

Simulación del proceso de producción de ácido clavulánico¹

Simulation of the clavulanic acid production process¹

S. Bedoya, A. N. Ardila y R. Barrera

Recibido: junio 7 de 2022 – Aceptado: junio 30 de 2023

Resumen—El Ácido Clavulánico es un metabolito ampliamente utilizado con distintas combinaciones de antibióticos para contrarrestar diferentes enfermedades infecciosas. Este metabolito no se produce en Colombia a pesar de tener una gran demanda a nivel nacional, aparentemente debido a sus altos costos de producción y a la poca información que se tiene del proceso global. En esta investigación se usan diferentes reportes de la literatura para presentar un esquema generalizado de la producción de este metabolito y, con ayuda del software Aspen plus, la implementación de un modelo para simular el proceso de producción, incluyendo etapas de pretratamiento, producción y postratamiento o purificación. El modelo resulta de gran utilidad para analizar costos o evaluar eventuales cambios en el proceso de producción, constituyendo una herramienta útil para el estudio y entendimiento del proceso, así como para la toma de decisiones frente a su eventual implementación.

Palabras clave—Acido clavulánico, Aspen plus, Esquema de producción, Estrategia de simulación, Procesos biotecnológicos, Simulación de procesos.

Abstract—Clavulanic acid is a metabolite widely used with different combinations of antibiotics to counteract different infectious diseases. This metabolite is not produced in Colombia despite having a great demand at a national level, apparently due

to its high production costs and the little information available on the global process. In this research, different literature reports are used to present a generalized scheme of the production of this metabolite and, with the help of Aspen Plus software, the implementation of a model to simulate the production process, including pretreatment, production, and post-treatment or purification stages. The model is very useful to analyze costs or to evaluate eventual changes in the production process, constituting a useful tool for the study and understanding of the process, as well as for decision-making regarding its eventual implementation.

Keywords—Clavulanic acid, Aspen plus, Production scheme, Simulation strategy, Biotechnological processes, Process simulation.

I. INTRODUCCIÓN

EL ácido clavulánico (AC) es un compuesto que se produce por el microorganismo *Streptomyces Clavuligerus* (*Scl*) y se sintetiza a partir del aminoácido arginina (ARG) y el monosacárido gliceraldehído 3-fosfato (GAP). En su forma activa el AC se usa como Clavulanato de potasio (CK) [1] y su presentación para la venta incluye diferentes combinaciones en cuanto a su formulación antibiótica, como por ejemplo la Amoxicilina – clavulanato, que se usa en el tratamiento de infecciones respiratorias como faringitis, bronquitis, neumonía y enfermedades entéricas y de transmisión sexual [2].

En la literatura no se encuentran procedimientos estandarizados ni condiciones de operación definidas para la obtención de AC. La mayoría de los estudios son exploratorios y toman alguno de los siguientes enfoques: i) la selección y combinación de nutrientes y materias primas (incluyendo tipo de cepa y condiciones de cultivo), ii) las condiciones de operación del biorreactor, incluyendo tiempo, temperatura, pH, volumen de reactor y agitación, entre otras, además del modo de operación (lotes, semi-lotes o continuo) y/o iii) el postratamiento o purificación del producto. Es por ello que para el estudio y análisis del sistema de producción de AC es deseable contar con un modelo que permita, mediante simulaciones, integrar diversos cálculos asociados al diseño conceptual del proceso completo, tales como balances de masa y energía, la estimación de propiedades físicas y termodinámicas, dimensionamiento de equipos, costeo de unidades de operación, entre otros, a la vez que ayuda a

¹Producto derivado de la tesis de Maestría en Ingeniería “Simulación y evaluación tecno-económica de la producción de ácido clavulánico en Colombia”, Universidad de Antioquia, 2022, con el apoyo de Minciencias a través del proyecto: Modelación Dinámica y Análisis Técnico Económico de la Producción de Ácido Clavulánico, usando procedimientos alternativos de cultivo de *Streptomyces Clavuligerus*, código 432-2017.

S. Bedoya, Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia UdeA, Calle 70 No. 52-21. Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Medellín, Colombia, email: sbedoyab@unal.edu.co.

A. N. Ardila, Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Medellín, Colombia, email: anardila@elpoli.edu.co.

R. Barrera, Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia UdeA, Calle 70 No. 52-21, Medellín Colombia, email: rolando.barrera@udea.edu.co.

Como citar este artículo: Bedoya, S., Ardila, A. N., y Barrera, R. Simulación del proceso de producción de ácido clavulánico, Entre Ciencia e Ingeniería, vol. 17, no. 33, pp. 46-xx, enero-junio 2023. DOI: <https://doi.org/10.31908/19098367.2830>.



reducir los costos de investigación, riesgos de accidentes e impactos negativos en el medio ambiente (por la generación de residuos) producto de la ejecución de experimentos de laboratorio [3].

Con la ayuda de un modelo que permita simular razonablemente el proceso, es posible planificar diseños de experimentos puntuales bajo las mejores condiciones simuladas, en lugar de extensos y costosos diseños experimentales exploratorios en busca de unas mejores condiciones de operación. No obstante, en la literatura no se encuentra información precisa o detallada sobre la cinética del proceso y/o los mecanismos de reacción para las reacciones bioquímicas que toman parte en la obtención de AC a partir de *ScL*. Por tal razón, la implementación de un modelo generalizado que permita simular el proceso de obtención de AC necesariamente requiere asumir y suponer variados escenarios en busca de un modelo que pueda ser al menos parcialmente validado con la literatura disponible, de modo que resulte de utilidad para estudiar y analizar diferentes condiciones de operación, estimar costos, o ayudar en la toma de decisiones frente a la implementación del proceso de obtención de AC.

Para tal fin, en la presente investigación se realizó un análisis detallado de la literatura, gracias al cual se fijaron o definieron etapas y parámetros de operación y, con ayuda del software Aspen plus, se implementó un modelo que permite simular el proceso completo de la obtención de AC, incluyendo etapas de pretratamiento, producción y purificación del mismo. El modelo resultante se usó para explorar el efecto de diversos parámetros de operación sobre los rendimientos a AC y para la estimación preliminar de costos de producción como los consumos energéticos, requerimientos de materia prima, volumen y costo de equipos, entre otros. Estas estimaciones del modelo resultan útiles como punto de partida hacia estudios de factibilidad y viabilidad de sistemas de producción de AC. Adicionalmente, el modelo puede modificarse para simular condiciones específicas diferentes a las utilizadas en su estructuración, permitiendo de esta forma simular variados escenarios de producción para la obtención de AC.

II. ANÁLISIS DE CONDICIONES DE OPERACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE AC REPORTADAS EN LA LITERATURA

El uso de nutrientes y las condiciones para el pretratamiento (incluyendo el almacenamiento y la reactivación con crecimiento celular) para la producción de AC se presenta de manera diferente en variados reportes de la literatura. Durante la etapa de pretratamiento, es común encontrar reportes donde sugieren temperaturas dentro de los intervalos $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (para el almacenamiento) y $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ (para el crecimiento celular), velocidades de agitación entre 200 rpm y 250 rpm y la adición o uso de nutrientes de variada naturaleza, como glicerol, peptona, extracto de malta y sales de hierro, magnesio y zinc, entre otros [4-7]. Para los estudios donde se utilizan cepas nativas (*ScL*), algunos de los más comunes se resumen en la Tabla I.

TABLA I
FUENTES DE ALIMENTO PARA LA SÍNTESIS DE AC Y OBTENCIÓN DE BIOMASA.

Fuente	Nutrientes	Referencias
Carbono	Glicerol (aceite de palma y oliva), glucosa, almidón.	[4,8-12]
Nitrógeno	Ornitina, prolina, ácido glutámico, proteína aislada de soya, harina de soya, peptona, sulfato de amonio, glutamato monosódico, asparagina.	[8,11,13]
Oxígeno	Oxígeno.	[5,7,13]
Elementos traza	Cloruro de sodio, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, cloruro de manganeso, carbonato de calcio, sulfato de cobre, cloruro de zinc.	[4,12,13]
Soluciones buffer y antiespumantes	Siliconado (Antifoam A), solución buffer (MOPS)	[7-9]
Reguladores de pH	Hidróxido de sodio, ácido clorhídrico y ácido sulfúrico.	[7,8]

La diferente combinación o uso de nutrientes (en cantidad y/o naturaleza), sumado a las diversas condiciones de operación, dan lugar a diferentes rendimientos hacia AC que dificultan la comparación objetiva de los procesos y, por lo tanto, definir a partir de la literatura unas “mejores condiciones” para llevarlo a cabo. En la Tabla II se resumen algunos casos reportados en la literatura.

En la Tabla II se evidencia la variedad de condiciones de operación reportadas para la obtención de AC. También se observa que en variados estudios algunos parámetros son comunes, como por ejemplo temperatura de operación de $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, agitación de 800 rpm o el uso de glicerol como fuente de carbono. Adicionalmente, aunque no sea posible comparar objetivamente los rendimientos hacia AC, las producciones más altas reportadas rondan los 5 g en tiempos de operación entre 90 y 144 h.

Por su parte, la etapa de extracción y purificación del AC ha sido menos explorada, aunque tiene incidencia directa sobre los rendimientos finales y costos de producción. Algunas de las técnicas mencionadas en la literatura, así como algunas de sus principales características se resumen en la Tabla III.

De acuerdo con la Tabla III las técnicas de extracción físicas aparecen como las más convenientes, sin embargo, pueden incluir diversos procesos (filtración, centrifugación y precipitación), además de requerir sustancias adicionales como agentes precipitantes y/o solventes como MIC (metil isobutil cetona) para la insolubilización del AC.

TABLA II.
FUENTES DE ALIMENTO PARA LA SÍNTESIS DE AC Y OBTENCIÓN DE BIOMASA.

Principales Nutrientes	Volumen (l)	Operación del reactor	Agitación (rpm)	Temperatura (°C)	Tiempo de operación (h)	AC (mg/l)	AC (g)	Referencia
Almidón (10 g/L), L-asparagina (2 g/L)	5	Discontinuo o semi-continuo	800	28	80	120	0.6	[14]
Glicerol (20 g/L), harina de soja (15 g/L)	5	Discontinuo	400	28	144	994	4.97	[15]
Glicerol (20 g/L), peptona (10 g/L)	5	Discontinuo o semi-continuo	500	28	130	280	1.40	[16]
Glicerol (15 g/L), proteína de soja (10 g/L)	5	Discontinuo	800	28	70	614	1.80	[5]
Glicerol (15 g/L), proteína de soja (15.5 g/L)	5	semi-continuo	250	28	72	640	3.20	[4]
Glicerol (15 g/L), peptona (10 g/L)	0.5	Discontinuo	250	20	250	1534.3	0.77	[17]
Glicerol (10 g/L), harina de soja (11 g/L)	5	Discontinuo o semi-continuo	800	28	90	1002.6	5.01	[14]
Glicerol (15g/L), proteína de soja (20 g/L)	0.25	Discontinuo	250	27	84	437	0.11	[12]
Glicerol (20 g/L), peptona (10 g/L)	0.5	Semi-continuo	200	28	70	311	0.16	[18]
Glicerol (15g/L), proteína de soja (10 g/L)	4	Continuo o discontinuo	800	28	153	470	1.88	[8]

TABLA III.
TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN HACIA EL AC.

Técnicas de extracción	Observaciones	Referencias
Líquido - Líquido	Limitaciones con el escalado, carácter nocivo para el ambiente y las personas por el uso de solventes y otras sustancias químicas, equipamientos costosos para el manejo de múltiples fases, bajos rendimientos hacia la producción de AC.	[19,20]
Adsorción en columnas empacadas	Fácil contaminación del metabolito, altos costos de operación.	[21]
Sistemas micelares	Relativa poca información disponible.	[22]
Físicas	Resultan menos contaminantes hacia el ambiente en comparación con procesos químicos, relativamente fáciles de implementar, pueden afectar negativamente los rendimientos hacia AC.	[13,23,24]

1) Pretratamiento.

La etapa de pretratamiento incluye tres unidades de operación. La primera para el almacenamiento de la cepa (*ScI*) a una temperatura de -80 °C con glicerol [6,15,25,26]. La segunda para la activación celular mediante el uso de sales y oligoelementos a una temperatura de 28 °C y 220 rpm. La tercera para el crecimiento celular a través del uso de sales y oligoelementos a una temperatura de 28 °C, 220 rpm y pH 6.8. Las unidades dos y tres difieren en las concentraciones de los nutrientes que ingresan a los respectivos sistemas. La corriente que sale de la fase de crecimiento celular y entra hacia el reactor corresponde al 10 % de inóculo [6,7].

2) Producción.

En la etapa de producción de AC se obtiene el metabolito de interés mediante el uso de la cepa nativa (*ScI*) a una temperatura de 28 °C, una agitación de 800 rpm y bajo un flujo de oxígeno de 1 ml/min [5, 16]. Adicionalmente, se utilizan materias primas como sales, glicerol, sulfato de amonio, antiespumantes [11], soluciones buffer y reactivos químicos como NaOH y HCl para el control de pH.

3) Postratamiento o purificación.

Para la etapa de recuperación y purificación, se asume recuperación mediante solventes, dada la relativa escasa información disponible para simular razonablemente otras técnicas [13,23,24]. Para esta, la salida del biorreactor transporta el metabolito y subproductos hacia un proceso de centrifugación donde se separa el sobrenadante (que contiene el AC) de las células (*ScI*). El sobrenadante pasa al sistema de extracción, mientras que las células se recirculan hacia el reactor donde nuevamente son utilizadas para la producción de AC [8].

Posteriormente se insolubiliza el AC utilizando MIC en medio ácido con ácido sulfúrico, luego se precipita con EHK (etil hexanoato de potasio), generando la sal de CK (en una

III. METODOLOGÍA

A. Planteamiento de un esquema del proceso global.

De acuerdo con el análisis de la literatura y con el objeto de simular el proceso para la obtención de AC, en esta investigación se propone el diagrama de flujo conceptual de la Fig. 1. Se consideran las condiciones de operación que, según la literatura, favorecen los mayores rendimientos de

AC. El proceso general se divide en tres etapas: (1) pretratamiento, (2) producción y (3) postratamiento.

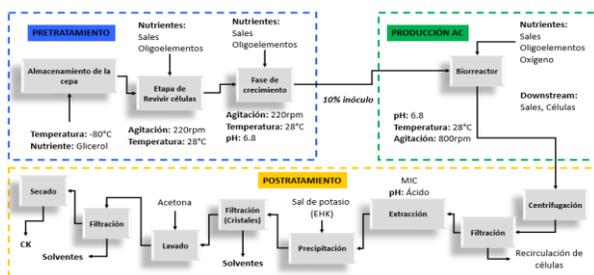


Fig. 1. Diagrama de proceso para la producción de AC.

proporción uno a uno) a pH 2 [27]. La solución y la sal se filtran para separar el CK de los solventes.

Después, la sal de CK se lava con acetona para retirar ácidos grasos e impurezas [13,23]. A continuación, se realiza un filtrado para separar solventes e impurezas remanentes antes de secar el producto final.

B. Simulación del proceso.

Tomando como base el proceso global de la Fig. 1, se implementó en el software Aspen plus el modelo de la Fig. 2. La descripción de las corrientes y equipos respectivos, así como las referencias usadas para las suposiciones, se muestran en la Tabla IV.

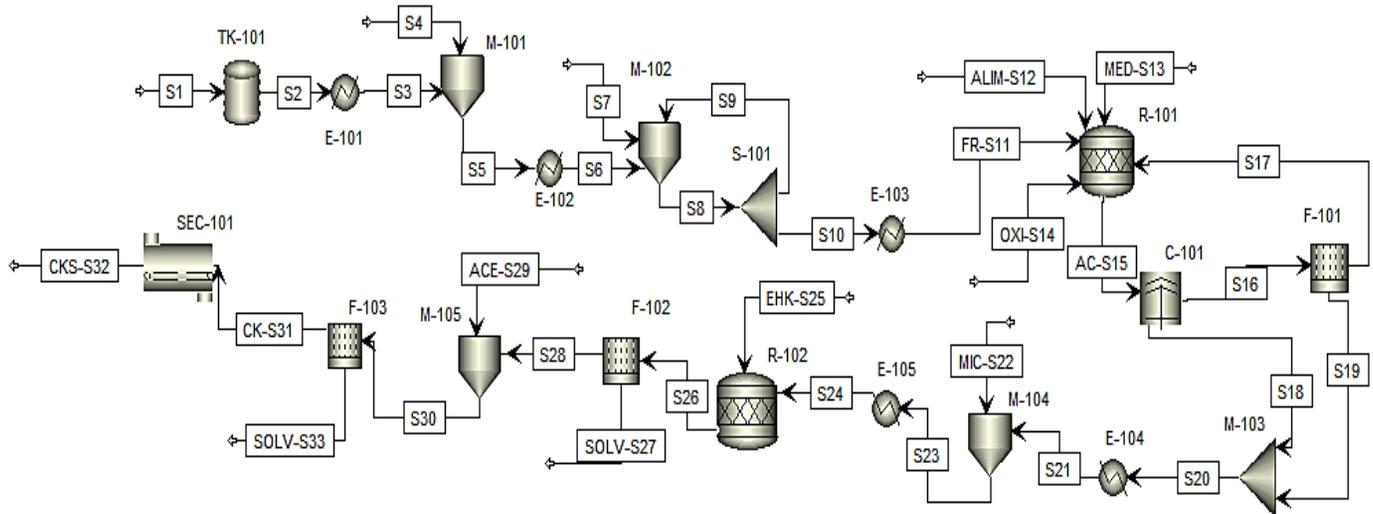


Fig. 2. Diagrama del proceso de obtención de AC en Aspen plus.

TABLA IV.
DESCRIPCIÓN DE CORRIENTES Y EQUIPOS DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE AC (FIG. 2).

Corriente/equipo	Observaciones	Referencias
S1	Células (8 g/L) y glicerol (20%), flujo de 40.126 g/h, -80 °C.	[4,15,18]
TK-101 Tanque (Tank)	Almacena y conserva la cepa con glicerol a -80 °C.	[15]
S2	Corriente de Glicerol y Scl a -80 °C.	-
E-101 Intercambiador (Heater)	Ajusta la temperatura a 28 °C para la fase de reactivación	[15]
S3	Corriente de Glicerol y Scl a 28 °C.	[15]
S4	Nutrientes (316.25 g/h): C ₃ H ₈ O ₃ (15 g/L), extracto de malta (10 g/L), peptona (10 g/L), extracto de levadura (1 g/L), MgSO ₄ .7H ₂ O (0.75 g/L), K ₂ HPO ₄ (2.5 g/L), MOPS (21 g/L), y solución de sales (1 mL/L): MnCl ₂ .4H ₂ O (1 g/L), FeSO ₄ .7H ₂ O (1 g/L) y ZnSO ₄ .7H ₂ O (1 g/L).	[8]
M-101 Mezclador (Hooper)	Mezcla las diferentes sustancias para la reactivación celular a 28 °C y 220 rpm durante 36 h.	[9-11]
S5	Mezcla de S3 y S4.	-
E-102 Intercambiador (Heater)	Mantiene la temperatura constante a 28 °C.	[16,18]
S6	Salida del intercambiador E-102 (28°C).	[16,18]
S7	Nutrientes (257.75 g/h): C ₃ H ₈ O ₃ (15 g/L), proteína de soja 90NB (10 g/L), extracto de levadura (1 g/L), MgSO ₄ .7H ₂ O (0.75 g/L), K ₂ HPO ₄ (0.8 g/L), MOPS (21 g/L) y solución de sales (1mL/L): MnCl ₂ .4H ₂ O (1 g/L), FeSO ₄ .7H ₂ O (1 g/L) y ZnSO ₄ .7H ₂ O (1 g/L).	[8]
M-102 Mezclador	Crecimiento exponencial del microorganismo, 28°C, 36 h.	[9-11]

Corriente/equipo	Observaciones	Referencias
(Hooper)		
S8	Mezcla de S6, S7 y recirculación de S9.	-
S-101 Separador (Fsplit)	Separa el 10 % del inóculo (Scl) hacia el biorreactor, recirculando el resto al mezclador M-102.	[6]
S9	Recirculación del 90 % del inóculo.	[6]
S10	10 % del inóculo hacia el biorreactor (28 °C).	[6]
E-103 Intercambiador (Heater)	Mantiene la temperatura constante a 28 °C.	[6,15]
FR-S11	Inóculo que ingresa al reactor (28 °C).	-
ALM-S12	Alimento (725 g/h): Glicerol (120 g/L), (NH ₄) ₂ SO ₄ (2 g/L), K ₂ HPO ₄ (2 g/L), solución antiespumante (0.1 mL/L), solución buffer MOPS (21 g/L). HCl 4M y NaOH 2M para control de pH en 6.8	[16,23,28,29]
MED-S13	Medio (125.30 g/h): Glicerol (9.3 g/L), (NH ₄) ₂ SO ₄ (1.26 g/L), K ₂ HPO ₄ (0.8 g/L), C ₅ H ₈ NNaO ₄ (9.8 g/L), MgSO ₄ .7H ₂ O (0.72 g/L), FeSO ₄ .7H ₂ O (0.18 g/L), solución de sales (1 mL/L): MnCl ₂ .4H ₂ O (1 g/L), FeSO ₄ .7H ₂ O (1 g/L), ZnSO ₄ .7H ₂ O (1 g/L).	[8,28]
OXI-S14	Oxígeno 1 ml/min (7.145 g/h).	[15]
R-101 Biorreactor (Rstoic)	Reactor de 5 L donde se produce el AC (base para el cálculo de los balances de materia y su posterior estimación de flujos en las corrientes de entrada), 800 rpm, 144 h, 28 °C y pH 6.8	[1,8,15,28]
AC-S15	AC y mezcla de nutrientes y subproductos varios.	-
C-101 Centrifuga (Cfuge)	Separación de sólidos. Se asume operación de 10 min por cada 11.180 g que ingresan al equipo.	[8,27]
S16	Células que se separan en el proceso de centrifugación.	[8]

Corriente/equipo	Observaciones	Referencias
S18	Sobrenadante, subproductos, trazas de células y AC.	-
F-101 filtro (Ssplit)	Recircula las células al reactor R-101. Se asume una retención en el filtro del 95 % de células.	[8]
S17	Células que se recirculan al reactor.	[8]
S19	Trazas de sobrenadante provenientes de la centrifugación y 5 % de células que pasan el filtro.	-
M-103 mezclador (Mixer)	Mezcla las corrientes S18 y S19 a la temperatura de salida del reactor (28°C)	-
S20	Salida del mezclador M-103	-
E-104 intercambiador (Heater)	Disminuye la temperatura de S20 a 15°C para facilitar la extracción de AC.	[27]
S21	Salida del intercambiador E-104 (15°C).	[13,23,24]
MIC-S22	MIC (1015.7 g/h) para insolubilización del AC	[13]
M104 Mezclador (Hopper)	Insolubilización del AC (15 °C, 250 rpm, pH 6.2 (ajustado con ácido sulfúrico), 1 h)	[13,27]
S23	AC insolubilizado y MIC.	-
E-105 Intercambiador (Heater)	Mantiene la temperatura a 15 °C para facilitar la precipitación del AC a CK en el reactor R-102.	[13,23,24]
S24	Salida del intercambiador E-105	-
EHK-S25	Solución de EHK 0.3 M (2.188 g/h), adición lenta (1 gota en 2 minutos).	[13,23,24]
R-102 Reactor (Rstoic)	Precipitación de CK. Se asume estequiometría 1 a 1 entre AC y CK. Volumen de 5 L, 15°C, 250rpm, 1.5 h.	[23,27]
S26	CK precipitado (sal) y solventes	-
F-102 Filtro (Ssplit)	Separa la sal de CK de los solventes y ácidos añadidos. Se asume una retención en el filtro del 95 %.	[8]
SOLV-S27	Purga de MIC y 95 % del agua presente.	[23,27]
S28	Cristales de CK. Por cada 1 g de AC se produce 1.19 g.	[13,23,24]
ACE-S29	Acetona (476.58 g/h) como solvente de lavado.	[13]
M-105 Mezclador (Hopper)	Lavado de los cristales de CK para retirar impurezas como ácidos grasos y trazas de sales.	[23]
S30	Salida del mezclador M-105	-
F-103 Filtro (Ssplit)	Separa la sal CK, la MIC y acetona. Se asume una retención en el filtro del 95 %	[8]
SOLV-S33	Purga de acetona, solventes y agua.	[23,27]
CK-S31	Cristales de CK.	-
SEC-101 Intercambiador (Dryer)	Secado al vacío de los de cristales CK por 24 horas a temperatura ambiente.	[23,27]
CKS-S32	Cristales de CK secos.	-

Para la simulación del modelo (Fig. 2) en Aspen plus, se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones:

-Todos los equipos se asumen isobáricos (1 atm).

-Los equipos simulados no incluyen datos cinéticos, hidrodinámicos ni de dimensionamiento, por lo que pueden asumirse como modelos de caja negra.

-Todos los filtros (incluyendo la centrífuga) se asumen como separadores de sólidos e incluyen distribución de tamaño de partícula.

-Las sustancias que entran a cada uno de los equipos se consideran líquidas y de tipo convencional, exceptuando el microorganismo (biomasa), que se considera un sólido no convencional, con distribución de tamaño de partícula de 0.5 µm. Para la simulación del proceso en el biorreactor no se incluyeron aquellas sustancias que no afectan los rendimientos hacia AC (por ejemplo, MOPS y antiespumantes).

-Las propiedades fisicoquímicas y termodinámicas de las sustancias convencionales utilizadas (L-arginina, glicerol, octanoato de potasio, (NH₄)₂SO₄, O₂, H₂O, CO₂, H₃PO₄, MnCl₂*4W, FeSO₄, ZnSO₄, NaOH, HCl, MgSO₄*W, C₈H₁₅KO₂, C₃H₆O, MIK (C₆H₁₂O₂), entre otras), se tomaron directamente de las bases de datos del software. Por su parte, para sustancias no disponibles en las bases de datos y/o no convencionales (como glutamato monosódico (C₅H₉NO₄) o el ácido clavulánico (C₈H₉NO₅), entre otros), se definieron sus estructuras moleculares y se usaron métodos de contribución de grupos (UNIFAC) para la estimación de sus propiedades. A modo de ejemplo, la Fig. 3 ilustra los grupos funcionales, número de ocurrencias de átomos y estructura para el AC, de acuerdo a sugerencias tomadas de [30].

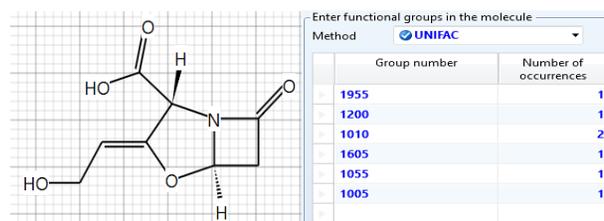
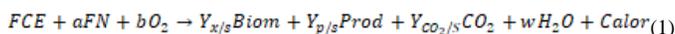


Fig. 3. Compuesto AC y número de átomos y ocurrencias en la molécula usando el método UNIFAC.

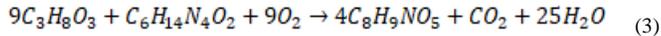
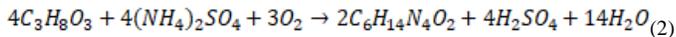
-Ante la limitada información experimental que permita incluir y validar datos cinéticos, el reactor se simula a partir de modelos estequiométricos (RSTOIC) y con base a los rendimientos hacia AC reportados en la literatura.

-De acuerdo con la literatura, aproximadamente por cada 20 g de glicerol se obtiene 1 g de AC [14,15]. Esta relación se usa para estimar la conversión de los reactivos según la estequiometría de la reacción.

-Más allá de la posibilidad de ilustrar el modelo macroscópico mediante la reacción 1 [15], o las múltiples reacciones que pueden o no considerarse según el mecanismo supuesto para la reacción, en esta investigación se utilizan las reacciones 2 y 3 para representar y simular las especies más importantes y los posibles productos.



Con FCE: Fuente de carbono y energía, FN: Fuente de nitrógeno, $Y_{x/s}Biom, Y_{p/s}Prod, Y_{CO_2/s}CO_2$: moles de biomasa, de producto y de CO₂ (respectivamente) formadas por cada mol FCE consumida, a, b, w: coeficientes estequiométricos



-A partir de la fórmula química del *Scl* ($CH_{1.66}N_{0.2}O_{0.27}$) se estimaron, mediante simulaciones, los análisis último y próximo del sólido no convencional [31]. La humedad se estimó como el 73%, correspondiente a la cantidad de agua presente en una célula y el restante se supuso como material volátil (27 %). Las cenizas consideraron el 0 % ya que el microorganismo no contiene sustancias inorgánicas.

-Para la selección de los modelos termodinámicos, se exploraron diferentes opciones disponibles en el software (incluyendo UNIFAC, UNIQUAC, ELECNRTL y PITZER, entre otros). Por comparación entre la predicción de propiedades de las mezclas y sustancias puras presentes en el sistema a partir de diferentes modelos y datos disponibles en la literatura, se eligió el modelo UNIFAC. Adicionalmente, el modelo UNIFAC se recomienda para realizar cálculos de propiedades de mezclas cuando se carece de datos experimentales y de estudios preliminares hacia un proceso en específico.

-El modelo resultante se utilizó para realizar análisis de sensibilidad sobre el efecto de variables de operación como la cantidad de oxígeno, de amonio y de biomasa sobre los rendimientos a AC. Una vez estimadas unas mejores condiciones de operación, el modelo se usó para estimar costos de operación del proceso.

III. RESULTADOS DE LAS SIMULACIONES Y DISCUSIÓN

A. Simulación de la biomasa.

Con relación a la simulación del microorganismo, el porcentaje elemental de la biomasa se muestra en la Tabla V. Con base en estos porcentajes se realizó el cálculo del análisis último para simular la biomasa como un sólido no convencional en el software Aspen plus.

TABLA V.
PORCENTAJE ELEMENTAL DE LA BIOMASA $CH_{1.66}N_{0.2}O_{0.27}$.

	Elementos			
	C	H	O	N
Coefficiente	1	1.66	0.27	0.2
Moles totales	0.47			
Moles	4.81	7.99	1.30	0.96
%	57.75	7.99	20.79	13.47

B. Análisis de sensibilidad sobre parámetros de operación.

Para evaluar las condiciones de alimentación adecuadas en el reactor se realizaron análisis de sensibilidad variando el flujo de entrada de oxígeno, amonio y glicerol, suponiendo la reacción isotérmica a 28 °C. A manera de ejemplo la Fig. 4 muestra la cantidad de AC (g) producidos según el modelo en función de la cantidad de oxígeno. Se encontró que para un

flujo de oxígeno de 0.018 kg/h el valor máximo de AC es de 7.08 g. Como puede observarse en la Fig., hasta alcanzar el máximo hay una correlación directa entre la cantidad de oxígeno suministrado y la cantidad de AC producido. No obstante, la cantidad de AC obtenido para el volumen de reactor supuesto de 5 L se encuentra fuera de los rangos que se reportan en la literatura. De acuerdo con la Fig. 4, la máxima producción de AC reportada (5g) puede lograrse con un flujo de 0.013 kg/h de oxígeno.

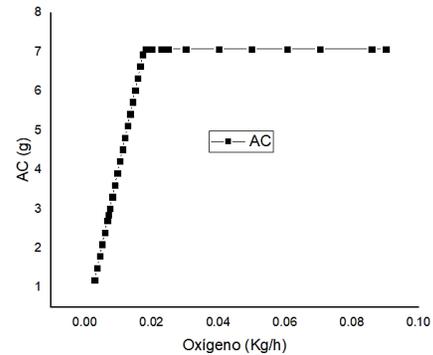


Fig. 4. Efecto del flujo de oxígeno en la cantidad de AC producido

De manera similar y según los análisis de sensibilidad se definieron las mejores condiciones simuladas para el reactor, siendo éstas: temperatura de 28 °C, flujo de oxígeno 0.018 kg/h, flujo de amonio 0.0073 kg/h y flujo de glicerol de 0.6751 kg/h. Con tales flujos y las demás condiciones utilizadas, incluyendo la estequiometría de las reacciones 2 y 3 para las conversiones y rendimientos en el reactor, el modelo predice la producción de 4.14 g de clavulanato de potasio (CK) en un batch de 10 días. Para la estimación de costos de producción a partir del modelo, se extrapoló dicha producción a 149 g de KC al año, suponiendo 3 lotes de producción al mes durante los doce meses del año.

Si bien el modelo estequiométrico usado en este estudio no tiene en consideración parámetros cinéticos en el reactor (como tiempos de residencia, velocidad de reacción, orden de la reacción, entre otros), vale la pena recalcar que, para efectos de la estimación global de los costos del proceso, la inclusión o no de la cinética no les afectan directamente, pues los costos globales pueden estimarse con base en el volumen del reactor y los rendimientos o producción al AC.

C. Estimación de costos.

Para la estimación de los costos de equipos se usaron las herramientas Economics Active, mapping y sizing de Aspen plus. Estas herramientas permitieron acceder a varias características (o especificaciones técnicas) de los equipos que se simularon y posteriormente posibilitaron el cálculo del precio de equipos según la base de datos que suministra el software.

Los costos de utilidades se asumieron en su totalidad en consumo de agua (para los intercambiadores de calor y el secador) y eléctricos (Fig. 2). Lo que se refiere al consumo de agua se cuantificó los (kg) que se deben suministrar a cada equipo de acuerdo con las simulaciones. Por su parte, los

costos eléctricos se obtuvieron a partir de los resultados (en Kwh) que se obtuvieron en la simulación de cada unidad de operación. Como valores de referencia se usaron costos para la electricidad en (Kwh) y el agua en (m^3) promedio para las principales ciudades de Colombia en el año 2021, esto es de \$ 671.65 COP y \$ 3766 COP, respectivamente. El resumen de los costos aproximados para la operación del proceso durante un año se muestra en la Tabla VI y los costos estimados para los equipos en la Tabla VII.

TABLA VI.
COSTOS APROXIMADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE 149 G/AÑO DE CK, DE ACUERDO A LAS SIMULACIONES DEL PROCESO (FIG 2.).

Materia prima	Millones (COP)
Nutrientes	\$ 47.9
Solventes	\$ 33.1
Sales	\$ 7.1
Células (<i>Sc1</i>)	\$ 50.1
Utilidades	
Electricidad	\$ 13.2
Total	\$ 151.4

TABLA VII.
COSTOS DE EQUIPOS.

Costos de equipos de operación		
Equipo/Instrumentos	Cantidad	Millones (COP)
Tanque de almacenamiento	1	\$ 2.6
Intercambiador de calor	5	\$ 0.7
Mezclador	5	\$ 3.5
Separador	1	\$ 0.8
Reactor	2	\$ 7.4
Centrífuga	1	\$ 3.7
Filtro	3	\$ 6.3
Secador	1	\$ 1.6
Total		\$ 26.6

IV. CONCLUSIONES

La información que se tiene del proceso con base en la literatura es limitada y exclusiva a la escala de laboratorio, sin unas condiciones estándar definidas, por lo que la simulación del proceso de producción de AC puede llegar a ser compleja, en especial a una escala de producción mayor. Aun así, tomando como referente la información disponible de la literatura, se estructuró un modelo donde es posible analizar unas mejores condiciones para el proceso, permitiendo simular la obtención de 4.14 g de CK/batch (10 días) utilizando flujo de oxígeno de 0.018 kg/h, flujo de amonio de 0.0073 kg/h, flujo de glicerol de 0.6751 kg/h y volumen de reactor de 5 l a una temperatura de 28 °C. El modelo también permite estimar unos costos anuales en reactivos y utilidades cercanos a los 150 millones de pesos y/o unos costos en equipamiento cercanos a los 27 millones de pesos, para la implementación del proceso piloto. Por tal razón, el modelo implementado en Aspen plus resulta de gran utilidad para estudiar y analizar

conceptualmente el proceso de obtención de AC incluyendo etapas de preparación o adecuación, producción, y postratamiento o purificación.

Es importante resaltar que para efectos de un análisis técnico-económico detallado, es necesario incluir el costo de otras sustancias que intervienen en el proceso, como reguladores de pH y/o antiespumantes; así como costos asociados a la mano de obra, control de calidad, créditos bancarios, etc, no incluidos en esta investigación ya que ante la ausencia de un escenario físico real para fijar o suponer tales parámetros, su incorporación en el estimado de costos del proceso a partir del modelo presentado termina siendo altamente subjetiva.

AGRADECIMIENTOS

A Minciencias y UdeA por el apoyo a través del proyecto Modelación Dinámica y Análisis Técnico Económico de la Producción de Ácido Clavulánico, usando procedimientos alternativos de cultivo de *Streptomyces Clavuligerus*, código 432-2017.

REFERENCIAS

- [1] P. S. Saudagar, S. A. Survase, and R. S. Singhal, "Clavulanic acid: A review," *Biotechnol. Adv.*, vol. 26, no. 4, pp. 335–351, 2008.
- [2] C. Tooke et al., "β-Lactamases and β-Lactamase Inhibitors in the 21st Century," *J. Mol. Biol.*, vol. 431, no. 18, pp. 3472–3500, 2019.
- [3] Y. Zhang et al., "Experiments and simulation of varying parameters in cryogenic flue gas desulfurization process based on Aspen plus," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 259, no. November 2020, p. 118223, 2021.
- [4] L. C. G. Domingues, J. C. Teodoro, C. O. Hokka, A. C. Badino, and M. L. G. C. Araujo, "Optimisation of the glycerol-to-ornithine molar ratio in the feed medium for the continuous production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*," *Biochem. Eng. J.*, vol. 53, no. 1, pp. 7–11, 2010.
- [5] J. C. Rosa, A. B. Neto, C. O. Hokka, and A. C. Badino, "Influence of dissolved oxygen and shear conditions on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 27, no. 2, pp. 99–104, 2005.
- [6] J. A. Roubos, P. Krabben, W. T. A. M. De Laat, R. Babuška, and J. J. Heijnen, "Clavulanic acid degradation in *Streptomyces clavuligerus* fed-batch cultivations," *Biotechnol. Prog.*, vol. 18, no. 3, pp. 451–457, 2002.
- [7] D. Gómez-Ríos et al., "A genome-scale insight into the effect of shear stress during the fed-batch production of clavulanic acid by *streptomyces clavuligerus*," *Microorganisms*, vol. 8, no. 9, pp. 1–19, 2020.
- [8] Á. Baptista-Neto, J. C. Teodoro, L. C. M. Cassiano Filho, A. C. Badino, and C. O. Hokka, "Comparisons between continuous and batch processing to produce clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*," *Brazilian Arch. Biol. Technol.*, vol. 48, no. SPEC. ISS., pp. 97–104, 2005.
- [9] C. L. L. Costa and A. C. Badino, "Overproduction of clavulanic acid by extractive fermentation," *Electron. J. Biotechnol.*, vol. 18, no. 3, pp. 154–160, 2015.
- [10] R. Pérez-Redondo, I. Santamarta, R. Bovenberg, J. F. Martín, and P. Liras, "The enigmatic lack of glucose utilization in *Streptomyces clavuligerus* is due to inefficient expression of the glucose permease gene," *Microbiology*, vol. 156, no. 5, pp. 1527–1537, 2010.
- [11] J. C. Teodoro, A. Baptista-Neto, M. L. G. C. Araujo, C. O. Hokka, and A. C. Badino, "Influence of glycerol and ornithine feeding on clavulanic acid production by *streptomyces clavuligerus*," *Brazilian J. Chem. Eng.*, vol. 27, no. 4, pp. 499–506, 2010.
- [12] K. C. da S. Rodrigues, A. T. de Souza, A. C. Badino, D. B. Pedrolli, and M. O. Cerri, "Screening of medium constituents for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*," *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 49, no. 4, pp. 832–839, 2018.

- [13] C. Martin, T. Thomas, and R. Christopher, "Purified Clavulanic Acid and Salts thereof," 6051703-US006051703A, 2000.
- [14] C. Bellão, T. Antonio, M. L. G. C. Araujo, and A. C. Badino, "Production of clavulanic acid and cephamycin c by streptomycetes clavuligerus under different fed-batch conditions," *Brazilian J. Chem. Eng.*, vol. 30, no. 2, pp. 257–266, 2013.
- [15] C. P. Henao, N. A. Grimaldos, and J. C. Diaz, "Producción de ácido clavulánico por fermentación de *Streptomyces clavuligerus*: Evaluación de diferentes medios de cultivo y modelado matemático," *DYNA*, vol. 79, no. 175, pp. 158–165, 2012.
- [16] K. C. Chen, Y. H. Lin, C. M. Tsai, C. H. Hsieh, and J. Y. Houg, "Optimization of glycerol feeding for clavulanic acid production by streptomycetes clavuligerus with glycerol feeding," *Biotechnol. Lett.*, vol. 24, no. 6, pp. 455–458, 2002.
- [17] C. L. L. Costa and A. C. Badino, "Production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* in batch cultures without and with glycerol pulses under different temperature conditions," *Biochem. Eng. J.*, vol. 69, pp. 1–7, 2012.
- [18] K. C. Chen, Y. H. Lin, J. Y. Wu, and S. C. J. Hwang, "Enhancement of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* with ornithine feeding," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 32, no. 1, pp. 152–156, 2003.
- [19] P. Panas, C. Lopes, M. O. Cerri, S. P. M. Ventura, V. C. Santos-Ebinuma, and J. F. B. Pereira, "Purification of clavulanic acid produced by *Streptomyces clavuligerus* via submerged fermentation using polyethylene glycol/cholinium chloride aqueous two-phase systems," *Fluid Phase Equilib.*, vol. 450, pp. 42–50, 2017.
- [20] C. S. Da Silva, M. F. Cuel, V. O. Barreto, W. H. Kwong, C. O. Hokka, and M. Barboza, "Separation of clavulanic acid from fermented broth of amino acids by an aqueous two-phase system and ion-exchange adsorption," *N. Biotechnol.*, vol. 29, no. 3, pp. 428–431, 2012.
- [21] M. B. S. Forte, C. Taviot-Guêho, F. Leroux, M. I. Rodrigues, and F. Mauger Filho, "Clavulanic acid separation on fixed bed columns of layered double hydroxides: Optimization of operating parameters using breakthrough curves," *Process Biochem.*, vol. 51, no. 4, pp. 509–516, 2016.
- [22] R. B. Haga, V. C. Santos-Ebinuma, M. De Siqueira Cardoso Silva, A. Pessoa, and C. O. Rangel-Yagui, "Clavulanic acid partitioning in charged aqueous two-phase micellar systems," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 103, pp. 273–278, 2013.
- [23] Joaquim P. Cardoso, "Process for the isolation of pharmaceutically acceptable alkali metal salt of Clavulanic Acid," 6417352 B1-US006417352B1, 2002.
- [24] V. C. Otero; M. Moreno; M. Lopez; A. Collados de la vieja; A. "Process for the production of Clavulanic Acid and/or salts thereof."
- [25] S. C. S. Lavarda, C. O. Hokka, and M. L. G. C. Araujo, "Clavulanic acid production processes in a tower bioreactor with immobilised cells," *Biochem. Eng. J.*, vol. 39, no. 1, pp. 131–136, 2008.
- [26] D. Gómez-Ríos, H. Ramírez-Malule, P. Neubauer, S. Junne, and R. Ríos-Esteva, "Data of clavulanic acid and clavulanate-imidazole stability at low temperatures," *Data Br.*, vol. 23, 2019.
- [27] D. B. Hirata et al., "Precipitation of clavulanic acid from fermentation broth with potassium 2-ethyl hexanoate salt," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 66, no. 3, pp. 598–605, 2009.
- [28] H. Ramirez-Malule et al., "TCA cycle and its relationship with clavulanic acid production: A further interpretation by using a reduced genome-scale metabolic model of *Streptomyces clavuligerus*," *Bioengineering*, vol. 8, no. 8, 2021.
- [29] H. L. Ser et al., "Fermentation conditions that affect clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: A systematic review," *Front. Microbiol.*, vol. 7, no. APR, 2016.
- [30] Barrera, R., Villa, A.L., Montes C. (2009). Measurement of Activity Coefficients at Infinite Dilution for Acetonitrile, Water, Limonene, Limonene Epoxide and their Binary Pairs. *Fluid Phase Equilibria*. (275), 46 – 51.
- [31] K. Chater, "Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*," *Microbial.*, R. In Losick., Ed. 1986, pp. 89–115.

Santiago Alexander Bedoya Betancur. Magíster en Ingeniería, Ingeniero Químico. Áreas de desempeño Catálisis Ambiental y Energías Renovables. Grupo de Investigación al que pertenece: CAMER – Catálisis Ambiental y Energías Renovables del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid.

Alba Nelly Ardila Arias. Doctor en Ingeniería Química, Magister en Ciencias Químicas, Especialista en Manejo y Gestión del Recurso Hídrico. Licenciado en Biología y Química. Áreas de desempeño Química Analítica y

Análisis Instrumental. Grupo de Investigación al que pertenece Catálisis Ambiental y Energías Renovables (CAMER) del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7675-0647>.

Rolando Barrera Zapata. Doctor en Ingeniería, Magister en Ciencias Químicas. Ingeniero Químico. Área de desempeño Ingeniería Química. Grupo de Investigación al que pertenece CERES Agroindustria & Ingeniería. Nombre de la Institución: Universidad de Antioquia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8718-9242>.