

**Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo**

**João Paulo Sato Saito**

**Identificação das principais variáveis de processo para a  
biossíntese de antibiótico em escala industrial**

**São Paulo**

**2021**

João Paulo Sato Saito

Identificação das principais variáveis de processo para a biossíntese de antibiótico  
em escala industrial

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo – IPT, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Processos Industriais.

Data da aprovação \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Profa. Dra. Elisabeth F. P. Augusto  
(Orientadora)  
Mestrado Processos Industriais

Membros da Banca Examinadora:

Profa. Dra. Elisabeth F. P. Augusto (Orientadora)  
Mestrado Processos Industriais

Profa. Dra. Rosane A. Moniz Piccoli (Membro)  
IPT – Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo

Dra. Tatiane Araujo (Membro)  
Instituição Confidencial

João Paulo Sato Saito

Identificação das principais variáveis de processo para a biossíntese de  
antibiótico em escala industrial

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo – IPT, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Processos Industriais.

Área de Concentração: Desenvolvimento e Otimização de Processos Industriais

Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth F. P. Augusto

São Paulo  
Julho/2021

Ficha Catalográfica  
Elaborada pelo Departamento de Acervo e Informação Tecnológica – DAIT  
do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo - IPT

S158i     **Saito, João Paulo Sato**  
Identificação das principais variáveis de processo para a biossíntese de antibiótico em escala industrial. / João Paulo Sato Saito. São Paulo, 2021.  
58p.

Dissertação (Mestrado em Processos Industriais) - Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo. Área de concentração: Desenvolvimento e Otimização de Processos Industriais.

Orientador: Profa. Dra. Elisabeth F. P. Augusto

1. Biossíntese de antibióticos 2. Processo industrial 3. Variáveis de processo 4. Escala industrial 5. Actinomiceto 6. Melhoria de desempenho 7. Tese I. Augusto, Elisabeth F. P., orient. II. IPT. Unidade de Negócios de Ensino Tecnológico III. Título

2022-07 CDU 67.02(043)

## DEDICATÓRIA

À minha família, por ser a base da minha vida, meu maior exemplo e a minha maior motivação em buscar ser uma pessoa melhor a cada dia.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, professora Beth, que dedicou um tempo precioso para me acompanhar durante toda essa longa jornada.

Aos meus amigos e mentores, Bruno e Marcio, por sempre compartilharem seus conhecimentos comigo.

## RESUMO

A ordem dos *Actionomicetos* é composta por bactérias capazes de produzir antibióticos (metabólitos secundários), sendo vários deles utilizados na agropecuária como melhoradores de desempenho. A produção desses metabólitos secundários em escala industrial pode ser separada em duas etapas: biossíntese e recuperação. A biossíntese em escala industrial, composta pelas fases de germinação (crescimento celular) e produção, possui uma grande quantidade de variáveis de processo, susceptíveis a variações involuntárias. Historicamente na indústria em estudo, o uso de biorreatores mecanicamente agitados na etapa produtiva apresentavam resultados de produtividade em produto inferiores aos biorreatores do tipo coluna de bolhas. Com o objetivo de identificar as principais variáveis de processo da biossíntese, foram selecionados lotes de produção de um processo que faz uso de *Actinomiceto* e que compartilharam o mesmo inóculo e utilizaram as mesmas matérias-primas, denominados lotes pares, possibilitando a concentração do estudo exclusivamente nos parâmetros de processo da etapa de produção, incluindo a geometria do reator (tanque agitado e coluna de bolhas). Outro critério de seleção utilizado foi em relação à produtividade de antibiótico, sendo que para o conjunto 1 foram selecionados lotes pares com boas produtividades (acima de 0,750, numa escala normalizada) e, no conjunto 2, lotes pares nos quais aqueles advindos do biorreator de coluna de bolhas apresentavam boa produtividade, porém aqueles gerados no biorreator mecanicamente agitado apresentavam baixa produtividade. As variáveis de processo dos biorreatores com agitação mecânica do primeiro e do segundo conjunto foram comparadas para identificar possíveis causas dessa diferença de resultado. Em relação ao crescimento celular, observou-se que os valores máximos atingidos nos dois grupos foram semelhantes, mas os lotes do primeiro conjunto atingiram esses valores em tempos de processo menores. A velocidade de consumo de glicose e de fonte secundária de carbono também foi mais elevada nos lotes do primeiro conjunto. Contudo, foi identificado que este comportamento não foi a causa da diferença de produtividade e sim uma consequência. O controle do oxigênio dissolvido foi preciso, com pouca oscilação em relação ao *setpoint* (0,33, valor normalizado). Por isso, neste estudo não foi considerado uma das causas da diferença de produtividade. O valor médio de concentração de residual de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), principalmente nas primeiras 40 horas de processo, apresentou grande diferença entre os dois conjuntos. O valor médio do conjunto 1 foi de 0,186 e do conjunto 2 foi de 0,418 (valores normalizados). Esta mesma diferença de residual não foi observada em tempos de processo superiores a 40h. Por esta razão, nas condições avaliadas neste estudo, concluiu-se que a manutenção da concentração de residual de nitrato em valores menores ou iguais a 0,200 (valor normalizado) influencia positivamente a biossíntese de antibiótico.

Palavras-Chave: Antibiótico. Actinomicetos. Produtividade em produto. Escala industrial. Coluna de bolhas. Tanque agitado. Oxigênio dissolvido. Residual de nitrato.

## ABSTRACT

### Identification of the main process variables to antibiotic biosynthesis in industrial scale.

The order *Actinomycetales* is composed by bacteria capable of producing antibiotics (secondary metabolites), a great part of them is used in livestock as performance enhancer. Its production can be divided in two steps: biosynthesis and recovery. The biosynthesis of antibiotics in industrial scale, composed by seed stage and production stage, is affected by a high number of process variables, susceptible to unintentional variations. Historically at the industry related with this study, stirred tank bioreactors presented antibiotic productivities lower than bubble column bioreactors. Aiming to identify the main process variables for antibiotic biosynthesis, production batches of a process that uses *Actinomycetes* and shared the same inoculum and the same raw materials, also known as pair batches, were selected, allowing to concentrate this study exclusively on process parameters related with production stage, including the reactors' design (stirred tank and bubble column). Another selection criterion was related with antibiotic productivity, for the group 1 it was selected pairs batches with high productivities (above 0,750, in a standardized scale) and, in group 2, it was selected pairs batches that the bubble column presented high productivity, but the stirred tank presented low productivity. The process variables of batches produced in stirred tanks of both groups were compared to identify possible causes of these differences in antibiotic productivities. Regarding cell growth, it was observed that the maximum values of both groups were similar, but the batches on group 1 reached these values sooner than group 2. Glucose and secondary carbon source consumption were higher in batches of the group 1. However, it was identified that this behavior was not the cause of antibiotic productivity differences, it was a consequence. Dissolved oxygen (DO) control was efficient, with little oscillation around the setpoint (0,33, standardized value). For this reason, in this study, DO control was not considered one of the causes of productivities differences. The average of nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) concentration, mainly during the first 40h of process, presented great difference between the two groups. The medium value of group 1 was 0,186 and for group 2 it was 0,418 (standardize values). This same difference was not noted above 40 hours of process. Therefore, within the conditions evaluated in this study, it was concluded that maintaining nitrate concentration bellow 0,200 (standardize value) has a good impact on antibiotic biosynthesis.

Keywords: Antibiotic. Actinomycetes. Productivity in product. Industrial scale. Bubble column. Stirred tank. Dissolved oxygen. Nitrate residual.

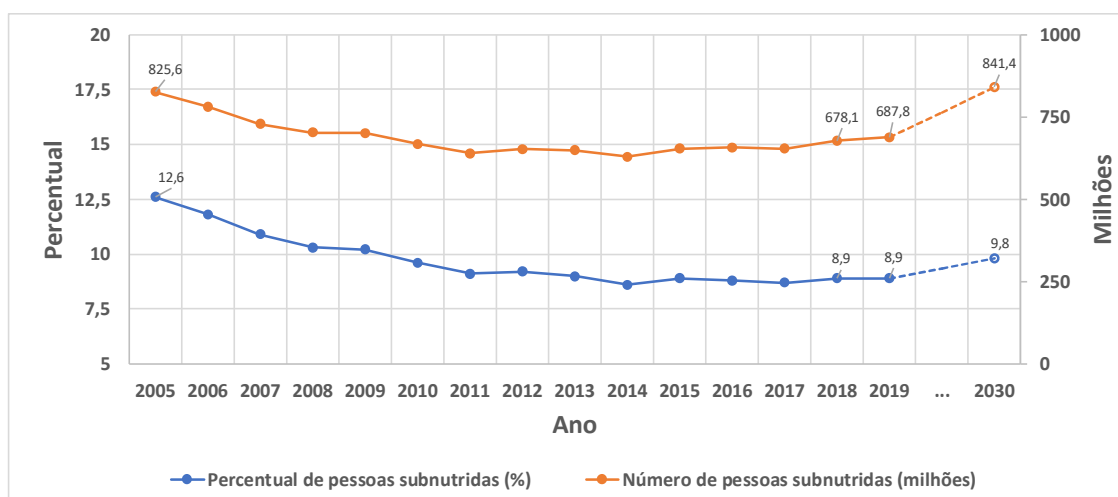




## 1 INTRODUÇÃO

Após uma queda constante por mais de uma década, a desnutrição mundial voltou a crescer em 2015. No ano de 2019, atingiu 690 milhões de pessoas, equivalente a 8,9% da população mundial, de acordo com *Food and Agriculture Organization - FAO* (2020). Conforme a Figura 1.1, houve um aumento expressivo de 10 milhões de pessoas afetadas pela desnutrição entre os anos de 2018 e 2019, o que indica uma tendência de crescimento. Com esta tendência, a previsão é que, no ano de 2030, o número de pessoas afetadas pela subnutrição seja de 841,4 milhões ou 9,8% da população mundial.

**Figura 1.1 - Número de pessoas afetadas pela desnutrição no mundo de 2005 a 2019, com projeção para 2030.**



Fonte: adaptado da *Food and Agriculture Organization* e colaboradores. 2020. *The State of Food Security and Nutrition in the World 2020*.

No Brasil, o número estimado de pessoas em grave situação alimentar é de 10,3 milhões de pessoas, o que equivale a um crescimento de 3 milhões de pessoas nessa situação em 5 anos, segundo o último levantamento realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2021).

Neste cenário, o uso da tecnologia para auxiliar a produção de alimentos de maneira mais sustentável e eficiente é uma das melhores ferramentas para se combater os altos índices mencionados anteriormente.

No campo da biotecnologia, desde a década de 40, sabe-se que alguns antibióticos, quando ministrados na alimentação de animais, atuam como promotores de crescimento. Contudo, apenas na década de 50 os antibióticos

passaram a ser ministrados continuamente e em baixa concentração nas rações. O uso dessas substâncias como melhoradores de desempenho visa, principalmente, melhorar a saúde dos animais e aumentar a eficiência no consumo de nutrientes fornecidos na ração. De maneira geral, esses antibióticos agem no sistema digestivo do animal, controlando a microbiota presente no intestino e, conseqüentemente, diminuindo a competição por nutrientes, segundo Gonzales e colaboradores (2012).

Por outro lado, uma preocupação que vem crescendo é o aparecimento de bactérias resistentes a uma grande quantidade de antibióticos, decorrente do uso incorreto desses medicamentos. Esta crescente preocupação impulsionou o surgimento de grupos como o *Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR)* da Organização Mundial da Saúde (OMS). Este grupo, fundado em 2008, tem como objetivos principais combater a resistência antimicrobiana e minimizar o seu impacto na saúde pública associado ao uso de antibióticos em animais destinados a alimentação (*World Health Organization, 2017*). No Brasil, um exemplo de ação acerca deste tema foi a proibição dos antimicrobianos tilosina, lincomicina e tiamulina como aditivos melhoradores de desempenho, por serem substâncias classificadas como importantes na medicina humana, de acordo com a Instrução Normativa (IN) nº1 de 2020 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (2021).

O presente estudo analisou a etapa industrial de biossíntese de um antibiótico, atualmente aprovado para uso como melhorador de desempenho, por meio de um actinomiceto. Nesta etapa, há uma grande quantidade de variáveis que podem impactar o desempenho da biossíntese do metabólito secundário de maneiras diferentes, causando, em alguns casos, lotes com baixa produtividade no produto de interesse. Por meio de comparações dos comportamentos das variáveis de processo a partir de análises de dados industriais, é possível identificar causas prováveis dessa oscilação de desempenho. Por isso, este estudo focou em selecionar lotes industriais com produtividades diferentes e comparar os perfis das variáveis de processo, com o objetivo de identificar os principais gatilhos para a produção do antibiótico.

Por questões de sigilo industrial, não serão informados linhagem celular, meio de cultura e produto de interesse e os dados de processo analisados foram todos normalizados pelo maior valor de cada variável.

## 7 CONCLUSÃO

Com base na comparação dos valores normalizados das variáveis de processo dos lotes industriais estudados, foi possível concluir que:

Não foi identificada uma diferença significativa do crescimento máximo obtido nos lotes do primeiro e do segundo conjunto. Por outro lado, os lotes do primeiro conjunto atingiram a fase estacionária de crescimento mais rapidamente (conjunto 1: de 29 a 37h; conjunto 2: de 37 a 44h);

O tempo para início da adição de glicose e para consumo total da segunda fonte de carbono foi menor nos lotes do primeiro conjunto (conjunto 1: 43 a 45h para início da adição de glicose e 32 a 45h para consumo total da segunda fonte de carbono; conjunto 2: 47h para início da adição de glicose e 45 a 49h para consumo total da segunda fonte de carbono). Contudo, nas primeiras 40h, também foi possível observar que: os residuais de glicose e da segunda fonte de carbono tiveram valores iniciais próximos em todos os lotes (vide Tabela 5.6), os tempos para atingir a concentração celular máxima foram próximos ( $CV = 16\%$ ) e não houve adição de glicose nesse período (as adições se iniciaram entre 43 e 47h). Estes fatos indicam que esta velocidade de consumo maior no conjunto 1 foi uma consequência e não a causa das diferenças de produtividade;

O OD e a vazão de ar, apesar de fundamentais para o processo produtivo de metabólitos secundários com actinomicetos, nos lotes estudados demonstrou um controle preciso em relação ao valor de *setpoint*. Por isso, não pode ser considerado uma das causas das diferenças de produtividades entre os dois conjuntos;

A diferença entre os perfis de residual de nitrato dos conjuntos foi a mais notória. Claramente, os lotes com boas produtividades apresentaram valores médios mais baixos de concentração residual de nitrato nas primeiras 40 horas de processo, quando comparados com os lotes com baixas produtividades (0,186 e 0,418, respectivamente). Adicionalmente, os lotes pares (coluna de bolhas), que apresentaram boas produtividades, também tiveram médias de concentração residual de nitrato nas primeiras 40 h baixas (conjunto 1: 0,168; conjunto 2: 0,162), semelhantes à concentração média do primeiro conjunto dos tanques agitados (0,186). Esta mesma diferença entre concentrações residuais de nitrato relacionada ao desempenho dos lotes não foi observada em tempos de processo maiores que 40 h, ou seja, em tempos de processo acima de 40 h, a produtividade do lote

aparenta não estar tão correlacionada com a concentração residual média de nitrato. Por essas razões, nas condições avaliadas neste estudo, conclui-se que a manutenção da concentração de residual de nitrato em valores menores ou iguais a 0,20 influencia positivamente a biossíntese do antibiótico em estudo;

A estratégia adotada para seleção dos lotes pares a serem estudados, baseada na técnica de *data mining*, possibilitou o foco do estudo nas variáveis da etapa de produção de metabólito secundário e a identificação de padrões relacionados ao desempenho dos lotes em condições reais de operação.