

Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria* sp.

Ellen Cristine Giese, Luiz Gustavo Covizzi, Robert Frans Huibert Dekker e Aneli de Melo Barbosa*

Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, CCE, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Caixa Postal 6001, 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: aneli@uel.br

RESUMO. O *Botryosphaeria* sp. é um fungo ligninolítico produtor de lacases. Estudos anteriores demonstraram que o álcool veratrílico (AV) induziu fortemente a produção de lacases nesse ascomiceto. Sabe-se que surfactantes tais como o Tween-80 podem aumentar a produção de algumas exoenzimas fúngicas. Tem sido relatado que o Tween-80 pode induzir a produção de lacase em basidiomicetos. No presente trabalho, foi avaliada a influência dos Tweens 80, 60, 40 e 20 na produção de lacases constitutivas (ausência de AV) e indutivas (presença de AV) pelo *Botryosphaeria* sp. A atividade de lacase foi determinada usando-se dois substratos diferentes, o ABTS (PPO-I) e o DMP (PPO-II). Todos os Tweens estudados aumentaram a produção das lacases (PPO-I) constitutivas e indutivas e não afetaram a produção da lacase (PPO-II) constitutiva. Os Tweens 60 e 20 aumentaram a produção da lacase (PPO-II) indutiva, enquanto que os Tweens 80 e 40 não causaram nenhum efeito.

Palavras-chave: *Botryosphaeria* sp., Tween, lacases, Polifenol oxidases.

ABSTRACT. Influence of Tween on constitutive and inducible laccase production by *Botryosphaeria* sp. *Botryosphaeria* sp. is a ligninolytic fungus that produces laccase. It was previously established that veratryl alcohol (VA) strongly induced laccase production in this ascomyceteous. It is well known that surfactants such as Tween-80 can increase the production of some fungal exo-enzymes. It has been reported that Tween-80 can also induce laccase production in basidiomycetes. In this work, the influence of Tweens 20, 40, 60 and 80 on the production of constitutive laccases (in the absence of VA) and inducible laccases (in the presence of VA) by *Botryosphaeria* sp. was evaluated, separately. Laccase activity was assayed using two putative laccase substrates: ABTS (PPO-I) and DMP (PPO-II). All of the Tweens examined increased the production of both constitutive and inducible laccase PPO-I, but did not affect the production of constitutive laccase PPO-II. Tweens 60 and 20 increased the production of inducible laccase PPO-II, while Tween 80 and 40 did not cause any effect.

Key words: *Botryosphaeria* sp., Tween, laccases, polyphenol oxydases.

Introdução

Os microrganismos fitopatogênicos produzem enzimas extracelulares capazes de superar a resistência natural dos componentes da madeira, em especial a lignina, que é constituída por uma estrutura aromática complexa (Griffin, 1994; Messerschmidt, 1997). As principais enzimas envolvidas na degradação da lignina são a lignina-peroxidase (Li-P), manganês-peroxidase (Mn-P) e as lacases (Leonowicz *et al.*, 2001).

O fungo ascomiceto *Botryosphaeria* sp. foi selecionado como ligninolítico, apesar de não produzir Li-P e Mn-P. Entretanto, esse microrganismo é produtor constitutivo de lacases, as quais são polifenol oxidases e também estão envolvidas na degradação da lignina (Barbosa *et al.*, 1995, 1996; Dekker e Barbosa, 2001).

A lacase (benzenediol: oxigênio oxidoreductase, EC 1.10.3.2) é uma enzima que catalisa a remoção de elétrons e prótons de grupos hidróxi-fenólicos e amino-aromáticos, formando radicais fenóxi livres e radicais amino, respectivamente (Leonowicz *et al.*, 2001). A importância tecnológica das lacases é resultante da capacidade de catalisar a transformação de um grande número de compostos aromáticos fenólicos e não-fenólicos (Durán *et al.*, 2002).

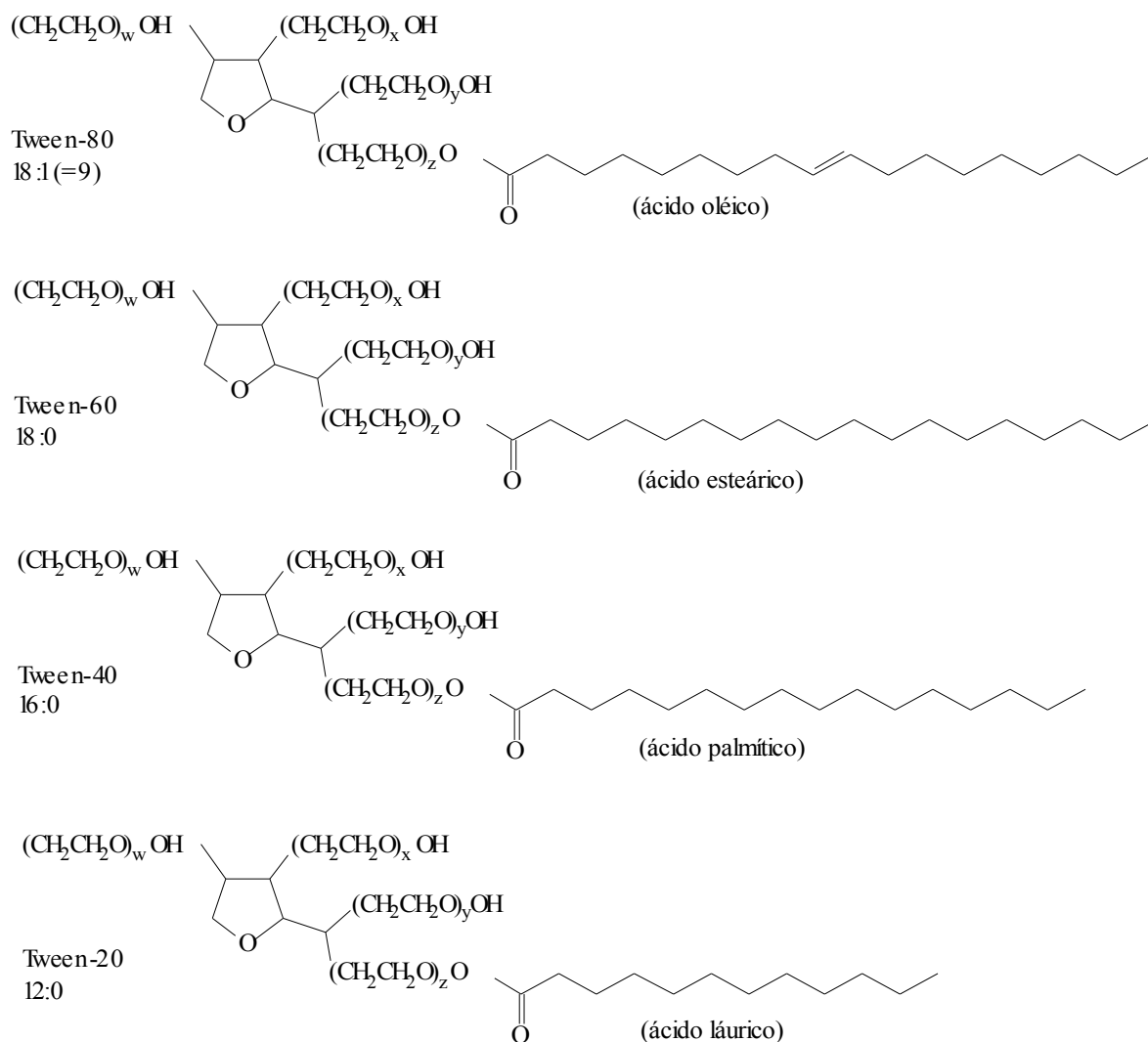
Os níveis de produção de lacase pelo *Botryosphaeria* sp. aumentaram significativamente na presença do álcool veratrílico (Barbosa *et al.*, 1996), o qual também parece atuar como regulador das enzimas responsáveis pela degradação da lignina pelo referido fungo (Dekker *et al.*, 2001).

A produção de lacases também pode ser estimulada pela adição de detergentes (Pointing *et al.*, 2000). Surfactantes não-iônicos como o Tween-20 e o Tween-

80 têm sido utilizados para aumentar a viabilidade das reações entre as enzimas e seus respectivos substratos (Pozdnyakova *et al.*, 2004). O Tween é um surfactante não-iônico, pouco tóxico para as membranas biológicas (Rege *et al.*, 2002), constituído por ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitol (Figura 1). Estimula a secreção de proteínas em microrganismos (Stutzenberger, 1992), além de alterar a morfologia e a superfície da parede celular tanto de bactérias (Van Boxel *et al.*, 1990) como de fungos (Domingues *et al.*, 2000).

A relação entre fluidez da membrana e o aumento da secreção de enzimas fúngicas foi descrita por Nemec e Jerne (2002), que constataram que a adição de Tween-80 aumentou a secreção de algumas hidrolases, em até 70%, pelo *Aspergillus niger*. No entanto, estudos detalhados sobre a influência do Tween na produção de lacases por fungos e em específico pelo *Botryosphaeria* sp. ainda não têm sido relatados na literatura científica.

Portanto, o presente trabalho tem por finalidade avaliar a influência de diferentes concentrações de Tween-80, 60, 40 e 20 na ausência ou na presença de álcool veratrílico, na produção de lacases constitutivas e indutivas, respectivamente, pelo *Botryosphaeria* sp.



$$x + y + z + w = 20$$

Figura 1. Estruturas dos surfactantes não iônicos Tween-80, 60, 40 e 20 (Prak e Pritchard, 2002).

Material e métodos

Microrganismo

O ascomiceto *Botryosphaeria* sp. (isolado MAMB-05) foi mantido a 4°C em meio de batata-agar-dextrose.

Meios de cultivo

O *Botryosphaeria* sp. foi crescido em frascos de Erlenmeyer de 125mL, previamente modificados com quatro inserções laterais contendo meio mínimo de sais de Vogel (MMSV, 1956), glucose (10g/L) e Tween (Merck) nas seguintes concentrações: 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0g/L; sendo que cada Tween (20, 40, 60 e 80) foi avaliado separadamente. Cada frasco foi inoculado com três discos de 0,7cm de diâmetro provenientes de placas de Petri contendo MMSV, glucose (10g/L) e agar (20g/L), incubadas durante 5 dias a 28°C. Os frascos foram mantidos sob agitação constante a

180rpm e 28°C, durante 108 horas, de acordo com Vasconcelos *et al.* (2000). Álcool veratrílico (álcool 3,4-dimetoxibenzílico – Aldrich) foi adicionado aos meios de cultivo líquidos, assepticamente, após autoclavação, para conferir uma concentração final de 30,4mM (Vasconcelos *et al.*, 2000).

Os cultivos foram realizados em triplicata, sendo os resultados obtidos descritos como média e desvio-padrão. O tratamento estatístico aplicado foi o teste-t com nível de confiança de 99%.

Determinações enzimáticas

O sobrenadante dos cultivos, obtido após remoção dos micélios através de centrifugação (9000 rpm por 10 min), foi utilizado como extrato enzimático. A atividade da lacase (PPO-I) foi determinada de acordo com Barbosa *et al.* (1996), utilizando-se como substrato o ácido 2,2' azino-bis (3 etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS - Sigma). Os ensaios foram

incubados durante 5min a 50°C em pH 3,0 e as leituras foram realizadas a 420 nm. A atividade da lacase (PPO-II) foi determinada conforme descrito por Vasconcelos *et al.* (2000), no qual o substrato utilizado foi o 2,6-dimetoxifenol (DMP - Aldrich). Os ensaios foram incubados durante 5min a 45°C em pH 6,5 e as leituras realizadas a 468nm. A unidade de atividade da lacase foi definida como o número em micromoles de substrato oxidados por minuto por mL de extrato enzimático.

Métodos analíticos

A glucose residual foi determinada através da técnica enzimática Glucose Oxidase/Peroxidase utilizando-se o kit Glicose Enz Color (Bio Diagnóstica). Os açúcares totais foram determinados pelo método do fenol-sulfúrico descrito por Dubois *et al.* (1956). A biomassa fúngica foi determinada por gravimetria após secagem em estufa a 70°C até peso constante.

Resultados e discussão

Avaliação da produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria* sp.

O Tween-80 tem sido descrito na literatura científica como um surfactante que pode aumentar a produção de diversas enzimas fúngicas. Por exemplo, Kuhad *et al.* (1994) constataram um aumento de 30% na produção de celulases pelo *Fusarium oxysporum* na presença desse detergente. Palma *et al.* (2000) observaram que a atividade de protease em *Penicillium restrictum* também foi aumentada com a adição de Tween-80. Segundo Pardo *et al.* (2000), a produção de xilanases e celulases por *Thecotheus pelletieri* não foi

afetada pela adição do surfactante. Por outro lado, Brucato e Wong (1994) constataram uma inibição da produção de enzimas extracelulares pelo *Penicillium funiculosum* na presença desse detergente. Portanto, através dos resultados e observações destes pesquisadores, o mecanismo de ação do Tween-80 parece ser diferente para cada microrganismo.

Conforme mostra a Figura 2a, a produção de lacase constitutiva PPO-I foi de 1,3 e 3,9 U/mL, na ausência e na presença de Tween-80 1,5g/L, respectivamente. Observou-se que o Tween-80 aumentou a produção de PPO-I em até 3 vezes.

Na presença de álcool veratrílico, a atividade de lacase indutiva PPO-I foi de 8,4 U/mL, comprovando o efeito indutor do álcool veratrílico, confirmando os resultados obtidos previamente por Vasconcelos *et al.* (2000). Quando o Tween-80 na concentração de 0,25g/L foi adicionado aos meios de cultivo, a produção de lacase indutiva PPO-I subiu para 12,2 U/mL, confirmando também o aumento da produção de lacases devido à presença de Tween-80 (Figura 2a). A adição desse mesmo surfactante ao meio de cultivo aumentou em 3 vezes a produção de lacases pelo basidiomiceto *Pycnoporus sanguineus* (Pointing *et al.*, 2000).

A produção de lacase PPO-II, constitutiva e indutiva, não foi alterada pela adição de Tween-80, tendo sido observada somente a indução provocada pela adição do álcool veratrílico, que aumentou a atividade de PPO-II de 0,4 U/mL para 1,7 U/mL (Figura 2a). Os valores de atividade de lacase não foram expressos em atividade específica pelo fato de o Tween interferir nos métodos clássicos de determinação de proteína, conforme o que também foi constatado por Stutzenberger (1992).

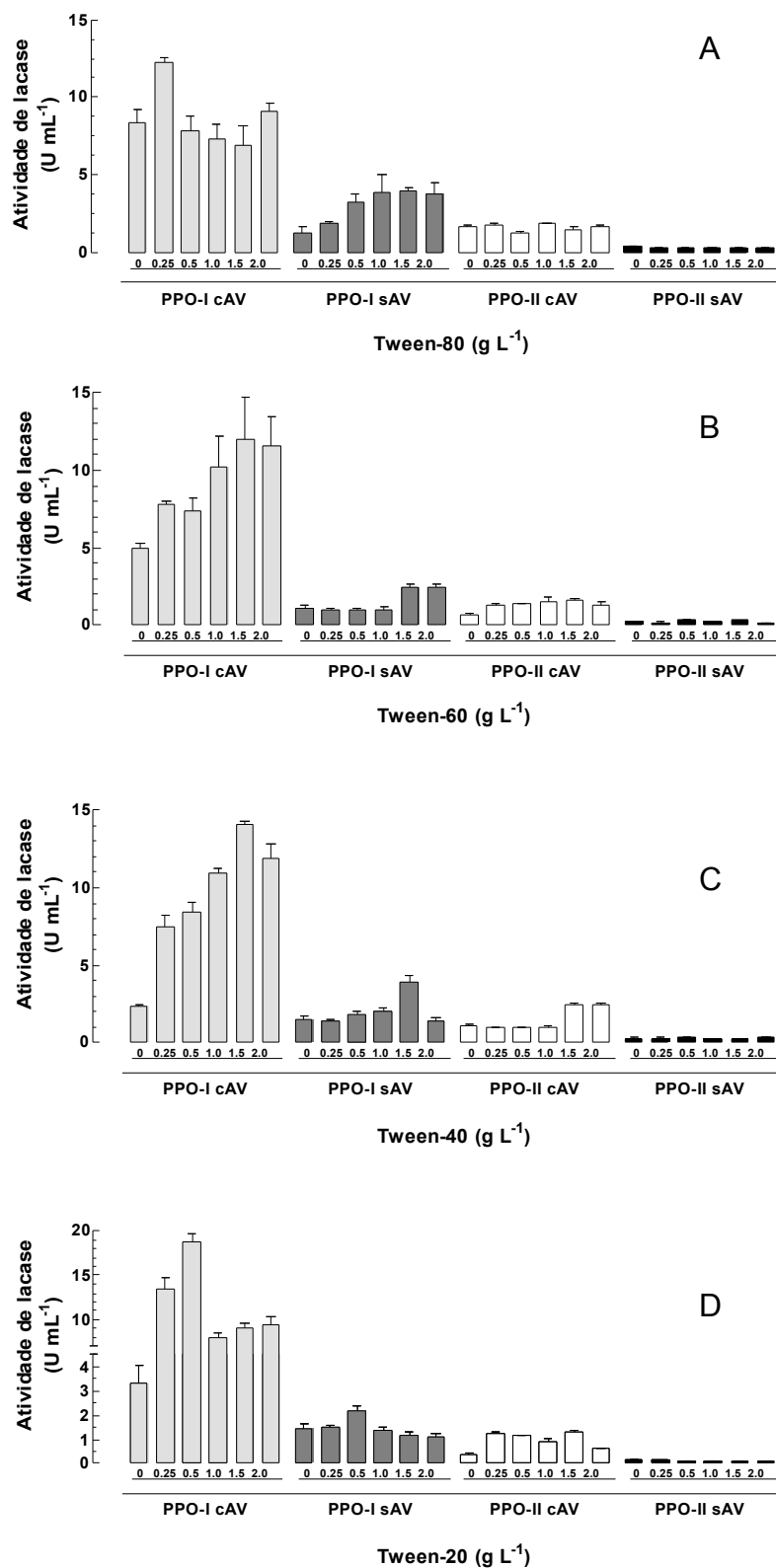


Figura 2. Efeito dos surfactantes: A (Tween-80); B (Tween-60); C (Tween-40) e D (Tween-20) na produção de lacases constitutivas, na ausência de álcool veratrílico (sAV), e indutivas, na presença de álcool veratrílico (cAV), pelo *Botryosphaeria* sp.

A adição de 1,5g/L de Tween-60 aumentou a produção de lacase PPO-I em até 2,7 vezes na ausência e na presença de álcool veratrílico, sendo 2,7 U/mL e 13,3 U/mL, respectivamente, os valores máximos de atividade enzimática detectados. Ao contrário do Tween-80, a adição do surfactante Tween-60 aumentou em 2 vezes (1,6 U/mL) a produção da lacase PPO-II indutiva pelo *Botryosphaeria* sp. Porém, o Tween-60 não influenciou na produção da lacase PPO-II constitutiva. A comparação da produção de lacases constitutivas e indutivas na presença de Tween-60 pode ser observada na Figura 2b.

A adição de Tween-40 aumentou a produção da lacase constitutiva PPO-I em até 2,6 vezes (3,9 U/mL) quando adicionado nas concentrações de 1,0 e 1,5g/L. Observou-se que, nas demais concentrações de Tween-40, a produção da enzima foi indiferente à presença do surfactante. Por outro lado, a produção da lacase indutiva PPO-I foi maior em todas as concentrações de Tween-40 estudadas, sendo o máximo de atividade enzimática detectada nos cultivos com 1,5g/L (14,2 U/mL). A produção de lacase PPO-II constitutiva e indutiva não foi alterada significativamente pela adição de Tween-40, da mesma forma que o Tween-80. A produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria* sp. na presença de Tween-40 está ilustrada na Figura 2c.

De acordo com os demais surfactantes estudados, o Tween-20 também aumentou a produção das lacases constitutivas e indutivas PPO-I, em 2,1 (2,3 U/mL) e 5,6 (18,7 U/mL) vezes, respectivamente. A produção da lacase constitutiva PPO-II permaneceu inalterada pela adição do Tween-20, enquanto a produção da lacase indutiva PPO-II aumentou em 24% (1,4 U/mL) na presença de 0,5g/L de Tween-20. A Figura 2(d) ilustra a comparação entre a produção de lacases constitutivas e indutivas nas diferentes concentrações de Tween-20.

Comparação da produção de biomassa fúngica e da variação de pH nos cultivos de *Botryosphaeria* sp. na ausência e na presença de álcool veratrílico e em diferentes concentrações de Tween-80, 60, 40 e 20.

A adição de Tween-80 não influenciou a produção de biomassa pelo *Botryosphaeria* sp. na ausência de álcool veratrílico, enquanto que na sua presença houve um aumento de 42% (6,6g/L) na produção da biomassa fúngica. Vasconcelos et al. (2000) observaram que concentrações elevadas de álcool veratrílico no meio de cultivo aumentaram a produção de lacases pelo *Botryosphaeria* sp., sendo que a produção de biomassa fúngica diminuiu consideravelmente nessas condições, o que também foi observado no presente trabalho, no qual a

presença de álcool veratrílico diminuiu em 65% (4,6g/L) a produção de biomassa pelo *Botryosphaeria* sp. A comparação da produção de biomassa fúngica e da variação de pH dos cultivos de *Botryosphaeria* sp. na ausência e na presença de álcool veratrílico estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1. Produção de biomassa fúngica, valores de pH final, glucose residual e açúcar total residual, nos cultivos do *Botryosphaeria* sp em diferentes concentrações e tipos de Tween na ausência do álcool veratrílico.

Tween	Conc. (g/L)	Biomassa (g/L)	pH final	Glucose Residual (mg/mL)	Açúcar Total Residual (mg/mL)
80	0,0	7,11±0,40	6,95±0,27	0,02±0,00	0,82±0,06
	0,25	5,59±0,26	6,72±0,11	0,01±0,00	0,97±0,32
	0,5	4,97±0,28	6,68±0,09	0,02±0,00	0,99±0,15
	1,0	6,03±0,21	6,59±0,11	0,02±0,00	1,07±0,36
	1,5	5,62±0,11	6,67±0,08	0,01±0,00	1,02±0,23
	2,0	5,26±0,46	6,72±0,09	0,03±0,00	1,37±0,01
60	0,0	6,48±0,38	6,40±0,02	0,01±0,00	1,75±0,10
	0,25	6,45±0,25	6,37±0,03	0,01±0,00	1,65±0,09
	0,5	6,57±0,36	6,37±0,06	0,01±0,00	2,12±0,08
	1,0	6,65±0,20	6,40±0,06	0,01±0,00	1,09±0,28
	1,5	6,61±0,35	6,43±0,09	0,01±0,00	1,74±0,03
	2,0	7,06±0,44	6,40±0,02	0,01±0,00	2,14±0,07
40	0,0	6,32±0,92	6,78±0,13	0,01±0,00	1,44±0,13
	0,25	6,18±0,13	6,82±0,07	0,01±0,00	2,05±0,31
	0,5	6,95±0,15	6,72±0,13	0,01±0,00	1,36±0,05
	1,0	7,47±0,37	6,83±0,02	0,01±0,00	1,64±0,18
	1,5	7,23±0,13	6,85±0,04	0,01±0,00	1,62±0,07
	2,0	7,68±0,08	6,83±0,06	0,01±0,00	1,76±0,38
20	0,0	6,19±0,52	6,65±0,04	0,04±0,00	1,15±0,13
	0,25	6,01±0,76	6,71±0,05	0,04±0,00	0,78±0,11
	0,5	6,19±0,39	6,72±0,05	0,06±0,00	0,93±0,02
	1,0	6,73±0,36	6,72±0,04	0,05±0,00	1,03±0,17
	1,5	6,59±0,26	6,70±0,04	0,04±0,00	1,12±0,12
	2,0	6,91±0,69	6,78±0,05	0,05±0,00	1,25±0,07

(*) pH inicial 5,

O *Botryosphaeria* sp. apresentou um aspecto filamentosos quando cultivado em meio basal líquido, sendo que na presença de álcool veratrílico verificou-se a formação de pequenos grânulos. Quando os detergentes estudados foram adicionados ao meio de cultivo, o aspecto filamentosos permaneceu, mesmo na presença do álcool veratrílico. A influência da adição de Tween na morfologia dos micélios fúngicos em cultivos submersos foi observada por Domingues et al. (2000) quando estudou o *Trichoderma reesei* e constatou que o Tween-80 inibiu a formação de “pellets” pelo referido fungo.

Tabela 2. Produção de biomassa fúngica, valores de pH final, glucose residual e açúcar total residual nos cultivos do *Botryosphaeria* sp. em diferentes concentrações e tipos de Tween na presença de álcool veratrílico.

Tween	Conc. (g/L)	Biomassa (g/L)	pH final	Glucose Residual (mg/mL)	Açúcar Total Residual (mg/mL)
80	0,0	4,63±0,15	5,06±0,80	0,03±0,00	3,42±0,29
	0,25	6,16±0,29	5,56±0,56	0,03±0,00	2,40±0,24
	0,5	5,49±0,50	4,61±0,81	0,10±0,01	2,06±0,16
	1,0	4,97±0,64	4,77±0,31	0,05±0,00	2,28±0,65
	1,5	6,20±0,84	4,76±0,40	0,05±0,00	3,19±0,69
	2,0	6,59±1,53	4,72±0,24	0,07±0,00	3,18±0,40

60	0,0	4,58±0,86	4,15±0,09	0,02±0,00	2,302±0,15
	0,25	7,14±0,43	4,20±0,26	0,02±0,00	1,772±0,33
	0,5	6,61±0,22	4,23±0,21	0,02±0,00	1,594±0,15
	1,0	6,74±0,59	7,91±0,79	0,02±0,00	2,073±0,19
	1,5	6,75±1,34	4,71±1,11	0,03±0,00	1,625±0,11
	2,0	4,80±0,25	4,65±1,11	0,03±0,00	1,624±0,43
40	0,0	4,50±0,47	4,06±0,15	0,02±0,00	1,254±0,07
	0,25	5,53±0,34	5,53±0,33	0,02±0,00	0,496±0,04
	0,5	5,73±1,19	5,73±0,29	0,02±0,00	0,711±0,03
	1,0	5,66±0,10	5,66±0,05	0,02±0,00	0,632±0,03
	1,5	5,72±0,55	5,72±0,20	0,02±0,00	0,73±0,03
	2,0	5,75±0,23	5,75±0,07	0,02±0,00	0,67±0,01
20	0,0	2,86±0,06	4,88±0,12	0,02±0,01	1,83±0,76
	0,25	5,02±0,35	4,37±0,14	0,01±0,01	1,16±0,18
	0,5	6,15±0,49	4,88±0,72	0,04±0,00	0,91±0,11
	1,0	4,75±0,74	4,41±0,39	0,02±0,00	1,04±0,15
	1,5	6,17±0,26	4,57±0,09	0,08±0,00	0,99±0,24
	2,0	5,54±1,31	4,48±0,26	0,19±0,01	1,25±0,26

(*) pH inicial 5,8

O Tween-60 não influenciou a produção de biomassa pelo *Botryosphaeria* sp. na ausência de álcool veratrílico, enquanto que na sua presença observou-se um aumento de 56% (7,1g/L) quando foi adicionado 0,25g/L de Tween-60. A adição de 2g/L do surfactante não alterou a produção de biomassa pelo referido fungo. Tsuboi *et al.* (1996), estudando a *Candida albicans*, constataram que o crescimento dessa levedura foi dependente da concentração de Tween presente no cultivo.

A presença de Tween-40 aumentou a produção de biomassa fúngica pelo microrganismo em até 26% (5,7g/L) na presença de álcool veratrílico. O aumento de biomassa no meio de cultivo foi maior em concentrações mais elevadas de Tween-40. Na ausência de álcool veratrílico a biomassa micelial não foi alterada significativamente pela adição do surfactante.

A adição de Tween-20 nos meios de cultivo não afetou a produção de biomassa fúngica pelo *Botryosphaeria* sp. na ausência de álcool veratrílico. Porém, como foi observado anteriormente pela adição dos demais surfactantes, a presença de Tween-20 provocou um aumento de até 2,2 vezes (6,1g/L) nos cultivos acrescidos de álcool veratrílico.

A adição de Tween-80 não alterou significativamente os valores de pH inicial e final dos cultivos. O pH final mensurado na ausência de álcool veratrílico foi 1,2 vezes maior (6,72) que o pH inicial (5,80) do cultivo. No entanto, na presença de álcool veratrílico, o pH final diminuiu 1,2 vezes (4,91) em relação ao pH inicial do cultivo. Esse comportamento foi descrito anteriormente por Vasconcelos *et al.* (2000) quando avaliaram o pH final do cultivo do fungo *Botryosphaeria* sp. em meio basal, na ausência e na presença de álcool veratrílico. Os valores de pH inicial e final também não foram alterados significativamente com a adição de Tween-60, 40 e 20, com exceção dos cultivos de Tween-60 (1,0g/L) na presença do álcool veratrílico, nos quais os valores de pH final foram próximos de 8,0.

Estudos anteriores demonstraram que o pH inicial não interferiu significativamente na produção de lacase constitutiva pelo *Botryosphaeria* sp. Todavia,

na presença de álcool veratrílico, valores de pH inicial entre 5,5 e 6,5 levaram a uma maior produção das lacases indutivas PPO-I (13,1 U/mL) e PPO-II (2,6 U/mL) (dados não publicados).

Comparação da glucose residual e açúcar total residual nos cultivos de *Botryosphaeria* sp., na ausência e na presença de álcool veratrílico e em diferentes concentrações de Tween-80, 60, 40 e 20.

De forma geral, verificou-se que o *Botryosphaeria* sp. consumiu mais de 99% da glucose presente no meio de cultivo, independente da adição de álcool veratrílico, da concentração do Tween e do tipo de Tween avaliado. A glucose residual foi determinada através da técnica enzimática Glucose Oxidase/ Peroxidase devido ao fato de o Tween ter interferido no método clássico de determinação de açúcares redutores descrito por Somogyi (1945) e Nelson (1944).

O *Botryosphaeria* sp. é produtor de um exopolissacarídeo (Dekker e Barbosa, 2001) recentemente caracterizado como uma β -D-(1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6)-glucana (Barbosa *et al.*, 2003), denominada botriosferana, a qual confere viscosidade ao meio de cultivo (Steluti *et al.*, 2004). A presença desse exopolissacarídeo foi observada não somente pela diferença da quantidade de carboidrato residual, determinado pelo açúcar total residual (>0,80mg/mL) em relação à glucose residual (<0,07mg/mL), como pela viscosidade do meio de cultivo, embora esta não tenha sido determinada.

Conclusão

O Tween-80 tem sido descrito como mediador da Mn-P nos processos de branqueamento da polpa da madeira (Dainab *et al.*, 2002; Hirai *et al.*, 2004) devido à presença da insaturação no C-9 (Figura 1), a qual aparenta possuir um papel importante no mecanismo de ação da Mn-P no processo de degradação da lignina (Bermek *et al.*, 2002). A adição desse surfactante nos processos de degradação de compostos poliaromáticos envolvendo lacases também tem sido descrita, pois o Tween facilita a solubilização dessas substâncias em meios aquosos e em solventes orgânicos (Pozdnyakova *et al.*, 2004). Contudo, estudos detalhados sobre a influência do Tween no aumento da produção de lacases não têm sido encontrados na literatura científica.

Sabe-se que em condições apropriadas os detergentes podem combinar-se com as lipoproteínas constituintes das membranas biológicas, tornando-as permeáveis (Wiseman, 1985). Porém, como o mecanismo de formação do complexo detergente/lipoproteína ainda não é conhecido, pode-se levantar a hipótese de que o Tween alteraria a

parede celular microbiana favorecendo a secreção de enzimas para o meio extracelular, visto que, como mostra o presente trabalho, todos os Tweens estudados aumentaram a produção da lacase (PPO-I) constitutiva e indutiva, embora não tenham afetado a produção da lacase constitutiva (PPO-II). No entanto, o Tween-80 também tem sido descrito como estimulador da produção de glicosiltransferases (Jacques *et al.*, 1985), o que poderia também aumentar a secreção das lacases, visto que estas são glicoproteínas, as quais se diferenciam estruturalmente de acordo com o microrganismo produtor e o meio de cultivo utilizado.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Capes, a PROPPG-UEL e a Fundação Araucária-Projeto nº909/00 pelo suporte financeiro. Ellen Cristine Giese e Luiz Gustavo Covizzi agradecem a Bolsa de Iniciação Científica concedida pelo Programa CNPq-P.I.B.I.C. da Universidade Estadual de Londrina, Estado do Paraná.

Referências

- BARBOSA, A.M. *et al.* In vivo decolorization of poly R-478 as a method for screening ligninolytic microorganisms for use in bioremediation. *Proc. 4th Pacific Rim Biotechn. Conference*. Melbourne, Australia, p. 88-90, 1995.
- BARBOSA, A.M. *et al.* Veratryl alcohol as an inducer of laccase by the ascomycete *Botryosphaeria* sp., when screened on polymeric dye poly R-478. *Lett. Appl. Microbiol.*, Oxford, v. 23, p. 93-96, 1996.
- BARBOSA, A.M. *et al.* Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3; 1→6)-β-D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. *Carbohydr. Res.*, Kidlington, v.338, p. 1691-1698, 2003.
- BERMEK, H. *et al.* Studies on mediators of manganese peroxidase for bleaching of wood pulps. *Biores. Technol.*, Kidlington, v. 85, p. 249-252, 2002.
- BRUCATO, C.L.; WONG, S.S. Extracellular poly-(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Penicillium funiculosum*: general characteristics and active site studies. *Arch. Biochem. Biophys.*, Orlando, v. 290, p. 497-502, 1994.
- DAINAB, S. *et al.* Degradation of β-5 lignin model dimmers by *Ceriporiopsis subvermispota*. *Enzyme Microb. Technol.*, New York, v. 30, p. 499-505, 2002.
- DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. *Enzyme Microb. Technol.*, New York, v. 28, p. 81-88, 2001.
- DEKKER, R.F.H. *et al.* A new role for veratryl alcohol: regulation of synthesis of lignocellulose-degrading enzymes in the ligninolytic ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp.; influence of carbon source. *Biotechnol. Lett.*, Dordrecht, v. 23, p. 1987-1993, 2001.
- DOMINGUES, F.C. *et al.* The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme Microb. Technol.*, New York, v. 26, p. 394-401, 2000.
- DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, Washington, DC., v. 28, p. 350-356, 1956.
- DURÁN, N. *et al.* Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme Microb. Technol.*, New York, v. 31, p. 907-931, 2002.
- GRIFIN, D.H. *Fungal physiology*. 2. ed. New York: Wiley-Liss, 1994.
- HIRAI, H. *et al.* T. Oxidative dechlorination of methoxychlor by ligninolytic enzymes from white-rot fungi. *Chemosphere*, Kidlington, v. 55, p. 641-645, 2004.
- KUHAD, R.C. *et al.* A hypercellulolytic mutant of *Fusarium oxysporum*. *Lett. Appl. Microbiol.*, Oxford, v. 19, p. 397-400, 1994.
- JACQUES, N.A. *et al.* Does an increase in membrane unsaturated fatty acids account for Tween 80 stimulation of glucosyltransferase secretion by *Streptococcus salivarius*? *J. Gen. Microbiol.*, Reading, v. 131, p. 67-72, 1985.
- LEONOWICZ, A. *et al.* Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microbiol.*, Berlin, v. 41, p. 185-227, 2001.
- MESSERSCHMIDT, A. *Multi-copper oxidases*. London: World Scientific, 1997.
- NEMEC, T.; JERNEJC, K. Influence of Tween 80 on lipid metabolism of an *Aspergillus niger* strain. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Totowa, v. 101, p. 229-238, 2002.
- NELSON, N.A. Colorimetric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *J. Biochem.*, Tokyo, v. 153, p. 376-380, 1944.
- PALMA, M.B. *et al.* Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Totowa, v. 84-86, p. 1137-1145, 2000.
- PARDO, A.G. *et al.* Cellulose and xylan degrading enzymes in *Thecotheus pelletieri*. *Rev. Argent. Microbiol.*, Buenos Aires, v. 32, p. 190-195, 2000.
- POINTING, S.B. *et al.* Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. *Mycologia*, Lawrence, v. 92, p. 139-144, 2000.
- POZDNYAKOVA, N.N. *et al.* Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. *J. Mol. Catal.*, Lausanne, v. 30, p. 19-24, 2004.
- PRAK, D.J.; PRITCHARD, P.H. Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in micellar nonionic surfactant solutions. *Water Res.*, Kidlington, v. 36, p. 3463-3472, 2002.
- REGE, B.D. *et al.* Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Shannon, v. 16, p. 237-246, 2002.
- SOMOGYI, M.A. A new reagent for determination of sugars. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v. 160, p. 61-68, 1945.
- STELUTI R.M. *et al.* Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. *J. B. Microbiol.*, v. 44, p. 480-486

STUTZENBERGER, F.J. Interference of the detergent Tween 80 in protein assays. *Anal. Biochem.*, Orlando, v. 207, p. 249-254, 1992.

TSUBOI, R. *et al.* Induction of an extracellular esterase from *Candida albicans* and some of its properties. *Infect. Immun.*, v. 64, p. 2936-2940, 1996.

VAN BOXTEL, R.M. *et al.* Effect of polyoxyethylene sorbate compounds (Tweens) on colonial morphology, growth, and ultra structure of *Mycobacterium paratuberculosis*. *APMIS*, Copenhagen, v. 98, p. 901-908, 1990.

VASCONCELOS, A.F.D. *et al.* Optimization of laccase production by *Botryosphaeria* sp. In the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. *Process Biochem.*, Rickmansworth, v. 35, p. 1131-1138, 2000.

VOGEL, H.J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. *Gen. Bull.*, v. 13, p. 42-48, 1956.

WISEMAN, A. *Handbook of enzyme biotechnology*. 2 ed. England: Ellis Horwood Limited, 1985.

Received on August 11, 2004.

Accepted on November 22, 2004.