

# Otimização do cultivo de *Burkholderia gladioli* BRM 58833 por fermentação submersa

Pedro Alves Martins<sup>1</sup>, Diogo Keiji Nakai<sup>2</sup>, Thaís Fabiana Chan Salum<sup>3</sup>

## Resumo

O objetivo do estudo foi entender as melhores condições de fermentação da *Burkholderia gladioli* BRM 58833 submersa a partir de condições encontradas na literatura para a produção de enzima com atividade lipolítica elevada. Para isso, foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), considerando três variáveis (pH, concentração de fosfato de amônio e óleo de dendê) em cinco níveis e em cinco diferentes tempos. Resultou-se então em cinco conjuntos de análises estatísticas e 15 cinéticas. As análises estatísticas dos dados indicaram que apenas o cultivo de 24 horas apresentou um coeficiente de ajuste adequado do modelo gerado, porém com atividades lipolíticas inferiores aos tempos mais longos. O modelo gerado indica que menor concentração de fosfato de amônio e pH próximo da neutralidade tendem a mostrar atividades lipolíticas mais elevadas. Essa tendência foi verificada nos tempos subsequentes (48 horas, 72 horas, 96 horas e 168 horas).

**Termos para indexação:** *Burkholderia gladioli*, otimização, cinética, lipase.

## Introdução

A produção de lipases por microrganismos tem sido objeto de intensa pesquisa, por sua ampla aplicação em diversas indústrias, incluindo a de alimentos, detergentes e biocombustíveis. *Burkholderia* é um gênero de bactérias conhecido por sua capacidade lipolítica, e a espécie *Burkholderia gladioli* BRM 58833 mostrou-se promissora para essa finalidade.

Com o objetivo de determinar as melhores condições para a produção da lipase de *B. gladioli* BRM 58833 por fermentação submersa, realizou-se uma pesquisa bibliográfica detalhada sobre a produção de lipases de outras espécies de *Burkholderia* por esse método. Oliveira et al. (2015) observaram que o cultivo de *B. lata* em meio contendo gordura de frango e fosfato de amônio resultou em uma alta atividade lipolítica em seu extrato.

O presente estudo teve como objetivo otimizar as condições de fermentação submersa para a produção de lipase por *B. gladioli* BRM 58833, partindo das condições ótimas para o mesmo gênero encontradas na literatura. Buscou-se, assim, obter um extrato enzimático com atividade lipolítica elevada, que pudesse ser potencialmente utilizado em diversas aplicações industriais.

<sup>1</sup> Biólogo, doutor em Biologia Microbiana, Embrapa Agroenergia, pedropam.bio@gmail.com

<sup>2</sup> Engenheiro de bioprocessos e biotecnologista, mestre em Ciências Mecânicas, Embrapa Agroenergia, diogo.nakai@embrapa.br

<sup>3</sup> Farmacêutica, doutora em Bioquímica, Embrapa Agroenergia, thais.salum@embrapa.br

## Materiais e métodos

### Planejamento experimental

A otimização da produção de lipases por fermentação submersa utilizando a cepa *B. gladioli* BRM 58833 foi planejada por meio de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) em cinco tempos diferentes, que consideraram três variáveis (pH, concentração de fosfato de amônio e óleo de dendê) em cinco níveis, conforme apresentado nas Tabelas 1A e 1B a seguir. Assim, foram originados cinco DCCRs e 15 cinéticas.

**Tabela 1A.** Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com três variáveis.

Experimento	pH	[(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ]	[óleo de dendê]
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

**Tabela 1B.** Codificação de cada condição do DCCR.

Variável	-1,68	-1	0	1	1,68
pH	6	6,81	8	9,19	10
[(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ]	5	9,05	15	20,95	25
[óleo de dendê]	1	5,655	12,5	29,345	24

### Preparo do inóculo

A cepa bacteriana *Burkholderia gladioli* BRM 58833 utilizada neste trabalho pertence à Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias (CMMAABio) da Embrapa Agroenergia. Retirou-se a cepa do estoque no ultrafreezer (-80 °C) e estriou-se em uma placa de Petri contendo meio Luria-Bertani (LB) com ágar para obtenção de colônias isoladas. A placa foi incubada na estufa a 30 °C para o crescimento das colônias.

Após o crescimento de colônias isoladas, uma colônia foi inoculada em frasco contendo o meio de cultivo LB e incubada sob agitação a 150 rpm a 28 °C por 24 horas. Quando a densidade

ótica (DO) atingiu a absorvância de 0,5, retirou-se 1 mL para cada um dos 17 experimentos descritos na Tabela 2B.

## Preparo dos meios de cultivo

Foram preparadas as soluções descritas na Tabela 2A a seguir.

**Tabela 2A.** Composição e preparação das soluções A, B, C, D e E utilizadas no experimento. Os pesos e volumes indicados foram utilizados para obter as concentrações desejadas de cada componente nas soluções.

Solução	Componente	Peso (g)	Volume (mL)
A	$K_2HPO_4$ 10 g/L (10x concentrada)	1,02	100
B	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5 g/L (10x concentrada)	0,50	100
C	NaCl 3,8 g/L (10x concentrada)	0,382	100
D	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L (100x concentrada)	0,0103	10
E	$(NH_4)_3PO_4$ 50 g/L	15,04	300

A seguir, foram preparados os meios de cultivo conforme a Tabela 2B a seguir.

**Tabela 2B.** Quantidades de cada componente (A, B, C, D e E) e volumes de água e óleo de dendê utilizados em cada um dos 17 experimentos de preparo de meio de cultivo.

Experimento	A (ml)	B (ml)	C (ml)	D ( $\mu$ L)	E (ml)	Água (ml)	Óleo de Dendê ( $\mu$ L)
1	5	5	5	500	9,05	25,45	282
2	5	5	5	500	9,05	25,45	282
3	5	5	5	500	20,95	13,55	282
4	5	5	5	500	20,95	13,55	282
5	5	5	5	500	9,05	25,45	967
6	5	5	5	500	9,05	25,45	967
7	5	5	5	500	20,95	13,55	967
8	5	5	5	500	20,95	13,55	967
9	5	5	5	500	15	19,5	625
10	5	5	5	500	15	19,5	625
11	5	5	5	500	5	29,5	625
12	5	5	5	500	25	9,5	625
13	5	5	5	500	15	19,5	50
14	5	5	5	500	15	19,5	1200
15	5	5	5	500	15	19,5	625
16	5	5	5	500	15	19,5	625
17	5	5	5	500	15	19,5	625

## Análise da atividade lipolítica

Uma curva padrão de *p*-nitrofenol foi preparada em microplaca de 96 poços, com nove pontos em triplicata (200  $\mu$ L por poço) nas seguintes concentrações em  $\mu$ mol/L: 450, 300, 150, 90, 60, 45, 30, 15 e 7.

Prepararam-se as seguintes soluções: solução A\*, contendo, 3 mg/mL de *p*-NPP (palmitato de *p*-nitrofenila) em isopropanol; e a solução B\*, contendo tampão fosfato de sódio 50 mmol/L (pH 7), triton X-100 0,44% e goma arábica 0,11%.

Após 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas e 168 horas de cultivo, alíquotas de 1.200  $\mu$ L de cada frasco foram retiradas em ambiente estéril e centrifugadas a 10.000 rpm e 4 °C por 15 min para separar a fração das células e o sobrenadante do cultivo. Então, 20  $\mu$ L de cada sobrenadante foram misturados com 180  $\mu$ L da solução C\* (A\*:B\*, 1:9) em triplicatas na placa de 96 poços. A placa foi então incubada a 37 °C, e a leitura foi feita em intervalos de 10 s por 1 min a 410 nm. A atividade foi calculada em função de U/mL, em que U é definido como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu$ mol de *p*-nitrofenol por minuto sob as condições de ensaio.

### Análise estatística do DCCR

Os dados de atividades enzimáticas de cada tempo foram tratados no programa PROTIMIZA, gerando cinco conjuntos de análises estatística. Dentre eles, estão a ANOVA, a análise de Pareto para avaliação do efeito de cada variável e suas interações, a equação gerada para modelar os valores experimentais, o gráfico de superfície das variáveis estatisticamente significativas e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) que mede o ajuste entre os valores experimentais e preditos pelo modelo.

### Cinética

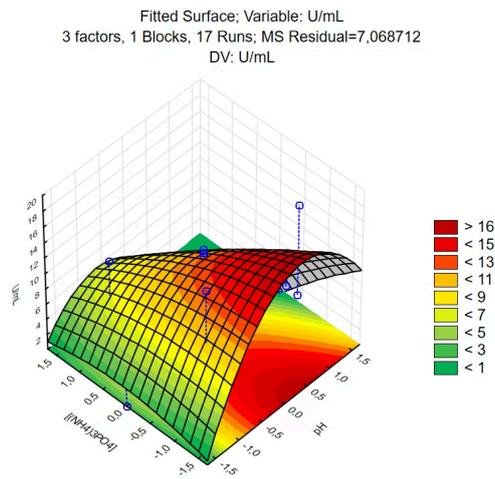
De forma a complementar, os dados de atividades enzimáticas de cada um dos 15 tratamentos do DCCR foram compilados num gráfico que permite visualizar comparativamente os níveis de atividades obtidas no decorrer do tempo.

## Resultados e discussão

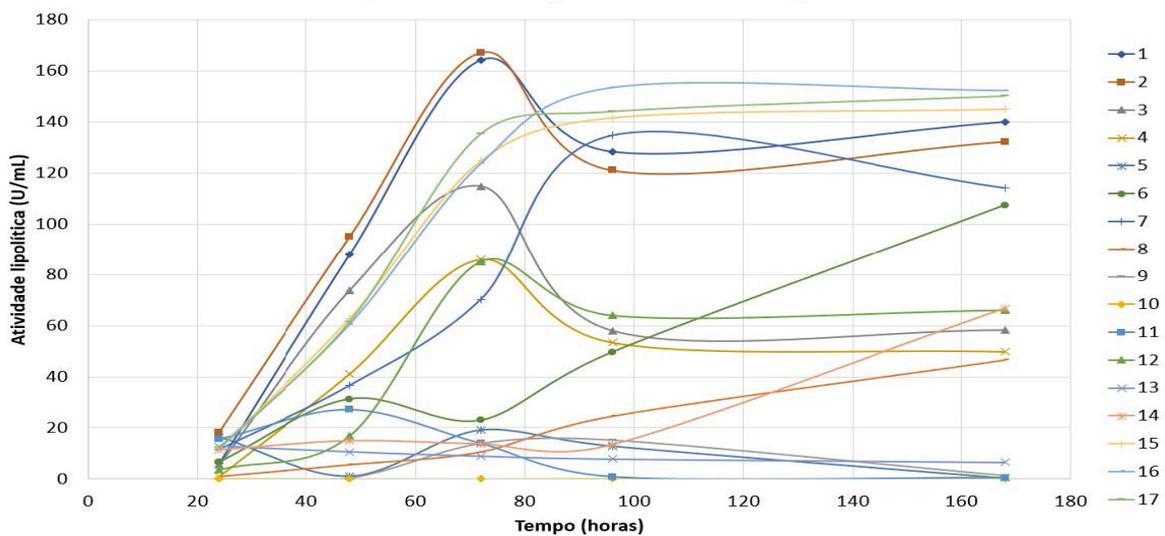
As análises estatísticas (Tabela 3) indicaram que os dados referentes ao cultivo de 24 horas atendem aos critérios para construção de um modelo preditivo. A análise de Pareto (nível de significância de 0,1) mostrou que as variáveis pH e concentração de fosfato de amônio são estatisticamente significativas para o modelo de cultivo no tempo de 24 horas. A Figura 1 mostra a superfície de contorno para essas variáveis, mostrando uma tendência de melhores resultados em pH mais neutro e menores concentrações de fosfato de amônio. No entanto, observou-se que as atividades lipolíticas obtidas em 24 horas são consideravelmente inferiores às observadas em tempos mais avançados de cultivo (Figura 2). As condições de cultivo referentes aos frascos 1 e 2 resultaram em atividades lipolíticas mais elevadas e em menor tempo. A terceira condição com maior atividade lipolítica correspondeu ao ponto central do experimento estatístico e foi considerado o ponto de ótimo para o trabalho de referência com *B. lata*.

**Tabela 3.** Dados estatísticos do DCCR. x1 – pH do cultivo. x2 – concentração de fosfato de amônio. x3 – óleo de dendê.

Tempo (h)	ANOVA	Pareto (<0,1)	$R^2$ (%)
24	Há diferença entre os tratamentos	x1 <sup>2</sup> , x2, x1.x2, x1.x3	91,49
48	Não há diferença entre os tratamentos	-	-
72	Não há diferença entre os tratamentos	-	-
96	Não há diferença entre os tratamentos	-	-
168	Não há diferença entre os tratamentos	-	-



**Figura 1.** Superfície de resposta do cultivo para as variáveis estatisticamente significativas (pH e concentração de fosfato de amônio) no tempo de 24 horas.



**Figura 2.** Cinéticas de cultivo por fermentação submersa. *Burkholderia gladioli* BRM 58833 nas diferentes condições do DCCR.

## Conclusão

As análises estatísticas dos dados indicaram que apenas o cultivo de 24 horas apresentou um coeficiente de ajuste adequado do modelo gerado, porém com atividades lipolíticas inferiores aos tempos mais longos. O modelo gerado indica que uma menor concentração de fosfato de amônio e um pH próximo da neutralidade tendem a mostrar atividades lipolíticas mais elevadas. Essa tendência foi verificada nos tempos subsequentes (48 horas, 72 horas, 96 horas e 168 horas). Os resultados sugerem que a produção da lipase de *Burkholderia gladioli* BRM 58833 por fermentação submersa apresenta potencial de melhoria.

## Referências bibliográficas

OLIVEIRA, B. H.; SANTOS, R. É.; LOIOLA, L. E. A.; NASCIMENTO, F. G. Overproduction and properties of lipase by a wild strain of *Burkholderia lata* LBBO-BL02 using chicken fat. *Annals of Microbiology*, v. 65, n. 2, p. 865-877, 2015.