

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

HUGO LEONARDO ANDRÉ GENIER

**ATIVIDADE NEMATICIDA DO FUNGO *Pleurotus ostreatus* E DE
SUAS PROTEASES**

ALEGRE- ES

2015

HUGO LEONARDO ANDRÉ GENIER

**ATIVIDADE NEMATICIDA DO FUNGO *Pleurotus ostreatus* E DE
SUAS PROTEASES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof.^a Dra. Iara Rebouças Pinheiro

ALEGRE- ES

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Genier, Hugo Leonardo André, 1980-
G331a Atividade nematicida do fungo *Pleurotus ostreatus* e de suas proteases/Hugo Leonardo André Genier. – 2015.
40f. : il.

Orientador: Iara Rebouças Pinheiro.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. *Pleurotus ostreatus*. 2. Enzimas proteolíticas. 3. Larvas. 4. Controle biológico. 5. Atividade nematicida. I. Pinheiro, Iara Rebouças. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 66.012.1

**ATIVIDADE NEMATICIDA DO FUNGO *Pleurotus ostreatus* E DE
SUAS PROTEASES**

HUGO LEONARDO ANDRÉ GENIER

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Aprovado em 08 de Junho de 2015

Prof.^a Dra. Iara Rebouças Pinheiro
Universidade Federal do Espírito Santo
(Orientadora)

Prof.^a Dra. Audrei Gimenez Barañano
Universidade Federal do Espírito Santo
(Membro Interno)

Prof.^o Dr. Filipe Elias de Freitas Soares
Universidade de Vila Velha
(Membro Externo)

O conhecimento traz orgulho, mas o amor edifica.

(Bíblia Sagrada- I Coríntios 1. 8b)

AGRADECIMENTOS

Quero inicialmente agradecer ao Senhor Deus pela graça e misericórdia. Ele esteve comigo em cada madrugada na rodoviária de Cachoeiro de Itapemirim (ainda bem que o tempo em Cachoeiro é quente, não senti tanto frio...) e nas horas de viagem para a simpática Alegre. Ao Senhor todo louvor!

Aos amigos que fiz no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PPEQ-UFES) em especial agradeço a Francisco José dos Santos que me acolheu em sua casa, como um bom (ótimo) Samaritano. Você tem idade para ser meu pai, mas foi um grande amigo-irmão.

Aos Professores do PPEQ que se dispuseram a dar aulas em horários condensados. Em especial à Audrei Gimenez Barañano, Simone Pereira Taguchi Borges, Iara Rebouças Pinheiro e Mirna Aparecida Neves.

À coordenadora do PPEQ, Prof.^a Dr.^a Andrea Oliveira Souza da Costa, pela sempre boa vontade em nos atender.

Ao Prof. Dr. José Humberto de Queiroz, da Universidade Federal de Viçosa, por abrir seu laboratório, disponibilizando meios e reagentes, os quais me ajudaram muito na execução experimental desse trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Flávia Maria Lopes Passos e ao Prof. Dr. Wendel Silveira, meus chefes diretos, que também dispuseram o Laboratório de Fisiologia de Microrganismos da UFV.

Ao meu grande amigo, Prof. Dr. Filipe Elias de Freitas Soares, cuja ajuda foi primordial em todas as etapas. Amigo, estou lhe devendo até a eternidade!

À minha mãe, Euzi Rocha André, exemplo de mulher, que se dedicou a mim e a minha irmã com todo zelo.

À minha irmãzinha mais nova, Francielli Silva Genier, pelo incentivo desde a prova de seleção do PPEQ, abrindo sua casa e privacidade para mim.

Ao amigo Tiago Marvila, por também abrir sua casa para me receber em Alegre.

Ao meu pai, José Raimundo Genier, pelo incentivo e orações.

À minha irmã, Mariana André Genier, cuja amizade ultrapassa os laços de sangue.

À minha orientadora, Iara Rebouças Pinheiro, por sempre reservar tempo e disposição para conversarmos sobre o trabalho, bem como a liberdade que me deu na execução dos experimentos. Também agradeço a você pela compreensão em inúmeros momentos.

Agradeço a CAPES, FAPEMIG, FAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

É muita gente para agradecer. Vou parar por aqui para não ser injusto. Desde já agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para esse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Enzimas extracelulares	3
2.2. Proteases aplicadas ao controle biológico	3
2.3. Fungos nematófagos.....	5
2.4. Produção de Proteases	6
3. METODOLOGIA	8
3.1. Microrganismos	8
3.1.1. Meio de cultivo para a preservação do fungo.....	8
3.1.2. Meio de cultivo para a preservação dos nematoides.....	8
3.2. Cultivo para a produção de proteases.....	8
3.3. Medida da atividade proteolítica.....	9
3.4. Caracterização das Proteases	10
3.4.1. Efeitos do pH e da Temperatura.....	10
3.4.2. Efeito de Inibidores.....	10
3.4.3. Atividade das proteases durante os dias de incubação.....	10
3.5. Ensaio experimental nematicida com fungos (Ensaio A)	10
3.6. Ensaio experimental nematicida com proteases (Ensaio B).....	11
3.7. Zimograma	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4.1. Ensaio experimental nematicida com fungos (Ensaio A)	13
4.2. Ensaio de atividade proteolítica do fungo <i>Pleurotus ostreatus</i>	16
4.3. Ensaio experimental nematicida com proteases (Ensaio B).....	20

5.	CONCLUSÕES.....	21
6.	REFERÊNCIAS.....	22

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.a)** Análise da purificação de serino protease produzida por *M. thaumasium* (NF34a) através de SDS-PAGE a 10% de gel. Linha M, marcador com seu peso molecular. Linha 1: Fração de protease (M1) obtida a partir de cromatografia de troca iônica. Linha 2: extrato bruto. **b)** investigação de produção de Mt1 durante o processo de infecção. Setas Brancas: Mt1. 4
- Figura 2.** Microfotografia de atividade nematocida das proteases do fungo nematófago *Arthrobotrys sinensis* (SF53) no primeiro estágio larvas de *Angiostrongylus vasorum* após 24 horas. a) grupo tratado e b) grupo de controle. Seta preta indica a ação das proteases sobre as larvas. Fonte: 5
- Figura 3.** Curva padrão de tirosina.....9
- Figura 4. a-c.** a: ação inicial de hifas do fungo *Pleurotus ostreatus* em larvas de *Panagrellus* sp. b: destruição de larvas e colonização por hifas de *Pleurotus ostreatus* c: destruição e / ou digestão de larvas *Panagrellus* sp por *Pleurotus ostreatus*. Barras: a-7,000µm; b-4,500 µm e c-6,000µm..... 13
- Figura 5.** a-b. Larvas de *Panagrellus* sp. (seta branca) e produção de gotículas tóxicas por fungos *Pleurotus ostreatus* (seta preta / detalhe). Barra: a-15,000µm. 15
- Figura 6.** Ensaio de atividade proteolítica, medida a pH 8,0, durante o período de incubação de 168 horas (7 dias). 17
- Figura 7.** a: Efeito do pH sobre a atividade das proteases de *Pleurotus ostreatus* (PLO 06). b.: Efeito da temperatura na atividade das proteases de *Pleurotus ostreatus* (PLO 06)..... 18
- Figura 8.** Zimograma de proteases produzidas pelo fungo *Pleurotus ostreatus* (PLO 06) em gel de poliacrilamida contendo SDS. A setas destacam os diferentes halos de digestão, o que sugere a existência de mais de uma protease. 19

RESUMO

GENIER, Hugo Leonardo André. **Atividade nematicida do fungo *Pleurotus ostreatus* e de suas proteases**, 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES. Orientadora: Prof^a Dra. Iara Rebouças Pinheiro.

Dentre as possíveis aplicações biotecnológicas de fungos e suas proteases, o controle biológico tem mostrado ser eficiente. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade nematicida do fungo *Pleurotus ostreatus* e suas proteases sobre larvas de *Panagrellus* sp. A atividade proteolítica de *Pleurotus ostreatus* (PLO 06) foi medida e caracterizada com pHs e temperaturas diferentes e na presença de um inibidor (PMSF). O tempo de produção máxima da enzima foi determinado coletando-se amostras a cada 24h durante 7 dias. O perfil das proteases foi observado através de zimograma. A atividade predatória do fungo *Pleurotus ostreatus* (PLO 06) foi avaliada sobre larvas de *Panagrellus* sp. (ensaio A), bem como a atividade nematicida de proteases de PLO 06 sobre as mesmas larvas (ensaio B). A atividade das proteases foi máxima em pH 9 e temperatura de 60 °C. Na presença de inibidor, não houve nenhuma atividade proteolítica. A maior atividade enzimática de *P. ostreatus* foi obtida com seis dias de incubação (71,6 U/mL). Os valores de redução das larvas (Ensaio A) foram: dia 1 (65,6%); dia 2 (77,4%); dia 3 (95,2%). A redução das larvas (Ensaio B) foi de 42%. *P. ostreatus* (PLO 06) e suas proteases mostraram eficácia contra larvas de *Panagrellus* sp., demonstrando ter potencial para aplicação no controle biológico integrado.

ABSTRACT

GENIER, Hugo Leonardo André. **Nematicidal activity of the fungus *Pleurotus ostreatus* and its proteases**, 2015. Dissertation (Master's Degree in Chemical Engineering) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES. Advisor: Prof^a Dra Lara Rebouças Pinheiro.

Among the possible biotechnological applications of fungi and their proteases biological control has proved to be efficient. The objective of this study was to evaluate the nematicidal activity of the fungus *Pleurotus ostreatus* and its proteases on *Panagrellus* sp. larvae. Proteolytic activity of *P. ostreatus* (PLO 06) was measured and characterized at different pHs, temperatures and in the presence of a inhibitor (PMSF). The time of maximum production of the enzyme was determined collecting samples every 24 hours for 7 days. A zymogram showed the profile of several proteases. Predatory activity of the fungus *P. ostreatus* (PLO 06) was evaluated on *Panagrellus* sp. larvae (assay A) as well as the nematicidal activity of PLO 06 proteases on the same larvae (assay B). At pH 9 and 60°C, the activity of the proteases reached the maximum. In the presence of inhibitor, there was no proteolytic activity. A sample collected on the sixth day of incubation showed the highest enzyme activity (71, 6 U/mL). The values of the reduction of the larvae (Assay A) were: day 1 (65.6%); day 2 (77.4%); day 3 (95.2%). The reduction of the larvae (Assay B) was 42%. *P. ostreatus* (PLO 06) and its proteases were very effective against *Panagrellus* sp. larvae, demonstrating great potential for use in integrated biological control.

Keywords: *Pleurotus*; protease; *Panagrellus* sp.; biological control; nematicidal activity

1. INTRODUÇÃO

A agricultura moderna busca interferir no sistema de produção de modo a maximizar a produtividade e a rentabilidade (FIEDLER et al., 2008). Entretanto, sistemas sustentáveis de produção agrícola, como a agricultura orgânica, têm sido propostos como alternativas viáveis ao método clássico de produção. Na esteira dessa tendência, o controle biológico de pragas agrícolas tem assumido relevância cada vez maior em substituição a outros métodos consagrados.

Nematoides são um dos mais diversos grupos de animais presentes na terra. Muitos deles parasitam plantas, causando significativos danos, tais como a destruição total do material vegetal (YANG et al., 2013). Apesar das intervenções clássicas no controle de doenças, como rotação de culturas, controle químico e o desenvolvimento de variedades resistentes, patógenos continuam a evoluir e desenvolver novos mecanismos para a predação (PEREIRA et al., 2007).

Muitos microrganismos podem atacar e destruir nematoides através de diversos processos como a captura, o parasitismo e pela produção de toxinas e enzimas (YANG et al., 2013). Nesse sentido, uma ampla variedade de fungos tem sido estudada. Especialmente fungos do gênero *Pleurotus* como o *P. ostreatus*, são conhecidos por predação fitonematoides como *Meloidogyne* spp. (OKORIE et al., 2011).

Pleurotus ostreatus é amplamente conhecido como um fungo comestível, até mesmo apontado como iguaria (FURLANI e GODOY, 2005). Entretanto, Yashvant et al. (2012) apontam possíveis compostos bioativos produzidos por esses fungos, os quais podem ser aplicados na medicina tais como: polissacarídeos, lipídios e proteínas. De modo semelhante, fungos nematófagos produzem enzimas extracelulares, tais como proteases, quitinases e colagenases, que estão envolvidas com a destruição das cutículas de nematóides para o processo de infecção (HUANG et al., 2004).

Entretanto, os fungos filamentosos são explorados para a produção de enzimas industriais. Entre as grandes vantagens oferecidas por enzimas produzidas por fungos destacam-se o menor custo de produção, bem como uma maior produtividade (SOARES et al., 2010).

A redução de custos e o aumento de rendimento são fatores que influenciam a escolha de um processo industrial. A utilização de fontes de carbono, por exemplo, provenientes de subprodutos de processos industriais, é uma maneira promissora de reduzir o preço de custo para a produção de moléculas de alto valor como antibióticos e enzimas (KAMMOUN et al., 2008). Desse modo, quanto mais informações forem obtidas sobre as enzimas envolvidas na interação com os nematoides, estas serão de extrema relevância industrial e biotecnológica. Tais parâmetros ajudam a definir o delineamento do processo.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a ação do fungo *Pleurotus ostreatus* e das suas proteases sobre larvas de *Panagrellus* sp. Além disso, outros objetivos foram: analisar o tempo de produção máxima dessas enzimas, o pH e a temperatura de máxima produção de proteases, bem como o efeito de inibidores sobre as enzimas. Dessa forma, foram realizados ensaios experimentais para a verificação da ação do fungo isolado e de suas proteases na destruição de larvas de *Panagrellus* sp., além de ensaios de caracterização enzimática.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Enzimas extracelulares

Proteases provenientes de microrganismos estão entre as mais importantes enzimas hidrolíticas (GUPTA et al., 2002). Para a obtenção de novas enzimas proteolíticas de valor econômico, novas cepas foram selecionadas a partir da natureza (TUNGA et al., 2003). Como exemplo disso, Damare et al. (2006) utilizaram vários isolados de fungos do fundo do mar para a produção de proteases alcalinas termo tolerantes.

Segundo Barrett e Rawlings (1995), enzimas proteolíticas que dependem de resíduos de serina para a atividade de seus sítios catalíticos, pertencem a muitas famílias diferentes de proteínas. Esses autores agruparam essas famílias em clãs, que são grupos de famílias de proteínas cujos membros possuem um ancestral comum. Sendo assim, as proteases constituem um grupo muito grande de enzimas, as quais diferem em propriedades, tais como especificidade do substrato e sítio ativo, mecanismo catalítico, bem como pH e temperatura ótimos (SUMANTHA et al., 2006). De acordo com o mecanismo catalítico, as proteases dividem-se em aspártico proteases, cisteíno proteases, metalo proteases e serino proteases (RAWLINGS e BARRETT, 1993).

As enzimas têm sido de grande interesse para a indústria de detergentes, pois promovem benefícios exclusivos, como a retirada de manchas provenientes de proteínas, que muitas vezes não podem de outro modo ser obtidos com as tecnologias convencionais. (GUPTA et al., 2002).

2.2. Proteases aplicadas ao controle biológico

Em relação ao controle biológico de pragas, as proteases, purificadas ou no extrato bruto, demonstram efetiva atividade nematicida sobre nematoides parasitas de plantas e animais. No trabalho de Sharon et al. (2001), os autores avaliaram a ação de proteases de *Trichoderma harzianum* no controle biológico do nematoide *Meloidogyne javanica*, parasita de raízes de plantas.

Vários trabalhos que envolvem a produção e a ação larvicida das proteases produzidas por fungos nematófagos foram realizados recentemente.

Em relação a trabalhos envolvendo fungos nematófagos predadores, Soares et al. (2012), demonstraram que uma serinoprotease produzida pelo fungo nematófago *Monacrosporium thaumasium* (NF34a) apresentou atividade larvicida sobre larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*. Nesse mesmo trabalho, os autores também purificaram uma serino protease (Mt1) utilizando cromatografia de troca iônica, conforme mostra a figura 1. Soares et al. (2013) otimizaram a produção de protease pelo fungo *Monacrosporium sinense*, e demonstraram mais uma vez a sua atividade larvicida. Além disso, Braga et al. (2012) purificaram uma serino protease, produzida pelo fungo nematófago *Duddingtonia flagras* (AC001), com atividade larvicida sobre larvas infectantes de ciatostomíneos.

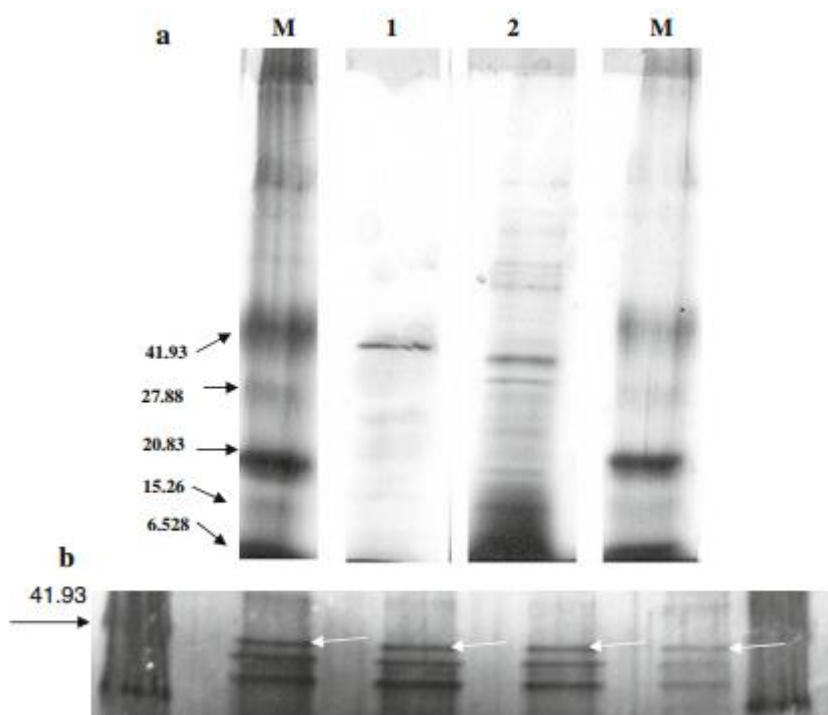


Figura 1. a) Análise da purificação de serino protease produzida por *M. thaumasium* (NF34a) através de SDS-PAGE a gel 10 %. Linha M, marcador com seu peso molecular. Linha 1: Fração de protease (M1) obtida a partir de cromatografia de troca iônica. Linha 2: extrato bruto. **b)** investigação de produção de Mt1 durante o processo de infecção. Setas Brancas: Mt1. Fonte: SOARES et al., 2012.

Quanto aos fungos nematófagos ovicidas, Braga et al. (2011) demonstraram que as proteases produzidas por *Pochonia chlamydosporia* destruíram ovos de *Ancylostoma* sp.

A atividade proteolítica do fungo nematófago *Arthrobotrys sinensis* (SF53) sobre larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* foi demonstrada por Soares et al. (2014), de acordo com a figura 2. Nesse estudo, demonstrou-se que após 24 horas, proteases hidrolisaram a cutícula das larvas. Uma serino protease e quitinases purificadas de *Paecilomyces lilacinus* também demonstraram atividade sobre ovos de *Meloidogyne javanica*, nematóide que está associado ao sistema radicular das plantas (Khan et al., 2004).

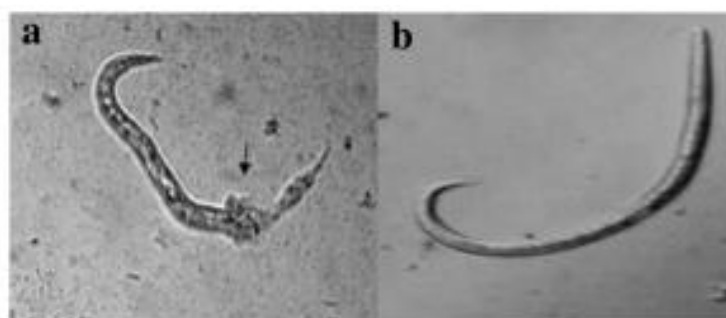


Figura 2. Microfotografia de atividade nematocida das proteases do fungo nematófago *Arthrobotrys sinensis* (SF53) no primeiro estágio larvas de *Angiostrongylus vasorum* após 24 horas. a) grupo tratado e b) grupo de controle. Seta preta indica a ação das proteases sobre as larvas. Fonte: Soares et al. 2014.

Contudo, o mecanismo molecular detalhado da ação patogênica de fungos contra nematoides ainda não foi completamente compreendido. No entanto, segundo Liang et al. (2011), entender as características estruturais das proteases é necessário para o esclarecimento de possíveis mecanismos envolvidos na virulência fúngica.

2.3. Fungos nematófagos

A grande maioria dos fungos nematófagos é classificada na divisão *Deuteromycetes*, classe *Hyphomycetes*, ordem *Hyphomycetales* e família *Moliniaceae* (ARAÚJO, 2009). Quanto à maneira pela qual capturam nematóides, esses fungos são divididos em dois grupos principais: os predadores que utilizam hifas para a captura e os endoparasitas, os quais produzem esporos que rompem a cutícula e penetram no nematóide (Larsen et al., 1997).

Waller e Faedo (1993) testaram noventa e quatro espécies de fungos nematofagos sobre larvas de nematóides *Arthrobotrys*, *Geniculifera* e *Monacrosporium* presentes em culturas de fezes de ovelhas. Mesmo em concentrações baixas, resultou em redução significativa no número de larvas infectantes em relação ao controle.

Araújo et al. (2004) mencionam que fatores como capacidade de produção em escala industrial, custos de produção, competitividade com as drogas tradicionais consagradas no mercado e o tempo de sobrevivência do organismo em formulações comerciais, são essenciais para o emprego comercial de um microrganismo no controle biológico. Assim, existe a necessidade de maiores investigações para viabilizar o uso econômico desses organismos em larga escala de modo que possam ser utilizados nas formulações de controladores biológicos contra nematoides.

2.4. Produção de Proteases

A produção de proteases por microrganismos é muito influenciada por componentes do meio, especialmente fontes de carbono e nitrogênio, e fatores físicos tais como temperatura, pH, tempo de incubação, agitação e a densidade do inoculo (ABIDI et al., 2008). Proteases provenientes de microrganismos têm ganhado cada vez mais importância em comparação com os produtos químicos convencionais que promovem as reações de clivagem de peptídeos, por causa do seu custo de produção mais baixo, além do uso de recursos renováveis empregados nos processos produtivos (POTUMARTHI et al., 2007).

Comercialmente, a otimização da composição do meio fermentativo para a produção de proteases é feita com o objetivo de garantir um equilíbrio entre os vários componentes do meio. Dessa forma ocorre, no final da fermentação, redução da quantidade de componentes que não foram utilizados (KUMAR e TAKAGI, 1999).

Gupta et al. (2002) relatam que a produção de protease alcalina de *Bacillus mojavensis* pode ser aumentada por repressão e indução utilizando alimentação intermitente, durante o crescimento do micro-organismo, sob operações de semi- batelada e batelada alimentada. Beg et al. (2003), utilizaram a metodologia de superfície de resposta para estudar os vários

efeitos dos fatores físico-químicos na produção de protease alcalina de *B. mojavensis*. Além disso, esses autores validaram o modelo previsto nessa metodologia em um biorreator de 14 L. A atividade da enzima no biorreator foi de 2389 U/mL obtida em 12 horas em comparação com 558 U/ mL após 24 h em culturas em frascos erlenmeyer.

Hadj-Ali et al. (2007) avaliaram a produção de proteases alcalinas extracelulares de *Bacillus licheniformis* NH1 e investigaram os efeitos na atividade e estabilidade da enzima em diferentes faixas de pH e temperatura, bem como na presença de solventes orgânicos, entre outros fatores. No trabalho de Hmidet et al. (2009), os autores caracterizaram o extrato enzimático de *B. licheniformis* NH1 e estudaram a sua compatibilidade com vários detergentes comerciais líquidos e sólidos.

Esses estudos confirmam que há uma diversidade de microrganismos produtores de proteases. Contudo, mostram a necessidade de se conhecer mais as características bioquímicas e moleculares dessas enzimas, de modo que o seu emprego comercial seja efetivo.

3. METODOLOGIA

3.1. Microrganismos

3.1.1. Meio de cultivo para a preservação do fungo

No presente trabalho foi utilizado um isolado fúngico, *Pleorotus ostreatus* (PLO 06). Esses fungos são oriundos de solo do Brasil, na localidade de Viçosa e pertencem a Coleção do Departamento de Microbiologia/UFV. O microrganismo foi preservado por meio de transferência contínua para meios de cultura sólidos contendo água-ágar 2% e posteriormente foram replicados em placa de Petri.

O preparo do inóculo foi realizado retirando-se das placas de Petri discos de 2 cm, os quais foram adicionados ao meio de cultivo.

3.1.2. Meio de cultivo para a preservação dos nematoides

Nematoides de vida livre do gênero *Panagrellus* do Laboratório de Parasitologia, do Departamento de Veterinária, da Universidade Federal de Viçosa, Brasil, foram utilizados nesse trabalho. Sua preservação foi realizada em placas de Petri contendo meio de cultura a base de aveia úmida.

3.2. Cultivo para a produção de proteases

Micélios fúngicos de PLO 06 foram transferidos para frascos (250 mL), previamente autoclavados contendo 50 mL de meio líquido, de acordo com a metodologia descrita por Soares et al. (2013). O meio líquido foi composto de glicose a 10 g/L; extrato de levedura, 10 g/L; K_2HPO_4 , 5 g/L; $MgSO_4$, 0,10 g/L.

O inóculo fúngico contido nos frascos foi cultivado sob agitação a 180 rpm a 28 °C durante sete dias. Em seguida, o meio fermentado foi filtrado usando papel de filtro Whatman N° 1 a 4 °C e posteriormente centrifugado a 10000 x g, 4 °C, para se obter as proteases.

3.3. Medida da atividade proteolítica

A atividade proteolítica de *P. ostreatus* (PLO 06) foi medida de acordo com a metodologia descrita por Soares et al. (2013). Em um tubo de ensaio foram introduzidos 50 µL de extrato bruto, 450 µL de Tris-HCl pH 7,0 100 mM e 500 µL de solução de caseína 1%, pH 8,0. O meio de reação foi incubado durante 15 minutos a 40 °C e a reação interrompida pela adição de 1 ml de ácido tricloroacético 10% (m/v). Após 10 minutos, o meio de reação foi centrifugado a 10.000 x g durante 5 min. O sobrenadante foi recolhido e a absorbância lida espectrofotometricamente a 280 nm. Uma curva padrão de tirosina foi construída através da variação das concentrações de tirosina, conforme a figura 3. Uma unidade de protease foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µg de tirosina por minuto sob as condições de ensaio.

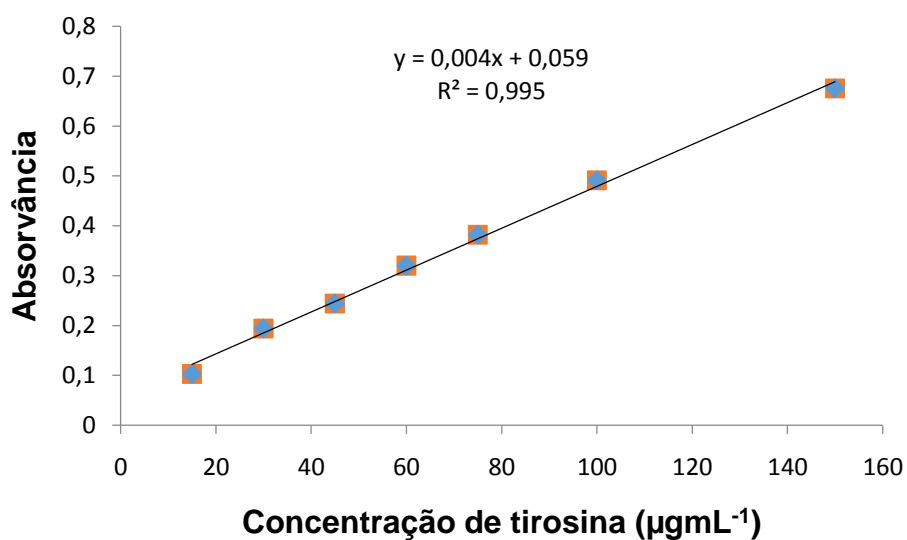


Figura 3. Curva padrão de tirosina.

3.4. Caracterização das Proteases

A caracterização enzimática foi realizada levando em consideração os efeitos de pH, temperatura e efeito de inibidores. Os ensaios de caracterização foram feitos com três repetições.

3.4.1. Efeitos do pH e da Temperatura

A atividade do extrato bruto foi caracterizada em diferentes valores de pH. Assim, foi utilizado o tampão citrato-fosfato 50 mM para os valores de pH 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9. A temperatura do ensaio foi de 40° C. A avaliação do efeito da temperatura na atividade proteolítica foi realizada em pH no qual a máxima atividade foi obtida no ensaio anterior em diferentes valores de temperatura (30° C, 40° C, 50° C, 60° C, 70° C e 80° C).

3.4.2 Efeito de Inibidores

O extrato bruto enzimático foi incubado com o inibidor fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), no pH e temperatura ótimos obtidos nos ensaios anteriores.

3.4.3 Atividade das proteases durante os dias de incubação

As amostras de meio de cultura foram coletadas diariamente, durante 7 dias a fim de medir a atividade proteolítica ao longo dos dias de cultivo, com o objetivo de obter o tempo de produção máxima de enzima.

3.5. Ensaio experimental nematicida com fungos (Ensaio A)

Para a realização do ensaio experimental nematicida com fungos e para o ensaio nematicida com proteases realizou-se a extração de *Panagrellus* sp por aparelho de Baermann e estes foram coletados em tubos de hemólises após seis horas de decantação. Para a sua manutenção, 1,0 mL de uma suspensão aquosa com cerca de 1000 *Panagrellus* foram inoculados em placas de Petri de poliestireno estéril contendo flocos de aveia fina e água na proporção de 1:1, de acordo com Araújo et al. (1993). Dois grupos foram formados em placas de Petri de 4,5 cm de diâmetro contendo 10 mL de água-

ágar 2% (AA2%), um grupo tratado e um grupo controle, sendo feitas 6 repetições para cada grupo. As placas de Petri foram previamente marcadas em campos de 4 mm de diâmetro. No grupo tratado cada placa de Petri continha 1000 larvas de *Panagrellus* sp e um dos fungos crescidos. O grupo controle (sem fungo) continha apenas 1000 larvas de *Panagrellus* sp. Ambos os grupos de placas foram incubados em câmara incubadora BOD, no escuro, a 28 °C. Durante cinco dias, a cada 24 horas, 10 campos aleatórios de 4 mm de diâmetro, em cada placa dos grupos tratados e controle, foram observados em microscópio óptico em objetiva de 10x, contando-se o número de larvas não destruídas em cada um, de acordo com a metodologia adaptada de Braga et al. (2010). Fotomicrografias foram retiradas para a comprovação da atividade de captura e posterior destruição dos nematoides.

A eficiência de destruição das larvas de *Panagrellus* sp em relação ao controle foi avaliada pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade. Os dados foram tratados estatisticamente pela análise de variância em níveis de significância de 1 e 5% de probabilidade (AYRES et al., 2003). O percentual de redução da média das larvas foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ Redução} = \frac{MLC - MLT}{MLC} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

Onde:

MLC = média de larvas do controle e,

MLT = média de larvas do tratamento.

3.6. Ensaio experimental nematicida com proteases (Ensaio B)

Com o intuito de avaliar a atividade nematicida das proteases de *Pleorotus ostreatus* (PLO 06), dois grupos foram formados em microtubos, um grupo tratado, no qual cerca de 50 larvas de *Panagrellus* sp foram incubadas juntamente com as proteases e um grupo controle no qual cerca de 50 larvas de *Panagrellus* sp foram incubadas sem a presença das enzimas. Seis repetições foram realizadas para cada grupo. Ambos os grupos foram incubados a 28° C, por 24 horas. Após esse período, o número total de larvas

foi contado (SOARES et al., 2013). Os dados foram submetidos à análise de variância em níveis de significância de 1 e 5% de probabilidade. A eficiência da destruição das larvas em relação ao controle foi avaliada pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade (AYRES et al., 2003). O percentual de redução da média de larvas foi calculado de acordo com a Equação 1.

3.7. Zimograma

A fim de se confirmar a atividade proteolítica do extrato bruto do fungo *P. ostreatus*, um zimograma foi realizado na presença de um detergente, utilizando caseína como substrato (Caseína-SDS-PAGE) (HUMMEL et al., 1996). As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% contendo caseína a 1%. As amostras foram misturadas com tampão de amostra gel-nativo (glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 1% (m/v), Tris- HCl 0,25M) e aplicado sem aquecimento prévio. Após a eletroforese, o gel foi incubado em uma solução de Triton X-100 2,5% durante 1 hora, seguido por três lavagens com água. O gel foi então incubado em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) durante 1 hora a 60 °C. Para posterior revelação, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 e descorado logo em seguida com solução descorante.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ensaio experimental nematicida com fungos (Ensaio A)

O fungo *Pleurotus ostreatus* (PLO 06) mostrou grande capacidade de capturar larvas de *Panagrellus* sp *in vitro*. Após 24 horas, observou-se uma interação de hifas do fungo com nematoides, como se mostra na Figura 4a. Na Figura 4b pode ser notada a destruição das larvas, bem como a colonização por hifas fúngicas. A Figura 4c mostra a completa destruição e/ou digestão das larvas pelos fungos testados.

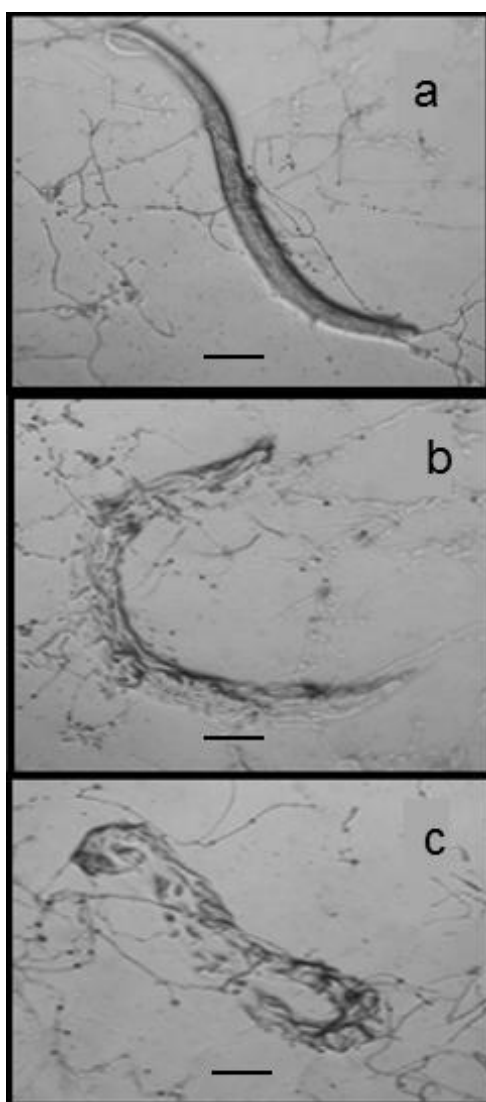


Figura 4. a-c. a: ação inicial de hifas do fungo *Pleurotus ostreatus* em larvas de *Panagrellus* sp. B: destruição de larvas e colonização por hifas de *Pleurotus ostreatus* c: destruição e / ou digestão de larvas *Panagrellus* sp por *Pleurotus ostreatus*. Barras: a-7,000 μ m; b-4,500 μ m e c-6,000 μ m.

Os fungos testados foram eficazes na destruição de larvas de *Panagrellus* sp., como mostrado na Tabela 1. No primeiro dia do experimento, as reduções percentuais observadas foram superiores a 50%, atingindo valores superiores a 90% no terceiro dia.

Em relação às placas do grupo controle, não houve presença de fungos durante o experimento. Por outro lado, analisando o grupo tratado, a presença de larvas em placas de Petri contendo ágar-água 2% (AA 2%) foi essencial para a digestão e a colonização pelos fungos testados, uma vez que a presença dessas referidas larvas induz o crescimento do microrganismo. Tal fato é semelhante ao trabalho de Braga et al. (2014).

Os resultados deste estudo demonstraram a atividade nematicida de fungos do gênero *Pleurotus* sobre nematóide de vida livre *Panagrellus* sp. A tabela 1 apresenta a média diária do número de larvas, desvio padrão dos percentuais de redução de larvas de *Panagrellus* sp. em ágar-água (AA 2%) durante o período de três dias nos tratamentos com o fungo *Pleurotus ostreatus* e do grupo controle, sem fungos. As espécies de fungos testados têm atividade contra fitonematoides, no entanto, estes isolados nunca foram testados como possibilidade real de controle biológico. Nesse sentido, pode-se argumentar que, entre as várias espécies de fungos, existem variações entre a ação de diferentes isolados, que devem ser constantemente testados (MENDOZA-DE-GIVES, 1999). Esta informação está também de acordo com Okorie et al. (2011) que testaram a atividade nematicida de duas espécies de fungos do gênero *Pleurotus* e que não demonstraram distinção em suas atividades.

Tabela 1. Resultado do ensaio experimental nematicida com fungo *Pleurotus ostreatus* durante três dias de tratamento.

Dias	Presença do fungo <i>Pleurotus ostreatus</i>	Controle (Sem o Fungo)	Redução (%)
1	10.2 ^a ± 4.3	29.1 ^b ± 8.92	65.6
2	6.2 ^a ± 3.4	15.7 ^b ± 10.60	77.4
3	1.4 ^a ± 0.8	29.4 ^b ± 11.15	95.2

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas linhas não diferem estatisticamente (p>0.01).

Hibbett e Thorn (1994) mencionam que o mecanismo básico da atividade de fungos do gênero predador *Pleurotus* é a produção de pequenas

gotas de toxina derivadas de ácido linoléico. Observou-se ainda que os nematoides paralisados são posteriormente invadidos pelas hifas. Estes resultados estão de acordo com o presente trabalho, no qual PLO 06 mostrou atividade nematocida e produção dessas gotículas tóxicas contra larvas de *Panagrellus* sp. (Figura 5a, 5b).



Figura 5. a-b. Larvas de *Panagrellus* sp. (seta branca) e produção de gotículas tóxicas por fungos *Pleurotus ostreatus* (seta preta / detalhe). Barra: a-15,000 μ m.

Alguns trabalhos, que tiveram como alvo o controle de fitonematoides *in vitro*, foram realizados com a espécie *P. ostreatus* (OKORIE et al., 2011). Contudo, com base em estudos anteriores de BRAGA et al. (2014) com outros grupos de fungos nematófagos, o presente ensaio experimental mostrou-se ser elucidativo no que diz respeito à redução de nematoides em placas de Petri, na presença de meio ágar-água 2%, uma vez que estas placas foram observadas durante três dias a cada 24 horas. Esta premissa é importante para elucidar o mecanismo predatório desta espécie em nematoides de vida livre (THORN e BARRON, 1984).

O organismo modelo *Panagrellus* sp. tem sido utilizado para a observação da atividade predatória dos fungos com potencial nematófago, uma vez que eles são ágeis e proporcionam a produção de armadilhas pelos fungos (EREM e PRAMER, 1965). Este tipo de modelo é importante, pois fornece a base para outros experimentos que visam à redução de nematoides que são prejudiciais aos animais, humanos e aos vegetais (JAFFEE e MULDOON, 1997, TAVELA et al., 2012;).

Comparativamente, o fungo predador *Monacrosporium* spp. demonstrou ser eficaz em capturar e destruir *Panagrellus* sp. e *Meloidogyne incognita*, em condições de laboratório (GOMES et al., 1999). Neste trabalho, os autores demonstraram que *Panagrellus* sp foram os mais susceptíveis ($p < 0,05$). Esses resultados estão de acordo com o presente trabalho, demonstrando que a espécie *P. ostreatus* reduziu larvas de *Panagrellus* sp. em placas de Petri em mais de 90% no final de 3 dias, sugerindo, assim, o enorme potencial biocontrolador destas espécies.

4.2. Ensaios de atividade proteolítica do fungo *Pleurotus ostreatus*

Neste estudo, foi observado que o fungo *P. ostreatus* (PLO 06) mostrou-se bom produtor de proteases. Conforme dados da literatura, a realização de alguns estudos com fungos nematófagos demonstrou potencial para a produção de enzimas extracelulares com atividade nematicida (BRAGA et al., 2012; BRAGA et al., 2013; SOARES et al., 2012; SOARES et al., 2013,).

A Figura 6 apresenta a atividade de proteases durante o tempo de cultivo de 7 dias nas condições de temperatura de 40 °C e pH 8,0. A maior atividade proteolítica foi observada no sexto dia de incubação com valor de 91,7 U/mL.

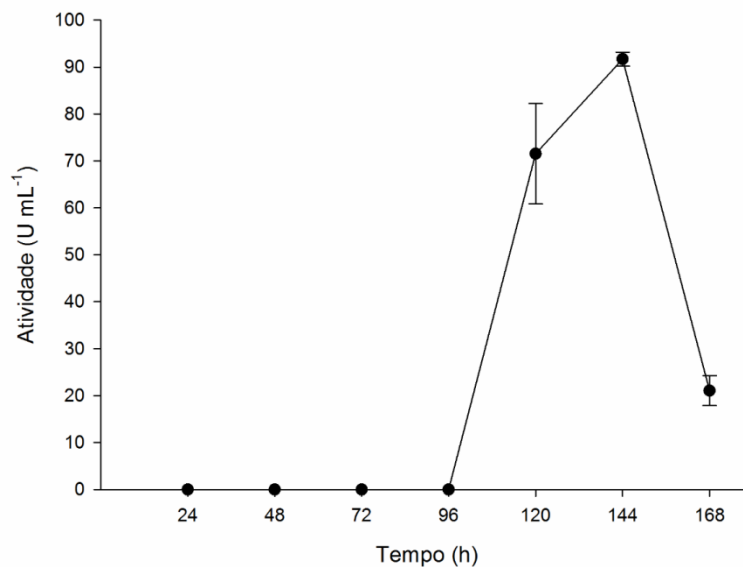


Figura 6. Ensaio de atividade proteolítica, medida a pH 8,0, durante o período de incubação de 168 horas (7 dias).

A figura 7a apresenta os valores da atividade proteolítica para a faixa de pH de 3 a 9, mantendo-se a temperatura constante em 40 °C e tampão citrato-fosfato 50 mM foi usado em toda a faixa de pH. O maior valor de atividade (70,8 U/mL) foi observado para o pH 9.

A figura 7b mostra o perfil da atividade enzimática em diferentes temperaturas. As temperaturas testadas foram: 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C e 80 °C, mantendo-se o pH no valor de 9, obtido no ensaio anterior. Observou-se a atividade enzimática mais elevada (121,3 U/mL) a 60 °C.

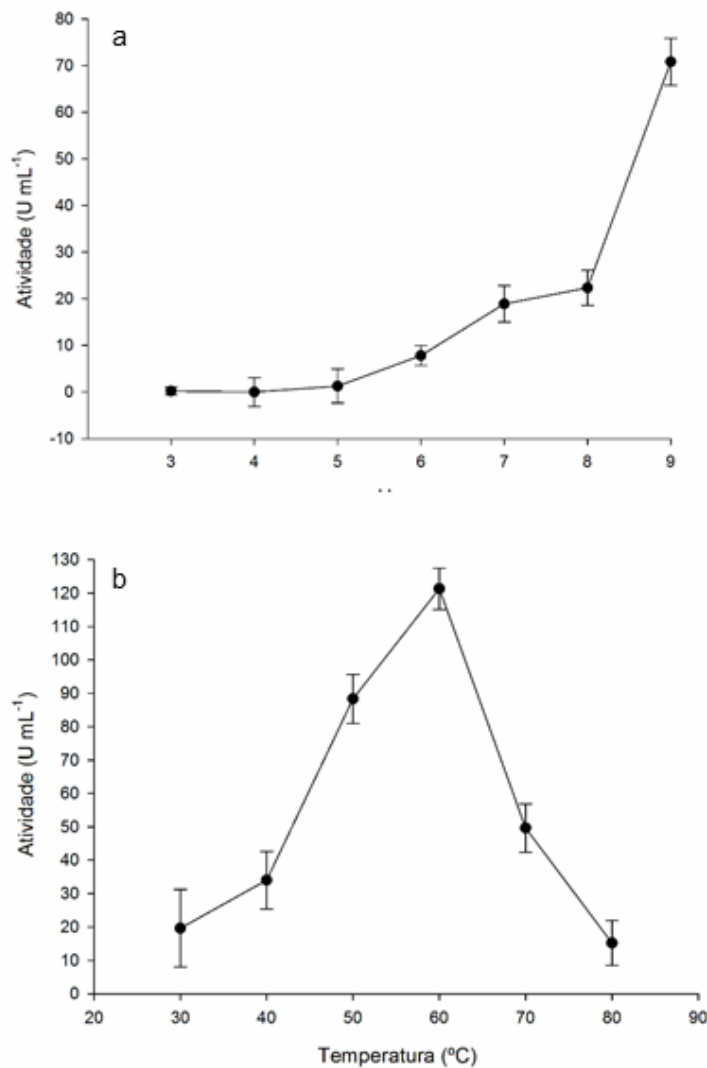


Figura 7. a: Efeito do pH sobre a atividade das proteases de *Pleurotus ostreatus* (PLO 06). b: Efeito da temperatura sobre a atividade das proteases de *Pleurotus ostreatus* (PLO 06).

Em relação ao ensaio com o inibidor, demonstrou-se que a atividade proteolítica total foi inibida por PMSF (tabela 2), sugerindo que as proteases produzidas por *P. ostreatus* são serino proteases. Shin e Choi (1998) purificaram e caracterizaram uma cisteíno protease a partir do fungo *P. ostreatus*, após a formação do corpo de frutificação. Corpos de frutificação geralmente são formados na presença de matriz sólida. Assim, para produção de cisteíno proteases a partir de *P. ostreatus*, a fermentação em estado sólido possivelmente será o processo mais eficiente. Neste estudo, o fungo como cogumelo não foi utilizado, o que sugere que em diferentes estágios morfológicos são produzidas diferentes proteases. Dessa maneira, para a

produção de serino proteases, a fermentação submersa é o processo industrial sugerido, embora outros estudos devam ser feitos para uma maior elucidação.

Tabela 2. Influência do inibidor PMSF (1 mM) na atividade relativa (%) de proteases de *Pleurotus ostreatus* (PLO 06) em pH= 9 e temperatura = 60 °C.

Tratamentos	Atividade relativa (%)
Controle ^a	100
PMSF	0

^a50 mM Citrato - fosfato (pH 9,0; 60°C)

O perfil proteolítico de proteases produzidas por *P. ostreatus* foi avaliada por um zimograma (figura 8). Por meio da presença de diferentes halos de digestão em gel, foi observada a presença de mais de uma protease. Este resultado confirma os dados experimentais obtidos por Faraco et al. (2005), que demonstraram por zimograma que o fungo *P. ostreatus* produz diferentes proteases.

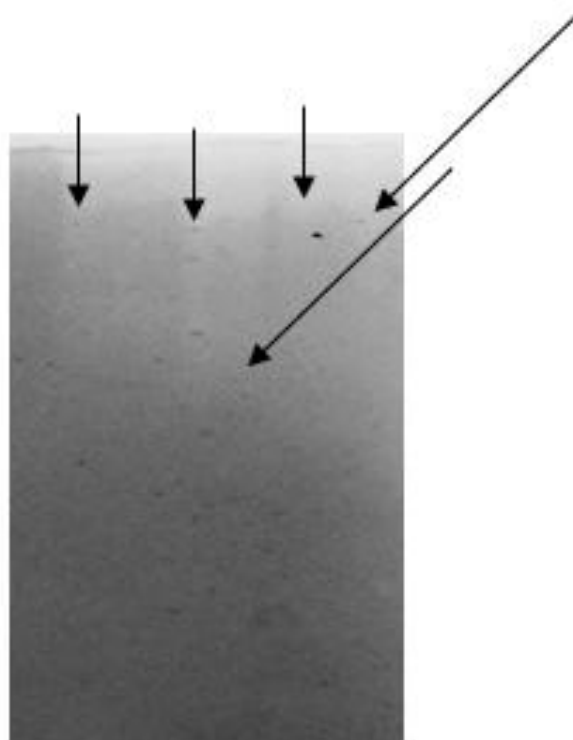


Figura 8. Zimograma de proteases produzidas pelo fungo *Pleurotus ostreatus* (PLO 06) em gel de poliacrilamida contendo SDS. As setas destacam os diferentes halos de digestão, o que sugere a existência de mais de uma protease.

4.3. Ensaio experimental nematicida com proteases (Ensaio B)

Em relação ao ensaio nematicida de proteases de PLO 06, no intervalo de 24 horas, estas enzimas apresentaram uma porcentagem de redução significativa ($p < 0,05$) de 42% no número de larvas de *Panagrellus* sp., quando comparadas com o controle. Soares et al. (2013) utilizaram proteases do fungo nematófago *Monacrosporium sinense* em larvas de *Panagrellus redivivus* e observou que as enzimas purificadas destruíram mais de 90% das larvas submetidas ao tratamento. No presente trabalho, a destruição foi menor, no entanto, vale ressaltar que o fungo *M. sinense* pertence à classe de fungos predadores, enquanto o fungo *P. ostreatus* pertence à classe de fungos produtores de toxina (YANG et al., 2007). Este fato é importante, pois é conhecido que diferentes classes de fungos produzem diferentes metabólitos e em concentrações distintas (BRAGA et al., 2012).

Neste estudo, comparando a redução percentual de *Pleurotus ostreatus* (95%) com a ação das suas proteases (42%) em larvas de *Panagrellus* sp, houve um valor mais elevado da ação do fungo. No entanto, este fato pode ser explicado por meio da diferença de tempo de interação com as larvas nos dois ensaios (três dias no ensaio com o fungo e apenas um dia no ensaio com as enzimas).

5. CONCLUSÕES

Os resultados mostraram que o fungo *P. ostreatus* (PLO 06) e suas proteases têm uma atividade predadora significativa contra as larvas de nematoides do gênero *Panagrellus*, demonstrando potencial para o uso no controle biológico integrado.

O maior valor para atividade enzimática das proteases foi observado em condição de elevado valor de pH (9,0). O tempo para a produção máxima de proteases foi de 6 dias. A atividade máxima de enzimas ocorreu a alta temperatura, viabilizando a aplicação biotecnológica das enzimas industrialmente.

Testes com inibidor (PMSF) indicaram que as enzimas, em sua grande maioria, são serino proteases e o zimograma demonstrou a presença de diferentes enzimas, devido à formação de distintos halos de digestão.

A fermentação submersa é sugerida como processo industrial para a produção de serino proteases a partir de *P. ostreatus*. Contudo, são necessários mais estudos para a confirmação em escala industrial. Além disso, este é o primeiro relato do uso de proteases de *P. ostreatus* (PLO 06) contra larvas de nematoides do gênero *Panagrellus*, portanto, ainda há muito a ser estudado sobre a ação e o mecanismo destas enzimas nematocidas.

6. REFERÊNCIAS

- ABIDI, F.; LIMAMB, F.; NEJIBA, M.M. Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: Assay as biodetergent. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1202–1208, 2008.
- ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S.; MAIA, A.S. Antagonistic Effect of *Predacious Arthrobotrys* fungi on Infective *Haemonchus placei* Larvae. **Journal of Helminthology**,v. 67, p. 136-138, 1993.
- ARAÚJO, J V; MOTA, M. DE A.; CAMPOS, A. K. Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Seropédica-RJ**, v. 13, n.suplemento, p. 165-170, 2004.
- ARAÚJO, F.B. Controle de Nematóides Gastrintestinais de Ovinos com o uso do fungo Nematófono *Duddingtonia flagrans*, **Universidade Federal do Paraná**, p. 36, 2009.
- AYRES, M.; AYRES, J.R.M.; AYRES, D.L.;SANTOS, A.S. Aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas. **Belém: Sociedade civil mamirauá: Brasília CNPq**, p. 290, 2003.
- BARRETT, A.J., RAWLINGS, N.D. Perspectives and Biochemistry and Biophysics: Families and clans of serine peptidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.318 (2), p. 247-250, 1995.
- BEG, Q.K.; SAHAI, V.; GUPTA, R. Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor. **Process Biochemistry**, v.39, p. 203-209, 2003.
- BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; ARAUJO J.M.; SILVA, A.R.; CARVALHO, R.O.; FERREIRA, S.R.; BENJAMIN, L.A. Predatory activity of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on horse *cyathostomin* infective larvae. **Tropical Animal Health Production**, v. 42, p.1161-1163, 2010.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.M.; SILVA, A.R.; ARAÚJO, J.V.; CARVALHO, R.O.; SOARES, F.E.F.; QUEIROZ, J.H.; GENIER, H.L.A. Ação ovicida do extrato bruto enzimático do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Ancylostoma* sp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44 (1), p.116-118, 2011.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; SOARES, F.E.F.; GENIER, H.L.A.; QUEIROZ, J.H. An extracellular serine protease of an isolate of *Duddingtonia flagrans* nematophagous fungus. **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, p. 1131-1142, 2012.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; SOARES, F.E.F.; ARAUJO, J.M.; TAVELA, A.O.; MELLO, I.N.K.; CARVALHO, L.M.; PAULA, A.T.; LELIS, R.T.; QUEIROZ, J.H. Interaction of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on *Amblyomma cajannense* engorged females and enzymatic characterisation of its chitinase. **Biocontrol Science Technology**, v. 23, p. 584-594, 2013.

BRAGA, F. R.; SOARES, F. E. F.; CARVALHO, R. O.; SILVA, A. R.; ARAÚJO, J. V.; FRASSY, L.N.; LAFISCA, L. Predatory capability of the nematophagous fungus *Arthrobotrys robusta* preserved in silica gel on infecting larvae of *Haemonchus contortus*. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, p. 571-574, 2014.

DAMARE, S.; RAGHUKUMAR, C.; MURALEEDHARAN, U.D.; RAGHUKUMAR, S. Deep-sea fungi as a source of alkaline and cold-tolerant proteases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p. 172–181, 2006.

EREN, J.; PRAMER, D. The most probable number of nematode-trapping fungi in Soil. **Soil Science**, v. 99, p. 285, 1965.

FARACO, V.; PALMIERI, G.; FESTA, G.; MONTI, M.; SANNIA, G.; GIARDINA, P. A new subfamily of fungal subtilases: structural and functional analysis of a *Pleurotus ostreatus* member. **Microbiology**, v.151, p. 457- 466, 2005.

FIEDLER, A. K.; LANDIS, D. A.; WRATTEN, S.D. Maximizing ecosystem services from conservation biological control: The role of habitat management. **Biological Control**, v. 45, p. 254–271, 2008.

FURLANI, R.P.Z.; GODOY, H.T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.64 (2), p.149-154, 2005

GOMES, A.P.S, ARAÚJO, J.V, RIBEIRO, R.C.F. Differential in vitro pathogenicity of predatory fungi of the genus *Monacrosporium* for phytonematodes, free-living nematodes and parasitic nematodes of cattle. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v. 32, p. 79-83, 1999.

GUPTA, R., BEG, Q.K., LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 15–32, 2002.

HADJ-ALI, N.; AGREBI, R.; GHORBEL-FRIKHA, B.; SELLAMI-KAMOUN, A.; KANOUN, S.; NASRI, M. Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p. 515–523, 2007.

HIBBETT, D.S.; THORN, R.G. Nematode trapping in *Pleurotus tuberregium*. **Mycologia**, v. 86, p. 696–699, 1994.

HMIDET, N.; HADJ-ALI, N., HADDAR, A., KANOUN, S.; SELLAMI-KAMOUN, A, NASRI, M. Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. **Biochemical Engineering Journal**, v. 47, p. 71–79, 2009.

HUANG, X.W.; ZHAO, N.H.; ZHANG, K.Q. Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. **Research Microbiology**, v. 155, p. 811–816, 2004.

HUMMEL, K.M.; PENHEITER, A.R.; GATHMAN, A.C.; LILLY, W.W. Anomalous estimation of protease molecular weights using gelatin containing SDS-PAGE. **Analytical Biochemistry**, v. 233, p.140–142, 1996.

JAFFEE, B.A.; MULDOON, A.E. Suppression of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by alginate pellets containing the nematophagous fungi *Hirsutella rhossiliensis*, *Monacrosporium cionopagum* and *M. elliposporum*. **Biocontrol Science and Technology**, v.7, p. 203-218, 1997.

KAMMOUN, R.; NAILI, B.; B, BEJAR, S. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). **Bioresearch Technology**, v. 99, p. 5602-5609, 2008.

KHAN, A.; WILLIAMS, K.L.; NEVALAINEN, H.K.M. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. **Biological Control**, v. 31, p. 346–352, 2004.

KUMAR, C.G., TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 561–594, 1999.

LARSEN, M.; NANSEN, P.; GRONVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S.A. Biological control of gastro-intestinal nematodes: facts, future, or fiction? **Veterinary Parasitology**, v. 72, p. 470-492, 1997.

LIANG, L.M.; LIU, S.Q.; YANG, J.K.; MENG, Z.H.; LEI, L.P.; ZHANG, K.Q. Comparison of homology models and crystal structures of cuticle degrading proteases from nematophagous fungi: structural basis of nematicidal activity. **The FASEB Journal**, v. 25, p.1894–1902, 2011.

MENDOZA-DE-GIVES, P. Interaction between nematodes and biocontrol agents with potential for use in biomanagement systems. **PhD Thesis, University of Nottingham**, p. 219, 1999.

OKORIE, C.C.; ONONUJU, C.C.; OKWUJIAKO, I.A. Management of *Meloidogyne incognita* with *Pleurotus ostreatus* and *P. tuberregium* in Soybean. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 13, p. 401-405, 2011.

PEREIRA, J.L.; NORONHA, E.F.; MILLER, R.N.G.; FRANCO, O.L. Novel insights in the use of hydrolytic enzymes secreted by fungi with biotechnological potential. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 573-591, 2007.

POTUMARTHI, R.; SUBHAKAR, C.; JETTY, A. Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis* NCIM-2042: Effect of aeration and agitation regimes. **Biochemical Engineering Journal**, v.34, p.185–192, 2007.

RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J. Evolutionary families of peptidases. **Biochemistry Journal**, v.290, p. 205-218, 1993.

SHARON, E.; BAR-EYAL, M.; CHET, I.; HERRERA-ESTRELLA, A.; KLEIFELD, O.; SPIEGEL, Y. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v. 91, p. 687-693, 2001.

SHIN, H.H.; CHOI, H.S. Purification and characterization of cysteine protease from *Pleurotus ostreatus*. **Bioscience and Biotechnology Biochemistry**, v. 62, p. 416-8,1998.

SOARES, F.E.F., BRAGA, F.R., GENIER, H.L.A., ARAÚJO, J.V., FERREIRA, S.R., ARAUJO, J.M., TAVELA, A.O., VILELA, V.L.R., QUEIROZ, J.H. Optimization of medium composition for protease production by *Paecilomyces marquandii* in solid-state-fermentation using response surface methodology. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, p. 2699-2703, 2010.

SOARES, F. E. F.; BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J. V.; LIMA, W. S.; MOZER, L. R.;QUEIRÓZ, J.H. In vitro activity of a serine protease from *Monacrosporium thaumasium* fungus against first-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum*. **Parasitology Research**, v.110, p. 2423–2427, 2012.

SOARES, F.E.F.;BRAGA, F.R.;ARAÚJO, J.V.;GENIÊR, H.L.A.; GOUVEIA, A.S.; Queiroz, J.H. Nematicidal activity of three novel extracellular proteases of the nematophagous fungus *Monacrosporium sinense*. **Parasitology Research**, v. 112, p. 1557-65, 2013.

SOARES, F.E.F; QUEIROZ, J.H ; BRAGA, F.R ; SANTOS , W.L; ZAMPROGNO, T.; ARAÚJO, J.V . Proteolytic activity of the nematophagous fungus *Arthrobotrys sinensis* on *Angiostrongylus vasorum* larvae. **BMC Research Notes**, v. 7, p. 811, 2014.

SUMANTHA, A.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, p. 211–220, 2006.

TAVELA, A.O.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; ARAUJO, J.M.; MAGALHAES, L.Q.; SILVEIRA W.F.; BORGES, L.A. In vitro association of nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF34) and *Pochonia chlamydosporia* (VC1) to control horse *cyathostomin* (Nematoda: Strongylidae). **Biocontrol Science and Technology**, v.22, p. 607-610, 2012.

THORN, R.G.; BARRON, G.L. Carnivorous mushrooms. **Science**, v. 224, p. 76-78, 1984.

TUNGA, R.; SHRIVASTAVA, B.; BANERJEE, R. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1553–1558, 2003.

WALLER, P.J.; FAEDO, M. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: screening studies. **Veterinary Parasitology**, v. 49, p. 285-297, 1993.

YANG, J.L.; TIAN, B.; LIANG, L.; ZHANG, K.Q. Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.75, p. 21-31, 2007.

YANG, J.; LIANMING, L.; JUAN,L.; ZHANG, K.Q. Nematicidal enzymes from microorganisms and their applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 7081-95, 2013.

YASHVANT, P.; NARAIAN, R.; SINGH, V.K. Medicinal Properties of *Pleurotus* Species (Oyster Mushroom): A Review. **World Journal of Fungal and Plant Biology**, v. 3, n.1, p. 01-12, 2012.

