2008). A novel finding that *Streptomyces clavuligerus* can produce the antibiotic clavulanic acid using only olive oil as a sole carbon source. *Applied Microbiology*, 105, 2058–2064. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03975.x>
- Elander, R. P. (2003). Industrial production of B-lactam antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61(0175–7598), 385–392. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1274-y>
- Farmalogica. (2017). Portafolio Farmalogica. Retrieved from <http://farmalogica.com/portafolio/>
- Ferrero, F. (2010). Adsorption of Methylene Blue on magnesium silicate: Kinetics, equilibria and comparison with other adsorbents. *Journal of*

Environmental Sciences, 22(3), 467–473. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60131-5](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60131-5)

- Forte, M. B. S., Rodrigues, M. I., & Filho, F. M. (2011). Clavulanic Acid Adsorption Studies in Zeolites. *Adsorption Science & Technology*, 29(4), 391–404. <https://doi.org/10.1260/0263-6174.29.4.391>
- Forte, M. B. S., Taviot-Guého, C., Leroux, F., Rodrigues, M. I., & Maugeri Filho, F. (2016). Clavulanic acid separation on fixed bed columns of layered double hydroxides: Optimization of operating parameters using breakthrough curves. *Process Biochemistry*, 51(4), 509–516. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.01.011>
- Foulstone, M., & Reading, C. (1982). Assay of amoxicillin and clavulanic acid, the components of augmentin, in biological fluids with high-performance liquid chromatography. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 22(5), 753–762. <https://doi.org/10.1128/AAC.22.5.753>
- Foulstone, Mark, & Reading, C. (1982). Assay of Amoxicillin and Clavulanic Acid, the Components of Augmentin, in Biological Fluids with High-Performance Liquid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 22(5), 753–762. <https://doi.org/10.1128/AAC.22.5.753>. Updated
- Garrett, B. G., Srinivas, K., & Ahring, B. K. (2015). Performance and stability of amberlite™ IRA-67 ion exchange resin for product extraction and pH control during homolactic fermentation of corn stover sugars. *Biochemical Engineering Journal*, 94, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.11.004>
- Gómez-Grimaldos, N. A. (2012). *Estudio de la fermentación de Streptomyces clavuligerus: Producción en continuo de Ácido Clavulánico en un reactor agitado*. Universidad de Antioquia.
- Gouveia, E. R., Baptista-Neto, A., Azevedo, A. G., Badino-jr, A. C., & Hokka, C. O. (1999). Improvement of clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in medium containing soybean derivatives. *Microbiology & Biotechnology*, 15(1984), 623–627. <https://doi.org/10.1023/A:1008942405378>
- Gouveia, E. R., Baptista-Neto, A., Badino Jr, A. C., & Hokka, C. O. (2001). Optimization of medium composition for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnology Letters*, 23, 157–161.
- Grand View Research. (2016). Antibiotics Market Analysis By Drug Class (Cephalosporins, Penicillins, Fluoroquinolones, Macrolides, Carbapenems, Aminoglycosides, Sulfonamides), By Mechanism Of Action (Cell Wall Synthesis Inhibitors, Protein Synthesis Inhibitors, DNA Synthesis Inhibitor). *Market Research Report*.
- Gray, P. P., & Vu-Trong, K. (1987). Production of the macrolide antibiotic tylosin in cyclic fed-batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 29(1), 33–40. <https://doi.org/10.1002/bit.260290106>
- Hamedí, J., Imanparast, F., Tirandaz, H., Laamerad, B., & Sadrai, S. (2011). Improvement of clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* with peanut derivatives. *Annals of Microbiology*, 62(3), 1227–1234.
- Hanson, W. C. (1950). The photometric determination of phosphorus in fertilizers using the phosphovanado-molybdate complex. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1(6), 172–173. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740010604>
- Henderson, J. W., & Brooks, A. (2010). Improved Amino Acid Methods using Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 Columns for a Variety of Agilent LC Instrumentation and Separation Goals. *Agilent Technologies*, 1–16.
- Higgins, C. E., & Kastner, R. E. (1971). *Streptomyces clavuligerus* sp. nov., a β -Lactam Antibiotic Producer. *Systematic Bacteriology*, 21(4), 326–331. <https://doi.org/10.1099/00207713-21-4-326>
- Hirata, D B, Oliveira, J. H. H. L., Leão, K. V, Rodrigues, M. I., Ferreira, A. G., Giulietti, M., ... Hokka, C. O. (2009). Precipitation of clavulanic

- acid from fermentation broth with potassium 2-ethyl hexanoate salt. *Separation and Purification Technology*, 66, 598–605.
- Hirata, D B, Oliveira, J. H. H. L., Leão, K. V, Rodrigues, M. I., Ferreira, A. G., Giuletta, M., ... Hokka, C. O. (2013). Optimization of the precipitation of clavulanic acid from fermented broth using t-octylamine as intermediate. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 30(2), 231–244.
- Hirata, D Battaglia, de Oliveira, J. H. H. L., Ferreira, A. G., & Leão, K. V. (2009). Preparation of clavulanate salt using a tertiary octylamine as an intermediate. In *Proceedings of the II International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology* (pp. 754–759).
- IMS Health. (2013). Pharmerging Markets: Picking a pathway to success.
- INVIMA. (2017). Consulta de Registros INVIMA. Retrieved from <https://www.invima.gov.co/consultas-registros-sanitarios>
- Jensen, S. (2012). Biosynthesis of clavam metabolites. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 39, 1407–1419.
- John, R. P., Nampoothiri, K. M., & Pandey, A. (2008). L(+)-lactic acid recovery from cassava bagasse based fermented medium using anion exchange resins. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(6), 1241–1248. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132008000600020>
- Khan, A. M., Gautam, S., & Ganai, S. A. (2008). Sorption studies on cresol red modified Amberlite IR400 (Cl⁻) resin: Binary and selective separation of Hg²⁺ ions. *Indian Journal of Chemical Technology*, 15(6), 541–546.
- Kirk, S. (2000). *The physiology of clavulanic acid production by Streptomyces clavuligerus*. University of Surrey.
- Kirk, S., Avignone-Rossa, C. A., & Bushell, M. E. (2000). Growth limiting substrate affects antibiotic production and associated metabolic fluxes in *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnology Letters*, 22(22), 1803–1809. <https://doi.org/10.1023/A:1005670603596>
- Kong, K.-F., Schneper, L., & Mathee, K. (2010). Beta-lactam Antibiotics: From Antibiosis to Resistance and Bacteriology. *APMIS*, 118(1), 1–36. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x>. Beta-lactam
- Korbekandi, H., Darkhal, P., Hojati, Z., Abedi, D., Hamed, J., & Pourhosein, M. (2010). Overproduction of clavulanic acid by UV mutagenesis of *Streptomyces clavuligerus*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 9(2), 177–181.
- Kuo-Cheng, C., Yun-Huin, L., Cheng-Min, T., Chen-Hao, H., & Jer-Yiing, H. (2002). Optimization of glycerol feeding for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* with glycerol feeding. *Biotechnology Letters*, 24(6), 455–458.
- Kuo-Cheng, C., Yun-Huin, L., Jane-Yii, W., & Sz-Chwun, J. H. (2003). Enhancement of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* with ornithine feeding. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(1), 152–156.
- Kusunose, Y., & Wang, D. I. C. (2004). The enhancement of production of phenylalanine by extractive fermentation with polymeric beads. *Chemical Engineering Communications*, 191(9), 1199–1207. <https://doi.org/10.1080/00986440490464020>
- La Rebaja. (2017). La Rebaja Virtual: Droguería. Retrieved from <https://www.larebajavirtual.com/catalogo/buscar?busqueda=curam>
- Lebrihi, A, Germain, P., & Lefebvre, G. (1987). Phosphate repression of cephamycin and clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 26, 130–135.
- Lebrihi, Ahmed, Germain, P., & Lefebvre, G. (1987). Phosphate repression of cephamycin and clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26, 130–135.
- Lee, P. C., & Ho, C. C. (1996). Production of clavulanic acid and cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* in palm-oil medium. *World*

Journal of Microbiology & Biotechnology, 12(1), 73–75.

- Lineweaver, H., & Burk, D. (1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 56(3), 658–666. <https://doi.org/10.1021/ja01318a036>
- Liu, S., Wu, Q., Zhang, J., & Mo, S. (2011). Production of ϵ -poly-l-lysine by *Streptomyces* sp. using resin-based, in situ product removal. *Biotechnology Letters*, 33(8), 1581–1585. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0616-6>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Randall, R. J., & Lewis Farr, A. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/0304-3894\(92\)87011-4](https://doi.org/10.1016/0304-3894(92)87011-4)
- Lynch, H. C., & Bushell, M. E. (1995). The physiology of erythromycin biosynthesis in cyclic fed batch culture. *Microbiology*, 141, 3105–3111.
- Maeda, K., Luengo, J. M., Ferrero, O., Wolfe, S., Lebedev, M. Y., Fang, A., & Demain, A. L. (1995). The substrate specificity of deacetoxycephalosporin C synthase (“expandase”) of *Streptomyces clavuligerus* is extremely narrow. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(3), 231–234. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00001-8](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00001-8)
- Maiti, S. K., Lantz, A. E., Bhushan, M., & Wangikar, P. P. (2011). Multi-objective optimization of glycopeptide antibiotic production in batch and fed batch processes. *Bioresource Technology*, 102(13), 6951–6958. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.095>
- Manteca, A., Sanchez, J., Jung, H. R., Schwämmle, V., & Jensen, O. N. (2010). Quantitative proteomics analysis of *Streptomyces coelicolor* development demonstrates that onset of secondary metabolism coincides with hypha differentiation. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 9(7), 1423–1436. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900449-MCP200>
- Maranesi, G. L., Baptista-Neto, A., Hokka, C. O., & Badino, A. C. (2005). Utilization of vegetable oil in the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(4), 509–514. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-2393-z>
- Marques, D. A. V., Oliveira, R. P. S., Perego, P., Porto, A. L. F., Pessoa, A., & Converti, A. (2009). Kinetic and thermodynamic investigation on clavulanic acid formation and degradation during glycerol fermentation by *Streptomyces DAUFPE 3060*. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(2), 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.03.005>
- Mayer, A., Anspach, F., & Deckwer, W. (1996). Purification of clavulanic acid by ion-pairing systems. *Bioseparation*, 6, 25–39.
- Mayer, A F, & Deckwer, W. D. (1996). Simultaneous production and decomposition of clavulanic acid during *Streptomyces clavuligerus* cultivations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 41–46.
- Mayer, Anne F., Hartmann, R., & Deckwer, W.-D. (1997). Diffusivities of clavulanic acid in porous sorption systems with ion pairing. *Chemical Engineering Science*, 52(24), 4561–4568. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(97\)00299-6](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(97)00299-6)
- Ministerio de Salud y Protección Social. (2014). Cifras Financieras del Sector Salud.
- Montúfar, F. E. (2013). Recomendaciones para el diagnóstico, tratamiento y prevención de la neumonía adquirida en la comunidad en adultos. *Infectio*, 17(1), 1–38. <https://doi.org/0123-9392>
- Moreno, C. (2015). Analisis de la Situacion de Salud (ASIS) Colombia 2015. *Instituto Nacional de Salud*.
- Mustafa, S., Ahmad, T., Naeem, A., Shah, K. H., & Waseem, M. (2010). Kinetics of chromium ion removal from tannery wastes using Amberlite IRA-400 Cl- and its hybrids. *Water, Air, and Soil Pollution*, 210(1–4), 43–50. <https://doi.org/10.1007/s11270-009-0221-7>

- Neto, A. B., Hirata, D. B., Cassiano Filho, L. C. M., Bellão, C., Júnior, A. C. B., & Hokka, C. O. (2005). A study on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in batch, fed-batch and continuous processes. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 22(04), 557–563.
- Neves, A. A., Vieira, L. M., & Menezes, J. C. (2001). Effects of preculture variability on clavulanic acid fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 72(6), 628–633. [https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20010320\)72:6<628::AID-BIT1028>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1097-0290(20010320)72:6<628::AID-BIT1028>3.0.CO;2-L)
- Ng, I. S., Ye, C., Zhang, Z., Lu, Y., & Jing, K. (2014). Daptomycin antibiotic production processes in fed-batch fermentation by *Streptomyces roseosporus* NRRL11379 with precursor effect and medium optimization. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(3), 415–423. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-1007-2>
- Olmos, E., Mehmood, N., Haj Husein, L., Goergen, J. L., Fick, M., & Delaunay, S. (2013). Effects of bioreactor hydrodynamics on the physiology of *Streptomyces*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(3), 259–272. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0794-1>
- Ortiz, S. C. A., Hokka, C. O., & Badino, A. C. (2007). Utilization of soybean derivatives on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), 1071–1077. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.08.009>
- Ozcengiz, G., & Demain, A. L. (2013). Recent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its regulation. *Biotechnology Advances*, 31(2), 287–311. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.12.001>
- Panas, P., Lopes, C., Cerri, M. O., Ventura, S. P. M., Santos-Ebinuma, V. C., & Pereira, J. F. B. (2017). Purification of clavulanic acid produced by *Streptomyces clavuligerus* via submerged fermentation using polyethylene glycol/cholinium chloride aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria*, 450, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2017.07.005>
- Pérez-Redondo, R., Santamarta, I., Bovenberg, R., Martín, J. F., & Liras, P. (2010). The enigmatic lack of glucose utilization in *Streptomyces clavuligerus* is due to inefficient expression of the glucose permease gene. *Microbiology*, 156(5), 1527–1537. <https://doi.org/10.1099/mic.0.035840-0>
- Pinto, L. S., Vieira, L. M., Pons, M. N., Fonseca, M. M. R., & Menezes, J. C. (2004). Morphology and viability analysis of *Streptomyces clavuligerus* in industrial cultivation systems. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26(3), 177–184. <https://doi.org/10.1007/s00449-003-0349-6>
- Polowczyk, I., Cyganowski, P., Urbano, B. F., Rivas, B. L., Bryjak, M., & Kabay, N. (2017). Amberlite IRA-400 and IRA-743 chelating resins for the sorption and recovery of molybdenum(VI) and vanadium(V): Equilibrium and kinetic studies. *Hydrometallurgy*, 169, 496–507. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2017.02.017>
- Ramirez-Malule, H., Junne, S., López, C., Zapata, J., Sáez, A., Neubauer, P., & Rios-Esteva, R. (2016). An improved HPLC-DAD method for clavulanic acid quantification in fermentation broths of *Streptomyces clavuligerus*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 120, 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.12.035>
- Reading, C., & Cole, M. (1977). Clavulanic Acid: a Beta-Lactamase-Inhibiting Beta-Lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 11(5), 852–857. <https://doi.org/10.1128/AAC.11.5.852>. Updated
- Ríos, R., Mattar, S., & González, M. (2011). Análisis bibliométrico de las publicaciones sobre enfermedades infecciosas en Colombia, 2000–2009. *Revista de Salud Pública*, 13(2), 298–307. Retrieved from <http://www.scielosp.org/pdf/rsap/v13n2/v13n2a11.pdf>
- Rioeras, B., López-garcía, M. T., Yagüe, P., Sánchez, J., & Manteca, Á. (2014). Mycelium differentiation and development of *Streptomyces coelicolor* in lab-scale bioreactors: Programmed cell death, differentiation, and lysis are closely linked to undecylprodigiosin and actinorhodin production. *Bioresour Technol.*, 151, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.068>. Mycelium

- Rioseas, B., López-García, M. T., Yagüe, P., Sánchez, J., & Manteca, Á. (2014). Mycelium differentiation and development of *Streptomyces coelicolor* in lab-scale bioreactors: Programmed cell death, differentiation, and lysis are closely linked to undecylprodigiosin and actinorhodin production. *Bioresource Technology*, *151*, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.068>
- Robles Reglero, V. (2014). *Caracterización de la agrupación génica de biosíntesis de holomicina en Streptomyces clavuligerus ATCC 27064*. Universidad de León.
- Romero, J., Liras, P., & Martín, J. (1984). Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, *20*, 318–325.
- Romero, J., Liras, P., & Martín, J. (1986). Utilization of ornithine and arginine as specific precursors of clavulanic acid. *Applied Environ Microbiol*, *52*, 892–897.
- Rosa, J. C., Neto, a. B., Hokka, C. O., & Badino, a. C. (2005). Influence of dissolved oxygen and shear conditions on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *27*(2), 99–104.
- Roubos, J. A., Krabben, P., De Laat, W. T. A. M., Babuška, R., & Heijnen, J. J. (2002). Clavulanic acid degradation in *Streptomyces clavuligerus* fed-batch cultivations. *Biotechnology Progress*, *18*, 451–457.
- Roubos, J. A., Krabben, P., Luiten, R. G. M., Verbruggen, H. B., & Heijnen, J. J. (2001). A Quantitative Approach to Characterizing Cell Lysis Caused by Mechanical Agitation of *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnology Progress*, *17*, 336–347.
- Ryu, Y. G., Jin, W., Kim, J. Y., Kim, J. Y., Lee, S. H., & Lee, K. J. (2004). Stringent factor regulates antibiotics production and morphological differentiation of *Streptomyces clavuligerus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *14*(6), 1170–1175.
- Sánchez De Rivas, C. (2006). ¿Antibióticos, ayer, hoy y mañana...? *Química Viva*, *2*, 63–77.
- Sánchez Henao, C. P., Gómez Grimaldos, N. A., & Quintero Díaz, J. C. (2012). Producción de ácido clavulánico por fermentación de *Streptomyces clavuligerus*: evaluación de diferentes medios de cultivo y modelado matemático. *Dyna*, *175*, 158–165.
- Saudagar, P. S., & Singhal, R. S. (2007a). A statistical approach using L25 orthogonal array method to study fermentative production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* MTCC 1142. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *136*(3), 345–359. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-9030-x>
- Saudagar, P. S., & Singhal, R. S. (2007b). Optimization of nutritional requirements and feeding strategies for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Bioresource Technology*, *98*, 2010–2017.
- Saudagar, P. S., Survase, S. A., & Singhal, R. S. (2008). Clavulanic acid: A review. *Biotechnology Advances*, *26*(4), 335–351. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.03.002>
- Sebastine, I. M., Stocks, S. M., Cox, P. W., & Thomas, C. R. (1999). Characterisation of percentage viability of *Streptomyces clavuligerus* using image analysis. *Biotechnology Techniques*, *13*(6), 419–423.
- Secretaría de Salud de Medellín. (2016). Boletín Epidemiológico Medellín Saludable Periodo Epidemiológico 3 - Semanas 1 a 12.
- Ser, H.-L., Law, J. W.-F., Chaiyakunapruk, N., Jacob, S. A., Palanisamy, U. D., Chan, K.-G., ... Lee, L.-H. (2016). Fermentation Conditions that Affect Clavulanic Acid Production in *Streptomyces clavuligerus*: A Systematic Review. *Frontiers in Microbiology*, *7*(April), 522. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00522>

- Tahlan, K., Anders, C., Wong, A., Mosher, R., Beatty, P., & Brumlik, M. (2007). 5Sclavam biosynthetic genes are located in both the clavam and paralog gene clusters in *Streptomyces clavuligerus*. *Chem Biol*, *14*, 131–142.
- Teodoro, J. C., Araujo, M. L. G. C., Hokka, C. O., & Badino, A. C. (2010). Influence of glycerol and ornithine feeding on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, *27*(4), 499–506.
- Teodoro, J. C., Baptista-Neto, A., Cruz-Hernández, I. L., Hokka, C. O., & Badino, A. C. (2006). Influence of feeding conditions on clavulanic acid production in fed-batch cultivation with medium containing glycerol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *72*(3), 450–455.
- Vahdat, L., & Sunderland, V. B. (2007). Kinetics of amoxicillin and clavulanate degradation alone and in combination in aqueous solution under frozen conditions. *International Journal of Pharmaceutics*, *342*(1–2), 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.05.029>
- Viana, D. A., Carneiro-Cunha, M. N., Araújo, J. M., Barros-Neto, B., Lima-Filho, J. L., Converti, A., ... Porto, A. L. F. (2010). Screening of variables influencing the clavulanic acid production by streptomyces DAUFPE 3060 strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *160*(6), 1797–1807. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8671-3>
- Viana Marques, D. A., Carneiro Cunha, M. N., Araújo, J. M., Lima-Filho, J. L., Converti, A., Pessoa-Jr, A., & Figueiredo Porto, A. L. (2011). Optimization of clavulanic acid production by *Streptomyces DAUFPE 3060* by response surface methodology. *Brazilian Journal of Microbiology*, *42*, 658–667.
- Viana Marques, D. A., Pessoa-Júnior, A., Lima-Filho, J. L., Converti, A., Perego, P., & Porto, A. L. F. (2011). Extractive fermentation of clavulanic acid by *Streptomyces DAUFPE 3060* using aqueous two-phase system. *Biotechnology Progress*, *27*(1), 95–103. <https://doi.org/10.1002/btpr.526>
- Waterborg, J. H., & Matthews, H. R. (1985). The burton assay for DNA. *Methods Mol Biol*, *2*, 1–3. <https://doi.org/10.1385/0-89603-064-4:1>
- Yagüe, P., Rodríguez-García, A., López-García, M. T., Rioseras, B., Martín, J. F., Sánchez, J., & Manteca, A. (2014). Transcriptomic analysis of liquid non-sporulating *Streptomyces coelicolor* cultures demonstrates the existence of a complex differentiation comparable to that occurring in solid sporulating cultures. *PloS One*, *9*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086296>
- Yegneswaran, P. K., Gray, M. R., & Thompson, B. G. (1991a). Effect of dissolved oxygen control on growth and antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus* fermentations. *Biotechnology Progress*, *7*(3), 246–250.
- Yegneswaran, P. K., Gray, M. R., & Thompson, B. G. (1991b). Experimental simulation of dissolved oxygen fluctuations in large fermentors: Effect on *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnology and Bioengineering*, *38*(10), 1203–1209.
- Yu, Y., & Christopher, L. P. (2017). Detoxification of hemicellulose-rich poplar hydrolysate by polymeric resins for improved ethanol fermentability. *Fuel*, *203*, 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.04.118>
- Yuen, S. H., & Pollard, A. G. (1954). Determination of nitrogen in agricultural materials by the Nessler. *Journal of Scientific Food Agriculture*, *5*, 364–369.
- Zhan, Y., & Zheng, S. (2016). Efficient production of nonactin by *Streptomyces griseus subsp. griseus*. *Canadian Journal of Microbiology*, *62*(8), 711–714. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0248>