



Desarrollo de un modelo cinético de *Streptomyces clavuligerus* para representar la utilización de múltiples sustratos en medios complejos durante la producción de ácido clavulánico

Paula Andrea Martinez Aldana

Informe de trabajo de grado como requisito para optar al título de Ingeniería Bioquímica otorgado por UdeA Seccional Oriente.

León Felipe Toro Navarro, Doctor en Biotecnología

Universidad de Antioquia
Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química
Ingeniería Bioquímica UdeA Seccional Oriente
El Carmen de viboral , Colombia
2023.



Cita	(Martínez Aldana, 2023)
Referencia	Martínez Aldana, P. (2023). <i>Desarrollo de un modelo cinético de Streptomyces clavuligerus para representar la utilización de múltiples sustratos en medios complejos durante la producción de ácido clavulánico</i> Proyecto de investigación. Universidad de Antioquia, Seccional Oriente.
Estilo APA 7 (2020)	



Grupo de Investigación Bioprocesos UdeA Medellín.



Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y cone

Tabla de contenido

NOMENCLATURAS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
I. INTRODUCCIÓN	10
II. OBJETIVOS	12
A. Objetivo general	12
B. Objetivos específicos	12
III. MARCO TEÓRICO	13
IV. METODOLOGÍA	16
A. Revisión bibliográfica	16
B. Equipo y software	16
C. Implementación del modelo cinético en Python	16
D. Estimación de los parámetros del modelo	16
F. Datos Experimentales	17
G. Construcción del modelo cinético	17
H. Análisis de los datos	19
V. RESULTADOS Y ANÁLISIS	20
VII. CONCLUSIONES	25
REFERENCIAS	26

LISTA DE TABLAS

TABLA I: PARÁMETROS AJUSTADOS DE LAS ECUACIONES DE BIOMASA, SUSTRATO Y PRODUCTO PARA UN PROCESO DE FERMENTACIÓN.	22
TABLA II PARÁMETROS AJUSTADOS PARA EL MODELO CINÉTICO DE CONSUMO DE AMINOÁCIDOS EN EL TIEMPO INICIAL (T=0) EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN.	22
TABLA III PARÁMETROS AJUSTADOS PARA EL MODELO CINÉTICO DE CONSUMO DE AMINOÁCIDOS EN EL TIEMPO (T=20) EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN.	22

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1. Comparación entre valores experimentales y simulados de las variables sustrato, biomasa y producto. 20
- Fig. 2. Comparación entre los valores experimentales y simulados del sustrato, biomasa y ácido clavulánico en un modelo cinético de fermentación. 21
- Fig. 3. Comparación entre los valores experimentales y simulados por el modelo cinético de los aminoácidos para los tiempos $t_0=0$ (correspondientes a las primeras cuatro gráficas) y $t_0=20$ (correspondientes a las demás gráficas). 23

ABREVIATURAS

AC	Ácido clavulánico
Glyc	Sustrato correspondiente al glicerol
Glu	Glutamato
Asp	Aspartato
Ser	Serina
Trp	Triptófano
Phe	Fenilalanina
Ala	Alanina
His	Histidina
Pro	Prolina
Thr	Treonina
Lys	Lisina
Cys	Cisteína
Arg	Cisteína
Leu	Leucina
Tyr	Tirosina
Gly	Glicina
Val	Valina
Amm	Aminoácidos

NOMENCLATURAS

X: Concentración de la biomasa (gL^{-1}).

Glyc: Concentración de glicerol (gL^{-1}).

CA: Concentración del ácido clavulánico (mgL^{-1}).

μ : velocidad específica de crecimiento (h^{-1}).

$Y_{x/\text{glyc}}$: Rendimiento de sustrato en producto ($\text{g}_X/\text{g}_{\text{Glyc}}$).

Y_{x/NH_4} : Rendimiento de NH_4 sustrato en producto ($\text{g}_X/\text{g}_{\text{NH}_4}$).

Y_{x/PO_4} : Rendimiento de PO_4 en producto ($\text{g}_X/\text{g}_{\text{PO}_4}$).

$Y_{p/X}$: Rendimiento de producto en biomasa ($\text{g}_X/\text{mg}_{\text{AC}}$).

kd: Constante de degradación de AC (h^{-1}).

α : Productividad de AC específica ($\text{mgg}^{-1}\text{h}^{-1}$)

K_S : Constante de saturación de Monod (gL^{-1}).

R^2 : Coeficiente de determinación.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue desarrollar un modelo cinético para predecir variables clave en el proceso de producción de ácido clavulánico (AC) por *Streptomyces clavuligerus*, y las concentraciones de sustrato, la biomasa y la formación de producto. El modelo se basó en datos recogidos del cultivo del microorganismo en un medio semisintético utilizando hidrolizado de caseína (medio CAS-5).

Los parámetros del modelo se estimaron mediante regresiones no lineales, luego se simuló el proceso de fermentación y se compararon los resultados con los datos experimentales mediante coeficientes de correlación cuadrada. El modelo demostró un adecuado grado de ajuste, con valores R^2 de 0,92 para el sustrato (glicerol) y la biomasa, y de 0,94 para la formación de producto (AC). Los valores de los parámetros estimados se presentan en la **Tabla I**. Además, el modelo predijo con éxito el consumo de aminoácidos Cys y Arg, con valores R^2 de 0,96 y 0,92, respectivamente.

Sin embargo, el grado de ajuste para los demás aminoácidos, fue variado, con valores de R^2 inferiores a 0.9, lo que indica que los supuestos del modelo son susceptibles de ser revisados para representar mejor el proceso real. Sin embargo, la discrepancia puede deberse a la complejidad de la fisiología microbiana y al reto de modelar múltiples sustratos en medios complejos.

Este estudio contribuye a una mejor comprensión del proceso de crecimiento y síntesis de clavulánico mediante a través de un modelo cinético no estructurado. La metodología desarrollada puede servir de marco para futuras investigaciones, mejorando nuestra comprensión de los complejos procesos microbianos y la producción de metabolitos secundarios.

Palabras clave — **Modelo cinético, ácido clavulánico, medio semisintético, *Streptomyces clavuligerus*, aminoácidos.**

ABSTRACT

This study aimed to develop a kinetic model for predicting key variables in the production process of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*, such as substrate concentrations, biomass, and product formation. The model was based on data collected from the cultivation of the microorganism in a semi-synthetic medium using casein hydrolysate (CAS-5 medium).

The objective was to estimate model parameters through non-linear regressions. The fermentation process was then simulated, and results were compared to experimental data using squares correlation coefficients. The model demonstrated a strong fit, with R^2 values of 0.92 for substrate and biomass, and 0.94 for product formation. The estimated parameter values are presented in **Table I**. Additionally, the model successfully predicted the consumption of *Cys* and *Arg* amino acids, with R^2 values of 0.96 and 0.92, respectively.

However, the model did not accurately fit the consumption of other amino acids, as the obtained R^2 values were below 0.9, indicating that the model's assumptions were not representative at all for the actual process. This discrepancy may be due to the complexity of microbial physiology and the challenge of modeling the utilization of multiple substrates in complex media.

Thus, this study contributes to a better understanding of the clavulanic acid production process and the optimization of fermentation conditions to enhance productivity. The developed methodology can serve as a framework for future research and modeling, improving our understanding of complex microbial processes and the production of secondary metabolites.

.Keywords — Kinetic model, clavulanic acid, semi-synthetic medium, *Streptomyces clavuligerus*, amino acids.

I. INTRODUCCIÓN

El ácido clavulánico (AC), es un poderoso inhibidor natural de las β -lactamasas bacterianas, es un importante antibiótico β -lactámico producido por el organismo *Streptomyces clavuligerus* y es activo contra un amplio espectro de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas [1]. 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, alcanzado un nivel de producto de hasta 1.000 mg/L, usando medios de cultivo a base de derivados de soja y fuente de carbono como glicerol y lípidos [4].

La mayoría de las fermentaciones industriales emplean un proceso por lotes o por lotes alimentados con medios complejos que ofrecen múltiples sustratos sustituibles. Incluso pequeños cambios en la concentración del sustrato durante la fase crucial del lote pueden afectar significativamente el rendimiento y la calidad del producto [4].

Los requerimientos nutricionales específicos de los microorganismos utilizados en los procesos de fermentación industrial son tan complejos y variados como los microorganismos en cuestión. Lo cual requiere amplios esfuerzos de investigación interdisciplinarios [1]. Por tanto, es de gran importancia el seguir desarrollando estudios enfocados a mejorar la producción del AC, permitiendo una disminución en los costos de obtención del mismo, haciéndolo más accesible a la población de escasos recursos [3].

Una de las principales fuentes de nutrientes en un medio complejo es el conjunto de aminoácidos, péptidos y proteínas derivados de los sustratos de nitrógeno orgánico, como la harina de soja, el extracto de levadura, el licor de maceración de maíz, etc. Por lo tanto, es de vital importancia el poder comprender, el patrón de absorción de los aminoácidos durante procesos de fermentación industrial [4].

El objetivo del estudio es estimar los parámetros del modelo mediante regresiones no lineales y simular el proceso de fermentación utilizando los parámetros obtenidos. Por último, los resultados del modelo se van a comparar con los datos experimentales mediante el coeficiente de correlación y el porcentaje de error por mínimos cuadrados.

El modelo propuesto tendrá en cuenta la utilización de múltiples sustratos en medios complejos, lo que supone un reto importante a la hora de predecir el crecimiento microbiano y la producción de metabolitos secundarios. Por lo tanto, el estudio contribuirá a una mejor

comprensión del proceso de producción de ácido clavulánico y a la optimización de las condiciones de fermentación para aumentar la productividad. Los parámetros del modelo se estimaron a partir de los dos datos experimentales proporcionados por el grupo de Bioprocesos de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Antioquia.

II. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Desarrollar un modelo cinético para el crecimiento de *Streptomyces clavuligerus* y la producción de ácido clavulánico cuando es cultivado en un medio de cultivo complejo.

B. Objetivos específicos

- Construir a partir de un sistema de ecuaciones de balance de masa en estado dinámico un modelo cinético para la representación del crecimiento de *S. clavuligerus* y producción de ácido clavulánico en un medio complejo.
- Estimar los parámetros cinéticos del modelo mediante el ajuste de los datos experimentales a través de regresiones no lineales.
- Validar el modelo cinético usando datos experimentales mediante la optimización no lineal de los parámetros usando mínimos cuadrados.

III. MARCO TEÓRICO

El AC es un compuesto de origen microbiano, caracterizado como metabolito secundario extracelular, descubierto en los años 70 por científicos británicos [4]. El ácido clavulánico (AC), es una molécula que exhibe una potente actividad inhibitoria de las enzimas β -lactamasas, por lo que se ha convertido en un importante producto comercial disponible en combinaciones con antibióticos β -lactámicos como amoxicilina (Augmentin TM), tetraciclina (Timentín TM) y también como producto genérico [3]. Permitiendo que sea empleado eficazmente en tratamientos de enfermedades infecciosas causadas por bacterias resistentes como *E. coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, entre otras [6].

Este es producido por *Streptomyces clavuligerus*, la cual es una bacteria grampositiva capaz de metabolizar varias fuentes de carbono, incluidos aceites y carbohidratos. Sin embargo, el principal sustrato de carbono para la biosíntesis del ácido clavulánico es el glicerol, dada su facilidad de entrada en las células y su rápida tasa de captación y transporte [7].

Debido a la importancia clínica e industrial del ácido clavulánico, la investigación actual se ha centrado en mejorar su productividad, evaluando el efecto de la concentración de nutrientes, las condiciones ambientales y las capacidades metabólicas de *S. clavuligerus* para la biosíntesis de ácido [7]. Es por eso que se han realizado varias investigaciones sobre el papel de los aminoácidos como fuente de nitrógeno en la producción de ácido clavulánico, un estudio realizado por Saudagar and Singhal (2007), encontró que la producción de ácido clavulánico aumentó un 18 % con el intervalo de alimentación con glicerol y alcanzó un máximo de 1,30 mg/ml con 120 h de alimentación con glicerol en comparación con 1,10 mg/ml en el control, además la producción también aumentó con el intervalo de alimentación de aminoácidos y alcanzó un máximo de 1,31 y 1,86 mg/ml con alimentación de arginina y treonina , respectivamente en 120 h. Hubo un aumento general del 18 % y el 9 % en la producción de ácido clavulánico con la alimentación con arginina y treonina en comparación con los controles respectivos (1,10 y 1,70 mg/ml, respectivamente)[8].

Los modelos matemáticos son útiles para predecir el comportamiento de un cultivo y optimizar las condiciones de producción[10]. Uno de los modelos más antiguos y más ampliamente utilizados para describir el crecimiento celular es el de Monod [3] Sin embargo, a lo largo de los años se han propuesto modelos más sofisticados para describir el crecimiento de

células, entre los que sé que incluyen los modelos cinéticos no estructurados [5], [6], [7], [8] y modelos estructurados [9], [10], ya que este tipo de modelos describen el crecimiento, el consumo de los sustratos y así como la producción del metabolito de interés con una mayor precisión, permitiendo disminuir costos experimentales, al mismo tiempo que se crea un mejor entendimiento del sistema en cuestión[10]. En la investigación realizada por Ariza, L., Rubio, (2021), ellos evaluaron un modelo matemático para simular la producción de ácido clavulánico en modo continuo, teniendo en cuenta que el modo de operación por lotes lo propusieron como punto de partida para identificar el crecimiento de *Streptomyces clavuligerus*, consumo de sustrato y formación de CA a partir de un cultivo a base de glicerol medio [9]. En otro estudio, K Kasbawati et al 2022 lograron determinar un modelo cinético no estructurado apropiado para describir, el crecimiento de *Debaryomyces hansenii* con la hidrólisis de racimos vacíos de palma aceitera como fuentes de sustrato. Ellos encontraron que existía una cierta tasa máxima de crecimiento para la célula de levadura que genera la máxima producción de nuevas células y xilitol dentro de un tiempo de fermentación relativamente corto. Este resultado indica que el parámetro de la tasa de crecimiento desempeñó un papel importante en el ajuste del proceso de fermentación con fines de optimización.

Existen otros modelos desarrollados, con otro tipo de microorganismos, pero en condiciones de cultivo complejas, como lo fue el desarrollado por Wang et al. (2021) desarrollaron un modelo matemático para simular el crecimiento de *Pseudomonas putida KT2440* en una mezcla de glucosa y xilosa como fuentes de carbono. El modelo predijo con exactitud la tasa de crecimiento y la utilización de sustrato del microorganismo, demostrando el potencial del modelado matemático para predecir el comportamiento microbiano.

Así mismo, se encontraron otros estudios donde el modelo no se ajustó a los datos experimentales, como lo fue el desarrollado por Kim et al. (2018) donde evaluaron un modelo matemático para simular el crecimiento de una bacteria láctica en un medio de concentrado de proteína de suero. Este estudio enfatizó las limitaciones de los modelos predictivos y los desafíos de modelar la utilización de múltiples sustratos en medios complejos. Por lo tanto, los modelos matemáticos son una herramienta poderosa para simular procesos microbianos, pero su precisión depende de la calidad de los datos utilizados para parametrizar el modelo y de la complejidad del sistema modelado.

Otro caso similar fue encontrado en un estudio realizado por Chen et al. (2019), donde ellos desarrollaron un modelo matemático para simular el crecimiento de *Clostridium butyricum* en glucosa como sustrato. El modelo se basó en la ecuación de Monod e incluyó varios parámetros, como la tasa de crecimiento y la tasa de consumo de glucosa. Sin embargo, cuando el modelo se validó utilizando datos experimentales, no se ajustó bien, lo que indicaba que las suposiciones hechas en el modelo no eran representativas del crecimiento real del microorganismo. Este resultado permite comprender la complejidad de la fisiología microbiana y subraya la importancia de validar los modelos matemáticos con datos experimentales. Aunque el hecho de que el modelo no se ajustara a los datos fue decepcionante, esta información puede orientar futuras investigaciones para comprender mejor los mecanismos subyacentes al crecimiento microbiano y la formación de productos.

En este estudio, queremos desarrollar un modelo cinético no estructurado apropiado que describa el crecimiento de fermentación por lotes de *S. clavurigenus*, para la producción de ácido clavulánico, además de determinar los parámetros cinéticos, basándonos en los datos experimentales los cuales fueron proporcionados por el grupo de Bioprocesos de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Antioquia.

IV. METODOLOGÍA

A. Revisión bibliográfica

Se revisaron estudios previos para identificar los parámetros cinéticos y valores típicos utilizados en modelos similares de crecimiento microbiano, así mismo. Estos valores fueron empleados como punto de partida para el ajuste de parámetros. Las ecuaciones del modelo que se utilizaran como base fueron extraídas de la bibliografía [5], [19], [20], [32].

B. Equipo y software

El equipo de cómputo que se empleó para el desarrollo del trabajo de grado fue una PC Lenovo IdeaPad S340-15IIL, para la instalación del software Anaconda Navigator versión 4.14.0. Se empleó Spyder, el cual es un IDE (Integrated Development Environment) de código abierto para la programación científica en el lenguaje Python.

C. Implementación del modelo cinético en Python

Para la implementación del modelo cinético en Python se empleó Spyder, para desarrollar el modelo cinético basado en las ecuaciones extraídas de la revisión bibliográfica a través de un script de Python que permitiera resolver las ecuaciones de manera numérica y generar predicciones de crecimiento microbiano. Los paquetes empleados fueron:

- `numpy`: Se importó como `np` para realizar cálculos numéricos.
- `scipy.integrate`: Se empleó para resolver las ecuaciones diferenciales del modelo a través de la función `odeint`.
- `scipy.optimize`: Se utilizó para ajustar los parámetros del modelo a los datos experimentales mediante la función `curve_fit`.
- `sklearn.metrics`: Fue importada para calcular el coeficiente de correlación (R^2) utilizando la función `r2_score`.
- `matplotlib.pyplot`: Se utilizó para generar gráficos y visualizar los resultados obtenidos.

D. Estimación de los parámetros del modelo

Para estimar los parámetros del modelo, a partir de los datos experimentales y de las expresiones de las velocidades de producción de los diferentes compuestos [10], se realizó el

ajuste de los datos usando una regresión no lineal. Para esto, se resolvió el modelo cinético mediante el método de integración numérica de Euler, que se implementó con la función `odeint` de la librería SciPy, para el ajuste de parámetros, se utilizó el método de mínimos cuadrados, el cual se llevó a cabo mediante la función `curve_fit` de la misma librería [18].

F. Datos Experimentales

Los datos experimentales que se utilizaran para el ajuste del modelo, pertenecen al grupo de Bioprocesos de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Antioquia. A continuación, se describe brevemente el proceso seguido para obtener estos datos experimentales.

Utilizaron una cepa *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, la cual se mantuvo en tubos de microcentrífuga con glicerol estéril al 20% (v/v) a -80 °C. A partir de un tubo, se inoculó el cultivo en matraces Erlenmeyer con pestañas que contenían medio de siembra TSB (50 mL) a pH 7, y se incubó durante 36 horas a 220 rpm y 28°C. Posteriormente, las células de un matraz fueron recolectadas por centrifugación, resuspendidas y utilizadas como inóculo en el medio semisintético propuesto, Cas-5, a base de hidrolizado de caseína (5g/L) y glicerol como fuente de carbono principal (20g/L) y ajustado a pH 6.8. Los cultivos se incubaron durante 120 horas a 28°C y 220 rpm en matraces Erlenmeyer con pestañas (50 mL) en triplicado (estos datos fueron proporcionados por el grupo de Bioprocesos).

G. Construcción del modelo cinético

La ecuación (1) describe la dinámica de crecimiento de un cultivo microbiano, donde X representa la concentración de biomasa en el tiempo t , μ la velocidad específica de crecimiento y K_d es constante de velocidad de muerte celular [15]. Esta ecuación describe cómo la biomasa microbiana cambia con el tiempo como resultado de la interacción entre el crecimiento y la muerte celular.

$$\frac{dx}{dt} = \mu X - K_d X \quad (1)$$

$$\mu = \mu_{glyc} + \mu_{amm} \quad (2)$$

Las ecuaciones 3 y 4 describen la velocidad de crecimiento para el glicerol y para diferentes aminoácidos respectivamente. La ecuación que describe la tasa de crecimiento de los

16 aminoácidos tiene la misma estructura, donde μ_{max} es la velocidad máxima de crecimiento para cada aminoácido, K_{amm} es la constante de sustrato; μ_{max} y K_{amm} son parámetros intrínsecos del sistema celular [19].

$$\mu_{glyc} = \frac{\mu_{max,glyc} \cdot Glyc}{K_{glyc} \cdot X + glyc} \quad (3)$$

$$\mu_{amm} = \frac{\mu_{max,amm} \cdot Amm^2}{K_{amm} \cdot X + Amm} \quad (4)$$

La ecuación (2) describe la velocidad específica de crecimiento del cultivo en función del aporte de los diferentes sustratos y aminoácidos [5].

El modelo que se está utilizando se basa en la cinética Monod. Este modelo resulta útil para determinar los valores numéricos de diferentes parámetros importantes del proceso [15].

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_s + S} \quad (5)$$

En general, estas ecuaciones permiten modelar cómo la tasa de crecimiento de un microorganismo depende de la disponibilidad de diferentes sustratos en el medio de cultivo. Las ecuaciones para la cinética de crecimiento describen cómo varían las concentraciones de los sustratos a medida que las células se reproducen y consumen los nutrientes disponibles.

$$\frac{dGlyc}{dt} = - \frac{\mu_{glyc}}{Y_{x/glyc}} \cdot X \quad (6)$$

$$\frac{dNH_4}{dt} = - \frac{\mu_{glyc}}{Y_{x/NH_4}} \cdot X \quad (7)$$

$$\frac{dPO_4}{dt} = - \frac{\mu_{glyc}}{Y_{x/PO_4}} \cdot X \quad (8)$$

Donde Glyc, NH₄ y PO₄ representan las concentraciones de glicerol, amonio y fosfato, respectivamente. Los rendimientos celulares $Y_{x/glyc}$, Y_{x/NH_4} y Y_{x/PO_4} representan la cantidad de células que se forman por cada unidad de sustrato consumido.

Se tienen dos grupos de ecuaciones diferenciales que describen la evolución de los aminoácidos en el tiempo. El primer grupo corresponde a los aminoácidos presentes desde el inicio del proceso $t=0$ y el segundo grupo de ecuaciones corresponde a los aminoácidos que son

consumidor a partir del tiempo $t > 20$. Las ecuaciones para la cinética de crecimiento de los aminoácidos son las siguientes:

$$\frac{dA_{mm}}{dt} = -\mu_{A_{mm}} \cdot X \quad (9)$$

Donde X representa la concentración de biomasa y μ_{amm} representan las tasas específicas de crecimiento para cada aminoácido.

Esta ecuación describe la tasa de cambio en la concentración del producto CA en un reactor biológico.

$$\frac{dCA}{dt} = \left(\frac{\mu}{Y_{x/P}} + \alpha\right) \cdot X - K_p \cdot CA \quad (10)$$

La ecuación tiene dos términos: el primer término representa la tasa de producción del producto CA , donde $Y_{x/P}$ es el coeficiente estequiométrico de conversión de sustrato en producto, α es la tasa de formación del producto independiente de la célula, X es la concentración de biomasa.

El segundo término representa la tasa de degradación del ácido clavulánico (CA), donde K_p es la constante de degradación del producto y CA es la concentración ácido clavulánico.

La cinética de formación de productos puede ser extremadamente compleja. El producto a veces se forma durante el crecimiento y otras veces después de que todo el crecimiento se ha detenido.

H. Análisis de los datos

Se compararon los datos obtenidos a partir del modelo cinético planteado, con los datos experimentales, según el coeficiente de correlación (R^2). Se utilizó la función `r2_score` de la librería `scikit-learn` para calcular el coeficiente de correlación (R^2) y la librería `Matplotlib` para graficar los resultados [18].

V. RESULTADOS Y ANÁLISIS

La comparación entre los valores experimentales y simulados del sustrato, la biomasa y el producto se visualizó mediante gráficos de dispersión para comparar los valores experimentales con los valores simulados. Al comparar los valores experimentales y simulados respecto al tiempo (figura 2), se obtiene información importante acerca de la precisión del modelo cinético y su capacidad para describir la producción de ácido clavulánico.

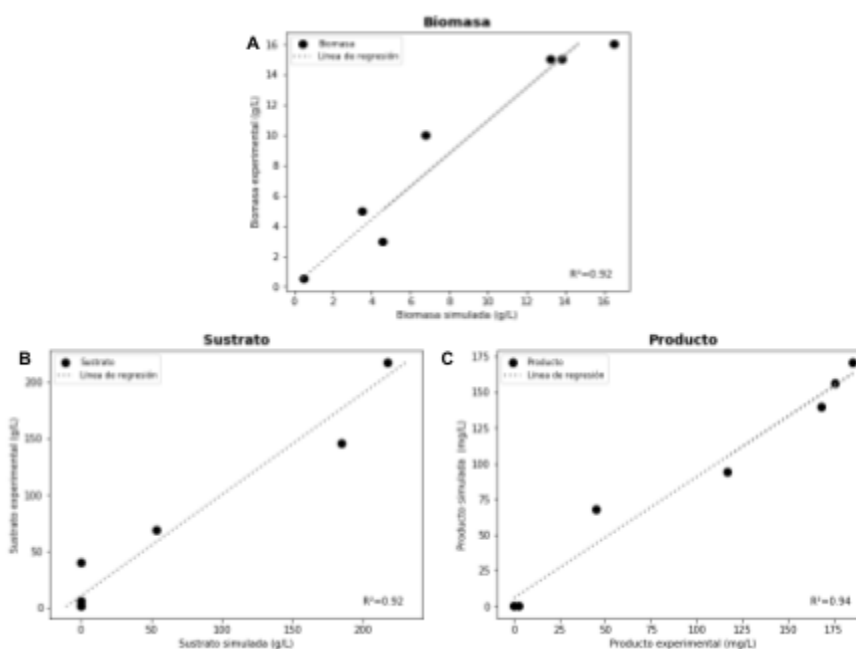


Fig. 1. Comparación entre valores experimentales versus simulados del sustrato, biomasa y producto.

Para el sustrato (en este caso el glicerol), la biomasa y el producto, el R^2 fue de 0.92, 0.92 y 0.94, respectivamente, con lo cual se puede observar que hay un buen ajuste con respecto a los datos del consumo del glicerol y la producción de biomasa, y un mejor ajuste con los datos de formación de AC; los valores estimados de los parámetros se encuentran en la Tabla I.

El glicerol juega un papel importante en la producción de ácido clavulánico por *Streptomyces clavuligerus*, por lo cual la importancia de que el modelo se ajuste al consumo de este en el medio de cultivo, ya que actúa como fuente primaria de carbono y energía, y sirve como precursor de metabolitos primarios y secundarios, influyendo en el flujo a través del metabolismo central del carbono y, en última instancia, afectando la producción de ácido clavulánico (Báez-Viveros et al., 2002)

Los resultados obtenidos para el amonio y el fosfato no muestran un buen ajuste, ya que los valores simulados son menores que los experimentales y el coeficiente de determinación (R^2) es inferior a 0.80. El amonio y el fosfato son dos componentes críticos que afectan la producción de ácido clavulánico. La presencia de exceso de amonio en el medio de fermentación puede conducir a la represión del catabolito de nitrógeno, lo que resulta en una disminución de la producción de ácido clavulánico. Por el contrario, un suministro controlado y limitado de amonio promueve la biosíntesis del ácido clavulánico (Liras et al., 2010). La regulación del metabolismo del nitrógeno, mediada por el amonio, influye en la expresión de enzimas clave implicadas en la biosíntesis del ácido clavulánico, como lo son la δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina sintetasa que cataliza la formación del tripéptido δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina, que es un precursor importante en la biosíntesis del ácido clavulánico. La expresión y actividad de ACVS están influenciadas por la disponibilidad de nitrógeno, incluida la concentración de amonio en el medio de fermentación [29][30].

Así mismo la limitación de fosfato desencadena una respuesta metabólica en *Streptomyces clavuligerus*, lo que lleva a una mayor producción de ácido clavulánico. La limitación de fosfato afecta varios aspectos del metabolismo celular, incluido el metabolismo del carbono y la producción de energía. Induce cambios en la expresión génica y la actividad enzimática, impactando en la redirección del flujo metabólico hacia la biosíntesis del ácido clavulánico [31]. Con base a los resultados anteriores obtenidos en coeficiente de determinación (R^2) y a la importancia de estos compuestos en el modelo, Se recomienda realizar más estudios para desarrollar ecuaciones o parámetros que permitan un mejor ajuste a los datos experimentales, ya que en este caso el modelo utilizado no es adecuado para describir con precisión estos sustratos y su efecto en la producción de AC.

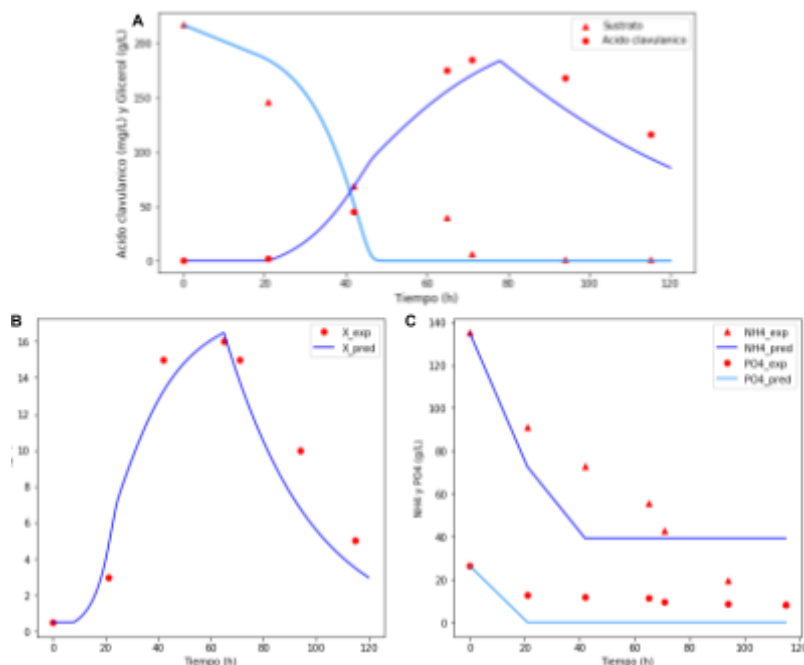


Fig. 2. Comparación entre los valores experimentales y simulados del sustrato, biomasa y ácido clavulánico en un modelo cinético de fermentación. En el gráfico las líneas representan el ajuste a los datos experimentales, generados por el modelo. Los símbolos representan datos experimentales. La biomasa, el ácido clavulánico y el PO_4 son representados por medio de puntos (●), el glicerol y el NH_4 por medio de triángulos (▲).

La figura 2 muestra la comparación de perfiles experimentales con los simulados por el modelo. El perfil de biomasa muestra que la fase de latencia dura poco tiempo, seguida de una fase exponencial, que dura aproximadamente 40 h (Fig. 2B); tomando como indicador los datos experimentales. La fase estacionaria no se puede ver claramente en el modelo planteado, pero iría entre 40h y 66h aproximadamente, a partir de ese momento empieza la fase de muerte. El consumo de glicerol comienza desde que empieza la fase de latencia (es decir, $t_0 = 0$) y aproximadamente 1.219 g/l de glicerol quedan sin utilizarse. La producción de ácido clavulánico comienza a partir de las 20 h, que es simultánea con la utilización de los aminoácidos mostrados en la tabla III, además coincide con el momento en que empieza la fase exponencial en el crecimiento de biomasa.

La formación del producto a partir del microorganismo depende tanto del crecimiento como del no crecimiento asociado [21]. Tiene lugar durante las fases de crecimiento y estacionaria (Fig. 1A).

TABLA I
PARÁMETROS DE LAS ECUACIONES DE BIOMASA, SUSTRATO Y PRODUCTO PARA UN PROCESO DE FERMENTACIÓN.

Parámetros	μ_{max}	K_p	K_d	α	$Y_{x/glyc}$	$Y_{x/p}$	$Y_{x/hn4}$	$Y_{x/po4}$
AC	-	0.0188	-	2.4118e-05	-	1.0138	-	-
X	-	-	0.0334	-	-	-	-	-
Glyc	0.1038	-	-	-	1.0021	-	-	-
PO ₄	-	-	-	-	-	-	-	0.0338
NH ₄	-	-	-	-	-	-	0.0297	-

Nota: La tabla I muestra los parámetros de las ecuaciones de biomasa, sustrato y producto para un proceso de fermentación. Estos parámetros fueron utilizados, en las ecuaciones que se utilizaron en el desarrollo del modelo. Los parámetros enumerados en la tabla incluyen la tasa de crecimiento específica máxima (μ_{max}), la constante cinética (K_s) y el coeficiente de rendimiento (Y) para cada uno de los componentes, respectivamente.

Los datos experimentales, los cuales incluían la concentración de glucosa, biomasa, glycerol como fuente de carbono, NH₄, PO₄ y 16 aminoácidos (tabla II y III) se utilizaron para la estimación de parámetros. Los parámetros del modelo se obtuvieron ajustando estos datos experimentales utilizando la función `curve_fit` de la librería SciPy de Python; se realizaron tres iteraciones de ajuste para lograr una mejor concordancia con los resultados experimentales.

TABLA II
PARÁMETROS DE CONSUMO DE AMINOÁCIDOS EN EL TIEMPO INICIAL ($t=0h$) EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN.

Parámetros	Glu	Asp	Ser	Trp	Phe	Ala	His	Pro
μ_{max}	0.0087	0.0046	0.0018	0.0047	0.0032	0.0003	0.0006	0.0081
K_s	0.0890	0.0002	0.0026	0.4966	0.0039	0.0006	0.0023	0.3885

Nota: La Tabla II muestra los parámetros para el consumo de aminoácidos en el momento inicial ($T=0$) en el proceso de fermentación. Estos parámetros se obtuvieron mediante el análisis de datos experimentales descrito anteriormente.

TABLA III
PARÁMETROS DE CONSUMO DE AMINOÁCIDOS EN EL TIEMPO ($t \geq 20h$) EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN.

Parámetros	Thr	Lys	Cys	Arg	Leu	Tyr	Gly	Val
μ_{max}	0.0023	0.0033	0.0726	0.0033	0.0070	0.0008	0.0040	0.0018
K_s	0.0001	0.0003	0.2490	0.0002	0.0196	0.0028	0.0007	0.0055

Nota: . La Tabla III muestra los parámetros para el consumo de aminoácidos en un momento específico ($t \geq 20h$) en el proceso de fermentación. Estos parámetros se obtuvieron mediante el análisis de los datos experimentales.

La Figura 3 muestra la comparación de perfiles experimentales de los aminoácidos con los simulados por el modelo, en donde podemos observar que las primeras 4 gráficas corresponden a los aminoácidos que se empiezan a consumir en el $t_0 = 0$. Entre estos aminoácidos se encuentran el glutamato, el aspartato y la prolina, los cuales desempeñan roles importantes en

el metabolismo celular [19]. El glutamato, un aminoácido esencial, participa principalmente en la asimilación de amonio y desempeña un papel fundamental en el metabolismo de los aminoácidos, la síntesis de proteínas y la generación de energía. La glutamato deshidrogenasa (GDH) cataliza la conversión de glutamato en α -cetoglutarato, utilizando amoníaco como cosustrato [30]. Esta reacción enzimática ayuda en la asimilación de amonio, un proceso vital para *Streptomyces clavuligerus*. Además, el aminoácido aspartato actúa como precursor en la síntesis de otros aminoácidos y nucleótidos esenciales. [19],[24].

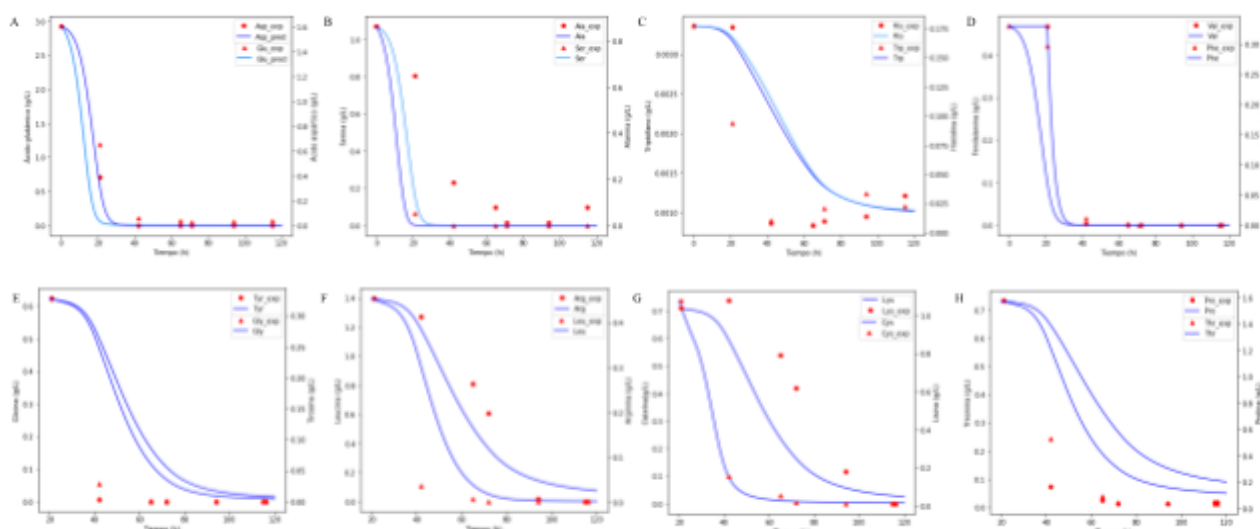


Fig. 3. En la gráfica se observa una representación de los datos experimentales mediante símbolos, mientras que las líneas representan los datos predichos por el modelo cinético de los aminoácidos para los tiempos $t_0=0$ (correspondientes a las primeras cuatro gráficas) y $t_0=20$ (correspondientes a las demás gráficas).

Sin embargo, el modelo utilizado no representa adecuadamente esta relación entre los aminoácidos y otros componentes. Una posible razón por la cual los resultados no se ajustaron correctamente podría ser la especificación errónea del modelo en relación con los aminoácidos [23]. Existen diferentes aspectos que podrían haber contribuido a esta mala especificación. Por ejemplo, es posible que las interacciones entre los aminoácidos y otros elementos del sistema sean más complejas de lo que se consideró en el modelo. Además, Los parámetros utilizados en el modelo con respecto a los aminoácidos, como μ_{\max} o K_s , podrían estar sujetos a incertidumbres significativas debido a la sensibilidad del modelo a los datos iniciales de los parámetros. Si estos datos iniciales no se acercan a los valores reales, es probable que el modelo no logre converger hacia una solución precisa o adecuada [23].

Para comprender las limitaciones de la representación del modelo de la relación entre los aminoácidos y otros componentes, es necesario realizar un análisis exhaustivo. Estudios recientes [27][28] han revelado la complejidad de las interacciones en las que intervienen los aminoácidos y su papel en diversos procesos biológicos. Estos estudios demuestran que si no se realizan suposiciones complejas, las suposiciones más simples, realizadas por el modelo en relación con los aminoácidos, podrían no ajustarse a la intrincada realidad observada en los sistemas biológicos.

Investigaciones previas [29] han enfatizado la criticidad de obtener datos de parámetros precisos y confiables para obtener resultados de modelado precisos. Ya que la obtención de valores iniciales altamente precisos para parámetros como μ_{\max} o K_s puede ser un reto. En consecuencia, la sensibilidad del modelo a la calidad de los datos iniciales de los parámetros aumenta significativamente las incertidumbres que rodean la representación de los aminoácidos dentro del sistema.

En conclusión, la dificultad del modelo para representar adecuadamente la relación entre los aminoácidos y otros componentes puede atribuirse tanto a la simplificación excesiva de sus interacciones como a las incertidumbres asociadas a la parametrización. Si se tiene en cuenta la complejidad de las interacciones de los aminoácidos y se mejora la precisión de los datos iniciales de los parámetros, los futuros modelos podrán captar mejor la intrincada dinámica de la producción de ácido clavulánico y proporcionar resultados más precisos y fiables.

VII. CONCLUSIONES

El desarrollo del modelo cinético para la producción de ácido clavulánico en un medio de cultivo complejo mostró limitaciones en su capacidad para ajustar los datos experimentales. Aunque se logró un buen ajuste para el consumo de sustrato (glicerol) y la producción de biomasa y ácido clavulánico, con coeficientes de correlación de 0.92, 0.92 y 0.94 respectivamente, se identificaron dificultades en la representación de los sustratos amonio y fosfato. Además, el modelo no logró describir de manera precisa el consumo de aminoácidos a lo largo del tiempo, presentando un coeficiente de correlación menor a 0.9.

Aunque el modelo cinético desarrollado mostró ciertos ajustes razonables con los datos experimentales, se requiere encontrar una ecuación más precisa que describa el comportamiento de los aminoácidos y su influencia en la producción de ácido clavulánico a partir de *Streptomyces clavuligerus* en un medio complejo.

Se sugiere llevar a cabo investigaciones adicionales para desarrollar una ecuación más precisa que describa el comportamiento de los aminoácidos y su influencia en la producción y el crecimiento de la biomasa en *Streptomyces clavuligerus* en un medio complejo. Esto ayudará a mejorar la calidad de los resultados y avanzar en la optimización de la producción de ácido clavulánico.

REFERENCIAS

- [1] Saudagar, P. S., Survase, S. A., & Singhal, R. S. (2008). Clavulanic acid: a review. *Biotechnology advances*, 26(4), 335-351. <https://www.sciencedirect-com.udea.lookproxy.com/science/article/pii/S0734975008000219>
- [2] Costa, C. L., & Badino, A. C. (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://www.sciencedirect-com.udea.lookproxy.com/science/article/pii/S1369703X12002367>
- [3] Henao, C. P. S., Grimaldos, N. A. G., & Diaz, J. C. Q. (2012). Producción de ácido clavulánico por fermentación de *streptomyces clavuligerus*: Evaluación de diferentes medios de cultivo y modelado matemático. *Dyna*, 79(175), 158-165. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/dyna/article/view/27804/43532>
- [4] Yepes García, J. (2020). Mejoramiento de la producción de ácido clavulánico mediante el cultivo de *Streptomyces clavuligerus* en fermentación extractiva, usando biorreactores operados en lote alimentado. https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/17114/3/YepesJeferyd_2020_ProduccionAcidoClavulanic.pdf
- [5] Bapat, P. M., Das, D., Sohoni, S. V., & Wangikar, P. P. (2006). Hierarchical amino acid utilization and its influence on fermentation dynamics: rifamycin B fermentation using *Amycolatopsis mediterranei*S699, a case study. *Microbial Cell Factories*, 5(1), 1-14. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1665455/>
- [6] Gouveia, E. R., Baptista-Neto, A., Badino Jr, A. C., & Hokka, C. O. (2001). Optimisation of medium composition for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnology letters*, 23(2), 157-161.
- [7] Ariza, L., Rubio, J., Moreno, V., Niño, L., & Gelves, G. (2021, October). Modeling of Clavulanic Acid Production from *Streptomyces clavuligerus* using a Continuous Operation Mode. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 2049, No. 1, p. 012073). IOP Publishing.
- [8] Saudagar, P. S., & Singhal, R. S. (2007). Optimization of nutritional requirements and feeding strategies for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Bioresource Technology*, 98(10), 2010-2017.
- [9] 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, 522.
- [10] Alcón Martín, A. (1999). Desarrollo de modelos cinéticos para bioprocesos: aplicación a la producción de xantano.

- [11] Guo, D., Zhao, Y., & Yang, K. (2013). Coordination of glycerol utilization and clavulanic acid biosynthesis to improve clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. *Science China Life Sciences*, 56(7), 591-600.
- [12] Bapat, P. M., Sinha, A., & Wangikar, P. P. (2011). Role of extracellular protease in nitrogen substrate management during antibiotic fermentation: a process model and experimental validation. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(4), 1019-1028.
- [13] Bonnet, M., Lagier, J. C., Raoult, D., & Khelaifia, S. (2020). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New microbes and new infections*, 34, 100622.
- [14] Salazar, A., Keusgen, M., & Von Hagen, J. (2016). Amino acids in the cultivation of mammalian cells. *Amino acids*, 48(5), 1161- 1171.
- [15] Dunn, I. J., Heinzle, E., Ingham, J., & Prenosil, J. E. (2003). *Biological reaction engineering*. John Wiley & Sons.
- [16] Kasbawati, K., Mardawati, E., Samsir, R., Suhartini, S., & Kalondeng, A. (2022). An appropriate unstructured kinetic model describing the batch fermentation growth of *Debaryomyces hansenii* for xylitol production using hydrolysis of oil palm empty fruit bunch. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 36(1), 462-471.
- [17] Kaur, G., Srivastava, A. K., & Chand, S. (2012). Mathematical modelling approach for concentration and productivity enhancement of 1, 3-propanediol using *Clostridium diolis*. *Biochemical Engineering Journal*, 68, 34-41.
- [18] SciPy. (2021). SciPy Documentation. Recuperado de <https://docs.scipy.org/doc/scipy/index.html>
- [19] D’Huys, P. J., Lule, I., Vercammen, D., Anné, J., Van Impe, J. F., & Bernaerts, K. (2012). Genome-scale metabolic flux analysis of *Streptomyces lividans* growing on a complex medium. *Journal of biotechnology*, 161(1), 1-13.
- [20] 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*, 79(175), 158-165.
- [21] Sakthiselvan, P., Meenambiga, S. S., & Madhumathi, R. (2019). Kinetic studies on cell growth. *Cell Growth*, 13.
- [22] Ortega Quintana, F. A. (2017). Modelado de bioprocesos: relaciones matemáticas entre el medioambiente y el material biológico. *Ingeniería Química*.
- [23] Lawson, D. (2008). An introduction to mathematical modeling Glenn Marion. Bioinformatics and Statistics Scotland. https://people.maths.bris.ac.uk/~madjl/course_text.pdf
- [24] Yepes García, J. (2020). Mejoramiento de la producción de ácido clavulánico mediante el cultivo de *Streptomyces clavuligerus* en fermentación extractiva, usando biorreactores operados en lote alimentado.
- [25] Sandoval Agama, E. D. (2019). Obtención de parámetros cinéticos para el crecimiento del

- microorganismo *Saccharomyces cerevisiae* en reactor CSTR (Bachelor's thesis, Quito: UCE).
- [25] Baptista-Neto, A., Gouveia, E. R., Badino-Jr, A. C., & Hokka, C. O. (2000). Phenomenological model of the clavulanic acid production process utilizing *Streptomyces clavuligerus*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 17, 809-818.
- [26] Solano-Cornejo, M. Á., & Vidaurre-Ruiz, J. M. (2017). Aplicación de modelos cinéticos no estructurados en el modelamiento de la fermentación láctica de subproductos de pesca. *Scientia Agropecuaria*, 8(4), 367-375.
- [27] Besser, A. C., Elliott Smith, E. A., & Newsome, S. D. (2022). Assessing the potential of amino acid $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analysis in terrestrial and freshwater ecosystems. *Journal of Ecology*, 110(4), 935-950.
- [28] Najumudeen, A. K., Ceteci, F., Fey, S. K., Hamm, G., Steven, R. T., Hall, H., ... & Sansom, O. J. (2021). The amino acid transporter SLC7A5 is required for efficient growth of KRAS-mutant colorectal cancer. *Nature genetics*, 53(1), 16-26.
- [29] Maddison, J. E., Watson, A. D. J., & Elliott, J. (2008). Antibacterial drugs. *Small animal clinical pharmacology*, 54, 148-185.
- [30] Sydor, P. K., & Challis, G. L. (2012). Oxidative tailoring reactions catalyzed by nonheme iron-dependent enzymes: Streptorubin B biosynthesis as an example. *Methods in enzymology*, 516, 195-218.
- [31] Zambri, M. P., Williams, M. A., & Elliot, M. A. (2022). How *Streptomyces* thrive: Advancing our understanding of classical development and uncovering new behaviors. *Advances in Microbial Physiology*, 203.
- [32] Gómez, N. A., Sánchez, C. P., & Quintero, J. C. (2013, April). Phenomenological Model of the Clavulanic Acid production, inhibitor of the enzymes β -lactamases using a method of multiple regression analysis nonlinear. In 2013 Pan American Health Care Exchanges (PAHCE) (pp. 1-4). IEEE.

