



**UNIVERSIDAD  
DE ANTIOQUIA**

**Evaluación del proceso de producción de ácido  
clavulánico: un enfoque integrado de simulación y  
biología de sistemas**

**Sofía Toro Vásquez**

**Universidad de Antioquia**

**Facultad de Ingeniería**

**Ingeniería Bioquímica**

**El Carmen de Viboral, Colombia**

**2021**



**EVALUACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CLAVULÁNICO:  
UN ENFOQUE INTEGRADO DE SIMULACIÓN Y BIOLOGÍA DE SISTEMAS**

Sofía Toro Vásquez

Informe de Práctica Profesional en Proyecto de Investigación

Presentada como requisito para optar al título de:

Ingeniera Bioquímica.

Asesor:

David Andrés Gómez Ríos  
Ingeniero Químico. Esp. MSc.  
Doctor en Ingeniería Química

Universidad de Antioquia

Facultad de Ingeniería

Ingeniería Química

El Carmen de Viboral, Colombia

2021

# **EVALUACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CLAVULÁNICO: UN ENFOQUE INTEGRADO DE SIMULACIÓN Y BIOLOGÍA DE SISTEMAS**

## **RESUMEN**

En la actualidad y debido al uso incontrolado de los antibióticos, los microorganismos han desarrollado estrategias de resistencia que impiden la acción eficaz de los medicamentos. Una de las estrategias principales evolutivamente desarrolladas por los organismos ha sido la síntesis de enzimas degradadoras. Para luchar con esto se han encontrado diferentes compuestos inhibidores, entre los cuales uno de los más utilizados es el Ácido Clavulánico, metabolito secundario producido por la bacteria *Streptomyces clavuligerus*. El objetivo principal de este trabajo fue realizar la integración de estrategias de estudio a nivel metabólico *in silico* y el modelado de bioprocesos, para realizar un acercamiento a la producción industrial de este compuesto según el estado actual del arte. Se encontró que la adición de aminoácidos relacionados con la ruta de biosíntesis del Ácido Clavulánico (Ácido Glutámico, Arginina, Ornitina, Treonina y Lisina) favorecen tanto la producción del metabolito como la producción de biomasa, así mismo se estableció un medio de producción óptimo con dichos aminoácidos a partir de un diseño de experimentos *in silico* para la producción del metabolito. A nivel metabólico se realizaron simulaciones en estado estacionario (FBA-Flux Balance Analysis) y dinámico (DFBA-Dynamic Flux Balance Analysis) para el estudio del proceso de bioproducción por lotes. Se establecieron las operaciones unitarias requeridas para el proceso de producción industrial y se integró con una evaluación económica, a partir de la cual se pudo concluir acerca de la rentabilidad operativa de una planta de producción en Colombia concebida conceptualmente para operar bajo las condiciones y procesos establecidos según el estado del arte del estudio del proceso.

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde hace aproximadamente 50 años, los antibióticos han contribuido al mejoramiento de la calidad de vida del ser humano, prolongando la expectativa de vida al ser tratamientos eficaces para diversas enfermedades infecciosas. No obstante, su distribución y uso sin controles claros ha contribuido a la aparición de genes y mecanismos de resistencia en los microorganismos (1, 2). En la actualidad se han desarrollado diferentes estrategias para luchar contra dicha resistencia; entre las estrategias más usadas se encuentra la inhibición de las enzimas que degradan el antibiótico principal. El ácido clavulánico es uno de los inhibidores más utilizados actualmente debido a su similitud estructural con el anillo presente en los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, permitiendo su unión estable con las serinas del sitio activo de las  $\beta$ -lactamasas, evitando así la degradación del compuesto activo del medicamento (3–6).

El ácido clavulánico (AC) es un metabolito secundario, producido por la bacteria *Streptomyces clavuligerus* bajo condiciones de estrés nutricional (5). Su producción industrial se realiza en cultivos sumergidos utilizando glicerol como fuente de carbono principal y diversas fuentes de nitrógeno (6). A nivel industrial, el proceso productivo con una cepa no modificada genéticamente presenta un bajo rendimiento, lo cual se suma a la sensibilidad en solución acuosa del AC (7) y al complejo proceso de recuperación y purificación, resultando en un producto de alto costo con una baja disponibilidad. Entre los enfoques empleados para afrontar dicha situación se encuentran: el mejoramiento del medio de cultivo (fuente de carbono, nitrógeno, fosfato u otros nutrientes), utilización de fuentes de carbono o nitrógeno complejas de bajo costo, mejoramiento genético, optimización de las condiciones de operación del proceso (temperatura, pH, agitación, etc.) o modo de operación del biorreactor (batch, fed-batch o continuo). Adicionalmente, se han realizado estudios para modelar el metabolismo con el fin de construir representaciones matemáticas que permitan analizar el proceso biológico de biosíntesis y así establecer rutas sintéticas de mejoramiento genético que permitan incrementar el rendimiento del producto de interés (8, 9). Una integración de estos enfoques podría permitir obtener conclusiones acerca del estado actual de los desarrollos con respecto al proceso de producción y mejoras requeridas para una mayor rentabilidad operativa del proceso que incide en una reducción del costo de producción y comercialización, todo con el fin de aumentar su disponibilidad.

A nivel mundial se evidencia que la mayor proporción de estudios respecto al AC han estado enfocados en el campo de medicina y farmacología (10). En el campo de metodologías de producción, en los últimos años los esfuerzos investigativos se han dirigido hacia las líneas de: condiciones de cultivo, proceso de purificación y separación, mejoramiento genético y estudios a nivel molecular. Aun así, no se reportan estudios que realicen una integración entre las estrategias de mejoramiento del proceso de producción con los estudios genéticos para el prototipado y simulación de plantas de producción. Es por tanto que el propósito de este trabajo es la evaluación del proceso de producción de ácido clavulánico en base al estado

actual del arte, incorporando un enfoque de biología de sistemas para el establecimiento in silico de condiciones óptimas de cultivo seguido de la simulación del proceso conceptual de producción con el fin de obtener conclusiones acerca de la viabilidad potencial de una planta de producción de ácido clavulánico en el contexto local.

*Objetivo general:*

Evaluar el proceso de producción del ácido clavulánico incorporando un enfoque combinado de biología de sistemas y modelación de bioprocesos, en base al estado del arte de la producción del inhibidor, para obtener conclusiones acerca de la rentabilidad operativa de una planta de producción.

*Objetivos específicos:*

- Determinar in silico condiciones óptimas de cultivo para la producción de ácido clavulánico por medio de un enfoque de biología de sistemas (Flux balance analysis – FBA).
- Establecer un proceso conceptual de producción de ácido clavulánico en base a información experimental, de simulación y bibliografía, incorporando las etapas de upstream, proceso de cultivo y downstream.
- Realizar una evaluación financiera de la operación soportado en simulación de bioprocesos, que permita obtener información relevante de la rentabilidad operativa del proceso en el contexto local.

## 2. MARCO TEÓRICO

Como se comentó anteriormente, las principales líneas de investigación en temas de producción de AC están dirigidas a mejorar tanto el rendimiento como la productividad. Uno de los campos más amplios es el del establecimiento de las mejores condiciones de cultivo que permitan maximizar la producción; este reto se ha abordado desde diferentes ángulos. El primero son la evaluación de las fuentes de nutrientes (carbono, nitrógeno, micronutrientes y otros suplementos). En cuanto a la fuente de carbono, se ha establecido que el glicerol es uno de los mejores sustratos a nivel de productividades (11, 12) pero también se han realizado estudios del efecto sobre la concentración final del producto de diferentes aceites como el de soya, maíz, girasol y oliva, así como de algunos ácidos grasos insaturados, encontrando que pueden llegar a estimular la producción de AC (13, 14). En cuanto a la fuente de nitrógeno, se han estudiado alternativas que buscan reducir los costes de los sustratos añadiendo fuentes complejas que sean baratas y a su vez mejoren la productividad, como por ejemplo la harina de soya y aislados de proteína (15–20); al ser fuentes complejas, poseen diferentes concentraciones de nitrógeno y otros nutrientes en cantidades no cuantificadas, lo cual puede llevar a variabilidades en el proceso que si bien pueden ser beneficiosas, también pueden llegar a inhibir el metabolismo celular. Desde 1986 se viene estudiando el efecto de adicionar aminoácidos al medio de cultivo (15, 21), estos estudios han cobrado mayor fuerza a medida que se aumenta el conocimiento de la ruta de biosíntesis del AC, permitiendo así plantear la suplementación de aminoácidos que son precursores en algunos puntos de la ruta de biosíntesis, como lo pueden ser la Prolina, Leucina, Glutamina, Treonina, Triptófano, Cisteína, Valina, y entre estos la Arginina ha cobrado especial interés al ser un precursor directo de la biosíntesis del precursor C-5 del AC (9, 21, 22).

Otro de los frentes ampliamente estudiados son las variables de producción, dentro de las cuales se han evaluado factores como la temperatura, encontrando que una disminución de la temperatura de cultivo mejora la concentración final de AC en el medio (15, 23). En cuanto al pH, se ha reportado que los mejores resultados se obtienen alrededor de 7, tendiendo a mejorar en pH ligeramente ácido (6, 9, 23). Por su parte, la agitación juega un papel importante, afectando no solo la aireación si no también la morfología y el estrés hidrodinámico al que se ven afectadas las células, afectando así los rendimientos de producción (9, 24–26). Adicionalmente, se han realizado estudios en diferentes tipos de fermentación que faciliten la recuperación de AC, como lo son el cultivo en sustrato sólido (27), así como metodologías de operación que favorezcan la producción como son la fermentación extractiva o la operación en lote alimentado, la cual ha estado ampliamente enfocada al efecto de la adición de glicerol al medio, encontrando valores de concentración final de AC mucho mayores que en la operación en batch (12, 15, 19, 24, 28).

En cuanto al campo de la biología celular y molecular, en los últimos años, se han realizado aportes significativos en el entendimiento del metabolismo del microorganismo, así como

sus mecanismos de regulación genética; esto ha sido posible principalmente gracias al desarrollo de modelos metabólicos a escala genómica (GEM), en los cuales se unen las ciencias ómicas para detallar tanto las reacciones como los genes y metabolitos presentes en las rutas metabólicas del microorganismo, y el análisis de balance de fluxes metabólicos (FBA, por sus siglas en inglés), este permite realizar simulaciones *in silico* del metabolismo microbiano identificando interacciones entre genes y proteínas, reconociendo los flujos de carbono dentro de las rutas metabólicas, identificando cuellos de botella metabólicos y mecanismos de regulación genética, para establecer así genes susceptibles de modificación genética para la obtención de cepas superproductoras (29–33).

El primer modelo GEM desarrollado para *S. Clavuligerus* se publicó en el año 2000, en el cual se detallaban las rutas metabólicas principales del metabolismo (ruta del carbono central, reacciones anapleróticas, entre otras) y la ruta de biosíntesis de AC, posteriormente se publicó en 2010 el primer modelo a escala genómica (iMM864), el cual permitió comenzar la evaluación de la esencialidad de genes y la utilidad del FBA como herramienta de predicción (9); A continuación se publicaron otros dos modelos (iLT1021, IGG871) que expandían el modelo base añadiendo genes, reacciones o metabolitos, con el fin de mejorar evaluar diferentes puntos de regulación y condiciones de cultivo (24). En 2020 se publicó el más reciente modelo metabólico, el cual contiene 2177 reacciones incluyendo 543 reacciones de intercambio, 1518 metabolitos y 1237 genes, este modelo fue utilizado en la elaboración del proyecto debido a que es un modelo curado termodinámicamente, validado con datos experimentales de cultivo en quimiostato, con chequeo de consistencia topológica según el MC3 Consistency Checker algorithm y revisado con el script MEMOTE. Este modelo al ser el más completo y validado a la fecha del metabolismo de *S. Clavuligerus*, permite evaluar condiciones nutricionales y ambientales (24).

Por su parte, el FBA es una herramienta que se vale de la representación matemática de la estequiometría de las reacciones metabólicas identificadas dentro del microorganismo para construir una matriz en la cual se recogen todos los coeficientes estequiométricos y compuestos. Esta matriz permite construir ecuaciones de balance de masa, las cuales se resuelven por medio de la programación lineal, estableciendo un estado pseudoestacionario en el cual se pueden plantear diversas restricciones a los flujos de entrada y salida de nutrientes a la célula, dependiendo de las necesidades e intereses de estudio, y ciertas funciones objetivo a optimizar bien sea para maximizar o minimizar. El resultado es un vector de flujos metabólicos que representa la distribución del flujo de los diferentes compuestos a través de las rutas, simulando el comportamiento de cada uno de los compuestos dentro de la célula en cultivo (9, 34–36).

Dentro de los genes diana, susceptibles a modificación genética, identificados gracias a estos estudios metabólicos, lo más relevantes son los reguladores *ccaR* y *claR*, los cuales parecen formar parte de un sistema que regula la biosíntesis de CA (9), la sobreexpresión de dichos reguladores, así como la evaluación de diferentes estrategias de modificación genética no

dirigida, como lo son el UV y la mutagénesis al azar, han permitido crear cepas superproductoras, que logran aumentar la concentración final de AC a valores cercanos a 7g/L (9, 37–39).

La factibilidad de un proceso productivo se cuantifica a través de un análisis de la tecnología de producción que parte del dimensionamiento y condiciones operativas de los equipos, costos de inversión y producción. Este análisis se basa en las especificaciones del proceso como materiales, energía, equipos, servicios, precio de comercialización y costos de producción (40). En cuanto al AC, son pocos los estudios enfocados en la producción industrial y estos están más enfocados en el establecimiento de las condiciones de separación y purificación, siendo este un paso crucial en el establecimiento los gastos de producción, ya que son los pasos más costosos (7, 9). La recuperación del AC se ve afectada ampliamente por su sensibilidad a la inestabilidad en solución acuosa a temperatura ambiente (7, 41) es por esto que se han planteado estrategias de recuperación como lo son la adsorción en resinas de intercambio iónico, carbon activado o zeolitas y la extracción líquido líquido por medio de la interacción de dos fases hidrofílicas, pasos seguidos por la precipitación del AC en un compuesto estable, como lo es el Clavulanato, para su posterior comercialización (9). No obstante, las características del medio de cultivo, las cuales se ven afectadas por el medio de cultivo y por las variables de producción, así como la concentración de AC en el medio y su cinética de degradación, afectan fuertemente dichas estrategias de purificación, siendo este campo aún una gran oportunidad de estudio (9).

### 3. METODOLOGÍA

#### *Estudio de condiciones nutricionales de cultivo*

Con el fin de determinar condiciones nutricionales de cultivo que eventualmente representen una mejora sobre la producción de AC en cultivos por lotes con cepa no modificada genéticamente se partió del medio de cultivo definido para el biomodelo iDG1237, utilizado como base para el desarrollo de las simulaciones (24) explorando *in silico* el efecto de la adición de aminoácidos considerados precursores directos y otros no directos, en la ruta biosintética del AC. Así, se partió de una revisión bibliográfica de los trabajos publicados en los últimos 10 años que hayan tratado la evaluación de la suplementación de aminoácidos al medio de cultivo y su influencia en la concentración final de AC. A partir de la información obtenida se usó como criterio de inclusión la concentración final de AC y la concentración del aminoácido utilizado. Se tomaron como relevantes aquellos reportes en los que se evidenciara un aumento de la concentración final respecto al promedio reportado para la cepa estándar (*Streptomyces clavuligerus* (ATCC® 27064™)) (42) que oscila alrededor de 1 g/L de AC y que especificaran la concentración del aminoácido agregado. Se excluyeron aquellos reportes en que se usaran medios complejos ya que no es posible determinar el perfil de aminoácidos y sus concentraciones respectivas en los componentes del medio. Se pudo constatar que los aminoácidos: Ácido Glutámico, Arginina, Ornitina, Treonina, Lisina e Isoleucina ejercieron un efecto potenciador de la productividad de AC en los estudios experimentales y por tanto, se seleccionaron para el subsecuente estudio *in silico*.

Para la evaluación de los efectos de los aminoácidos sobre la red metabólica y específicamente sobre el objetivo fisiológico de producción de biomasa y la secreción de AC se usó el análisis de robustez, definido matemáticamente en la Ecuación 1 como (43):

$$\begin{aligned} & \max/\min c^T v \\ & \left[ \begin{array}{l} \text{s. t. } Sv = dxdt : y \\ C_v \leq d : y \\ lb \leq v \leq ub : w \end{array} \right] \quad (1) \end{aligned}$$

La implementación de este modelo en el software COBRA toolbox 3.0 para Matlab® (29), permitió analizar la respuesta de una variable a los cambios en determinado parámetro (24), en este caso, comprobar o negar el aumento de la velocidad de producción de biomasa y la secreción de AC al realizar aumentar la concentración de aminoácidos en el medio. Dicho medio *in silico* fue definido con base en los medios sintéticos usados en estudios previos. Las restricciones en las redes de intercambio se presentan en la tabla 1:

Tabla 1. Restricciones en los flujos metabólicos utilizados para el análisis de robustez.

Variable	Upper bound	Lower bound
Glicerol	0	-1
Citrato	0	-0.01
Fosfato	0	-0.01
Aminoácido de estudio	0	-0.1

A continuación se planteó una estrategia *in silico* que permitiera identificar el efecto de la suplementación combinada de los distintos aminoácidos. Para lo anterior se realizó un diseño de experimentos con puntos centrales (Anexo 1) en el software STATGRAPHICS Centurion XVIII (44). Se tomaron como variables los aminoácidos que de acuerdo con los resultados del análisis de robustez presentaron el mayor efecto sobre la producción de AC, siendo estos: Ácido Glutámico, Arginina, Ornitina, Treonina y Lisina. Se definieron dos niveles (máximo y mínimo) para estas variables como fluxes de intercambio 0 y -0.1 mmol/gDCW.h (gramos de biomasa seca por hora según sus siglas en inglés), respectivamente. El valor máximo de captación de aminoácidos se seleccionó según lo reportado por (24, 33) para medio definido según (41) .

El diseño de experimentos se ejecutó bajo la formulación dual de Análisis del Balance de Fluxes Metabólicos (FBA, por sus siglas en inglés) con minimización de la norma del vector de fluxes y maximización de biomasa, como se expresa en la siguiente ecuación (24):

$$\begin{aligned} & \text{Min } \sum v^2 \\ & \left[ \begin{array}{l} s. t. Sv = 0 \\ l_b \leq v \leq l_u \\ f^T v = Z_{max} \end{array} \right] \quad (2) \end{aligned}$$

Las restricciones planteadas en los fluxes de intercambio para los restantes componentes del medio *in silico* fueron las mismas utilizadas en el análisis de robustez. Se tomaron como positivos los experimentos que mostraron un aumento en la producción de AC con respecto al caso base de medio definido sin suplementación de aminoácidos.

La dinámica de consumo de sustratos y producción de AC en cultivo por lotes se simuló con un enfoque dinámico de Análisis del Balance de Fluxes Metabólicos (DFBA, por sus siglas en inglés). Estas simulaciones se ejecutaron para los puntos del diseño experimental que en estado estacionario (FBA) indicaron los más altos valores en el flux de secreción de AC. Las simulaciones DFBA se realizaron en COBRA toolbox 3.0 bajo la formulación de Varma and Palsson (1994) (36), de la siguiente manera:

Concentración de sustrato definida por la concentración de sustrato disponible más añadidos en el modo de fermentación por lotes:

$$S_C = S_{CO} + \frac{\text{supply} \cdot \Delta t}{\text{volume}} \quad (3)$$

Disponibilidad de sustrato :

$$Disponibilidad = \frac{S_c}{X \cdot \Delta t} \quad (4)$$

Ecuación para el cálculo de la concentración para la biomasa y el sustrato en cada paso de tiempo:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \rightarrow X = X_0 \cdot e^{\mu \Delta t} \quad (5)$$

$$\frac{\partial S_c}{\partial t} = -S_u \cdot X \rightarrow S_C = S_{CO} + \frac{S_u}{\mu} X_0 (1 - e^{\mu \Delta t}) \quad (6)$$

Función objetivo de maximización de biomasa:

$$Minimize Z = -V_{gro} , \sum_{all M} d_M \cdot M_{\rightarrow}^{V_{gro}} biomass \quad (7)$$

Tanto el medio *in silico*, como los parámetros utilizados para el DFBA se muestra en la Tabla 2:

Tabla 2. Composición del medio de cultivo y parámetros utilizados para la simulación del DFBA.

<b>Composición</b>	
<b>Compuesto</b>	<b>Concentración (mmol)</b>
<b>Glicerol</b>	100
<b>Fosfato</b>	10
<b>Aminoácidos</b>	50 (divididas proporcionalmente en los aminoácidos requeridos para cada experimento)
<b>Parámetros</b>	
<b>Biomasa inicial</b>	0.05 g/L
<b>Tamaño de paso</b>	0.25
<b>Número de pasos</b>	600
<b>Tiempo</b>	100 h

Finalmente se seleccionó como medio de producción aquel que condujera a las concentraciones más altas de AC en cultivos por lotes, según los resultados *in silico*.

#### *Establecimiento de un proceso conceptual de producción*

Los estudios metabólicos *in silico* permitieron establecer la productividad de AC en cultivos por lotes bajo condiciones adecuadas de cultivo. Dicha productividad se usó como base para el establecimiento de un proceso conceptual de producción de AC que especificara tanto la operación en biorreactor como las etapas de purificación hasta el producto comercial (Clavulanato de potasio). La simulación del proceso conceptual se realizó en el software de simulación de procesos químicos y biotecnológicos SuperPro Designer v.9.5 (45). En la Figura 1 se presenta el diagrama del proceso.

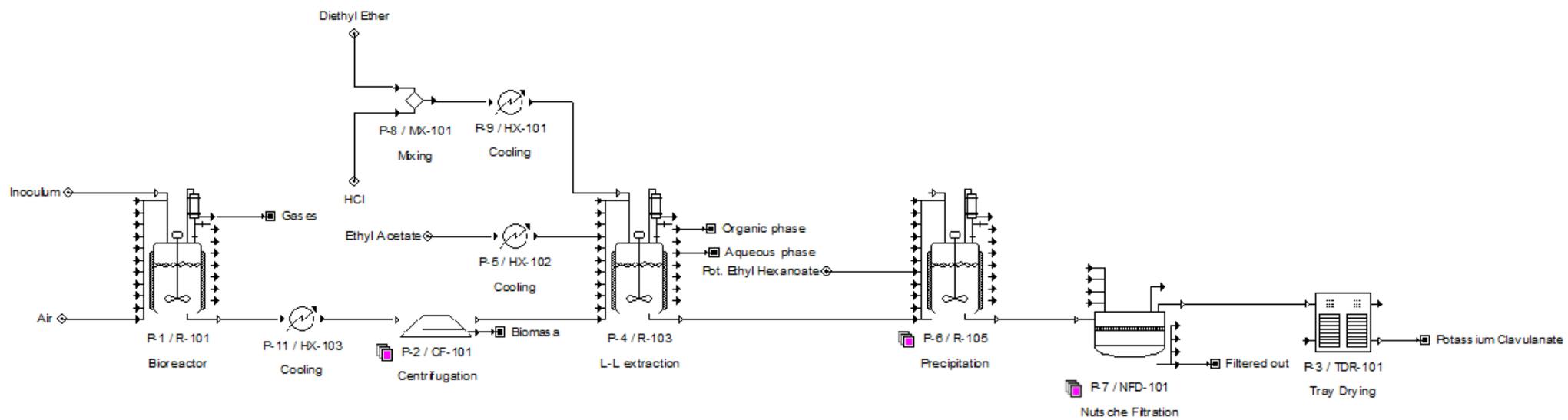
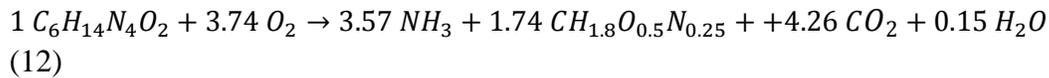
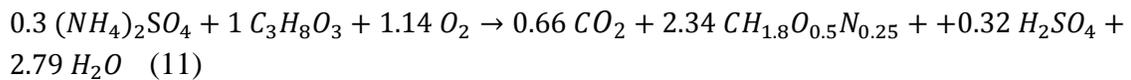
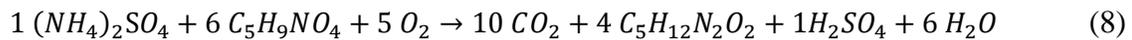


Figura 1. Diagrama del proceso de producción de ácido clavulánico.

Tal y como se planteó en el estudio *in silico* se definieron unidades de proceso para etapas de biorreacción, separación de AC y precipitación de Clavulanato operados por lotes. Se exploraron escenarios de producción esperada de acuerdo con los resultados *in silico* de DFBA.

La etapa de producción de AC en biorreactor se definió bajo condición isotérmica a 28°C, pH de 6.8, aireación disponible en la corriente de entrada, enfriamiento por medio de chaqueta con agua de alimentación a 5 °C y potencia de agitación de 3 kW/m<sup>3</sup>. Las reacciones que permitieron simular el proceso en el biorreactor como una fermentación cinética se presentan a continuación:



Siendo la ecuación 8 el balance estequiométrico de la conversión de Glutamato en Ornitina y la ecuación 9 la conversión de Ornitina en Arginina, siendo ambas las ecuaciones que modelan la degradación de los aminoácidos adicionados para convertirse en precursores metabólicos. La ecuación 10 representa la producción de ácido clavulánico a partir de los sustratos alimentados al reactor, Arginina y Glicerol. Las ecuaciones 11 y 12 describen la producción de biomasa, siendo la primera la ecuación de conversión de glicerol y la segunda la ecuación de utilización de Arginina para el crecimiento celular.

Al tratarse de una operación por lotes, además de la estequiometría se especificó la cinética de reacción de forma que los perfiles de concentración de sustratos y producto fueran congruentes con los obtenidos en el estudio *in silico*, el reactor se operó por 100 h. La ecuación cinética se presenta a continuación y sus parámetros para cada reacción se muestran en la tabla 3:

Ecuación para la velocidad de reacción (en g/L-h), según el software:

$$Velocidad = (\alpha * \mu_{max} * (Término S1)) * (\beta) \quad (13)$$

Ecuación de cinética tipo Monod para el término S1 (ecuación 13):

$$\frac{S}{K_s+S} \quad (14)$$

Tabla 3. Parámetros cinéticos utilizados para la simulación de la fermentación en lotes.

Reacción	Sustrato	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	Constante $\alpha$	Constante $\beta$	Tipo de cinética	Ks (mg/L)
8	Glutamato	0.06	1	0	Monod	450
9	Ornitina	0.06	1	0	Monod	450
10	Glicerol	0.06	0.05	0	Monod	450
11	Glicerol	0.06	0.4	0	Monod	450
12	Arginina	0.06	0.05	0	Monod	450

Para el caso base (Concentración de AC obtenida en el estudio de DFBA) se tomó como base de producción una cepa no modificada, estableciendo la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) en 0.06 h<sup>-1</sup>, la constante de saturación en (Ks) 0.45 g.L<sup>-1</sup>, la constante de velocidad según la tabla 3. Las concentraciones del medio de cultivo se establecieron de la siguiente manera, según bibliografía y el medio de cultivo diseñado con ayuda del software COBRA: Sulfato de amonio 9 g/L, Glutamato 3.7 g/L, Glicerol 9 g/L, Ornitina 3.3 g/L. Las especificaciones de las corrientes de carga al reactor se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición del medio de cultivo utilizado para la producción.

Componente	Masa kg/batch	Concentración g/L
Sulfato de amonio	225	9
Biomasa	25	1
Glutamato	92	3.68
Glicerol	230	9.2
Ornitina	82	3.3
Agua	24346	974.38
Aire	1300	1.18

Al finalizar el proceso de fermentación se descarga el reactor pasando por un intercambiador de calor que enfría el medio agotado a una temperatura de 10 °C para disminuir la degradación del producto, que es favorecida por el incremento de temperatura en solución acuosa (7). La corriente enfriada es centrifugada para la separación de la biomasa, operación llevada a cabo en un tiempo de 2h con un factor de concentración de 20. El sobrenadante, conteniendo el AC en solución acuosa, se pasa a un reactor en el que se somete a una reducción de su pH hasta 2 manteniendo la temperatura en 10°C. Se ha documentado que la rata de reacción de hidrólisis a pH ácido es menor que a pH básico (23, 46) , por lo que la reducción de pH llevará a una disminución de las pérdidas por degradación de producto. Teniendo como base resultados experimentales, se plantean dos etapas de extracción: la primera con solvente apolar de funcionalidad éter para eliminación de sustancias solubles en fase orgánica como son los remanentes de lípidos y aminoácidos que no hayan sido removidos previamente en la centrifugación. Para esta etapa se simuló la extracción líquida con Dietiléter en relación 1:1; dado que el AC es soluble en solución acuosa por su naturaleza polar, éste permanece en la fase acuosa de la extracción. Se aproximó una separación del

100%. La segunda etapa de extracción se realiza con un solvente orgánico ligeramente polar que establezca una interacción con el AC, siendo en este caso el Etilacetato, en una relación 1:3.4, que permite una recuperación media del 60%, obteniendo así el AC en la fase orgánica. Los solventes utilizados en estas extracciones fueron enfriados a la entrada para asegurar mantener el proceso a 10 °C y cada una de las extracciones se realizó por 20 minutos. Finalmente se realiza una precipitación directa con Etilhexanoato de potasio, debido a que este que produce Clavulanato de Potasio y Ácido Etilhexanoico con una estequiometría de reacción de 1 a 1 y un avance del 95%, de la siguiente manera (47):



Por último el Clavulanato de potasio es filtrado y secado a 80 °C para obtener un producto en polvo listo para su comercialización.

Se simularon tres escenarios de producción: cepa estándar (caso base en el cual se estableció la concentración de salida como la concentración obtenida en ese mismo medio de cultivo en el estudio de DFBA), y cepas modificadas, de 2 y 3 veces el caso base, lo que concuerda con lo documentado recientemente por (9). Para la simulación de los escenarios con cepas modificadas genéticamente, se ajustó el parámetro cinético  $\alpha$  en la reacción de producción de ácido clavulánico (ecuación 10), debido a que este parámetro es el que maneja la velocidad de producción de AC, para obtener el doble y el triple de la concentración de AC, tal como se muestra en la Tabla 5:

Tabla 5. Valores de los parámetros cinéticos en los tres casos de simulación.

Caso	Constante $\alpha$	AC (g/L)
Base	0.05	0.69
Doble	0.1	1.34
Triple	0.16	2.06

### *Evaluación económica*

El dimensionamiento de equipos y corrientes de material se determinó partiendo de la demanda anual de AC para el país, según lo documentado por el Ministerio de Salud en dosis diarias dispensadas (DDD) en el rango de años 2014-2018 (48). Se halló el crecimiento en la demanda por regresión de mínimos cuadrados ordinarios y se proyectó el crecimiento a 2020 y 2035. Las DDD se convirtieron a gramos de AC según la relación del medicamento comercial (Amoxicilina/Clavulanato de potasio) y la DDD establecida por la OMS para el antibiótico. Adicionalmente se aproximó la demanda veterinaria y particular (fuera de la seguridad social) obteniendo así un aproximado del consumo de AC en el país de 123726.203 y 196647.6943 toneladas para los años 2020 y 2035 respectivamente. Para establecer el valor de las exportaciones, se parte del reporte de exportación de antibióticos en 2017 en el país, ponderando las exportaciones según la clase química. Se aproximó la cantidad exportada de AC y se proyectó el crecimiento de la demanda determinado anteriormente. Vale la pena

aclarar que si bien Colombia no es productor de AC, realiza preparación de la formulación antibiótica comercial, empaque y maquila, importando la materia prima y exportando la formula antibiótica comercial a diferentes países de Suramérica y el Caribe. La suma de la demanda interna y las exportaciones se asumió como la demanda total de AC para Colombia, la cual al ser la única planta productora en el país se definió como capaz de satisfacer la demanda total.

Se calcularon las magnitudes aproximadas de flujos de reactivos para el proceso y mediante un proceso iterativo y se ajustó en las simulaciones de forma que la producción final de AC por lote satisficiera la demanda anual, estableciendo cada batch en 150 horas y definiendo 8000 horas de operación anual. Posteriormente se determinaron los volúmenes de los equipos requeridos, volúmenes de materias primas y servicios (agua de refrigeración, vapor y energía) desde los balances de masa y energía para el proceso completo.

Los costos de inversión se determinaron en valores nominales para los equipos requeridos partiendo de los precios FOB. Los costos de operación se establecieron por lote procesado y producción anual según los costos de materias primas y servicios. El precio de venta de AC como reactivo comercial en el mercado completó el flujo de caja. Se estableció un margen de beneficio sobre costo de 60% para cubrimiento de costos indirectos de fabricación, servicio de la deuda y capital de trabajo así como beneficios esperados. Se estimó que el 40% restante debía cubrir totalmente los costos directos de fabricación, de lo contrario el proceso no sería viable económicamente en las condiciones actuales.

#### 4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

##### *Suplementación de aminoácidos al medio de cultivo*

Partiendo de la revisión de la literatura se identificaron los aminoácidos cuyos reportes experimentales documentaran un aumento de la productividad de AC en cultivos sumergidos de *S. clavuligerus*. Los compuestos identificados se presentan en la Tabla 6:

Tabla 6. Resultados de los aminoácidos para la revisión bibliográfica.

Aminoácidos						Productividad (g/L)	Referencia
Piruvato						1	(49)
Leucina						1,2	
Prolina						1,18	
Prolina						1,17	
Arginina						1,4	
Arginina						1,4	
Glutamato	Arginina					1,5	(12)
	Tryptófano					1,7	
Ornitina						1,4	(50)
Ornitina						1,4	
Ornitina						1,3	(51)
Ornitina						0,681	
Glutamato	Arginina	Treonina	Aspartato	Asparagina	Isoleucina	Aumento de los fluxes	(35)
Arginina		Ornitina		Treonina		Efecto positivo según el análisis estadístico	(21)

De los anteriores se seleccionaron para un diseño de experimentos *in silico* aquellos con un mayor impacto sobre la productividad, reduciendo la selección a los aminoácidos: Ácido Glutámico, Arginina, Ornitina, Treonina, Lisina e Isoleucina. La revisión de la literatura mostró que el estudio de la adición de aminoácidos al medio no está muy explorado, reduciéndose a aquellos aminoácidos relacionados con la ruta biosintética de las clavamas que termina en AC y clavamas 5S. Adicionalmente, en ocasiones la adición al medio de fuentes de nutrientes complejas puede resultar en la adición indirecta de aminoácidos hidrolizados y dipéptidos por lo que el uso de estas fuentes complejas generalmente se asocia a incrementos en la productividad del metabolito especializado sobre medios no

suplementados (2, 6, 20) . Los estudios *in silico* con validación experimental pueden mostrar los efectos de estos nutrientes y facilitar el diseño racional de medios de cultivo y alimentaciones para cultivos por lotes, lote alimentado y continuo, permitiendo aumentar la productividad. La máxima concentración observada en cultivo en Erlenmeyer (1.7 g/L) ha sido la reportada por (12) usando Ácido Glutámico y Triptófano con una cepa no modificada genéticamente.

#### *Maximización de biomasa como función objetivo*

Tal y como se había descrito, se realizó inicialmente un análisis de robustez con el modelo metabólico iDG1237 de Gómez-Ríos et al (2020) para observar la respuesta de la red metabólica a la captación de los aminoácidos que experimentalmente se han reportado como mejoradores de la producción de AC.

Las figuras 2a a 2f muestran el efecto de la variación en el flux de captación de cada aminoácido sobre la tasa específica de crecimiento en  $gDCW.h$  . Las restricciones por defecto del medio *in silico* se modificaron para permitir la captación extracelular de los aminoácidos bajo estudio. En el caso de los aminoácidos: Ácido Glutámico, Arginina, Ornitina, Treonina y Lisina (figuras 2a a 2e), se observan regiones de aumento proporcional de la tasa de crecimiento con el flux de captación del aminoácido, esto debido a que los aminoácidos son fuente de carbono y nitrógeno que favorecen las rutas de síntesis proteica que en última instancia favorecen la síntesis de biomasa. En el caso de la Arginina, Treonina y Lisina, se observa un punto a partir del cual se da una disminución en la pendiente, lo que indica que proporcionalmente el rendimiento de la biomasa disminuye aún con el crecimiento en la captación del nutriente. Para el caso de la Isoleucina (Figura 2f), a bajas tasas de captación se favorece la productividad de la biomasa, pero a medida que estas aumentan, el crecimiento celular se ve disminuido hasta llegar a inhibirlo completamente. . El punto de inflexión observado para Isoleucina después de marcar una tendencia proporcional positiva permite inferir a que a partir de ese flux no se satisface la demanda del otro nutriente requerido, en este caso el Oxoglutarato, necesario para la ruta de degradación de la Isoleucina, el cual es un metabolito proveniente del ciclo del citrato y en última estancia, del glicerol, lo que convierte a este aminoácido en un competidor por la fuente de carbono. Según los resultados obtenidos se puede validar la hipótesis que la adición individual de ciertos aminoácidos puede favorecer la síntesis de biomasa al proveer mayor cantidad de carbono y nitrógeno a la célula. La mayor productividad se obtuvo en el caso de la Arginina, debido probablemente a que este aminoácido es un punto común en varias rutas metabólicas de síntesis y degradación de aminoácidos.

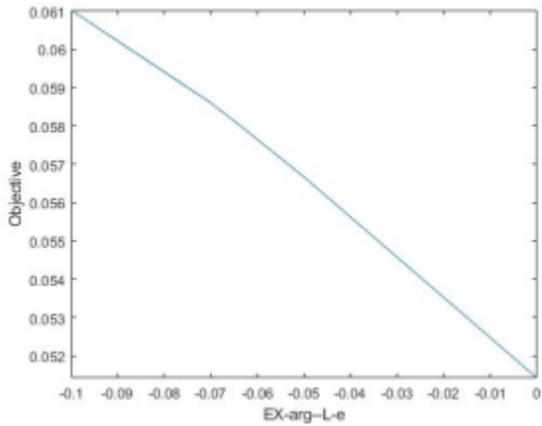


Figura 2a. Resultado del análisis de robustez para la Arginina con función objetivo la maximización de la biomasa.

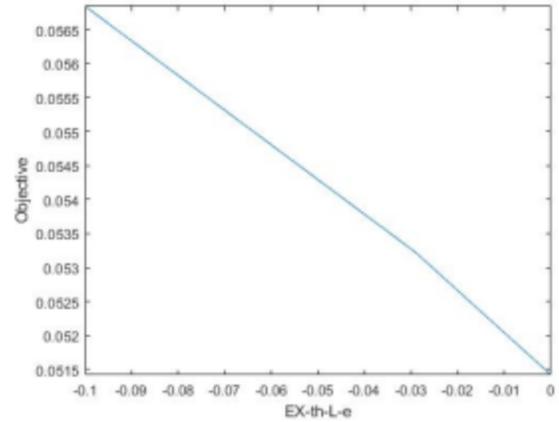


Figura 2b. Resultado del análisis de robustez para la Treonina con función objetivo la maximización de la biomasa.

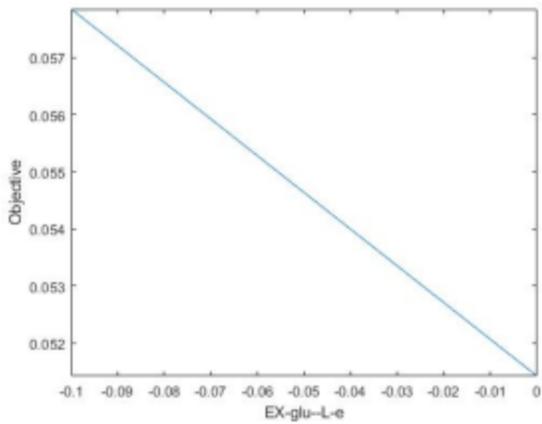


Figura 2c. Resultado del análisis de robustez para el ácido glutámico con función objetivo la maximización de la biomasa.

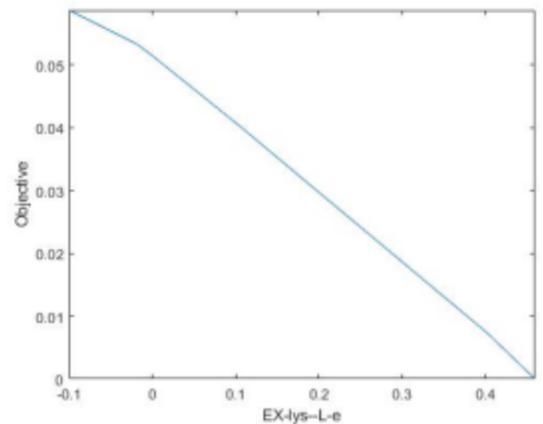


Figura 2d. Resultado del análisis de robustez para la Lisina con función objetivo la maximización de la biomasa.

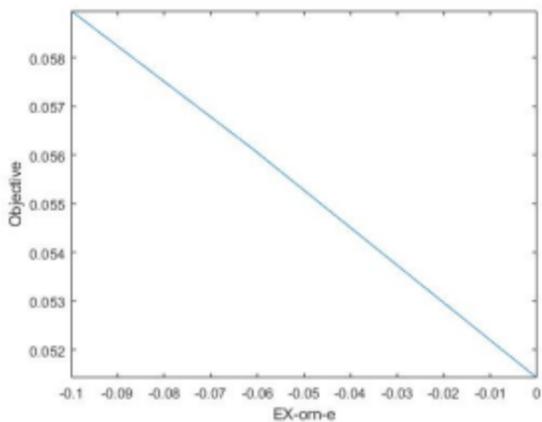


Figura 2e. Resultado del análisis de robustez para la Ornitina con función objetivo la maximización de la biomasa.

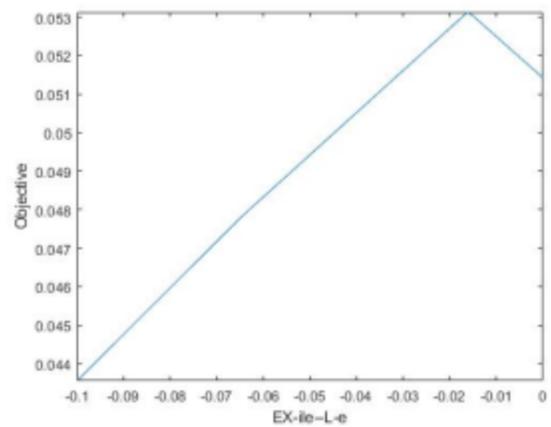


Figura 2f. Resultado del análisis de robustez para la Isoleucina con función objetivo la maximización de la biomasa.

### Maximización de ácido clavulánico como función objetivo

Con el fin de verificar el impacto de la adición de los aminoácidos seleccionados en la ruta biosintética del AC se definió la secreción de este producto como función objetivo en el análisis de robustez. Las figuras 3a a 3b muestran el efecto de la variación en el flux de consumo de cada aminoácido sobre la biosíntesis y secreción de AC. Para los aminoácidos Ácido Glutámico, Arginina, Ornitina, Treonina y Lisina (Figuras 3a a 3e) se evidencia una relación directamente proporcional entre el aumento del consumo del aminoácido con la productividad de AC, esto debido a una relación directa con el ciclo de la urea (Ácido Glutámico, Arginina, Ornitina) o con la ruta de las clavamas (Arginina, Lisina, Treonina). Debido a que el análisis de robustez permite la evaluación de una función objetivo a la vez, no se puede concluir acerca de si el aumento de la productividad impacta negativamente el crecimiento de biomasa causado por la adición de aminoácidos. Es de esperar que la mayor demanda de nutrientes lleve a una reducción de la tasa específica de crecimiento. En la figura 3f se puede observar una situación similar a la observada en la figura 2f para la Isoleucina y la biomasa, aunque sin punto de inflexión, por lo que eventualmente este aminoácido en las condiciones del medio definido puede ser un inhibidor de la ruta de síntesis. La mayor productividad se obtuvo con la Arginina, lo que concuerda con lo reportado en la literatura (6, 15), debido a que esta es un precursor directo del AC en la ruta metabólica en la primera reacción de condensación del AC (9).

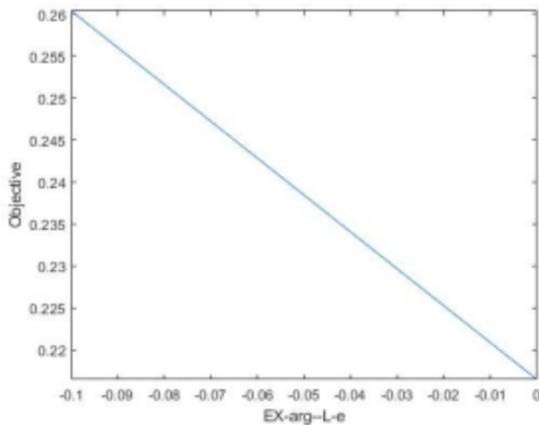


Figura 3a. Resultado del análisis de robustez para la Arginina con función objetivo la maximización de AC.

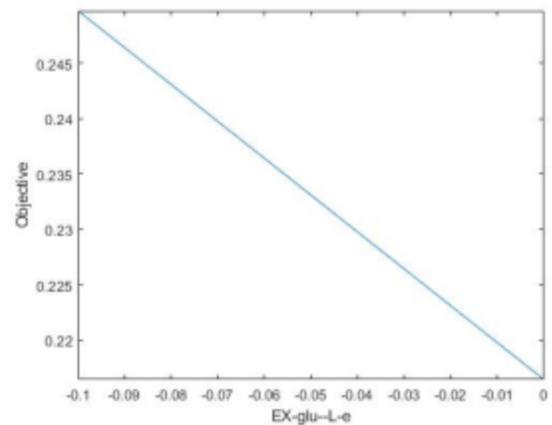


Figura 3b. Resultado del análisis de robustez para el Ácido Glutámico con función objetivo la maximización de AC.



En la tabla se observa como los experimentos 4 a 6 presentan un aumento de la productividad de AC con respecto al caso base, para el cual el medio definido *in silico* no consideraba fluxes de captación de aminoácidos. Aunque en todos los experimentos se dio crecimiento, no en todos se produjo AC. Se puede notar además que a medida que se aumenta el flux de captación de aminoácidos en el medio, aumenta la tasa de producción de biomasa, lo que concuerda con el análisis de robustez aun cuando el FBA se ejecutó con un enfoque de problema dual. Se esperaba que la captación de arginina pudiera favorecer la producción de AC, sin embargo, en estado estacionario no se observó dicho efecto, lo que sugiere un cuello de botella sobre la incorporación directa de la arginina en la síntesis de AC, que no permite que el incremento en el flux de este aminoácido se vea reflejado en la mayor secreción de AC. Sin embargo, la captación de Ornitina parece tener un efecto positivo sobre la producción de AC a ser combinado con Glutamato, Lisina o Treonina. En el caso del Glutamato, la incorporación de este en el ciclo de la urea a través de su conversión en aspartato llevaría a una mayor demanda de Ornitina, que siendo satisfecha aumentaría el flux de los productos del ciclo aguas abajo. Para el caso de la Ornitina, su participación directa en el ciclo de la urea la convierte en un precursor de la arginina, esta última siendo precursor C-5 del ácido clavulánico. Por su parte la Lisina aporta a los otros precursores C-3 participando en el ciclo del ácido cítrico al convertirse en Acetil-CoA, el cual ayuda a la producción tanto de AC como precursor a través de la demanda de succinato, así como de biomasa. Por último la Treonina es también precursor indirecto del ciclo del ácido cítrico por su conversión en piruvato.

Si bien el flux de secreción de AC es bajo, respecto al caso base es una mejora sustancial. Es importante resaltar que no se obtuvo un aumento de la producción en ninguno de los casos en los que se añadió un aminoácido solo, sino que requirió de combinaciones. Los resultados obtenidos pueden dar una dirección a futuros experimentos teniendo en cuenta que al resolver las ecuaciones el sistema al estar centrado en la optimización de la biomasa redirige la mayor cantidad de flujo de carbono en dicha dirección, por tanto los resultados experimentales pueden variar con respecto a la simulación.

#### *Análisis del balance de fluxes metabólicos bajo enfoque dinámico*

La simulación dinámica de fluxes metabólicos mediante DFBA permitió obtener perfiles de concentración en mmol/L. Las figuras 4a a 4d muestran los resultados para biomasa, fuentes de carbono (glicerol y aminoácidos) y el metabolito de interés (AC). En cuanto a la producción de biomasa (Figuras 4b a 4d) se puede confirmar que la adición de aminoácidos favorece el crecimiento celular en cultivos por lotes, representando un aumento en la concentración de biomasa seca (g/L) entre 65.58% y 73.62%. En ausencia de aminoácidos se observan dos fases de crecimiento, crecimiento exponencial a altas concentraciones de sustrato y un crecimiento secundario asociado al agotamiento de nutrientes. En el caso de la adición de aminoácidos en el medio, se observan tres fases de crecimiento asociadas a la

disponibilidad de nutrientes. Inicialmente se da la fase exponencial acelerada por la asimilación combinada de glicerol y los aminoácidos suplementados. Dada la integración rápida del glicerol sobre la glicolisis, el ciclo del ácido cítrico y la preferencia de *S. clavuligerus* por esta fuente de carbono, se da un agotamiento más rápido de este sustrato (antes de las 50 h evidenciadas en el caso base), mientras que los aminoácidos se asimilan con una dinámica más lenta ante la disponibilidad de glicerol. La asimilación de aminoácidos se incrementa ante el agotamiento del carbohidrato, viéndose acelerado el consumo entre las 25 y 50h como se observa en las Figuras 4b, 4c y 4d generando una segunda fase de crecimiento un poco más lenta. Finalmente, se ralentiza el crecimiento ante el agotamiento de los nutrientes. Las simulaciones en estado estacionario no dieron cuenta de la producción de AC en el medio no suplementado, sin embargo la simulación dinámica muestra que éste se sintetiza a partir de las 20 h aproximadamente ante el inicio de una etapa de limitación de fosfato (24). La producción de AC se mantiene mientras haya disponibilidad de glicerol, en este caso aproximadamente hasta las 50 h. Esto puede indicar que el aumento en la concentración final es debido principalmente a la cantidad de biomasa final más que a la participación dentro de la ruta metabólica de los aminoácidos añadidos. Es importante notar que la adición de aminoácidos causa un agotamiento más rápido del glicerol en el rango de las 25 a 50h, debido al favorecimiento del crecimiento celular. Es posible que una estrategia de cultivo en lote alimentado con un medio suplementado favorezca la producción de AC, incrementando los fluxes de precursores hacia la ruta biosintética del AC (19, 24, 28).

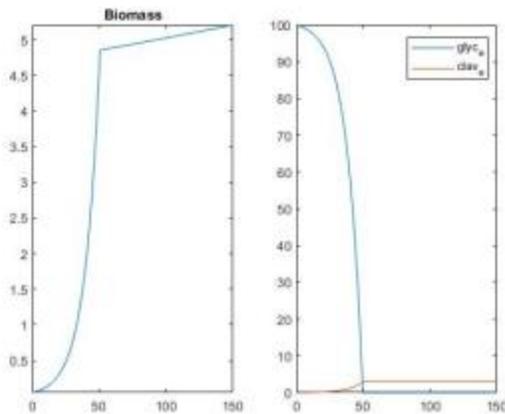


Figura 4a. Resultado del DFBA para el experimento base (sin adición de aminoácidos).

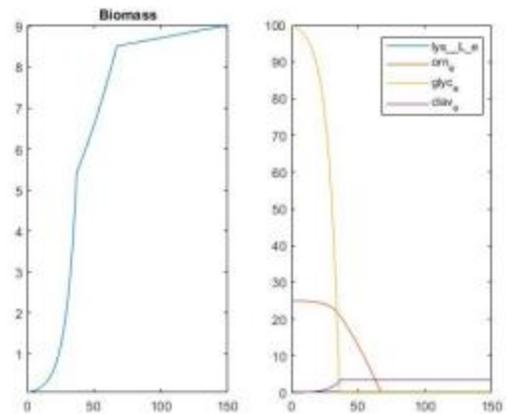


Figura 4b. Resultado del DFBA para el experimento número 4 (adición de Ornitina y Lisina).

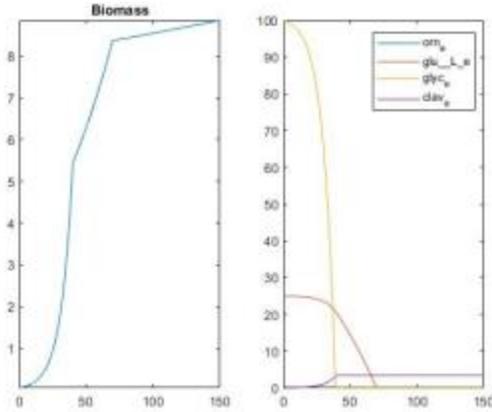


Figura 4c. Resultado del DFBA para el experimento número 5 (adición de Ornitina y ácido glutámico).

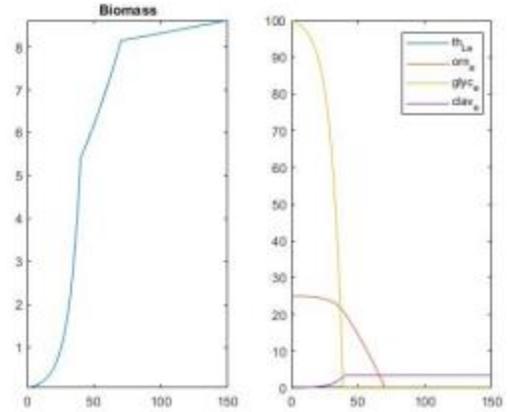


Figura 4d. Resultado del DFBA para el experimento número 6 (adición de Ornitina y Treonina).

Tabla 8. Resultados de las concentraciones finales para el estudio del DFBA.

	AC (mmol/L)	Biomasa (mmol/L)
<b>Base</b>	3	5.203452
<b>4</b>	3.5	9.034182
<b>5</b>	3.4	8.858442
<b>6</b>	3.4	8.616172

La concentración específica de AC disminuyó respecto al caso base en 32.8% para el experimento 4 (adición de Ornitina y Lisina), 33.4% para el experimento 5 (adición de Ornitina y glutamato) y 31.6% para el experimento 6 (adición de Ornitina y Treonina). Así, la concentración del caso base fue de 3 mmol/L (0.6 g/L), 3.5 mmol/L (0.7 g/L) para el experimento 4 y 3.4 mmol/L (0.68 g/L) para los experimentos 5 y 6. En esta etapa del desarrollo del proceso, se eligió como medio de cultivo óptimo el experimento 5 ya que, como se comentó anteriormente, la Ornitina participa dentro del ciclo de la urea directamente a la producción de arginina, y en este caso a pesar de tener una concentración específica mayor para el experimento 6, el glutamato (experimento 5) se también participa dentro del ciclo de la urea, siendo este un precursor directo del AC. Adicionalmente, a nivel industrial, el costo de la Treonina es 5 veces más que el glutamato.

Se descartó el experimento 4 ya que se tienen algunos reportes de estudios experimentales que indican que el aminoácido Lisina favorece la producción de Cefamicina compitiendo por precursores con la producción de AC. Los resultados de concentración específica respaldan la hipótesis planteada que la adición de aminoácidos favorece la producción de biomasa, más no la de AC directamente.

### Definición de un proceso conceptual de producción de AC

La producción de la planta de producción se calculó en base a las DDD/año de AC para consumo interno y exportación. La figura 5 muestra el crecimiento de las DDD en Colombia entre 2014 y 2018, ajustándose por regresión lineal con un coeficiente de correlación de 0.993. Asumiendo el mantenimiento de esta tendencia que parece estar ligada al crecimiento poblacional y la tasa de incidencia de enfermedades infecciosas, se realizó la proyección de la demanda para los años 2020 y 2035, los cuales se calcularon por medio de la ecuación de regresión obteniendo 494904.8 y 786590.7 kg respectivamente, representando un crecimiento del 14% y 82% respecto al año 2017.

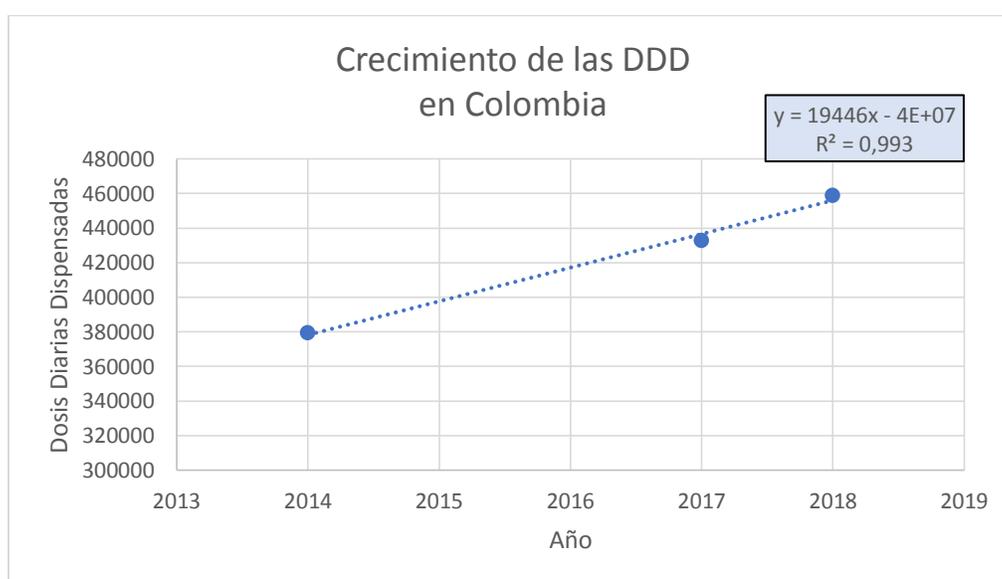


Figura 5. Crecimiento de las DDD en Colombia.

El reporte del plan de negocios del sector farmacéutico publicado por Mincomercio (52) se establecieron los valores ponderados para las exportaciones de antibióticos por clase química, siendo el 2.3% de los antibióticos, medicamentos que contienen AC. Aplicando esta proporción y la demanda proyectada, se determinó la demanda total de AC para Colombia (exportaciones inclusive) para 2020 y 2035 como se presenta en la Tabla 9.

Tabla 9. Demanda proyectada de AC.

Año	Consumo AC (g)	Exportaciones (g)	Total demanda (g)
2020	123726.203	259158.0704	382884.2734
2035	196647.6943	411900.1129	608547.8072

Definiendo las horas operativas de la planta por año (8000 h) y teniendo en cuenta que un lote de producción toma 150 h de las cuales 100 h corresponden a la fermentación, se calculó

una producción de 11 kg de Clavulanato de potasio por lote, para satisfacer la demanda de 0.6 toneladas anuales proyectadas en el último año según la demanda proyectada.

La figura 1 muestra el proceso de producción de AC simulado en Super Pro Designer. El proceso considerado es secuencial, por lotes y para el presente análisis no se consideraron en la simulación equipos de servicio como lo son los compresores, bombas y caldera. Dado que se trata de una evaluación de los costos del proceso desarrollado bajo el estado del arte actual, los requerimientos de servicios se calcularon por balance de energía en cada equipo para proyección de los costos directos de fabricación.

La ocupación de los equipos de planta se presenta en la Figura 6, evidenciando que el proceso de fermentación ocupa el mayor tiempo de proceso en el lote. Así, para un posterior aumento de la producción sería necesario iniciar fermentaciones en paralelo con tiempos de inicio diferentes para mantener la ocupación de los equipos en las etapas de separación y precipitación de AC y así aumentar la productividad de la planta. Así mismo, los procesos de limpieza y mantenimiento pueden ser llevados a cabo durante el tiempo de fermentación, maximizando los tiempos muertos y aumentando la producción.

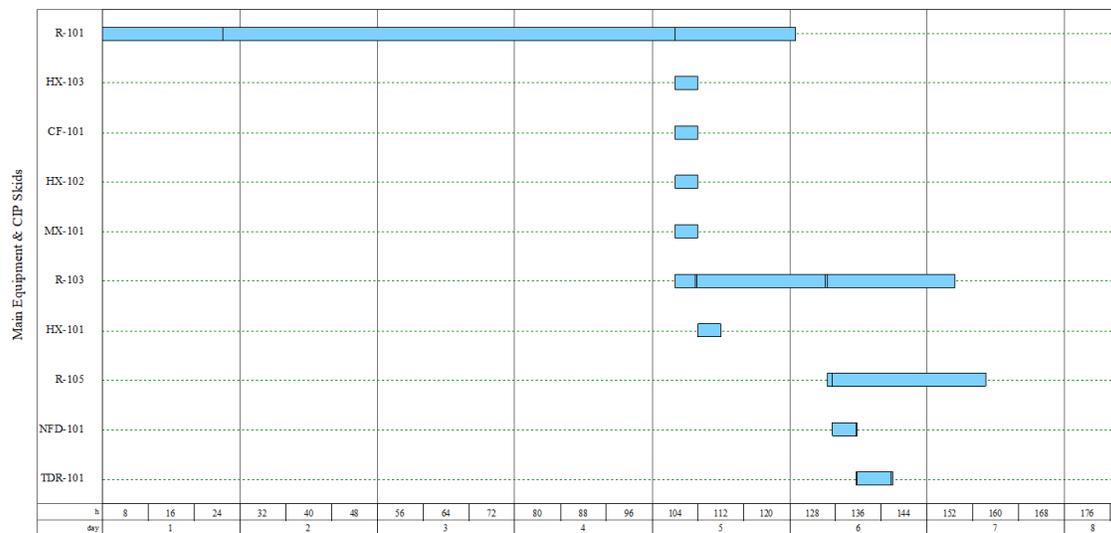


Figura 6. Ocupación de los equipos en la planta de producción.

Un paso importante de la operación de una planta es la definición de los gastos por servicios, en este caso el proceso de producción requiere agua de refrigeración, energía eléctrica y vapor de calentamiento.

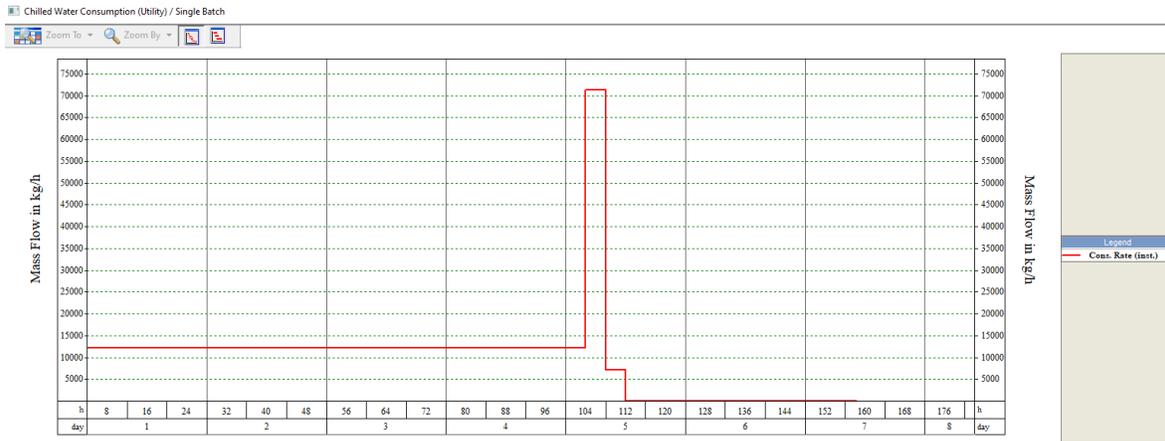


Figura 7a. Requerimiento en agua de refrigeración en el proceso.

La refrigeración se realiza con agua a 5 °C y es requerida tanto durante el tiempo de fermentación para mantener el biorreactor a la temperatura de 28 °C, como para enfriar los reactivos y el medio de cultivo luego de la fermentación, para evitar degradación del AC y realizar la extracción a una temperatura de 10 °C permitiendo obtener los mejores rendimientos. En la Figura 7a se puede observar los requerimientos de agua de enfriamiento en el proceso. Debido a que se requiere durante una gran cantidad de tiempo y una gran cantidad debido al volumen de solventes utilizados que deben ser refrigerados, el establecimiento de procesos de reciclaje o el aprovechamiento de dicha agua dentro de operaciones posteriores puede disminuir el consumo del servicio, disminuyendo costos de operación.

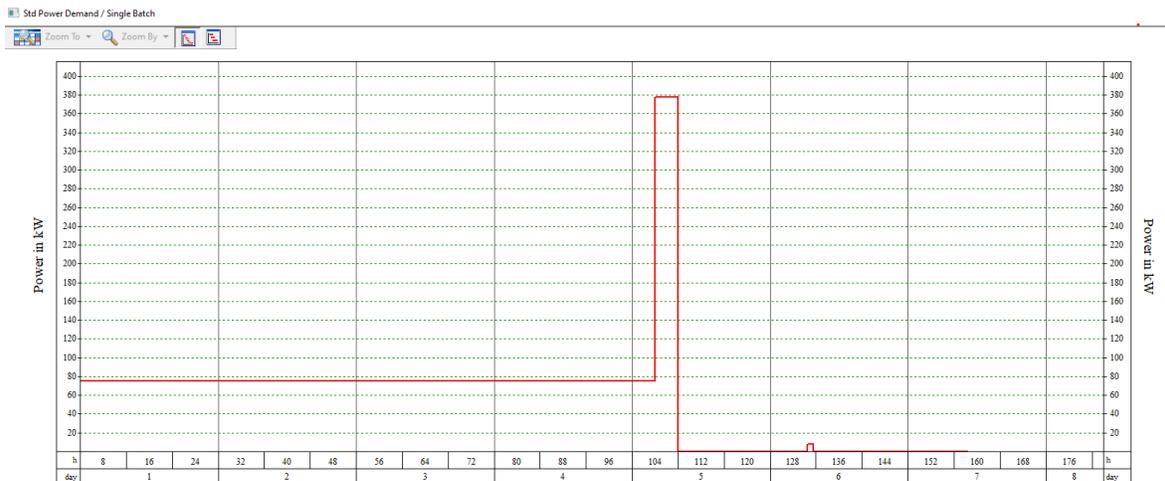


Figura 7b. Requerimiento en energía en el proceso.

La figura 7b muestra los requerimientos energéticos de la planta, los cuales se resumen en la agitación continua del biorreactor y los reactores tanto de extracción como de precipitación, así como la operación de la centrífuga. Es importante reconocer que dichos requerimientos pueden variar y aumentar al añadir las unidades de servicios faltantes en el diseño, así como los requerimientos a nivel de planta como lo son oficinas, iluminación entre otros.

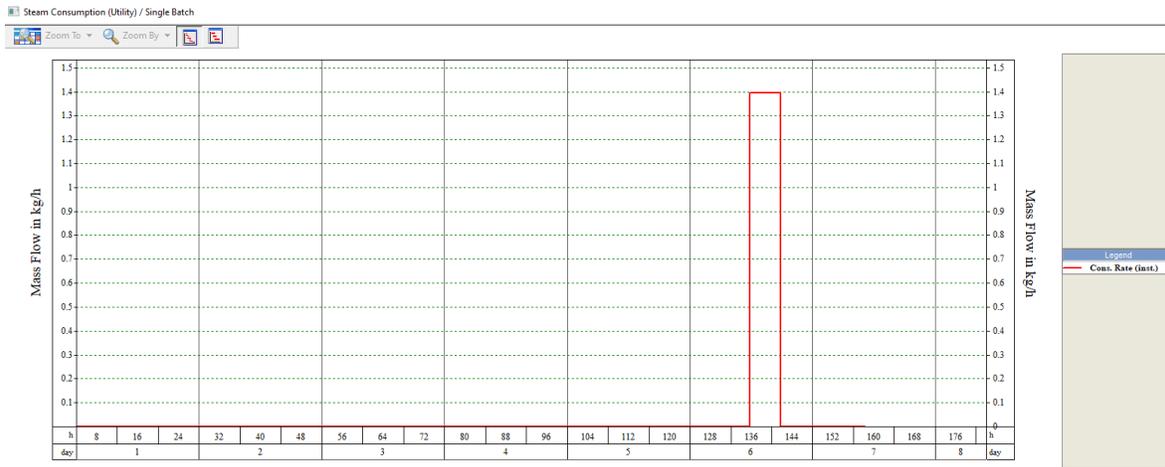


Figura 7c. Requerimiento en vapor en el proceso.

La figura 7c muestra los requerimientos de vapor en el proceso que se resumen principalmente en el uso de vapor para calentamiento en el secador, para lograr la temperatura de 80 °C, dicho secado no ha sido muy estudiado y por tanto el planteamiento de otras estrategias como lo son el spray drying, pueden disminuir e incluso eliminar el uso de vapor dentro de la planta. Para la utilización de vapor se hace necesario establecer una caldera que provea los requerimientos de dicho servicio.

Teniendo estos gastos definidos, se determinaron los costos para el agua y la energía, según la empresa prestadora de los servicios en Rionegro, Antioquia, Colombia. El precio del vapor se calculó según el artículo técnico (53) a una presión de operación de 4.3 MPa, temperatura de vapor de 460 °C, temperatura de alimentación de 25 °C y eficiencia para el gas natural de 95% (54), poder calorífico de 42.8 MJ/m<sup>3</sup> para el gas natural (55) , siendo el costo de este 1806.24 pesos por m<sup>3</sup> (56). Así los costos en los servicios se recopilan en la tabla 10:

Tabla 10. Costos de los servicios en USD.

Servicio	Cantidad por batch	Costo	Total por batch USD
Agua de refrigeración	1536302.40 kg	3195.62 por m <sup>3</sup> (57)	0,336293
Vapor	8.37 kg	144.16 por kg	1368,294
Energía	11276.43 kW-h	685.95 por kW-h (58)	2155,816

### *Estudio económico de la producción de AC*

A partir de los balances de materia y energía en el software SuperPro Designer se calcularon los costos para los reactivos frescos usados en el proceso, los cuales se presentan en la Tabla 11, en estos no se añade el costo de la biomasa, al ser este un reactivo producido dentro de la misma planta como inóculo.

Tabla 11. Costos reactivos, sin precio de importación.

Reactivo	Kg/batch	Costo/Kg USD	Total USD
Sulfato de amonio	224.87	0.139	31.25693
Dietiléter	16708.78	0.0047	78.531266
Etilacetato	144859.68	1	144859.68
Glutamato monosódico	91.95	1	91.95
Glicerol	230.09	0.9	207.081
Ácido sulfúrico	0.71	0.315	0.22365
Ornitina	82.45	10	82.45
Etilhexanoato de potasio	9.00	10	90
<b>Gran total</b>			145442.1728

De estos resultados se puede observar que los principales requerimientos en el proceso se encuentran en los solventes de extracción, como son el Dietiléter y el Etilacetato. Esto es debido principalmente a que a la salida del reactor el producto está muy diluido debido a que su concentración es baja (aproximadamente 0.7 g/L de AC) y de acuerdo con la relación de volúmenes según los estudios experimentales se requiere una gran cantidad de solvente en esta etapa, pues las relaciones 1:1 del Dietiléter y 1:3.4 del Etilacetato obligan a la adición de grandes volúmenes de solvente así como un equipo de volumen considerable (185000 L) para realizar la operación. Este problema puede observar también en los costos de los equipos (Tabla 12), en los cuales se evidencia que la mayor inversión requerida en los equipos de proceso es debida al tamaño de los tanques de reacción para la extracción líquido líquido. Adicionalmente, no se ha documentado un posible reciclaje de estos solventes a través de un tratamiento del efluente, lo que implicaría que cada lote sea procesado con solvente fresco.

Tabla 12. Costos de inversión en equipos, sin costos de importación.

Equipo	Requerimiento	Tamaño	Cantidad	Precio USD	Total USD
Biorreactor	25000 L	10000 L	3	20000	60000
Intercambiador de calor 1	25000 L	25000 L	1	30000	30000
Centrífuga	25000 L	10000 L	3	15000	45000
Tanque de mezcla	25000 L	10000 L	3	20000	60000
Intercambiador de calor 2	25000 L	25000 L	1	30000	30000
Intercambiador de calor 3	160000 L	25000 L	7	30000	210000
Reactor 1	185000 L	10000 L	19	20000	380000
Reactor 2	160000 L	10000 L	16	20000	320000
Equipo de Filtrado	160000 L	160000 L	1	500	500
Equipo de secado	20 kg	100L	1	2000	2000
<b>Total</b>					1137500

Bajo el precedente del gran costo de los reactivos, se evaluaron las ganancias por lote procesado según el costo del AC como ingrediente activo en el mercado internacional. Los costos de operación se dividieron en costos de los reactivos requeridos para la fermentación y los solventes requeridos para la extracción. Se evaluaron las ganancias para los casos de la cepa base con una productividad de 0.7 g/L, y el caso de una cepa modificada genéticamente que produce el doble 1.3 g/L y el triple 2.6 g/L.

Tabla 13. Costos directos de fabricación .

<b>Etapa</b>	<b>Cepa base</b>	<b>Doble</b>	<b>Triple</b>
<b>Ganancias USD</b>	1113	2181	3338
<b>60%</b>	667,8	1308,6	2002,8
<b>Costos de reactivos de fermentación</b>	788,73793		
<b>Costos solventes</b>	145028,4349	145118,4349	145208,4349
<b>Costos energía</b>	3524,446	3525,173	3526,022
<b>Total</b>	-148673,8189	-148123,7457	-147520,395

Tal y como se mencionó en la descripción de la metodología, se simularon casos de mayor productividad de la cepa, los cuales se corresponden al uso de una cepa mutante, ya sea desarrollada por la empresa o adquirida bajo licencia. Los resultados más relevantes se presentan a continuación.

Tabla 14. Resultados más relevantes de los casos de simulación.

<b>Reactivos</b>			
	<b>Base</b>	<b>Doble</b>	<b>Triple</b>
	<b>Kg/batch</b>	<b>Kg/batch</b>	<b>Kg/batch</b>
<b>Etilhexanoato de potasio</b>	9.00	18	27
<b>Tiempo de operación en días</b>	7	9	9
<b>Clavulanato de potasio</b>	11.13	21.81	33.38
<b>Servicios</b>			
<b>Energía (kW/h)</b>	11276.43	11277.88	11280.31
<b>Vapor (kg)</b>	8.37	16.40	25.09
<b>Agua de enfriamiento (kg)</b>	1536302.40	1536444.90	1536484.91

Se puede ver cómo en el caso de aumentar la productividad de la cepa por medio de una modificación genética (Tabla 14), el efecto se ve reducido a los pasos finales de la

producción, como lo son la precipitación y el secado, aumentando la cantidad de Etilhexanoato de potasio requerido para lograr la conversión establecida, así como el vapor necesario para secar una mayor cantidad de Clavulanato. No se evidenciaron cambios significativos en ninguna otra parte del proceso.

De estos resultados (Tablas 13 y 14) se pueden obtener dos conclusiones, la primera es que los gastos de los reactivos de fermentación solo pueden librarse en el caso de utilizar una cepa modificada genéticamente, esto debido principalmente a la adición de aminoácidos planteada ya que implica la compra de reactivos costosos sin aumentar considerablemente la productividad. Sin embargo, la utilización de materias primas baratas como son glicerol residual, medios complejos de hidrolizados soya y aceites vegetales, aportarían mezclas de aminoácidos y otros nutrientes a un bajo costo, como ya se ha documentado en varios trabajos experimentales (6, 15, 20). Por otro lado, los gastos en solventes bajo la metodología de extracción en relaciones equivolumétricas o incluso, superiores al volumen de sobrenadante hacen inviable la producción. Entre las posibles alternativas, podría estar la evaporación con vacío a la salida del biorreactor, sin embargo este requeriría de una gran cantidad de vapor necesario para la remoción de tan altos volúmenes de agua en el proceso. Adicionalmente, al ser el producto sensible a la temperatura en medio acuoso, se puede aumentar el grado de degradación disminuyendo la rentabilidad. Opciones como la adsorción del producto desde el medio de cultivo podrían permitir una disminución de los requerimientos de solvente, siempre y cuando la etapa de desorción condujera a una alta concentración de AC. Así mismo, es necesario estudiar extracciones en una menor relación volumétrica o una alta afinidad por el AC. Es interesante explorar la posibilidad de realizar estudios para la disminución del agua en el proceso de una forma rentable, bien sea por medio de microfiltración, tamices moleculares, precipitación directa en solución acuosa entre otras estrategias de separación.

## 5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos con el estudio a nivel metabólico *in silico* permiten confirmar los hallazgos experimentales que indican que la adición de aminoácidos, específicamente Ácido Glutámico, Arginina, Ornitina, Treonina y Lisina favorecen la producción de biomasa y por tanto la concentración de biomasa en el medio de cultivo. En el caso de la Isoleucina, los resultados muestran una probable inhibición tanto del crecimiento celular como de la producción de AC. El uso de fuentes de nutrientes complejas continúa siendo una interesante posibilidad debido a que aporta aminoácidos a un bajo costo; sin embargo es necesario determinar mezclas apropiadas de fuentes de aminoácidos de forma que se logre el balance nutricional deseado con una mayor participación de los aminoácidos que favorecerían la biosíntesis de AC. Adicionalmente, se requiere estudiar experimentalmente el efecto de las diferentes condiciones de cultivo reflejadas en la literatura, como lo son temperatura, agitación, entre otros, ya que pueden contribuir a la mejora de la productividad junto con las condiciones nutricionales adecuadas.

La simulación dinámica de la red metabólica permite explorar los efectos de los nutrientes y su dinámica, lo que permite una representación más cercana los procesos de reacción por lotes que el enfoque del estado pseudoestacionario.

El proceso de producción planteado en base a estudios experimentales presenta diferentes puntos críticos, como lo son la baja concentración de AC a la salida del biorreactor, incluso si la cepa productora lograra niveles tan altos como 10 g/L, su concentración es muy baja con relación al volumen de agua en la solución, lo que afecta el procesamiento aguas abajo. Sin embargo, el uso de cepas modificadas genéticamente se hace casi obligatorio para lograr una buena productividad en el proceso. El estudio o planteamiento de estrategias de deshidratación como la adsorción o la filtración molecular podrían mejorar la productividad, sin embargo esto no se ha explorado experimentalmente. En términos de servicios, el proceso requiere principalmente de agua de refrigeración, por tanto a la hora de diseñar las tuberías un proceso de integración energética puede disminuir los costos de energía, así como procesos de recirculación y reciclaje tanto de agua de servicio como de solventes.

La aproximación alcanzada en este trabajo permitió el acercamiento del proceso de producción y las estrategias establecidas por los estudios publicados a un nivel más industrial, lo cual brinda nuevos horizontes y posibilidades de estudio, al identificar puntos claves que deben ser solucionados antes de continuar con el diseño de una planta de producción de AC.

El software utilizado permite la evaluación a nivel general del proceso, brindando información sobre los flujos generales, tamaños de los equipos y requerimientos de servicios, que puede permitir direccionar los esfuerzos investigativos para realizar un mejor diseño del proceso productivo. Una vez se haya surtido una etapa de optimización de los procesos de purificación, un nivel de ingeniería de detalle permitiría obtener una visión precisa de los

costos e inversiones requeridas, así los servicios y gastos de operación de la planta en cuanto a personal.

## ANEXO 1

Tabla 15. Diseño de experimentos con puntos centrales y dos niveles para los aminoácidos con efecto positivo y resultados de producción de biomasa y AC. Los experimentos en verde fueron seleccionados para el DFBA.

El experimento en azul es el experimento base sin adición de aminoácidos. . Fluxes de intercambio para Arginina (Arg), Ácido Glutámico (Glu), Ornitina (Orn), Treonina (Thr) y Lisina (Lys) en mmol/gDCW.h y tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) en  $h^{-1}$

EXPERIMENTO	Arg	Glu	Orn	Thr	Lys	Biomasa	Ácido Clavulánico
1	-0,1000000	-0,1000000	-0,1000000	0,0000000	-0,1000000	0,0826	0
2	0,0000000	-0,1000000	-0,1000000	-0,1000000	-0,1000000	0,0785	0
3	0,0000000	-0,1000000	0,0000000	0,0000000	-0,1000000	0,0652	0
4	0,0000000	0,0000000	-0,1000000	0,0000000	-0,1000000	0,0663	0,0042
5	0,0000000	-0,1000000	-0,1000000	0,0000000	0,0000000	0,0654	0,0042
6	0,0000000	0,0000000	-0,1000000	-0,1000000	0,0000000	0,0645	0,0014
7	0,0000000	-0,1000000	0,0000000	-0,1000000	0,0000000	0,0633	0
8	-0,0500000	-0,0500000	-0,0500000	-0,0500000	-0,0500000	0,0707	0
9	0,0000000	0,0000000	0,0000000	-0,1000000	-0,1000000	0,0642	0
10	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0514	0
11	-0,1000000	0,0000000	-0,1000000	0,0000000	0,0000000	0,0685	0
12	-0,1000000	0,0000000	0,0000000	0,0000000	-0,1000000	0,0686	0
13	-0,1000000	-0,1000000	0,0000000	-0,1000000	-0,1000000	0,0812	0
14	-0,1000000	-0,1000000	-0,1000000	-0,1000000	0,0000000	0,0805	0
15	-0,1000000	0,0000000	-0,1000000	-0,1000000	-0,1000000	-	-
16	-0,1000000	-0,1000000	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0677	0
17	-0,1000000	0,0000000	0,0000000	-0,1000000	0,0000000	0,0667	0
18	-0,0500000	-0,0500000	-0,0500000	-0,0500000	-0,0637593	0,0716	0
19	-0,0500000	-0,0500000	-0,0500000	-0,0500000	-0,1637590	0,0784	0
20	-0,0500000	-0,0500000	-0,1637590	-0,0500000	-0,0500000	-	-
21	-0,0500000	-0,1637590	-0,0500000	-0,0500000	-0,0500000	0,0779	0
22	-0,0500000	-0,0500000	-0,0500000	-0,0500000	-0,0500000	0,0707	0
23	-0,0637593	-0,0500000	-0,0500000	-0,0500000	-0,0500000	0,0721	0
24	-0,0500000	-0,0500000	-0,0500000	-0,1637590	-0,0500000	-	-
25	-0,0500000	-0,0500000	-0,0637593	-0,0500000	-0,0500000	0,0717	0
26	-0,0500000	-0,0500000	-0,0500000	-0,0637590	-0,0500000	0,0714	0
27	-0,1637590	-0,0500000	-0,0500000	-0,0500000	-0,0500000	0,0804	0
28	-0,0500000	-0,0637593	-0,0500000	-0,0500000	-0,0500000	0,0726	0

## REFERENCIAS

1. RAI, Mahendra, KON, Kateryna, GADE, A., INGLE, A., NAGAONKAR, D., PARALIKAR, P. and DA SILVA, S. S. Antibiotic Resistance: Can Nanoparticles Tackle the Problem?. Can Nanoparticles Tackle the Problem? In : *Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches* [online]. Elsevier Inc., 2016. p. 121–143. ISBN 9780128036686. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803642-6.00006-X>
2. GÓMEZ RÍOS, David and RAMÍREZ MALULE, Howard. Bibliometric analysis of recent research on multidrug and antibiotics resistance (2017-2018). *Journal of Applied Pharmaceutical Science* [online]. 2019. Vol. 9, no. 5, p. 112–116. DOI 10.7324/JAPS.2019.90515. Available from: [https://www.japsonline.com/admin/php/uploads/2917\\_pdf.pdf](https://www.japsonline.com/admin/php/uploads/2917_pdf.pdf)
3. WESTER, Astrid Louise, GOPINATHAN, Unni, GJEFLE, Karsten, SOLBERG, Svein Øivind and RØTTINGEN, John Arne. *Antimicrobial Resistance in a One Health and One World Perspective - Mechanisms and Solutions*. Second Edi. Elsevier, 2017. ISBN 9780128037089.
4. VARDANYAN, Ruben and HRUBY, Victor. Chapter 30 – Antibiotics. In : *Synthesis of Best-Seller Drugs* [online]. Academic Press, 2016. p. 573–643. ISBN 978-0-12-411492-0. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124114920000304>
5. RODRÍGUEZ GARCÍA, A and LIRAS, P. Clavulanic acid, a b-lactamase inhibitor: biosynthesis and molecular genetics. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2000. Vol. 54, p. 467–475. Available from: <https://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2399/10.1007/s002530000420>
6. SAUDAGAR, Parag S., SURVASE, Shrikant A. and SINGHAL, Rekha S. Clavulanic acid: A review. *Biotechnology Advances*. 2008. Vol. 26, no. 4, p. 335–351. DOI 10.1016/j.biotechadv.2008.03.002.
7. GÓMEZ-RÍOS, David, RAMÍREZ-MALULE, Howard, NEUBAUER, Peter, JUNNE, Stefan and RÍOS-ESTEPA, Rigoberto. Degradation kinetics of clavulanic acid in fermentation broths at low temperatures. *Antibiotics*. 2019. Vol. 8, no. 1, p. 12–16. DOI 10.3390/antibiotics8010006.
8. VIANA MARQUES, Daniela de Araújo, FEITOSA MACHADO, Suellen Emilliany, SANTOS EBINUMA, Valéria Carvalho, LIMA DUARTE, Carolina de Albuquerque, CONVERTI, Attilio and FIGUEIREDO PORTO, Ana Lúcia. Production of  $\beta$ -lactamase inhibitors by *Streptomyces* species. *Antibiotics*. 2018. Vol. 7, no. 3, p. 1–26. DOI 10.3390/antibiotics7030061.
9. LÓPEZ-AGUDELO, Victor A., GÓMEZ RÍOS, David and RAMÍREZ-MALULE, Howard. Clavulanic Acid Production by *Streptomyces clavuligerus*: Insights from Systems Biology, Strain Engineering, and Downstream Processing. *Antibiotics* [online]. 2021. Vol. 10, no. 1. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-6382/10/1/84/htm>
10. RAMÍREZ-MALULE, Howard. Bibliometric analysis of global research on clavulanic acid. *Antibiotics*. 2018. Vol. 7, no. 4. DOI 10.3390/antibiotics7040102.
11. SANCHEZ HENAO, Claudia Patricia, GOMEZ GRIMALDOS, Nathalia Andrea and QUINTERO DIAZ, Juan Carlos. Producción de ácido clavulánico por fermentación de

- Streptomyces clavuligerus*: Evaluación de diferentes medios de cultivo y modelado matemático. *Dyna* [online]. 2012. Vol. 79, no. 175, p. 158–165. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0012-73532012000500019](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0012-73532012000500019)
12. SAUDAGAR, Parag S. and SINGHAL, Rekha S. Optimization of nutritional requirements and feeding strategies for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Bioresource Technology*. 2007. Vol. 98, no. 10, p. 2010–2017. DOI 10.1016/j.biortech.2006.08.003.
  13. YOUNG, Taran, LI, Yingying and EFTHIMIOU, Georgios. Olive Pomace Oil can be Used as an Alternative Carbon Source for Clavulanic Acid Production by *Streptomyces clavuligerus*. *Waste and Biomass Valorization* [online]. 2020. Vol. 11, no. 8, p. 3965–3970. DOI 10.1007/s12649-019-00719-5. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00719-5>
  14. KIZILDOĞAN, A. K.v. The effect of different vegetable oils on clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligeru*. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*. 2017. Vol. 32, no. 2, p. 223–228. DOI 10.7161/omuanajas.287668.
  15. SER, Hooi Leng, LAW, Jodi Woan Fei, CHAIYAKUNAPRUK, Nathorn, JACOB, Sabrina Anne, PALANISAMY, Uma Devi, CHAN, Kok Gan, GOH, Bey Hing and LEE, Learn Han. Fermentation conditions that affect clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: A systematic review. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2016. Vol. 7, no. APR. DOI 10.3389/fmicb.2016.00522. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00522/full>
  16. PINILLA, Laura, TORO, León F., AVIGNONE-ROSSA, Claudio, PEÑUELA, Mariana and RÍOS-ESTEPA, Rigoberto. *Streptomyces clavuligerus* strain selection for clavulanic acid biosynthesis: A study based on culture composition effects and statistical analysis. *Dyna*. 2018. Vol. 85, no. 205, p. 111–118. DOI 10.15446/dyna.v85n205.69560.
  17. KHAYAT, Sanaz Hasani and KOLAH, Saeid Akbarzadeh. Production of Clavulanic Acid by *Streptomyces clavuligerus* in batch cultures with using wheat bran as the source of carbon. *Journal of Pharmaceutical and Health Sciences* [online]. 2017. Vol. 5, no. 1, p. 51–60. Available from: [http://jphs.iautmu.ac.ir/article\\_529252.html](http://jphs.iautmu.ac.ir/article_529252.html)
  18. BAJESTANI, Ramin Shahrada, NEMAT, Fahimeh and KOLAH, Saeid Akbarzadeh. Production of clavulanic acid by *streptomyces clavuligerus* bacteria using rapeseed meal as the source of nitrogen. *Biomedical and Pharmacology Journal*. 2016. Vol. 9, no. 2, p. 631–637. DOI 10.13005/bpj/983.
  19. TEODORO, Juliana C., BAPTISTA NETO, Alvaro, CRUZ HERNÁNDEZ, Isara L., HOKKA, Carlos O. and BADINO, Alberto C. Influence of feeding conditions on clavulanic acid production in fed-batch cultivation with medium containing glycerol. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006. Vol. 72, no. 3, p. 450–455. DOI 10.1007/s00253-005-0273-6.
  20. GOUVEIA, Ester R., BAPTISTA NETO, Alvaro, BADINO, Alberto C. and HOKKA, Carlos O. Optimisation of medium composition for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnology Letters*. 2001. Vol. 23, no. 2, p. 157–161. DOI 10.1023/A:1010356231673.
  21. RODRIGUES, Kaio César da Silva, TAIRYNE DE SOUZA, Arianne, BADINO, Alberto Colli, PEDROLLI, Danielle Biscaro and CERRI, Marcel Otavio. Screening of medium constituents

for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Brazilian Journal of Microbiology* [online]. 2018. Vol. 49, no. 4, p. 832–839. DOI 10.1016/j.bjm.2018.01.006. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.01.006>

22. CAVALLIERI, André Pastrelo, BAPTISTA, Amanda Salvador, LEITE, Carla Andréa and ARAUJO, Maria Lucia Gonsales da Costa. A case study in flux balance analysis: Lysine, a cephamycin C precursor, can also increase clavulanic acid production. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2016. Vol. 112, p. 42–53. DOI 10.1016/j.bej.2016.03.012. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2016.03.012>

23. RODRIGUES, K. C.S., COSTA, C. L.L., BADINO, A. C., PEDROLI, D. B., PEREIRA, J. F.B. and CERRI, M. O. Application of Acid and Cold Stresses to Enhance the Production of Clavulanic Acid by *Streptomyces clavuligerus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2019. Vol. 188, no. 3, p. 706–719. DOI 10.1007/s12010-019-02953-y.

24. GÓMEZ-RÍOS, David, LÓPEZ-AGUDELO, Victor A., RAMÍREZ-MALULE, Howard, NEUBAUER, Peter, JUNNE, Stefan, OCHOA, Silvia and RÍOS-ESTEPA, Rigoberto. A genome-scale insight into the effect of shear stress during the fed-batch production of clavulanic acid by *streptomyces clavuligerus*. *Microorganisms*. 2020. Vol. 8, no. 9, p. 1–19. DOI 10.3390/microorganisms8091255.

25. VIANA MARQUES, Daniela A., SANTOS-EBINUMA, Valéria C., PESSOA-JÚNIOR, Adalberto, PORTO, Ana L.F., TORRES, Beatriz Rivas and CONVERTI, Attilio. Effect of aeration and agitation on extractive fermentation of clavulanic acid by using aqueous two-phase system. *Biotechnology Progress*. 2016. Vol. 32, no. 6, p. 1444–1452. DOI 10.1002/btpr.2333.

26. YEPES-GARCÍA, Jeferyd, CAICEDO-MONTOYA, Carlos, PINILLA, Laura, TORO, León F. and RÍOS-ESTEPA, Rigoberto. Morphological differentiation of *streptomyces clavuligerus* exposed to diverse environmental conditions and its relationship with clavulanic acid biosynthesis. *Processes*. 2020. Vol. 8, no. 9. DOI 10.3390/pr8091038.

27. WANG, Hui and CHEN, Hongzhang. Clavulanic Acid Production by *Streptomyces clavuligerus* using Solid State Fermentation on Polyurethane Foam. *Trends in Renewable Energy*. 2016. Vol. 2, no. 1, p. 2–12. DOI 10.17737/tre.2016.2.1.0018.

28. NETO, A. B., HIRATA, D. B., CASSIANO FILHO, L. C.M., BELLÃO, C., BADINO, A. C. and HOKKA, C. O. A study on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in batch, FED-batch and continuous processes. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2005. Vol. 22, no. 4, p. 557–563. DOI 10.1590/S0104-66322005000400008.

29. HEIRENDT, Laurent, ARRECKX, Sylvain, PFAU, Thomas, MENDOZA, Sebastián N., RICHELLE, Anne, HEINKEN, Almut, HARALDSDÓTTIR, Hulda S., WACHOWIAK, Jacek, KEATING, Sarah M., VLASOV, Vanja, MAGNUSDÓTTIR, Stefania, NG, Chiam Yu, PRECIAT, German, ŽAGARE, Alise, CHAN, Siu H.J., AURICH, Maike K., CLANCY, Catherine M., MODAMIO, Jennifer, SAULS, John T., NORONHA, Alberto, BORDBAR, Aarash, COUSINS, Benjamin, EL ASSAL, Diana C., VALCARCEL, Luis v., APAOLAZA, Iñigo, GHADERI, Susan, AHOOKHOSH, Masoud, BEN GUEBILA, Marouen, KOSTROMINS, Andrejs, SOMPAIRAC, Nicolas, LE, Hoai M., MA, Ding, SUN, Yuekai, WANG, Lin, YURKOVICH, James T., OLIVEIRA, Miguel A.P., VUONG, Phan T., EL ASSAL, Lemmer P., KUPERSTEIN, Inna, ZINOVYEV, Andrei, HINTON, H. Scott, BRYANT, William A., ARAGÓN ARTACHO, Francisco J., PLANES, Francisco J., STALIDZANS, Egils, MAASS, Alejandro, VEMPALA,

Santosh, HUCKA, Michael, SAUNDERS, Michael A., MARANAS, Costas D., LEWIS, Nathan E., SAUTER, Thomas, PALSSON, Bernhard, THIELE, Ines and FLEMING, Ronan M.T. Creation and analysis of biochemical constraint-based models using the COBRA Toolbox v.3.0. *Nature Protocols*. 2019. Vol. 14, no. 3, p. 639–702. DOI 10.1038/s41596-018-0098-2.

30. TORO, León, PINILLA, Laura, AVIGNONE-ROSSA, Claudio and RÍOS-ESTEPA, Rigoberto. An enhanced genome-scale metabolic reconstruction of *Streptomyces clavuligerus* identifies novel strain improvement strategies. *Bioprocess and Biosystems Engineering* [online]. 2018. Vol. 41, no. 5, p. 657–669. DOI 10.1007/s00449-018-1900-9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-018-1900-9>

31. AKTAŞ, Caner. *Quantitative expression analysis of the genes potentially involved in clavulanic acid overproduction in Streptomyces clavuligerus* [online]. 2018. Available from: <http://etd.lib.metu.edu.tr/upload/12622763/index.pdf>

32. RAMIREZ MALULE, Howard Diego. *Quantitative description of the metabolic capabilities of Streptomyces clavuligerus for clavulanic acid production : A combined constraint-based modeling approach and experimental testing*. 2016.

33. RAMIREZ-MALULE, Howard, JUNNE, Stefan, NICOLÁS CRUZ-BOURNAZOU, Mariano, NEUBAUER, Peter and RÍOS-ESTEPA, Rigoberto. *Streptomyces clavuligerus* shows a strong association between TCA cycle intermediate accumulation and clavulanic acid biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018. Vol. 102, no. 9, p. 4009–4023. DOI 10.1007/s00253-018-8841-8.

34. ORTH, Jeffrey D., THIELE, Ines and PALSSON, Bernhard. What is flux balance analysis? *Nature Biotechnology*. 2010. Vol. 28, no. 3, p. 245–248. DOI 10.1038/nbt.1614.

35. BUSHHELL, Michael E., KIRK, Samantha, ZHAO, Hong Juan and AVIGNONE ROSSA, Claudio A. Manipulation of the physiology of clavulanic acid biosynthesis with the aid of metabolic flux analysis. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006. Vol. 39, no. 1, p. 149–157. DOI 10.1016/j.enzmictec.2006.01.017.

36. VARMA, A. and PALSSON, B. O. Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994. Vol. 60, no. 10, p. 3724–3731. DOI 10.1128/aem.60.10.3724-3731.1994.

37. CHO, Hang Soo, JO, Jin Chul, SHIN, Chang Hun, LEE, Namil, CHOI, Joon Sun, CHO, Byung Kwan, ROE, Jung Hye, KIM, Chan Wha, KWON, Ho Jeong and YOON, Yeo Joon. Improved production of clavulanic acid by reverse engineering and overexpression of the regulatory genes in an industrial *Streptomyces clavuligerus* strain. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* [online]. 2019. Vol. 46, no. 8, p. 1205–1215. DOI 10.1007/s10295-019-02196-0. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02196-0>

38. KURT KIZILDOĞAN, Aslıhan, VANLI JACCARD, Güliz, MUTLU, Alper, SERTDEMİR, İbrahim and ÖZCENGİZ, Gülay. Genetic engineering of an industrial strain of *Streptomyces clavuligerus* for further enhancement of clavulanic acid production. *Turkish Journal of Biology*. 2017. Vol. 41, no. 2, p. 342–353. DOI 10.3906/biy-1608-17.

39. PARADKAR, Ashish. Clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*: Biogenesis, regulation and strain improvement. *Journal of Antibiotics*. 2013. Vol. 66, no. 7, p. 411–420. DOI 10.1038/ja.2013.26.
40. GÓMEZ RÍOS, David, BARRERA ZAPATA, Rolando and RÍOS ESTEPA, Rigoberto. Comparison of process technologies for chitosan production from shrimp shell waste: A techno-economic approach using Aspen Plus®. *Food and Bioproducts Processing* [online]. 2017. Vol. 103, p. 49–57. DOI 10.1016/j.fbp.2017.02.010. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2017.02.010>
41. ROUBOS, Johannes A., KRABBEN, Preben, DE LAAT, Wim T.A.M., BABUŠKA, Robert and HEIJNEN, Joseph J. Clavulanic acid degradation in *Streptomyces clavuligerus* fed-batch cultivations. *Biotechnology Progress*. 2002. Vol. 18, no. 3, p. 451–457. DOI 10.1021/bp020294n.
42. *Streptomyces clavuligerus* Higgins and Kastner (ATCC® 27064™). ATCC [online]. [Accessed 21 January 2021]. Available from: <https://www.atcc.org/Products/All/27064.aspx#generalinformation>
43. THE COBRA TOOLBOX DEVELOPERS. FBA. *The COBRA Toolbox* [online]. 2018. [Accessed 24 January 2021]. Available from: <https://opencobra.github.io/cobratoolbox/stable/modules/analysis/FBA/index.html>
44. *Statgraphics 18* [online]. 2017. The Plains, Virginia : Statgraphics Technologies, Inc. Available from: <https://www.statgraphics.com/centurion-xviii>
45. *SuperPro Designer* [online]. Scotch Plains, NJ : Intelligen Inc. 9.5. Available from: <https://www.intelligen.com/products/superpro-overview/>
46. BERSANETTI, Patrícia A., ALMEIDA, Renata M.R.G., BARBOZA, Marlei, ARAÚJO, Maria Lucia G.C. and HOKKA, Carlos O. Kinetic studies on clavulanic acid degradation. *Biochemical Engineering Journal*. 2005. Vol. 23, no. 1, p. 31–36. DOI 10.1016/j.bej.2004.10.007.
47. GRANATO, Ana C., COSTA, Edson B., ANGELOTTI, Wagner F.D., MALPASS, Geoffroy R.P., BARBOZA, Marlei, DA SILVA, Albérico B.F. and TRSIC, Milan. Precipitation reaction of clavulanic acid: thermodynamic and electronic study. *Quim.Nova* [online]. 2016. Vol. 39, no. 8, p. 968–972. Available from: <https://www.scielo.br/pdf/qn/v39n8/0100-4042-qn-39-08-0968.pdf>
48. MINSALUD. MEDCOL-STAT. [online]. [Accessed 14 December 2020]. Available from: <https://pospopuli.minsalud.gov.co/MEDCOL-STAT/POSEstadisticasMedicamentos.aspx#form1>
49. SAUDAGAR, Parag S. and SINGHAL, Rekha S. A statistical approach using L25 orthogonal array method to study fermentative production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* MTCC 1142. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2007. Vol. 136, no. 3, p. 345–359. DOI 10.1007/s12010-007-9030-x.
50. TEODORO, J. C., BAPTISTA-NETO, A., ARAUJO, M. L.G.C., HOKKA, C. O. and BADINO, A. C. Influence of glycerol and ornithine feeding on clavulanic acid production by *streptomyces clavuligerus*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2010. Vol. 27, no. 4, p. 499–506. DOI 10.1590/S0104-66322010000400001.

51. WANG, Yong Hua, YANG, Bo, REN, Jie, DONG, Mei Ling, LIANG, Dong and XU, An Long. Optimization of medium composition for the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. *Process Biochemistry*. 2005. Vol. 40, no. 3–4, p. 1161–1166. DOI 10.1016/j.procbio.2004.04.010.
52. PRODUCTIVA, Colombia. *Plan De Negocios Sector Farmacéutico Visión a 2032* [online]. 2019. Available from: <https://www.colombiaproductiva.com/CMSPages/GetFile.aspx?guid=3cb6e799-34af-4b7e-8bb3-fa28e6ce5ccf>
53. SWAGELOK ENERGY ADVISORS. Knowing the Cost of Steam. [online]. 2011. No. 31, p. 4. Available from: [http://chicago.swagelok.com/Services/Energy-Services/~~/media/DistributorMedia/C-G/Chicago/Services/ES - Knowing Cost of Steam\\_BP\\_31.ashx](http://chicago.swagelok.com/Services/Energy-Services/~~/media/DistributorMedia/C-G/Chicago/Services/ES - Knowing Cost of Steam_BP_31.ashx)
54. VAKKILAINEN, Esa Kari. Boiler Processes. *Steam Generation from Biomass*. 2017. P. 57–86. DOI 10.1016/b978-0-12-804389-9.00003-4.
55. COMISIÓN DE REGULACIÓN DE ENERGÍA Y GAS. *Especificaciones De Calidad Del Gas Natural En El Punto De Entrada Del Sistema Nacional De Transporte De Gas* [online]. 2008. Available from: [http://apolo.creg.gov.co/Publicac.nsf/1c09d18d2d5ffb5b05256eee00709c02/ffad21a8c27fd8a20525785a007a7086/\\$FILE/D-062-08 NÚMERO DE WOBBE.pdf](http://apolo.creg.gov.co/Publicac.nsf/1c09d18d2d5ffb5b05256eee00709c02/ffad21a8c27fd8a20525785a007a7086/$FILE/D-062-08 NÚMERO DE WOBBE.pdf)
56. EPM. *Aplicación tarifas gas natural* [online]. 2020. Valle de Aburrá. Available from: <https://www.epm.com.co/site/Portals/2/GAS/Tarifas/2020/Tarifa/Tarifa diciembre.pdf?ver=2020-11-26-153341-190>
57. EPM. *Tarifas para servicios de acueducto y aguas residuales* [online]. 2020. Rionegro, Antioquia. Available from: [https://www.epm.com.co/site/Portals/2/Tarifas\\_Aguas/2020/12/Tarifas\\_Aguas\\_Fact\\_DIC\\_2020.pdf?ver=2020-12-09-164918-887](https://www.epm.com.co/site/Portals/2/Tarifas_Aguas/2020/12/Tarifas_Aguas_Fact_DIC_2020.pdf?ver=2020-12-09-164918-887)
58. EPM. *Tarifas y costo de energía eléctrica* [online]. 2020. Rionegro, Antioquia. Available from: [https://www.epm.com.co/site/Portals/2/Documentos/tarifas/energia2020/Publicacion\\_Tarifas\\_Energia\\_Diciembre\\_16\\_2020.pdf?ver=2020-12-16-082225-187](https://www.epm.com.co/site/Portals/2/Documentos/tarifas/energia2020/Publicacion_Tarifas_Energia_Diciembre_16_2020.pdf?ver=2020-12-16-082225-187)