



Acta Scientiarum. Technology

ISSN: 1806-2563

eduem@uem.br

Universidade Estadual de Maringá  
Brasil

Carvalho, Walter; Ferraz, André; Ferreira Milagres, Adriane Maria  
Uso de carvão ativado e resina de troca iônica para limpeza e concentração de enzimas em extratos  
de madeira biodegradada  
Acta Scientiarum. Technology, vol. 32, núm. 4, 2010, pp. 347-354  
Universidade Estadual de Maringá  
Maringá, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=303226529012>

- ▶ Como citar este artigo
- ▶ Número completo
- ▶ Mais artigos
- ▶ Home da revista no Redalyc

# Uso de carvão ativado e resina de troca iônica para limpeza e concentração de enzimas em extratos de madeira biodegradada

Walter Carvalho\*, André Ferraz e Adriane Maria Ferreira Milagres

Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Estrada Municipal do Campinho, s/n, 12602-810, Lorena, São Paulo, Brasil. \*Autor para correspondência. E-mail: carvalho@debiq.eel.usp.br

**RESUMO.** *Ceriporiopsis subvermispora* foi utilizado para a biodegradação de cavacos de *Eucalyptus grandis* na presença ou ausência de cossubstratos (glicose e milhocina) durante 7, 14 e 28 dias. Os cavacos obtidos em cada um desses períodos foram extraídos com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,5) adicionado de 0,01% de Tween 60. A atividade de manganês peroxidases (MnPs) nos extratos foi marcante ao longo de todo o período de biodegradação, tanto na ausência (430, 765 e 896 UI kg<sup>-1</sup>, respectivamente) quanto na presença de cossubstratos (1.013, 2.066 e 2.323 UI kg<sup>-1</sup>, respectivamente). Os extratos apresentaram elevadas relações entre absorbância a 280 e a 405 nm, indicando forte abundância de compostos aromáticos derivados da lignina em relação à heme-peroxidases. A adsorção em carvão ativado se mostrou uma estratégia adequada para reduzir a absorbância a 280 nm em todos os extratos. Além disso, permitiu maximizar a capacidade de um leito de resina trocadora de ânions (DEAE Sepharose), utilizado para concentrar as MnPs presentes nos referidos extratos. Concluiu-se que o uso de carvão ativado seguido de adsorção em DEAE Sepharose é uma estratégia que pode ser utilizada para concentrar MnPs em extratos obtidos durante a biodegradação de *E. grandis* por *C. subvermispora*.

**Palavras-chave:** *Ceriporiopsis subvermispora*, *Eucalyptus grandis*, manganês peroxidases.

**ABSTRACT.** Use of activated charcoal and ion-exchange resin to clean up and concentrate enzymes in extracts from biodegraded wood. *Ceriporiopsis subvermispora* was used for the biodegradation of *Eucalyptus grandis* chips in the presence or absence of co-substrates (glucose and corn steep liquor) during 7, 14 and 28 days. Afterwards, the biodegraded chips were extracted with 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.5) supplemented with 0.01% Tween 60. High activities of manganese peroxidases (MnPs) were observed in all the extracts, both in the absence (430, 765 and 896 UI kg<sup>-1</sup>, respectively) and in the presence of co-substrates (1,013; 2,066 and 2,323 UI kg<sup>-1</sup>, respectively). The extracts presented a high ratio between absorbances at 280 and 405 nm, indicating a strong abundance of aromatic compounds derived from lignin over heme-peroxidases. Adsorption into activated charcoal showed to be an adequate strategy to reduce the absorbance at 280 nm in all the extracts. Moreover, it allowed to maximize the capacity of an anion exchange resin bed (DEAE-Sepharose) used to concentrate the MnPs present in the extracts. It was concluded that the use of activated charcoal followed by adsorption into DEAE Sepharose is a strategy that can be used to concentrate MnPs in extracts obtained during the biodegradation of *E. grandis* by *C. subvermispora*.

**Key words:** *Ceriporiopsis subvermispora*, *Eucalyptus grandis*, Manganese peroxidases

## Introdução

Estudos desenvolvidos na Escola de Engenharia de Lorena têm mostrado que manganês peroxidases (MnPs) são as principais enzimas oxidativas detectadas durante a biodegradação de madeira por *Ceriporiopsis subvermispora* (FERRAZ et al., 2003; CRUZ et al., 2004; GUERRA et al., 2005; AGUIAR et al., 2006).

Recentemente, foi observado que a suplementação de cavacos de *Eucalyptus grandis* com glicose e milhocina acarreta aumentos consideráveis

na atividade de MnPs recuperada nos extratos enzimáticos (VICENTIM; FERRAZ, 2007).

Característica comum entre os fungos capazes de promover a biodegradação da madeira, as MnPs apresentam-se como uma família de isoenzimas que podem ser codificadas por genes distintos regulados diferencialmente por diversos fatores, incluindo idade do cultivo e disponibilidade de nutrientes (MARTINEZ, 2002; ARO et al., 2005). Em face disso, algumas perguntas permanecem ainda por serem respondidas com relação aos estudos descritos nos parágrafos anteriores:

a) A que se deve o aumento na atividade enzimática observado na presença de cossubstratos: à expressão mais acentuada de uma única isoenzima ou à expressão de isoenzimas diferentes?

b) No caso de se verificar a presença de múltiplas isoenzimas, quais as diferenças nos espectros de ação e nas concentrações de  $Mn^{2+}$  e  $H_2O_2$  requeridas por cada uma delas para oxidar compostos com estruturas distintas?

Para responder à primeira pergunta, cavacos de *E. grandis* suplementados ou não com glicose e milhocina foram submetidos à biodegradação pelo fungo supramencionado e, então, utilizados para o preparo de extratos enzimáticos. Devido aos baixos teores de proteínas e à presença maciça de compostos aromáticos derivados da lignina, o perfil de proteínas presentes nos extratos enzimáticos supramencionados não pôde ser avaliado diretamente por eletroforese em gel de poliacrilamida. Para que bandas proteicas bem definidas pudessem ser identificadas no gel, os teores de compostos aromáticos tiveram de ser reduzidos (por pré-tratamento com carvão ativado) e as proteínas tiveram de ser concentradas (por adsorção em resina trocadora de ânions) consideravelmente (CARVALHO et al., 2008).

No presente trabalho, apresentamos a caracterização dos extratos enzimáticos obtidos durante a biodegradação de cavacos de *E. grandis*, suplementados ou não com cossubstratos (glicose e milhocina), pelo fungo *C. subvermispora*. Em seguida, descrevemos as estratégias utilizadas tanto para a remoção dos compostos aromáticos derivados da lignina quanto para a concentração das MnPs, as quais permitiram comparar, por meio de eletroforeses desnaturante e nativa, os perfis das principais proteínas extracelulares produzidas pelo fungo em condições diferenciadas de cultivo.

## Material e métodos

### **Microrganismo, preparo do inóculo e biodegradação dos cavacos**

*Ceriporiopsis subvermispora* SS-3, mantido em ágar extrato de malte (2%) a 4°C, foi repicado (20 discos com diâmetro de 8 mm) em frascos Erlenmeyer de 2 L contendo 200 mL de meio à base de extrato de batata-dextrose (2,4%) e extrato de levedura (0,7%). Após 12 dias de incubação estática a 27°C, o micélio foi filtrado, lavado e macerado com água estéril.

Biorreatores de polietileno com capacidade de 20 L foram preenchidos com 2 kg de cavacos de *E. grandis* (base seca) e mantidos imersos em água por um período de 12h. Após drenagem e esterilização a 121°C por 15 min., os biorreatores foram inoculados

com uma alíquota da suspensão descrita no parágrafo anterior, de forma a se obter uma concentração inicial de micélio igual a 500 mg por kg de madeira (base seca), e suplementados (CN) ou não (SN) com cossubstratos, glicose (0,5% p p<sup>-1</sup>) e milhocina (0,5% p p<sup>-1</sup>). Os biorreatores inoculados foram então agitados para homogeneização de seu conteúdo e incubados a 27°C, utilizando-se fluxo de ar igual a 23 L h<sup>-1</sup>. Para cada uma das duas condições de cultivo avaliadas (CN ou SN), foram inoculados três biorreatores. Cada um deles forneceu os cavacos biodegradados para o preparo dos extratos enzimáticos nos tempos de 7, 14 e 28 dias.

### **Preparo dos extratos enzimáticos**

Para a obtenção dos extratos enzimáticos, o conteúdo do biorreator (micélio e cavacos) foi transferido, em frações de 200 g, para Erlenmeyers de 2 L contendo 500 mL do tampão de extração (acetato de sódio 50 mM em pH 5,5 adicionado de 0,01% de Tween 60) e mantido em agitação de 120 rpm a 10°C por um período de 4h. Os extratos enzimáticos assim obtidos foram então centrifugados a 3.400 g por 15 min., para a remoção de materiais particulados.

### **Remoção dos extractivos e derivados da lignina presentes nos extratos**

Para a remoção de compostos aromáticos nos extratos enzimáticos, os experimentos foram realizados em tubos Eppendorff de 2 mL, empregando-se 1,5 mL de extrato e concentrações variadas de polivinilpolipirrolidona ou carvão ativado. Após homogeneização manual por 30 min. à temperatura ambiente, o sobrenadante foi recuperado por centrifugação a 12.000 g por 15 min.

### **Concentração das MnPs presentes nos extratos**

Os extratos CN 14 dias e CN 28 dias foram concentrados em uma coluna trocadora de ânions. Cada extrato foi pré-tratado de forma diferente antes de aplicá-lo na coluna. O extrato CN 14 dias teve seu pH ajustado para 4,8 com ácido acético 2 M, sendo posteriormente carregado na coluna (10,2 x 0,98 cm) empacotada com resina DEAE Sepharose CL 6B. Por outro lado, o extrato CN 28 dias foi pré-tratado com 7% de carvão ativado em agitador rotatório a 100 rpm e 30°C por 30 min., sendo o sobrenadante recuperado por filtração a vácuo. Após ajuste de pH para 4,8 com ácido acético 2 M, o extrato foi carregado na coluna. Previamente ao carregamento dos extratos, a coluna foi equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,8), sendo as operações de carregamento, lavagem e eluição operadas a 0,50 – 0,75 mL min.<sup>-1</sup>. Para lavagem da coluna, empregou-se o tampão de

equilíbrio. Para eluição, foi utilizado gradiente de concentração de NaCl (entre 0 e 0,5 M).

### Determinação das atividades enzimáticas

As atividades enzimáticas, expressas em UI kg<sup>-1</sup> de madeira ou UI mL<sup>-1</sup> de extrato, foram determinadas conforme segue: a atividade de endoglucanases foi determinada acompanhando-se a quantidade de açúcares redutores liberados durante a hidrólise de CMC. A atividade de celobiohidrolases foi determinada acompanhando-se a quantidade de açúcares redutores liberados durante a hidrólise de Avicel. A atividade de  $\beta$ -glicosidases foi determinada acompanhando-se a quantidade de p-nitrofenol liberado durante a hidrólise de p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo. A atividade de xilanases foi determinada acompanhando-se a quantidade de açúcares redutores liberados durante a hidrólise de xilana de birchwood. A atividade de  $\beta$ -xilosidases foi determinada acompanhando-se a quantidade de p-nitrofenol liberado durante a hidrólise de p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo. A atividade de mananases foi determinada acompanhando-se a quantidade de açúcares redutores liberados durante a hidrólise de manana de locust bean. A atividade de lacases foi determinada acompanhando-se a oxidação de ABTS. A atividade de manganês peroxidases foi determinada acompanhando-se a oxidação de vermelho de fenol. A atividade de lignina peroxidases foi determinada acompanhando-se a oxidação de Azure B. Uma unidade internacional (UI) de atividade enzimática foi considerada como a quantidade de enzima que catalisa a conversão de 1  $\mu$ mol de substrato ou produto por minuto.

### Resultados e discussão

#### Determinação das atividades enzimáticas presentes nos extratos

A Tabela 1 apresenta as atividades de algumas enzimas hidrolíticas e oxidativas nos extratos preparados a partir da madeira biodegradada por diferentes períodos na presença ou ausência de cossubstratos.

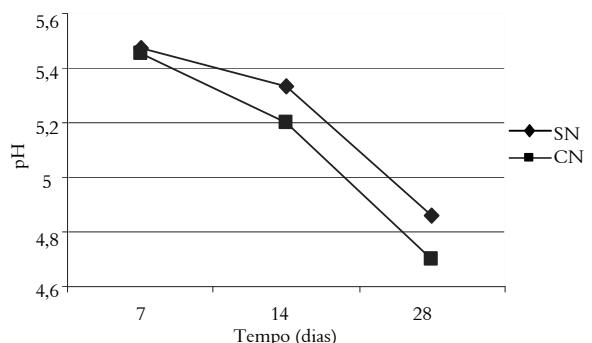
**Tabela 1.** Atividades enzimáticas (UI kg<sup>-1</sup>) determinadas nos extratos de *E. grandis* biodegradado por *C. subvermispora* durante diferentes períodos, na presença (CN) ou ausência (SN) de cossubstratos.

Enzima	7 dias		14 dias		28 dias	
	SN	CN	SN	CN	SN	CN
Endoglucanases	54	135	133	275	110	137
Celobiohidrolases	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -glicosidases	9	16	15	23	87	132
Xilanases	260	402	376	541	123	252
$\beta$ -xilosidases	-	-	-	-	-	-
Mananases	381	385	213	267	87	75
Lacases	10	6	2	1	6	29
Manganês peroxidases *	430	1.013	765	2.066	896	2.323
Lignina peroxidases	-	-	-	-	-	-

-: Não-detectada; \*: pH da mistura reacional igual a 4,3.

Com relação à atividade de MnPs, verificou-se que a mesma aumentou gradativamente durante o período de biodegradação, tanto na presença quanto na ausência de cossubstratos. Na presença de cossubstratos, a atividade de MnPs foi sempre consideravelmente superior àquela observada na ausência de cossubstratos, independentemente do tempo de cultivo. Esses dados corroboram o efeito positivo da adição de cossubstratos aos cavacos de *E. grandis* na maximização da atividade de MnPs recuperada nos extratos, conforme reportado por Vicentim e Ferraz (2007).

Verificou-se que, embora próximo, o pH da mistura reacional utilizada para se determinar a atividade de MnPs diferiu do pH do tampão succinato (4,5), utilizado no método proposto por Lundell et al. (1990). De fato, incluindo os extratos enzimáticos (Figura 1), todos os constituintes da mistura reacional utilizada para a determinação da atividade de MnPs apresentaram pH superior ao pH do tampão (lactato de sódio 50 mM - pH 6,4; vermelho de fenol 0,1% - pH 7,6, sulfato de manganês 1 mM - pH 5,6; albumina bovina 1,8% - pH 6,8), deslocando, assim, o equilíbrio ácido-base da mistura para um pH mais elevado.

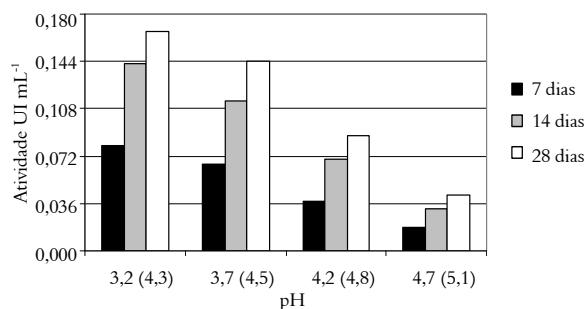


**Figura 1.** Valores de pH determinados nos extratos de *E. grandis* biodegradados por *C. subvermispora* na presença (CN) ou ausência (SN) de cossubstratos em função do tempo.

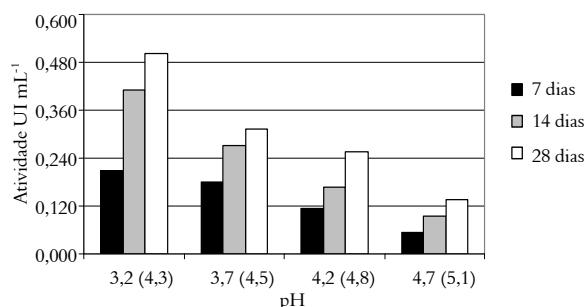
Alguns ensaios foram então realizados para se verificar o efeito do uso de tampão succinato com diferentes pHs sobre o pH da mistura reacional e também sobre a atividade de MnPs (Figuras 2 e 3). Nesses experimentos, manteve-se a força iônica dos tampões com diferentes pHs em 50 mM, com o objetivo de não se alterar a força iônica da mistura reacional, o que também poderia afetar a atividade enzimática.

Conforme pode ser observado, para todos os valores de pH do tampão testados o pH da mistura reacional foi superior ao valor esperado. Independentemente da presença ou não de cossubstratos, o uso de tampão com menor pH (3,2) resultou em maior atividade enzimática em todos os

tempos de cultivo. Nem com o aumento da força iônica do tampão entre 100 e 500 mM obteve-se um valor de pH da mistura reacional idêntico ao do tampão. Além disso, o ajuste, com HCl concentrado, do pH da mistura reacional contendo tampão succinato 50 mM, de 5,1 para 4,3, resultou em redução superior a 25% na atividade enzimática. Face ao exposto, optou-se por quantificar a atividade de MnPs nos diferentes extratos, utilizando-se tampão succinato 50 mM em pH 3,2, ou pH 4,3 na mistura reacional.



**Figura 2.** Atividade de MnPs em função dos valores de pH do tampão succinato 50 mM e da mistura reacional (entre parênteses) ao longo do cultivo na ausência de cossubstratos.



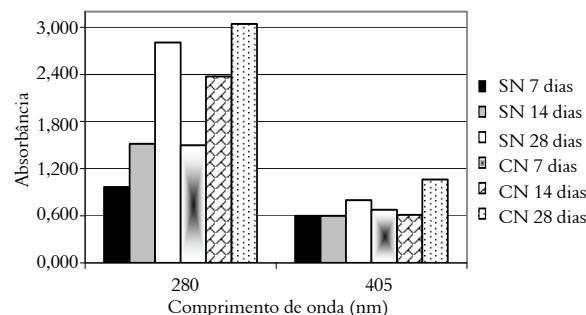
**Figura 3.** Atividade de MnPs em função dos valores de pH do tampão succinato 50 mM e da mistura reacional (entre parênteses) ao longo do cultivo na presença de cossubstratos.

De acordo com os resultados apresentados nas Figuras 2 e 3, é possível inferir que o pH ótimo para a oxidação de vermelho de fenol pelas MnPs de *C. subvermispora*, obtidas tanto na presença quanto na ausência de cossubstratos, seja inferior a 4,3. Entretanto, considerando-se a impossibilidade de obtenção de valores de pH da mistura reacional inferiores a 4,3 por meio da alteração do pH e da força iônica do tampão succinato, duas alternativas poderiam ser seguidas: 1) preparar todos os ingredientes da mistura reacional, inclusive o extrato enzimático, em tampão com valor de pH apropriado, e 2) utilizar um método de análise de atividade enzimática mais robusto, menos sujeito a variações de pH. Neste último caso, entretanto, dependendo do substrato e das condições utilizadas para a

determinação da atividade enzimática, pode-se esperar um valor de pH ótimo diferente daquele observado para a oxidação de vermelho de fenol, utilizando-se tampão succinato de sódio 50 mM na presença de ácido lático, Mn<sup>2+</sup> e albumina bovina.

#### Remoção dos extractos e derivados da lignina presentes nos extractos

Os diferentes extractos enzimáticos foram caracterizados com relação à absorbância em 280 e 405 nm, tomando-se esses dados como indicativos da concentração de compostos aromáticos (PARAJÓ et al., 1998) e heme-proteínas (RUBIA et al., 2002), respectivamente. Conforme pode ser observado na Figura 4, os extractos apresentaram teores de compostos aromáticos muito superiores aos teores de heme-proteínas. Além disso, não foi possível estabelecer correlação entre atividade enzimática e absorbância a 405 nm (da esquerda para a direita, as colunas estão dispostas em ordem crescente de atividade de MnPs), o que é indicativo da presença, nos extractos, de compostos outros que não a enzima de interesse e que também absorvem nesse comprimento de onda.



**Figura 4.** Absorbância, a 280 nm (extrato diluído cinco vezes) e a 405 nm (extrato não-diluído), dos extractos enzimáticos obtidos ao longo dos cultivos na presença (CN) ou ausência (SN) de cossubstratos.

Tanto na presença quanto na ausência de cossubstratos, a absorbância dos extractos a 280 nm aumentou com o tempo de biodegradação, indicando que a atividade de MnPs correlaciona-se positivamente com a concentração de compostos aromáticos nos extractos. A presença de derivados da lignina em extractos enzimáticos, além de interferir na determinação do teor de proteínas por métodos tradicionais (CRUZ et al., 2004), também interfere na determinação de atividades enzimáticas, uma vez que podem atuar como inibidores das enzimas presentes (LOBOS et al., 1994). Dessa forma, o desenvolvimento de uma metodologia adequada para remover os contaminantes presentes nos extractos é uma parte

importante de trabalhos que visam purificar e caracterizar enzimas de interesse.

Para a remoção de compostos aromáticos presentes em extratos de *Pinus taeda* biodegradados na ausência de cossubstratos, foi proposta a adsorção em 0,5% de polivinilpolipirrolidona (PVPP) a 27°C por 1h (CRUZ et al., 2004). O mesmo tratamento foi avaliado no presente trabalho, utilizando-se o extrato de *E. grandis* biodegradado por um período de 14 dias na presença de cossubstratos (extrato CN 14 dias). Conforme pode ser observado na Tabela 2, foram testadas concentrações de PVPP entre 0,5 e 2,0%. Entretanto, a máxima redução na absorbância a 280 nm, obtida, utilizando-se 2,0% de PVPP, foi de apenas 8,5%. De acordo com Toth e Pavia (2001), a eficiência de PVPP na adsorção de compostos aromáticos é aumentada em menores valores de pH, por haver favorecimento da formação de pontes de hidrogênio entre adsorvente e adsorbato. Com base nesta informação, o pH do extrato CN 14 dias foi reduzido até 3,5 previamente à adsorção em PVPP. Entretanto, conforme pode ser observado na Tabela 2, mesmo se utilizando o procedimento de se reduzir o pH do extrato previamente à adsorção com PVPP, não se logrou êxito em se melhorar a adsorção de compostos que absorvem a 280 nm.

**Tabela 2.** Valores de redução na absorbância a 280 nm do extrato CN 14 dias, após tratamento com PVPP em diferentes pHs.

PVPP (%)	pH	Redução (%)
0,5	5,2	3,3
1,0	5,2	5,4
2,0	5,2	8,5
0,5	3,5	0,7
1,0	3,5	5,3
2,0	3,5	10,1

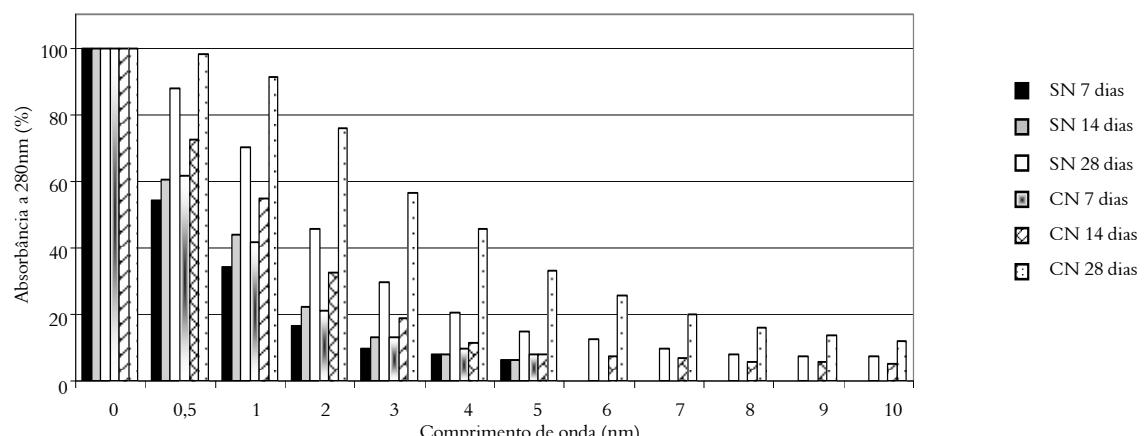
Devido à baixa eficiência da PVPP na remoção de compostos que absorvem a 280 nm, avaliou-se o uso de carvão ativado para a adsorção dos contaminantes presentes nos extratos enzimáticos. Essa estratégia é bastante utilizada para a detoxificação de

hidrolisados hemicelulósicos, apresentando elevada eficiência na remoção de compostos aromáticos (PARAJÓ et al., 1998).

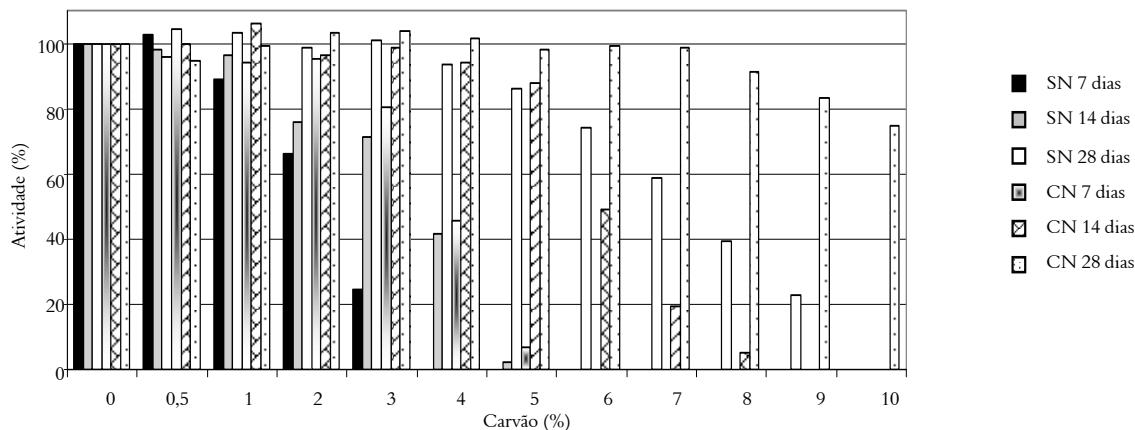
Verificou-se que o carvão ativado é um excelente adsorvente de compostos que absorvem a 280 nm. Com ele, foi possível reduzir o teor de compostos aromáticos em mais de 80% em todos os extratos. Entretanto, conforme demonstrado na Figura 5, a concentração de carvão utilizada para se alcançar tal eficiência dependeu do tempo utilizado para a biodegradação dos cavacos e da presença ou ausência de cossubstratos durante o cultivo do fungo.

Considerando-se a perda de atividade de MnPs em função da concentração de carvão utilizada para a remoção de compostos que absorvem a 280 nm (Figura 6), foi possível dividir os extratos em dois grupos: 1) aqueles cuja redução na atividade de MnPs pela adsorção em 5% de carvão ativado foi superior a 80% (CN 7 dias, SN 14 dias e SN 7 dias, em ordem crescente de perda da atividade), e 2) aqueles cuja redução na atividade de MnPs pela adsorção em 5% de carvão ativado foi inferior a 20% (CN 28 dias, SN 28 dias e CN 14 dias, em ordem crescente de perda da atividade). Enquanto os extratos pertencentes ao primeiro grupo são mais limpos, aqueles pertencentes ao segundo grupo, por apresentarem teor muito grande de impurezas, permitem maior seletividade na remoção dessas impurezas durante a adsorção em carvão ativado.

De fato, uma perda de 11% na atividade de MnPs foi necessária para se reduzir a absorbância a 280 nm do extrato SN 7 em 66% (1% de carvão), enquanto uma perda de 9% na atividade permitiu reduzir a absorbância do extrato CN 28 dias em 84% (8% de carvão). Em outras palavras, foi mais fácil remover contaminantes seletivamente de um extrato “mais sujo” (CN 28 dias) do que de um extrato “mais limpo” (SN 7 dias).



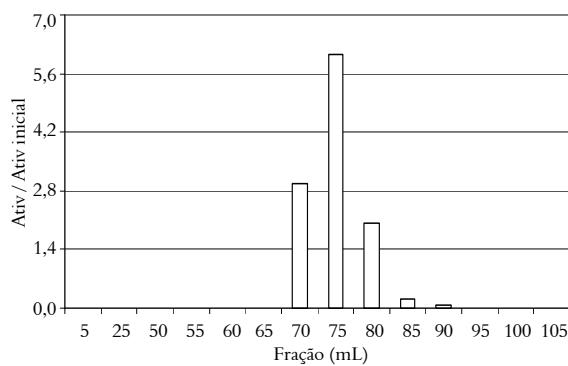
**Figura 5.** Percentual de absorbância a 280 nm remanescente nos extratos após adsorção em carvão ativado.



**Figura 6.** Percentual de atividade de MnPs remanescente nos extratos após adsorção em carvão ativado.

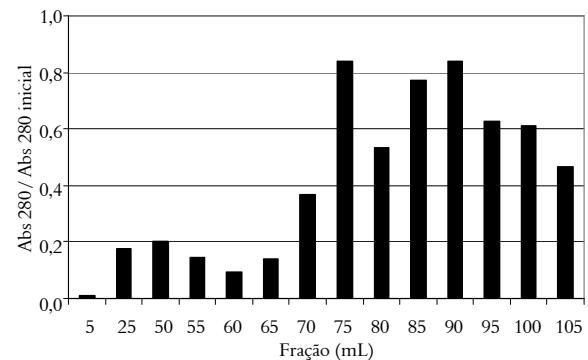
#### Concentração das MnPs presentes nos extratos

Considerando-se que as MnPs apresentam pontos isoelétricos (*pIs*) em valores de pH inferiores a 7,0 (HOFRICHTER, 2002) - no caso específico de *C. subvermispora*, os valores de *pI* determinados durante a biodegradação de cavacos de *P. taeda* se encontram em valores de pH entre 4,4 e 3,2 (LOBOS et al., 1994), espera-se que estas isoenzimas fiquem adsorvidas em resinas anionicas em pHs ácidos. De fato, experimentos preliminares mostraram que a atividade de MnPs desapareceu dos extratos após adsorção em uma resina anionica fraca (DEAE Sepharose) em pHs 3,8; 4,8 e 5,8. Sendo assim, avaliou-se a possibilidade de se concentrar as MnPs por cromatografia de troca iônica com a resina DEAE Sepharose. Para isso, uma amostra do extrato CN 14 dias foi carregada em coluna empacotada com a resina e equilibrada em pH 4,8, sendo posteriormente eluída com gradiente de NaCl (Figuras 7 e 8).



**Figura 7.** Relação entre a atividade de MnPs no eluado e no extrato bruto (CN 14 dias), durante as etapas de carregamento (0 - 50 mL), lavagem (55 - 60 mL) e eluição (65 - 105 mL) da coluna com a resina DEAE Sepharose em pH 4,8. Concentração de NaCl utilizada na eluição: 65 mL (0 - 0,1 M) 70 mL (0,1 M), 75 mL (0,1 - 0,2 M), 80 mL (0,2 M), 85 mL (0,2 - 0,3 M), 90 mL (0,3 M), 95 mL (0,3 - 0,4 M), 100 mL (0,4 M), 105 mL (0,4 - 0,5 M).

Conforme pode ser observado na Figura 7, foi possível adsorver toda a atividade de MnPs presente em 50 mL de extrato bruto, sem sequer se levar a resina a indícios de saturação. A eluição com gradiente de NaCl permitiu a obtenção de três frações com atividade superior àquela encontrada no extrato inicial. À exceção das frações eluídas com  $\text{NaCl} \leq 0,3 \text{ M}$  (85 - 90 mL), não foi detectada atividade de MnPs nas frações eluídas com maior força iônica. Verificou-se que a recuperação de atividade enzimática (22,7 UI) foi ligeiramente superior àquela utilizada para se carregar a resina (20 UI). Lobos et al. (1994) verificaram comportamento semelhante a esse, tendo atribuído o ganho em atividade à remoção de inibidores enzimáticos.



**Figura 8.** Relação entre a absorbância a 280 nm no eluado e no extrato bruto (CN 14 dias), durante as etapas de carregamento (0 - 50 mL), lavagem (55 - 60 mL) e eluição (65 - 105 mL) da coluna com a resina DEAE Sepharose em pH 4,8. Concentração de NaCl utilizada na eluição: 65 mL (0 - 0,1 M) 70 mL (0,1 M), 75 mL (0,1 - 0,2 M), 80 mL (0,2 M), 85 mL (0,2 - 0,3 M), 90 mL (0,3 M), 95 mL (0,3 - 0,4 M), 100 mL (0,4 M), 105 mL (0,4 - 0,5 M).

A Figura 8 demonstra que a absorbância a 280 nm foi inferior à do extrato bruto em todas as frações obtidas durante a eluição da coluna, caracterizando a possibilidade de se utilizar a

cromatografia em DEAE Sepharose como uma etapa que, além de concentrar as enzimas de interesse, também remove compostos aromáticos presentes nos extratos. Conforme pode ser observado, compostos que absorvem a 280 nm e não têm afinidade pela resina foram detectados na saída da coluna durante todas as etapas do experimento, incluindo-se a fase de carregamento.

As três frações ricas em atividade de MnPs foram então reunidas, dialisadas, congeladas e liofilizadas. A diálise provocou perda de atividade da ordem de 25%, em massa. O extrato liofilizado, por sua vez, apresentou teor de proteínas de 574  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e atividade de MnPs igual a 30,4 UI  $\text{mL}^{-1}$ , resultando em atividade específica de 53 UI  $\text{mg}^{-1}$ .

Apesar de a coluna com a resina DEAE Sepharose ter comportado o carregamento de 50 mL do extrato CN 14 dias sem exibir sinais de saturação, é de se esperar que o uso de um extrato pré-tratado, com menor teor de compostos que competem pela adsorção à resina, aumente a capacidade da coluna. Em consequência, espera-se que as frações obtidas durante a eluição sejam mais ricas em atividade enzimática. Para se comprovar essa hipótese, uma amostra do extrato CN 28 dias pré-tratado com carvão ativado (7%) foi carregada na coluna com DEAE-Sepharose. As atividades de MnPs nas frações coletadas durante as fases de carregamento, lavagem e eluição da coluna são apresentadas na Figura 9.

Conforme pode ser observado, foi possível carregar a coluna com uma quantidade relativamente elevada de extrato (375 mL) sem, no entanto, levá-la à saturação. Na fração correspondente a 375 mL (momento em que o carregamento da coluna foi

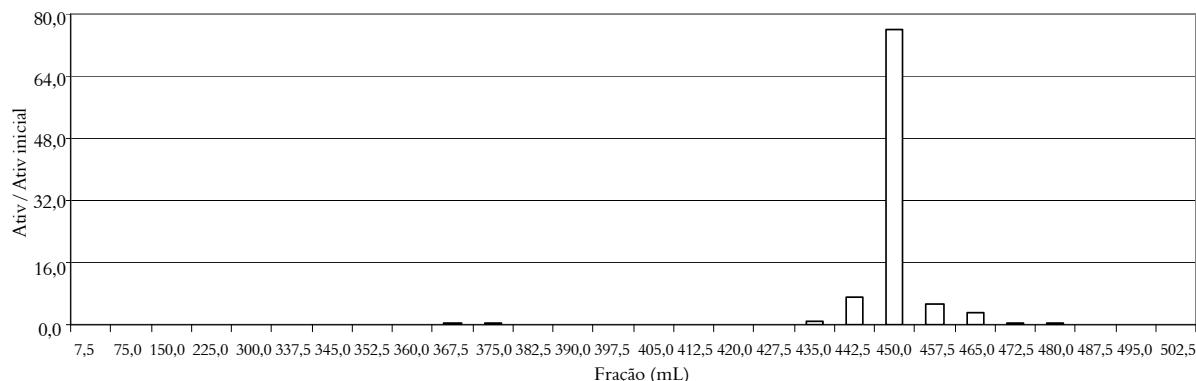
interrompido), detectou-se uma atividade de MnPs de apenas 0,08 UI. Durante a lavagem da coluna, não foi detectada perda de atividade enzimática e, durante a fase de eluição, quatro frações ricas em atividade de MnPs foram obtidas. Na mais concentrada delas, a atividade de MnPs foi 76 vezes superior àquela encontrada no extrato pré-tratado. Com relação ao balanço de massa, levando-se em consideração apenas a fração correspondente a 450 mL, recuperou-se uma atividade de MnPs cerca de 30% superior àquela utilizada para se carregar a coluna, o que indica que tanto o carvão ativado quanto a resina de troca iônica atuam em sinergia na remoção de inibidores enzimáticos. Quando somente a resina foi utilizada tanto para limpar quanto para concentrar o extrato CN 14 dias, o ganho de atividade foi de apenas 13,5%. O pequeno teor de proteínas (14,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) encontrado na fração mais rica em atividade de MnPs (15,2 UI  $\text{mL}^{-1}$ ) resultou em elevada atividade específica (1.027 UI  $\text{mg}^{-1}$ ).

## Conclusão

Com base nos resultados previamente descritos, concluiu-se que o uso de carvão ativado seguido de adsorção em resina de troca iônica é uma estratégia que pode ser utilizada para se concentrar MnPs em extratos obtidos durante a biodegradação de *E. grandis* por *C. subvermispora*.

## Agradecimentos

Os autores agradecem pelo auxílio financeiro recebido da Fapesp e do CNPq.



**Figura 9.** Relação entre a atividade de MnPs no eluato e no extrato (CN 28 dias) pré-tratado com carvão (7%), durante as etapas de carregamento (0 - 375 mL), lavagem (382,5 - 427,5 mL) e eluição (435 - 502,5 mL) da coluna com a resina DEAE Sepharose. Concentração de NaCl utilizada na eluição: 435 mL (0 - 0,1 M), 442,5 mL (0,1 M), 450 mL (0,1 - 0,2 M), 457,5 mL (0,2 M), 465 mL (0,2 - 0,3 M), 472,5 mL (0,3 M), 480 mL (0,3 - 0,4 M), 487,5 mL (0,4 M), 495 mL (0,4 - 0,5 M), 502,5 mL (0,5 M).

## Referências

- AGUIAR, A.; CRUZ, P. B. S.; FERRAZ, A. Oxalic acid,  $\text{Fe}^{3+}$  reduction activity and oxidative enzymes detected in culture extracts recovered from *Pinus taeda* wood chips biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 7, p. 873-878, 2006.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 719-739, 2005.
- CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Clean-up and concentration of manganese peroxidases recovered during the biodegradation of *Eucalyptus grandis* by *Ceriporiopsis subvermispora*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 2, p. 193-198, 2008.
- CRUZ, P. B. S.; FREER, J.; SIIKA-AHO, M.; FERRAZ, A. Extraction and determination of enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermispora* during biopulping of *Pinus taeda* wood chips. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 3-4, p. 228-234, 2004.
- FERRAZ, A.; CÓRDOVA, A. M.; MACHUCA, A. Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 1, p. 59-65, 2003.
- GUERRA, A.; MENDONÇA, R.; FERRAZ, A. Biochemimechanical pulps from *Eucalyptus grandis*: Strength properties, bleaching and brightness stability. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 25, n. 4, p. 203-216, 2005.
- HOFRICHTER, M. Review: Lignin conversion by manganese peroxidases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 4, p. 454-466, 2002.
- LOBOS, S.; LARRAIN, J.; SALAS, L.; CULLEN, D.; VICUÑA, R. Isoenzymes of manganese-dependent preoxidase and laccase produced by the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. **Microbiology**, v. 140, n. 10, p. 2691-2698, 1994.
- LUNDELL, T.; LEONOWICZ, A.; ROGALSKI, J.; HATTAKA, A. Formation and action of lignin-modifying enzymes in cultures of *Phlebia radiata* supplemented with veratic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 9, p. 2623-2629, 1990.
- MARTINEZ, A. T. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 4, p. 425-444, 2002.
- PARAJÓ, J. C.; DOMINGUEZ, H.; DOMINGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**, v. 66, n. 1, p. 25-40, 1998.
- RUBIA, T.; LINARES, A.; PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; ROMERA, J.; MARTINEZ, J. Characterization of manganese-dependent peroxidase isoenzymes from the ligninolytic fungus *Phanerochaete flavid-alba*. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 8, p. 547-554, 2002.
- TOTH, G. B.; PAVIA, H. Removal of dissolved brown algal phlorotannins using insoluble polyvinylpoly-pyrrolidone. **Journal of Chemical Ecology**, v. 27, n. 9, p. 1899-1910, 2001.
- VICENTIM, M. P.; FERRAZ, A. Enzyme production and chemical alterations of *Eucalyptus grandis* wood during biodegradation by *Ceriporiopsis subvermispora* in cultures supplemented with  $\text{Mn}^{2+}$ , corn steep liquor and glucose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 645-652, 2007.

Received on October 31, 2008.

Accepted on September 3, 2009.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.