

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA NORMAL SUPERIOR
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE PROTEASES PRODUZIDAS POR ESPÉCIES
DE *Penicillium*

MANAUS

2018

Ana Kezia Pimentel de Brito

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE PROTEASES PRODUZIDAS POR ESPÉCIES
DE *Penicillium***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como pré-requisito para conclusão do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Amazonas-UEA.

Orientadora: Larissa de Souza Kirsch

MANAUS

2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

B862c Brito, Ana Kezia Pimentel de.
Caracterização parcial de proteases produzidas por espécies de *Penicillium* / Ana Kezia Pimentel de. Brito.
Manaus : [s.n], 2018.
32 f.: color.; 30 cm.

TCC - Graduação em Ciências Biológicas -
Licenciatura - Universidade do Estado do Amazonas,
Manaus, 2018.
Inclui bibliografia
Orientador: Kirsch, Larissa de Souza

1. Enzimas . 2. Biocatalizadores. 3. *Penicillium* spp.. I. Kirsch, Larissa de Souza (Orient.). II. Universidade do Estado do Amazonas. III. Caracterização parcial de proteases produzidas por espécies de *Penicillium*

ANA KEZIA PIMENTEL DE BRITO

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE PROTEASES PRODUZIDAS POR ESPÉCIES
DE *Penicillium***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como pré-requisito para obtenção do título de
Licenciado em Ciências Biológicas, pelo
Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas
da Universidade do Estado do Amazonas-UEA

Aprovado em: _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Larissa de Souza Kirsch - Orientadora

Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes – ILMD/Fiocruz-Amazônia

MSc. Thayana Cruz de Souza - ILMD/Fiocruz-Amazônia

Dedico principalmente a Deus, aos meus pais,
família, amigos e a minha orientadora.

A todos aqueles que fizeram parte deste
projeto.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida e por ter me guiado até aqui, mostrando a mim que Seus sonhos são maiores que os meus e por ter sido meu maior exemplo.

Aos meus pais, Maria e Walter, pelos valores transmitidos a mim e aos meus irmãos. Por todo o sacrifício que fizeram para que eu pudesse concluir esta etapa de formação acadêmica.

Aos meus irmãos queridos, Lemoel e Walter Lucas, que sempre me apoiaram e incentivaram. A minha irmã, Alderlene, que sempre serviu de exemplo, e por ter me ajudado e alegrado durante este período.

Ao namorado, Maxwell Medeiros, por todo amor, companheirismo, compreensão e animação que transmite.

Agradeço as minhas amigas, Alderlene Pimentel, Laynah Pimenta e Juliana Nascimento pelos momentos de descontração, pelas conversas, apoio e incentivo.

Agradeço a Universidade do Estado do Amazonas, a por ser um lugar que proporciona muitas oportunidades. Ao Laboratório de Micologia da UFAM, por todo aprendizado e companheirismo que obtive.

A minha orientadora, Professora Doutora Larissa de Souza Kirsch, por transmitir seus ensinamentos, e pelo encorajamento na ciência.

Agradeço a meus professores que foram tão essenciais para a conclusão deste curso. A meus colegas de curso pelo convívio, auxílio e pelos momentos de descontração.

“Sabe, coisas extraordinárias só acontecem a pessoas extraordinárias, vai ver é um sinal que você tem um destino extraordinário, algum destino maior do que você pode ter imaginado.”

(C. S. Lewis)

RESUMO

No uso mundial de enzimas as proteases estão em destaque, correspondendo a 60% do total de biocatalisadores comercializados no mundo aplicadas em indústrias diversificadas. Grande parte das proteases comercializadas são provenientes de fungos filamentosos, no entanto apesar de diversas pesquisas apontarem para a produção destas enzimas a partir de espécies de *Penicillium*, pouco se sabe sobre a caracterização parcial de proteases de espécies da região Amazônica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a potencialidade das enzimas proteolíticas que apresentem características específicas obtidas do extrato bruto de *P. fellutanum* CFAM 60, *Penicillium* sp. CFAM 91 e *P. citrinum* CFAM 233, cedidos pela Coleção de Fungos da Amazônia-CFAM/FIOCRUZ – AM, produzidos por fermentação submersa. As espécies foram cultivadas em Ágar Extrato de Levedura Czapek, em placa de Petri, mantendo os cultivos a 25°C, durante sete dias. Dos cultivos obtidos foram retirados 03 discos miceliais para serem inoculados em 50mL de MGYB [(glicose + peptona + extrato de levedura, pH 6,0)]. A fermentação em meio líquido foi sob a condição de agitação e estacionária, incubados a 30°C, 150rpm. Após cinco dias o extrato foi filtrado a vácuo. Para a determinação da atividade das proteases utilizou-se 150µL do extrato e 250µL de azocaseína em tampão Tris-HCl, pH 7,2, realizando a leitura a 440nm. A atividade proteolítica foi determinada para todos os extratos, sendo de maior valor 43,13 U/mL, nos extratos obtidos de *P. citrinum* CFAM 233, e o menor valor 34,17 U/mL de *Penicillium* sp. CFAM 91. Nos extratos obtidos por cultivo estacionário, a espécie que apresentou melhor atividade enzimática, no valor de 34,22 U/mL, foi *P. fellutanum* CFAM 60, e a menor atividade, 11,24 U/mL, foi o *P. citrinum* CFAM 233. Para a caracterização parcial da enzima, foi selecionada a espécie de *P. citrinum* CFAM 233 e observou-se que o pH e temperatura ótimos das proteases foram em pH 6,0 e 50°C, respectivamente. Ao ser submetida ao teste de estabilidade, a enzima manteve-se estável do pH 6,0-10,0, com 100% de atividade e de 25 a 30°C. Assim pode-se concluir que *P. citrinum* CFAM 233 apresenta melhor produção proteases e, quando submetido a fermentação sob agitação, tais enzimas têm característica ácida e afinidade em temperatura elevada, inferindo sua aplicação na indústria de alimentos.

Palavras-chave: Enzimas; Biocatalizadores; *Penicillium* spp.

ABSTRACT

In world use of enzymes the proteases are highlighted, corresponding to 60% of the total of biocatalysts sold in the world applied in diversified industries. Most of the proteases commercialized are derived from filamentous fungi, however, although several studies point to the production of these enzymes from *Penicillium* species, little is known about the partial characterization of proteases of species from the Amazon region. The objective of this work was to evaluate the potential of the proteolytic enzymes that present specific characteristics obtained from the crude extract of *P. fellutanum* CFAM 60, *Penicillium* sp. CFAM 91 and *P. citrinum* CFAM 233, yielded by the Fungi Collection of the Amazon-CFAM / FIOCRUZ-AM, produced by submerged fermentation. The species were cultivated in Czapek Yeast Extract Agar in Petri dishes, maintaining the cultures at 25 ° C for seven days. From the cultures obtained, 3 mycelial discs were removed to be inoculated in 50mL MGYB [(glucose + peptone + yeast extract, pH 6.0). The fermentation in liquid medium was under the stirring and stationary condition, incubated at 30°C, 150rpm And the enzyme activity was determined by the enzymatic activity of the extracts and the enzyme activity of the enzyme, and the enzyme activity was determined by the enzymatic activity for all extracts, being the highest value 43.13 U / mL, in the extracts obtained from *P. citrinum* CFAM 233, and the lowest value 34.17 U / mL of *Penicillium* sp. CFAM 91. In the extracts obtained by stationary culture, the species that presented the best enzymatic activity, in the value of 34.22 U / mL, was *P. fellutanum* CFAM 60, and the lowest activity, 11.24 U / mL, was *P. citrinum* CFAM 233. For the partial characterization of enzyme, the species of *P. citrinum* CFAM 233 was selected and it was observed that pH and temperature of the proteases were pH 6.0 and 50, respectively. When subjected to the stability test, the enzyme remained stable at pH 6.0-10.0, with 100% activity and 25-30°C. Thus, it can be concluded that *P. citrinum* CFAM 233 presents better protease production and, when subjected to fermentation under agitation, these enzymes have acid characteristics and affinity at high temperature, inferring their application in the food industry.

Keywords: Enzymes; Biocatalysts; *Penicillium* spp.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Colônia de *Penicillium*, apresentando cor ao centro verde e nas bordas da colônia a cor branca, possuindo textura pulverulenta, e, sem presença de exsudatos.....14
- Figura 2.** Características microscópicas de *Penicillium*.....15
- Figura 3.** pH ótimo da espécie de *Penicillium citrinum* CFAM 223.....22
- Figura 4.** Temperatura ótima de *Penicillium citrinum* CFAM 233.....23
- Figura 5.** Estabilidade ao pH na atividade de proteases de *P. citrinum* CFAM 233.....24
- Figura 6.** Estabilidade a temperatura na atividade de proteases de *P. citrinum* CFAM 233...25

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Classificação das proteases.....	12
Tabela 2. Espécies de <i>Penicillium</i> como fontes de enzimas proteolíticas.....	16
Tabela 3. Atividade proteolítica de fermentação submersa agitada e estacionária.....	20

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Proteases.....	12
1.2 Fontes de proteases.....	13
1.2.1 <i>Penicillium</i> como fonte de proteases.....	13
1.3 Processos fermentativos para obtenção de proteases.....	17
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo Geral.....	17
2.2. Objetivo Específico.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Reativação e manutenção das culturas.....	18
3.2. Fermentação submersa para produção de proteases.....	18
3.3 Determinação da atividade proteolítica.....	18
3.3.1 Efeito do pH e temperatura na atividade proteolítica.....	19
3.3.2. Efeito do pH e temperatura na estabilidade das proteases.....	19
3.4. Análises estatísticas.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1. Seleção da espécie de <i>Penicillium</i> com maior atividade proteolítica.....	19
4.2. Caracterização Parcial das Enzimas Proteolíticas.....	21
4.2.1 Efeito do pH e temperatura na atividade de proteases.....	21
4.2.3 Estabilidade das proteases quanto ao pH e temperatura.....	23
5. CONCLUSÃO.....	25
6. REFERÊNCIAS	25

1. INTRODUÇÃO

1.1 Proteases

As proteases (proteínases ou peptidases) são enzimas que têm a capacidade de acelerar reações hidrolíticas da ligação peptídica que constituem as proteínas, degradando-as em peptídeos e aminoácidos (ZANPHORLIN et al., 2007; INÁCIO et al., 2013). A forma como essas enzimas agem é altamente específica, a qual cada uma é responsável pela quebra de determinadas sequências de aminoácidos em um conjunto particular de condições ambientais (BITTENCOURT, 2014). De acordo com o *Enzyme Commission* (EC), as proteases são enzimas da classe das hidrolases (3) e subclasse das peptídeo-hidrolases ou peptidases (4), sendo classificadas como EC 3.4 (SILVA et al., 2015).

Essa grande família de enzimas pode ser classificada, também, quanto ao tipo de reação catalisada, sítio catalítico em conformidade com sua estrutura (SILVA, 2013). Quanto a sua ação catalítica, são divididas em dois grupos, as endopeptidases e as exopeptidases, e estes, por sua vez, são subdivididos de acordo com aminoácido envolvido na reação (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação das proteases quanto a sua ação catalítica.

Proteases	Sítio de atuação	Reação catalisada	Sítio ativo catalítico	Número EC*
Endopeptidases	Atua nas regiões internas das cadeias polipeptídicas.		Serina	3.4.21
			Cisteína	3.4.22
			Aspártico	3.4.23
			Metalo	3.4.24
Exopeptidases	Agem nos finais das cadeias polipeptídicas	Aminopectidases		3.4.14
			Serina	3.4.16
			Carboxipeptidases	Cisteína
			Metalo	3.4.18

* Enzyme comission

Fonte: Palheta et al., 2011.

Também podem ser classificadas quanto a faixa de pH em que apresentam alta atividade: ácidas (pH 2,0- 6,0), neutras (pH 6,0-8,0) e alcalinas (pH 8,0-13,0) (RAO *et al.*, 1998; MONTEIRO, 2012; VERMELHO *et al.*, 2008).

As proteases possuem diversas aplicações com utilidade em setores, tais como: indústria de alimentos, couro, detergente, farmacêutica, seda, recuperação de prata a partir de filmes de raios-X, digestão de resíduos e estudo estrutural de proteínas (ABIDI *et al.*, 2011; SAVITHA *et al.*, 2011; INÁCIO *et al.*, 2013). De acordo com a Research and Markets (2017), as proteases representam cerca de 60% do mercado total de enzimas e as estimativas apontam para uma taxa de crescimento anual de 6,4% durante o período de 2017 a 2022 totalizando cerca de US \$ 3,29 bilhões até 2022.

1.2 Fontes de proteases

As enzimas proteolíticas podem ser obtidas por diferentes fontes, tais como: animal, vegetal e microbiana, contudo, estas últimas são preferíveis, devido ao rápido crescimento dos microrganismos, diversidade bioquímica, facilidade de manipulação genética e também por serem considerados recursos renováveis e poderem ser produzidos em ampla escala (MACHADO *et al.*, 2017; MARTIM *et al.*, 2017).

Os microrganismos são grande fonte de enzimas e as proteases deles extraídas demonstraram pH ótimo de atividade na faixa de 3,0 a 12,0, o que beneficia a aplicação em diversas indústrias (VRANOVA *et al.*, 2013). Dentre os microrganismos, merecem destaque os fungos filamentosos, que são usados em muitos processos industriais para a produção de enzimas e metabólitos. Alguns desses fungos são produtores de metabólitos primários, a exemplo de enzimas (amilases, celulasas, pectinases, ligninases, fitases, proteases, lipases e glico-oxidases), e metabólitos secundários, como os antibióticos, alcaloides e giberelinas (HOMBERG *et al.*, 1997; WARD, 2011).

As proteases de origem fúngicas são mais vantajosas quando comparadas com as proteases de origem bacteriana, dentre os quais, os fungos apresentam a capacidade de crescer em ambientes sob as mais variadas condições, como, temperatura, pH e variação de nutrientes do meio (MUTHULAKSHMI *et al.*, 2011; IKRAM-UL-HAQ *et al.*, 2006).

1.2.1 *Penicillium* como fonte de proteases

O gênero *Penicillium*, classificado no Filo Ascomycota, classe Eurotomycetes, ordem *Eurotiales* e família *Asperlogiaceae* (MONTEIRO, 2012; HOUBRAKEN & SAMSON, 2014) é dividido, atualmente em três subgêneros: *Talaromyces*, *Aspergilloides* e *Penicillium*. As

espécies desse gênero estão presentes no mundo todo e são caracterizadas por não serem tão exigentes no aspecto nutricional e toleraram uma gama de condições físico-químicas para o crescimento. A maioria das espécies é sapróbia, comumente encontrada no solo, sementes, grãos, no ar, e, inclusive, em ambientes aquáticos (LARSEN et al, 2000; PITT, 1997; PITT, 2014; PEREIRA, 2016).

No aspecto macromorfológico do gênero, pode-se observar que as colônias são, geralmente, de crescimento rápido e radial, em tons de verde, às vezes branco ou rosado, em sua maioria composta por uma densa rede de conidióforos. Além disso, têm a textura variando de aveludada, algodonosa e pulverulenta (Figura 1), sendo o verso da placa geralmente pálido a amarelado, ou apresenta pigmentos no meio de cultura. Podendo possuir ou não gotículas de exsudatos e diferentes tipos de topografia. (PITT, 1979; PITT, 2014).

Figura 1: Colônia de *Penicillium*, apresentando cor ao centro verde e nas bordas da colônia a cor branca, possuindo textura pulverulenta, e, sem presença de exsudatos.

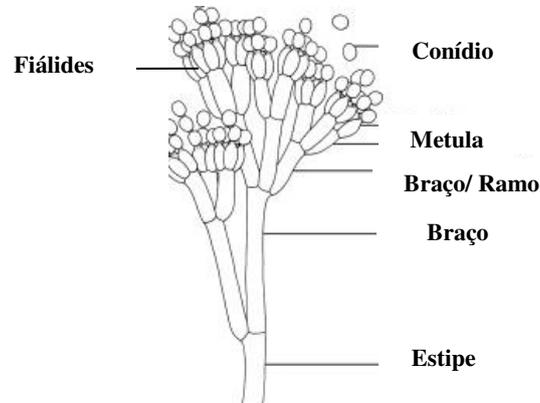


Fonte: Brito, 2018.

Quanto aos aspectos microscópicos, *Penicillium* spp. apresentam conidióforos com hifas septadas, sendo que estes conidióforos possuem uma forma semelhante à de pincel, característica que deu nome ao gênero. Produzem longas cadeias de conídios, que se apresentam no fim das ramificações das fiálides (Figura 2). As fiálides são curtas, com paredes lisas, apresentando três tipos de formatos: garrafa, ampulhiforme e aciculado. Podem originar-se no estipe, sobre uma metula, sobre mais de uma, ou sobre mais de duas metulas. A

reprodução é assexuada, e ocorre através de conídios (PEREIRA, 2016; Pitt, 2014; PITT, 1997).

Figura 2: Características microscópicas de *Penicillium* spp.



Fonte: www.researchgate.net/figure/Conidiophore-branching.htm

(acessado em: 12/06/2017)

Após a descoberta da penicilina, as espécies do gênero *Penicillium* têm sido usadas como modelos de pesquisas com aplicação biotecnológica devido a sua alta diversidade morfológica e fisiológica, que possibilita a produção de diversos metabólitos primários e secundários, tornando-os importantes produtoras de antibióticos, micotoxinas, antioxidantes, anticancerígenos, inseticidas e enzimas extracelulares (RODRIGUES, 2008; SILVA et al., 2010). Tais espécies são mesofílicas, termofílicas ou ácidos tolerantes, boas produtoras de enzimas extracelulares, tais como lipases, proteases, celulasas e xilanases. Estudos já foram realizados com diversas espécies para a obtenção de enzimas proteolíticas com características distintas (tabela 2), principalmente, ácidas, termofílicas e termoestáveis, (LI e ZONG, 2010; DJAMEL et al., 2009; CHAUD et al., 2007).

Tabela 2: Espécies de *Penicillium* como fontes de enzimas proteolíticas.

Fungo	Bioprocesso	Temperatura ótima	pH ótimo	Tipo de enzima	Referência
<i>Penicillium citrinum</i>	FES*	-	-	Alcalina	Xiao et al., 2015
<i>P. roquefortii</i>	FES	50°C	8.0-9.0	Alcalina	Novelli et al., 2015
<i>P. fellutanum</i>	FS**	40-55°C	5.0	Ácida	Bittencourt et al., 2014
<i>P. aurantiogriseum</i>	-	45°C	9.0	Alcalina	Wanderley et al., 2018
<i>P. chrysogenum</i>	FS	30°C	7.0	-	Mukhtar et al., 2006
<i>P. nalgiovense</i>	FS	35°C	8.0	Alcalina	Papagianni et al., 2014
<i>Penicillium</i> sp.	FES	45°C	6.5	Ácida	Germano et al., 2003
<i>P. waskamanii</i>	-	35°C	8.0	Serina	Graminho et al., 2013.
<i>P. godlewskii</i>	FES	35°C	8.0	Alcalina	Sindhu et al., 2004
<i>P. chrysogenum</i>	-	35°C	9.0	Alcalina	Zhu et al., 2009
<i>P. italicum</i>	-	50°C	7.0	Serina	Abidi et al., 2014
<i>P. chrysogenum</i>	-	36°C	9.0	Alcalina	Zhu et al., 2008
<i>P. chrysogenum</i>	-	30°C	9.0	Alcalina	Afifi et al., 2013
<i>P. digitum</i>	FS	55°C	7.0	Neutra	Aissaoui et al., 2014
<i>P. expansum</i>	-	30°C	3.5	Ácida	Dahot, 2001
<i>P. restrictum</i>	FS	45°C	8.0	Alcalina	Bittencourt, 2014
<i>P. restrictum</i>	FS	55°C	8.0	Alcalina	Caprara, 2015
<i>P. expansum</i>	FS	35°C	10.5	Alcalina	Dahot, 1994
<i>Penicillium</i> sp.		40°C	8.0	Alcalina	Yusriah et al., 2013

* FS- Fermentação submersa/ **FES- Fermentação em Estado Sólido

Fonte: Brito, 2018.

1.3 Processos fermentativos para obtenção de proteases

Diversos estudos mostram que espécies de *Penicillium* são importantes produtoras de enzimas de grande valor econômico nas indústrias (KIRK et al., 2002) e os processos fermentativos que são utilizados para a produção destes biocatalisadores pode ser de dois tipos: fermentação em estado sólido e submersa. A primeira é caracterizada por ser de mais baixo custo devido a possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais como matriz sólida para crescimento do microrganismo, baixa probabilidade de contaminação pela

reduzida quantidade de água, contudo pode oferecer problemas na determinação de parâmetros como pH, aeração, temperatura, umidade e baixa homogeneidade do meio e, conseqüentemente na produção de biocompostos de interesse (PALHETA et al., 2011).

Na fermentação submersa, por sua vez, o meio de cultura é líquido e os nutrientes estão homogêneamente distribuídos, os parâmetros físico-químicos são mais facilmente controlados e a recuperação de enzimas extracelulares torna-se facilitada, uma vez que estas são excretadas para o meio líquido e apresentam uma maior facilidade de remoção do micélio do meio após o cultivo (ALECRIM et al., 2012; SANDHYA et al., 2005).

A fermentação submersa ocorre quando a cultura estoque do microrganismo a ser utilizada é cultivada em frascos que permanecem em agitação até ser atingida a fase de crescimento exponencial média ou tardia. Após atingir uma dessas fases, é transferida para o fermentador principal, que contém o meio líquido específico para produção enzimática (ORLANDELLI et al., 2012). Após a fermentação as etapas de separação e purificação removem o micélio, toxinas e metabólitos indesejáveis. O micélio pode ser separado do caldo enzimático por centrifugação e filtração. No caso de fungos, a facilidade de se obter o extrato é maior do que quando se utiliza bactérias para a produção de enzimas em meio líquido (ORLANDELLI et al., 2012; SANDHYA et al., 2005).

Assim, a procura industrial de enzimas proteolíticas, com adequada especificidade e estabilidade ao pH, a temperatura, e agentes químicos, continua a motivar a busca de novas fontes (SAVITHA et al., 2011) e as espécies de fungos do gênero *Penicillium* possuem um grande potencial para a produção biotecnológica de proteases e outras enzimas (CAPRARA, 2015).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial de três espécies de *Penicillium* quanto à produção de proteases.

2.2. Objetivos específicos

- Investigar a influência da condição fermentativa para produção de proteases;
- Selecionar uma espécie promissora de *Penicillium* quanto à produção de proteases;
- Caracterizar as proteases quanto à temperatura e pH ótimos de atividade;
- Analisar a estabilidade das proteases extracelulares em diferentes temperaturas e pHs;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reativação e manutenção das culturas

Nesta pesquisa foram avaliadas três espécies de *Penicillium* da Coleção de Fungos da Amazônia-CFAM/FIOCRUZ - AM: *P. fellutanum* CFAM 60, *Penicillium* sp. CFAM 91 e *P. citrinum* CFAM 233. A seleção foi realizada com base no estudo de Souza, (2015), que avaliou o potencial dessas espécies na produção de proteases em meios de cultivos e de duas condições fermentativas diferentes, em que as espécies de *Penicillium* mostraram-se produtoras de enzimas.

Das culturas preservadas em água destilada foram retirados fragmentos de micélio e transferidos para tubo de ensaio contendo meio de cultura Ágar Extrato de Levedura Czapek (CYA) e os cultivos foram mantidos a 25 °C por sete dias.

3.2 Fermentação submersa para produção de proteases

Com a finalidade de avaliar a condição fermentativa para a maior produção de proteases, os fungos filamentosos foram submetidos à fermentação submersa agitada e estacionária. Sendo assim, o processo fermentativo foi realizado em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 50 mL do meio de cultivo com a seguinte formulação (g/L): glicose (10g/L), extrato de malte (3g/L), extrato de levedura (3g/L) e peptona (5g/L) (TAVARES et al., 2013). O meio de cultura foi esterilizado a 121 °C por 15 minutos e após resfriamento três discos miceliais ($\varnothing = 8\text{mm}$) das culturas de *Penicillium* foram adicionados ao meio de cultivo e incubados a 30 °C durante cinco dias, sob agitação constante de 150 rpm. O cultivo estacionário foi realizado nas mesmas condições de temperatura e tempo de incubação, sem a agitação. Ao término da fermentação a biomassa foi separada por filtração a vácuo, e o extrato bruto foi utilizado para determinação da atividade proteolítica.

3.3. Determinação da atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada a 25 °C segundo Leighton et al., (1973). Para a mistura reacional 150 μL de extrato bruto foi homogeneizado com 250 μL de substrato [(azocaseína 1,0% (p/v) (Sigma, St. Luis, MO USA)], em tampão 0,2 M Tris-HCl, pH 7,2. Decorridos 60 minutos de incubação em câmara escura a reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético 10% (p/v) e, em seguida as amostras foram centrifugadas por 15 minutos, a 8.000 x g a 4 °C. Do sobrenadante, 1,2 mL foram transferidos para 1,4 mL de Hidróxido de Sódio 1M, procedendo-se a leitura em espectrofotômetro a 440 nm. Uma

unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorvância de 0,1 em uma hora (TREMACOLDI et al., 2007).

3.3.1 Efeito do pH e temperatura na atividade proteolítica

O efeito do pH na atividade proteolítica foi avaliado utilizando azocaseína 1 % (p/v), incubando-se o extrato bruto em diferentes valores de pH variando de 5,0 a 10,0, a 25°C por uma hora. As soluções tampões usadas foram: Citrato-Fosfato 0,2 M (pH 5,0 e 6,0). Tris-HCl 0,2 M (pH 7,0 – 8,0) e Glicina – NaOH 0,2 M (pH 9,0 e 10,0). A atividade proteolítica foi determinada conforme descrito no item 3.3.

O efeito da temperatura na atividade proteolítica foi determinado utilizando diferentes temperaturas (25, 30, 40, 50, 60 e 70°C), incubando-se o extrato bruto em pH ótimo por uma hora. A atividade proteolítica foi determinada conforme descrito no item 3.3.

3.3.2 Efeito do pH e temperatura na estabilidade das proteases

Para os ensaios de estabilidade ao pH a solução enzimática foi incubada em diferentes tampões [Citrato-Fosfato 0,2 M (pH 5,0 e 6,0). Tris-HCl 0,2 M (pH 7,0 – 8,0) e Glicina – NaOH 0,2 M (pH 9,0 e 10,0)] e incubada a 25°C por 1h, e ao final a atividade proteolítica foi determinada.

Nos ensaios para a estabilidade a térmica os extratos enzimáticos foram incubados nas temperaturas de 25, 30, 40, 50, 60 e 70°C e o tempo de incubação das amostras foi de 1h para cada temperatura, ao final foi determinada a atividade proteolítica (MARTIM et al., 2017).

3.4. Análises estatísticas

Os resultados experimentais foram expressos como média \pm erro padrão da média e submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey que determinou a significância das diferenças observadas nas amostras, ao nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção da espécie de *Penicillium* com maior atividade proteolítica

Neste estudo as três espécies de *Penicillium* foram submetidas a duas condições fermentativas: fermentação submersa com agitação e sem agitação e os resultados estão expressos na Tabela 3. Após a fermentação sob agitação, o extrato bruto apresentou para *P.*

citrinum CFAM 233 pH final 6, *Penicillium fellutanum* CFAM 60 pH 7, e *Penicillium* sp. CFAM 91 pH 5. Nesta condição, o extrato bruto expressou valor estatisticamente significativo de atividade proteásica (43,13 U/mL \pm 0,57) para *P. citrinum* CFAM 233, em relação às demais espécies, *P. fellutanum* CFAM 60 (40,93 U/mL \pm 1,15) e *Penicillium* sp. CFAM 91 (34,17 U/mL \pm 2,04).

Tabela 3: Atividade proteolítica (U/mL) expressa por *Penicillium* spp. na fermentação submersa sob agitação e estacionária.

Fungos	Fermentação sob Agitação Atividade de proteases (U/mL)	Fermentação Estacionária Atividade de proteases (U/mL)
<i>P. citrinum</i> CFAM 223	43,13 \pm 0,57 ^{aA}	11,24 \pm 1,81 ^{cB}
<i>P. fellutanum</i> CFAM 60	40,93 \pm 1,15 ^{bA}	34,22 \pm 1,01 ^{aB}
<i>Penicillium</i> sp. CFAM 91	34,17 \pm 2,04 ^{cA}	32,49 \pm 1,40 ^{bB}

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes, onde as letras maiúsculas representam a análise do mesmo fungo nas diferentes condições fermentativas, e as minúsculas referem-se à análise entre os fungos submetidos na mesma condição fermentativa.

Fonte: Brito, 2018.

Na condição de fermentação submersa sem agitação, que seguiu os mesmos parâmetros de temperatura (30° C) e tempo de incubação, as três espécies foram submetidas a determinação da atividade proteolítica. Todas elas excretaram proteases, sendo que o valor mais elevado foi expresso por *P. fellutanum* CFAM 60 (34,22 U/mL \pm 1,01), e seguido em ordem decrescente por *Penicillium* sp. CFAM 91 (32,49 U/mL \pm 1,40) e *P. citrinum* CFAM 233 com menor valor (11,24 U/mL \pm 1,81). O pH final do extrato bruto de cada espécie foi, 7, 7, e 6, respectivamente.

Comparando os resultados da atividade proteolítica quanto ao tipo do processo fermentativo utilizado, é possível observar que a agitação é uma condição importante para promover o crescimento das espécies e consequentemente excreção de tais enzimas no meio de cultura, uma vez que a atividade proteolítica foi significativamente superior para todas as espécies avaliadas, quando comparada à condição estacionária. Assim, a espécie selecionada para as etapas posteriores que apresentou maior atividade proteásica foi *P. citrinum*.

Estudos recentes mostram que espécies do gênero *Penicillium*, como *P. italicum*, *P. roquefortii*, *P. waskamanii*, *P. aurantiogriseum*, e *P. nalgiovenses*, também são produtoras de enzimas proteolíticas, tornando interessante a ampliação de estudos para sua aplicação

industrial (ABIDI et al., 2014; NOVELLI et al., 2015; GRAMINHO et al., 2013; WANDERLEY et al., 2018; PAPAGIANNI et al., 2014)

Segundo Souza (2015), as espécies de *Penicillium* sp., *P. citrinum* e *P. fellutanum* apresentam maior atividade de proteases sob condição agitada, tendo uma média de atividade de 411, 78 U/mL para *Penicillium* sp., para *P. fellutanum* 447,33 U/ml e *P. citrinum* 378, 89 U/mL, enquanto que na condição estacionária houve atividade, mas não superou a da condição agitada. Estas espécies, foram as mesmas estudadas nesta pesquisa, e confirmaram que ocorrem variações no quantitativo enzimático em função da condição de cultivo submetida, fazendo com que o microrganismo apresente fisiologia diferenciada para cada condição. Corroborando ainda, que na fermentação agitada as espécies apresentaram maior valor de atividade de proteases no extrato bruto obtido.

Assim Nirmal (2011) confirma que a agitação tem íntima influência com a produção de enzimas, especialmente em fermentadores e biorreatores. A variação na velocidade de agitação influencia a extensão da mistura no biorreator ou em frascos de agitação e também afeta a disponibilidade de nutrientes. Com isso, Bittencourt (2014) afirma também que a condição fermentativa é importante, pois quando há agitação no processo, ocorre o aumento de oxigênio que favorece a obtenção de nutrientes, bem como garante homogeneidade do meio, crescimento e ajuda na transferência de troca de calor.

4.2 Caracterização Parcial das Enzimas Proteolíticas

4.2.1 Efeito do pH e temperatura na atividade de proteases

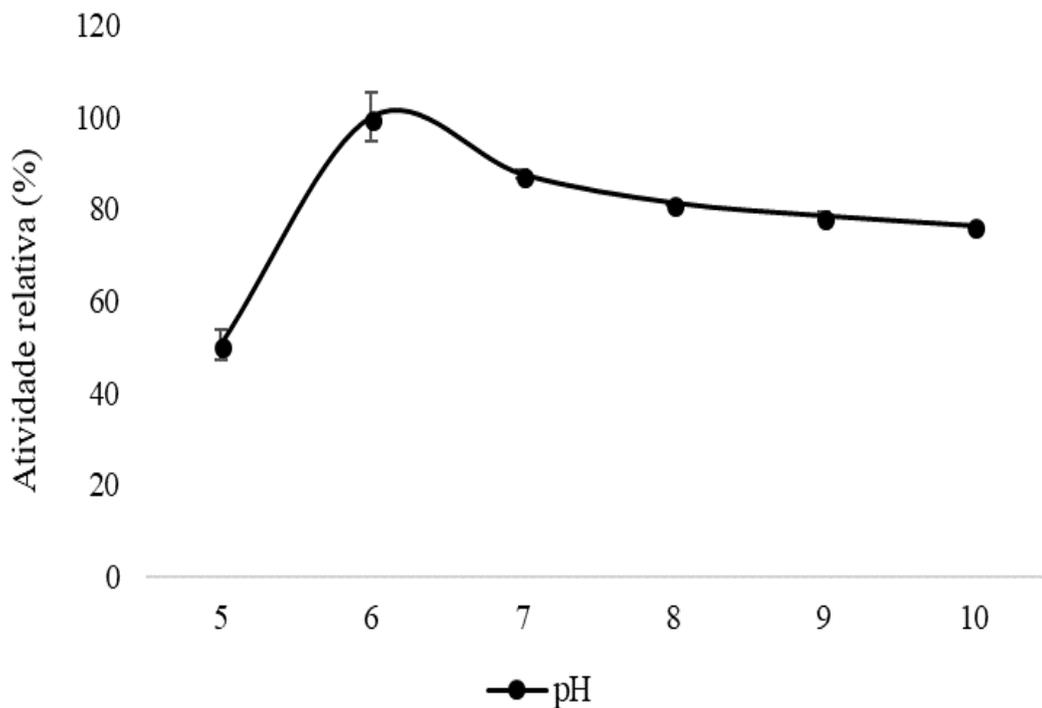
O efeito do pH na atividade enzimática foi determinado em pH variando de 5 a 10 e conforme mostrado na Figura 3, as proteases de *P. citrinum* CFAM 233, apresentaram atividade ótima em pH 6, em uma temperatura de 25°C, evidenciando que as proteases estiveram e mais ativas, realizando a quebra da proteína azocazeína nesta faixa de pH. Nos valores subsequentes houve um declínio de atividade não ocorrendo inativação da mesma, onde a menor atividade foi em pH 5 com 50, 47% de atividade proteásica. Os valores obtidos sugerem a presença de proteases ácidas no extrato enzimático, e que o pH potencializou sua ação enzimática.

De acordo com Nirmal (2011), fungos podem produzir proteases de características ácidas, neutras e alcalinas, mas uma mesma espécie pode produzir vários tipos dessa enzima, podendo ser ativas em diferentes faixas de pH.

Nos estudos de Bittencourt. (2014), quando *P. fellutanum* foi submetido a fermentação submersa, verificou-se atividades de proteases em pH 5-10, sendo a ótima atividade determinada em pH 5, sugerindo uma protease ácida. Segundo Germano (2003), *Penicillium* sp. apresentou atividade ótima em pH 6,5, que provavelmente era uma protease de característica serina.

Segundo Xie (2016), verificou-se atividade de pH ótimo na faixa de pH 4-10, apresentando atividade ótima na faixa de pH 8, comprovando que a enzima produzida era alcalina. Outro estudo, o de Zhu (2009), o pH ótimo observado para proteases de *P. chrysogenum* foi no pH 9, em uma temperatura de também classificada como protease alcalina. Com isso a espécie estudada nesta pesquisa foi determinada atividade ótima em pH 6, sugerindo-se a presença de protease ácida, como as produzidas por espécies de *Aspergillus* (RADHA, 2011).

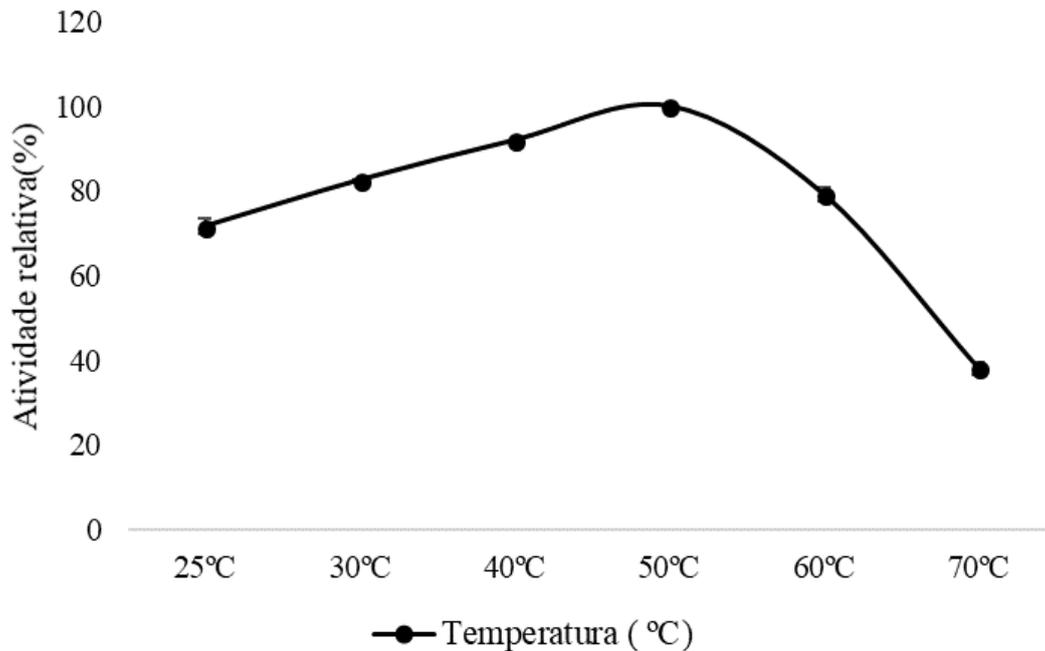
Figura 3: pH ótimo de *Penicillium citrinum* CFAM 233



Fonte: Brito, 2018.

O efeito da temperatura da atividade das proteases foi determinado utilizando o pH 6, em temperaturas de 25-70°C. Nesta condição as enzimas proteolíticas apresentaram alta atividade na temperatura de 50°C, ou seja 99,99% de atividade relativa, com decréscimo gradual de atividade nas temperaturas subsequentes (Figura 4).

Figura 4: Temperatura ótima de *Penicillium citrinum* CFAM 233.



Fonte: Brito, 2018.

Segundo Novelli (2016), diferenças bioquímicas observadas para as enzimas produzidas por diferentes cepas e substratos podem ser propícias para uma variedade de aplicações. Na temperatura ótima de uma mesma espécie de fungo a sua ótima atividade enzimática é muito específica, dependendo da cepa utilizada (BITTENCOURT, 2014).

O resultado de temperatura ótima obtido por Novelli (2016), para a espécie de *P. roquefortii* foi de atividade ótima em 50°C caracterizando uma temperatura elevada, onde afirma que enzimas que suportam elevadas temperaturas podem ser utilizadas em processamento de alimentos que utilizam temperaturas elevadas. Elas também reduzem o risco de contaminação microbiana, reduzem a viscosidade e melhoram a solubilidade do substrato, uma vez que são capazes de agir a temperaturas mais altas.

Nos estudos de Papagianni (2014), a atividade de temperatura ótima de *P. nalgiovense*, foi em 30°C, onde essa característica pode ser de interesse para aplicações em indústrias que trabalhem com tecnologias de carnes. Germano (2003), apresentou resultados de *Penicillium* sp. com temperatura ótima em 45°C (35 U/mL), em que possivelmente a enzima possa ser usada na formulação de detergentes.

Rodrigues (2008), determinou a temperatura ótima de *P. aurantiogriseum* em 50°C em que sua enzima pode ser aplicada na formulação de detergente. Assim os resultados obtidos

estão de acordo Rodrigues (2008), Novelli (2016), em a temperatura ótima de espécies *P. aurantiogriseum* e *P. roquefortii* foi determinada a 50°C.

4.2.2 Estabilidade das proteases quanto ao pH e temperatura

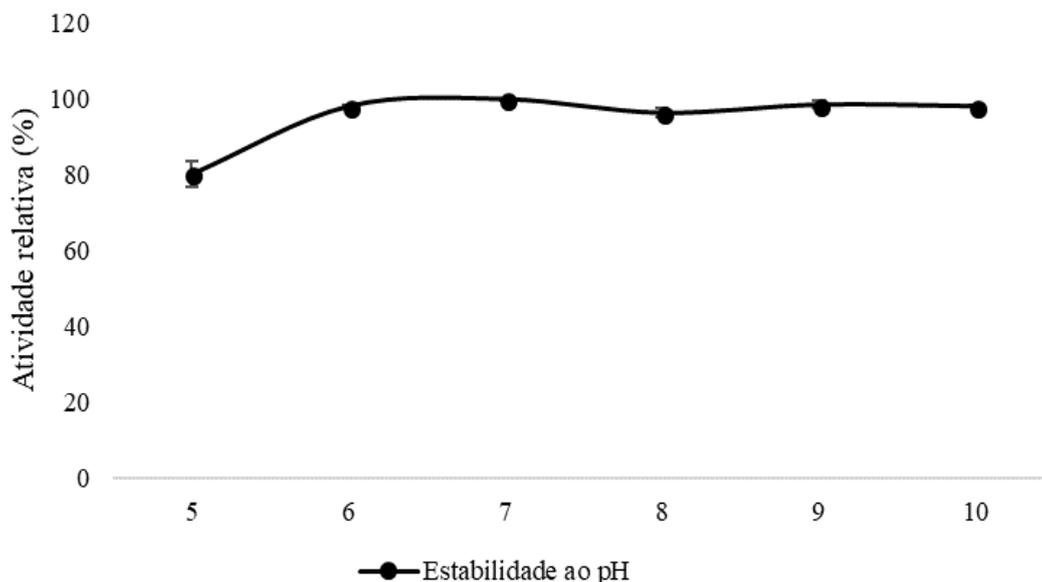
Na estabilidade ao pH pode-se avaliar por quanto tempo a enzima fica agindo em determinado pH, para que se possa determinar a viabilidade em processos industriais. Nos resultados obtidos pôde-se observar que as proteases produzidas por *P. citrinum* CFAM 233 permaneceram estáveis (Figura 5) em pH variando de 6.0 até 10.0, mantendo 100% de atividade relativa durante 1h, o que sugere a presença de isoformas da enzima.

Para Rodrigues (2005), *Penicillium aurantiogriseum* produziu uma protease que foi muito estável m uma faixa ampla de pH de ácido a básico, mantendo mais de 90% de sua atividade inicial entre pH 5,8 e 9,5. Indicando um potencial para industrias que requerem estabilidade paras as mais variadas faixas de pH.

Outros estudos, como no de Germano (2003), *Penicillium* sp. apresentou enzimas proteolíticas estáveis para a faixa de pH 6.0–8.0. A enzima foi bastante estável quando incubada na faixa de pH do ácido ao básico, o que poderia estar associado com a efeito das condições de incubação (24 h, 4 °C).

Papagianni (2014), *Penicillium nalgiovense* o perfil de estabilidade do pH mostrou que a protease é altamente estável entre pH 8,0 e 9,0. Apresentando 57% de sua atividade inicial foi mantida em pH 10,0, enquanto 72% em pH 7,0. Avaliando com os resultados obtidos, observa-se que a estabilidade similar a obtida, foi a de *Penicillium* sp. de Gemano (2003).

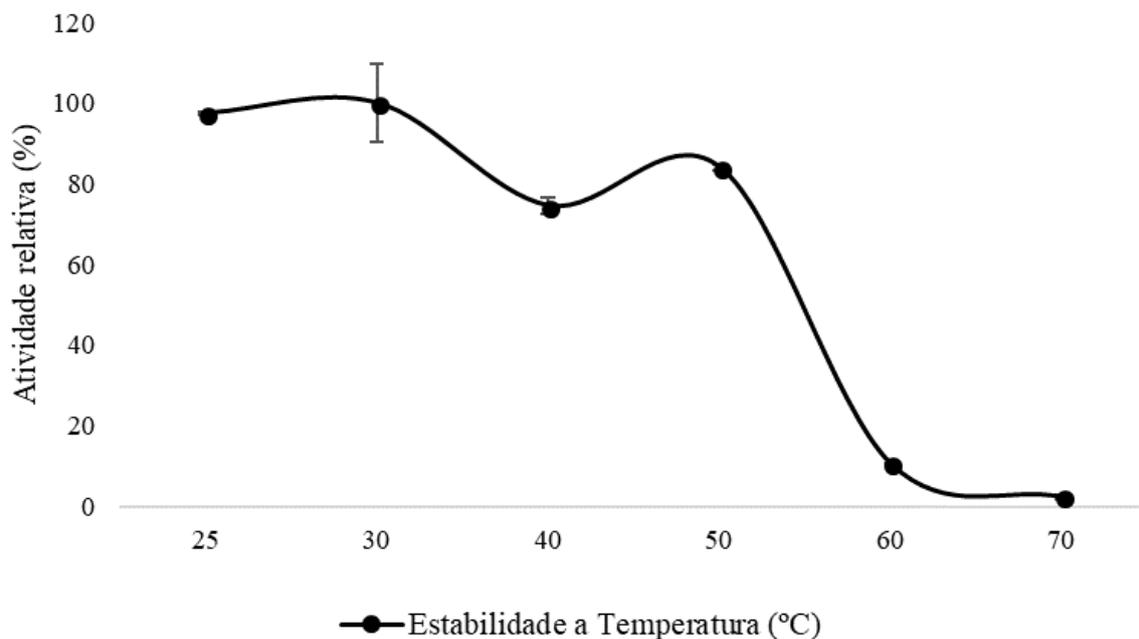
Figura 5: Estabilidade ao pH na atividade de proteases de *Penicillium citrinum* CFAM 233.



Fonte: Brito, 2018.

Com intervalo de tempo similar, a estabilidade térmica foi mantida de 25 a 30°C (Figura 6), expressando 97,46% e 100% de atividade relativa, respectivamente. Em 60 e 70°C foi verificada 10,60 a 2,26% de atividade, sendo quase inativadas.

Figura 6: Estabilidade a temperatura na atividade de proteases de *Penicillium citrinum* CFAM 233.



Fonte: Brito, 2018.

Aissaoui (2014) mostrou que as proteases de *P. digitum* foram estáveis a temperaturas mais baixas, uma vez que a enzima retém 100% de sua atividade inicial e cerca de 50% de sua atividade original após 2 h 30 min de pré-incubação a 35 e 45 ° C, respectivamente.

Xie (2016) cita que para *P. citrinum* a protease produzida foi estável numa faixa de 4°C e 30°C, sendo 99,5% e 95,4% da atividade inicial retidos após incubação por 6 horas a 4 °C e 30°C, respectivamente. Por sua vez, Germano (2003) cita que *Penicillium* sp. manteve suas enzimas estáveis na faixa térmica de 35°C a 40°C.

No estudo de Rodrigues (2005) a protease foi estável entre 25 e 40°C após 2 h de incubação, mantendo-se acima de 100% da atividade para a espécie de *Penicillium aurantiogriseum*, enquanto que nos experimentos realizados por Novelli (2016) as proteases de *A. brasiliensis*, apresentaram estabilidade em temperaturas entre 37°C a 50°C, com 100% de atividade relativa.

5. CONCLUSÃO

Os dados obtidos mostraram que *P. fellutanum* CFAM 60, *Penicillium* sp. CFAM 91 e *P. citrinum* CFAM 233 sintetizaram e excretaram proteases, independentemente da condição fermentativa, e a espécie que expressou quantidade de enzima significativa foi *P. citrinum*, na condição fermentativa com agitação. As proteases predominantes no extrato bruto desta espécie apresentaram característica ácida e potencialização da ação enzimática em temperatura elevada de 50°C, sendo estáveis em todas as faixas de pH, e termoestáveis de 25°C a 30°C. Característica que permite aplicação na indústria alimentícia, na produção de queijos e em hidrolisados.

6. REFERÊNCIAS

- ABIDI, F. et al., **Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea***. *Process Biochem*, v. 46, p. 2301-2310, 2011.
- AFIFI, A. F.; ABO-ELMAGD, H. I.; HOUSSEINY, M. M. **Improvement of alkaline protease production by *Penicillium chrysogenum* NRRL 792 through physical and chemical mutation, optimization, characterization and genetic variation between mutant and wild-type strains**. *Springer*, 2013.
- AISSOUI, N.; ABIDI, F.; MAHAT, S.; MARZOUKI, M. N. **Purification and biochemical characterization of a novel protease from *Penicillium digitatum* – Use in bioactive peptides production**. *J. Basic Microbiol.*, v. 54, p. 1–12, 2014.
- ALECRIM, M. M.; PALHETA, R. A.; TEIXEIRA, M. F.S.; OLIVEIRA, I. M. A. **Milk-clotting enzymes produced by *Aspergillus flavo-furcatis* strains on Amazonic fruit waste**. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 50, p. 151-157, 2015.
- CAPRARA, C. S. C. **Processo De Obtenção E Caracterização De Proteases Extracelulares Expressas Por *Penicillium restrictum***. Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2015.
- CHAUD, L. C. S.; VAZ, P. V.; FELIPE, M. G. **Considerações Sobre A Produção Microbiana E Aplicações De Proteases**. *Nucleus*, v. 4, p.1-2, 2007.
- DAHOT, M. U. **Purification And Some Properties Of Alkaline Protease From *Penicillium expansum***. *Journal Of Islamic Academy Of Sciences*, v. 7, n. 2, p. 100-105, 1994.

DAHOT, M. U. **Purification and Some Properties of Acid Protease from *Penicillium expansum***. *Journal of Applied Sciences*, v. 1, p. 405-408, 2001.

DJAMEL, C.; ALI, T.; NELLY, C. **Acid protease production by isolated species of *Penicillium***. *Eur J Sci Res*, v. 25, n.3, p. 469-477, 2009.

GERMANO, S.; PANDEY, A. OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; SOCCOL, C. R. **Characterization and Stability Of Proteases From *Penicillium* sp. Produced by solid-State Fermentation**. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, p. 246–251, 2003.

GLOBAL PROTEASES MARKET, Growth, Trends & Forecasts to 2022 -Key Players are Advanced Enzyme, Amano Enzyme, Associated British Foods, Biocatalysts & Chr. Hansen Holdings - Research and Markets (2018) Edition 2018. Disponível em: http://www.researchandmarkets.com/research/dm5c8j/global_proteases. Acessado em 10 de maio de 2018.

GRAMINHO, E. R. ET AL., **Purification, characterization, and specificity determination of a new serine protease secreted by *Penicillium waksmanii***. *Appl Biochem Biotechnol*, v.169, p. :201–214, 2013.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. **Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial application**. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 59, p.15-32, 2002.

HOMBERGH, J. P. T. W.; VONDERVOORT, P. J. I.; LAURENCE, F. T.; VISSER, J. ***Aspergillus* as a host heterologus protein production the problem of proteases**. *Tibtech* (reviews), v. 15, 1997.

HOUBRAKEN, J.; DE VRIES, R. P.; SAMSON, R. A. **Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species**. *Adv. Appl. Microbiol.*, v. 86, p. 199-249, 2014.

IKRAM-UL-HAQ, H. M.; UMBER, H. **Production of protease by *Penicillium chrysogenum* through optimization of environmental conditions.** *Journal of Agriculture & Social Sciences*, v. 1, p. 23-5, 2006.

INÁCIO, F. D.; BUENO, P.; NICHIDA, S.; VERNIER, K.; SILVA, C. A.; PERALTA, R. M.; SOUZA, C. G. M. **Produção de Protease e Lacase por Basidiomicetos.** *Biochemistry and Biotechnology Reports*, v. 2, n. 3, p. 359-362, 2013.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. **Industrial enzyme applications.** *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, n.4, p. 345-351, 2002.

LEIGHTON, T. J.; DOI, R. H.; WARREN, R. A. J.; KELLN, R. A. **The relationship of serine protease activity to RNA poly-merase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*.** *Journal Molecular Biology*, v. 76, p. 103-122, 1973.

LI, N.; ZONG, M. H. **Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization and applications.** *J Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 66, p. 43–54, 2010.

LI, J.; YANG, J.; HUANG, X.; ZHANG, K. **Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor.** *Process Biochem*, v. 41, p. 925–929, 2012.

MACHADO, A. R.G.; MARTIM, S. L.; PRADO, F. B.; TEIXEIRA, M. F. S. **Caracterização parcial de proteases de extratos orgânicos de cogumelos Comestíveis.** *Diversidade Microbiana da Amazônia-Editora INPA*, vol. 2, p. 09-12, 2017.

MARTIM, S. R.; SILVA, L. S. C.; PRADO, F. B.; MACAHDO, A. R. G.; TEIXEIRA, M. F. S. **Estabilidade e toxicidade de extratos proteolíticos de *Pleurotus ostreatoroseus* e *Lentinus citrinus* cultivados em resíduo lignocelulósico da Amazônia.** *Diversidade Microbiana da Amazônia-Editora INPA*, vol. 2, p. 208-216, 2017.

MARTIM, S. R.; SILVA, L. S. C.; SOUZA, L. B.; CARMO, E. J.; ALECRIM, M. M.; VASCONCELLOS, M. C.; OLIVEIRA, I. M. A.; TEIXEIRA, M. F. S. ***Pleurotus albidus*: A**

new source of milk-clotting proteases. *African Journal of Microbiology Research*, v. 11, n. 17, p. 660-667, 2017

MONTERIO, M. C. P. **Identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do cerrado**, 2012. In: PITT, J. I.; SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. List of accepted species and their synonyms in the family Trichocomaceae. In: SAMSON, R. A.; PITT, J. I. (Ed.). **Integration of modern taxonomic methods of *Penicillium* and *Aspergillus* classification.** *Harwood Academic*, Amsterdam, 2000. p. 9-49.

MUKHTAR, H.; IKRAM-UL-HAQ; UMBER, H. **Production of protease by *Penicillium chrysogenum* Through optimization of environmental conditions.** *Journal of agriculture & social sciences*, p. 1813–2235, 2006.

MUTHULAKSHMI, C.; GOMATHI, D.; KUMAR, D.G.; RAVIKUMAR, G.; KALAISELVI, M.; UMA, C. **Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation.** *Biological*, p. 3137, 2011.

NOVELLI, P. K.; BARROS, M. M.; FLEURI, L. F. **Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization.** *Food Chemistry*, 2015.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. **Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações.** *SaBios: Rev. Saúde e Biol.*, v.7, n.3, p.97-109, 2012.

PALHETA, R. A.; KIRSCH, L. S.; NEVES, K. C. S.; MACHADO, A. R. G.; BRITO, E.; TEIXEIRA, L. S.; MACEDO, A.J. P. **Enzimas e aplicações biotecnológicas.** *Fungos da Amazonia: uma riqueza inexplorável (aplicações biotecnológicas)*, Manaus: Edua. p. 126-153, 2011.

PAPAGIANNI, M.; SERGELIDIS, D. **Purification and biochemical characterization of a novel alkaline protease produced by *Penicillium nalgiovense*.** *Appl Biochem Biotechnol*, 2014.

PEREIRA, V. M. **Diversidade, Riqueza e Composição dos Gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* de Solos do Quadrilátero Ferrífero.** Tese (doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

PITT, J. I. ***Penicillium* and *Talaromyces*: Introduction.** *Encyclopedia of Food Microbiology*, v. 3, p.06-13, 2014.

PITT, J.I. **The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*.** *London: Academic Press Inc.*, p. 634, 1979.

RADHA, S.; NITHYA, N. J.; SRIDEVI, A.; PRASAD, N. B. L.; NARASIMHA, G. **Production and optimization of acid protease by *Aspergillus* spp. under submerged fermentatio.** *Archives of applied Science Research*, v.3, n. 2, p. 155-163, 2011.

RODRIGUES, P. M. B. **Produção de protease pelo *Penicillium aurentiogriseum* URM 4622.** Mestrado em Química e Biologia, Universidade Federal de Pernambuco, 2008.

RODRIGUES, P. M.B.; LIMA, C. A.; FILHO, J. L. L.; TEIXEIRA, J. A.; PORTO, A. L. F.; CUNHA, M. G. C. **Production and characterization of protease from *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622.** *Valnatura Project*, v. 8, 2005.

RAO, M. B.; TANKSALE, A.M; GHATGE, M. S. **Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases.** *Microbiol Mol Biol Ver*, v. 62, p. 597-635, 1998.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A. ; SZAKACS, G. ; PANDEY, A. **Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation.** *Process Biochemistry*, v. 40, n.8, p. 2689-2694, 2005.

SAVITHA, S. et al., **Fungal protease: Production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance.** *J Taiwan Inst Chem Eng*, v. 42, p. 298–304, 2011.

SILVA, E. T. **Estabilização de proteases para aplicação tecnológica.** Tese (Mestrado), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, p.28, 2013.

SILVA, J. C.; FERNANDES, O. C. F. C.; MARTINS, M. S.; RODRIGUES Jr, A. C. **Atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* mantidas sob duas condições de preservação.** *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiologia*, v. 30, p. 48-54, 2010.

SILVA, L. S. C. et al., **Protease de cogumelos da Amazônia com propriedade para uso em detergente.** Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015.

SINDHU, R.; SUPRABHA, G. N.; SHASHIDHAR, S. **Optimization of process parameters for the production of alkaline protease from *Penicillium godlewskii* SBSS 25 and its application in detergente industry.** *African Journal of Microbiology Research*, v. 3, n. 9, p. 515-522, 2009.

SOUZA, T. C.; ARAÚJO, C. P. M.; RODRIGUES, J. C.; FILHO, R. F. C.; FERNANDES, O. C.C. **Análise Quantitativa da Produção de Proteases por *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp da Coleção de Fungos da Amazônia CFAM/FIOCRUZ-AM em Diferentes Condições de Cultivo.** *Scientia Amazonia*, v.4, n.2, 107-113, 2015.

TAVARES, A. C. D.; FONSECA, J. S.; FONSECA, T. R. B.; BARRONCAS, J. F.; ÁILA, R.; SOUZA, T.; SILVA, T. A.; TEIXEIRA, M. F. S. **Enzimas Extracelulares de Fungos Anamórficos Isolados de *Morinda citrifolia* L.** *Biochemistry and Biotechnology Reports*, v.1, n.2, p. 1-6, 2012.

TREMACOLDI, C. R.; CARMONA, E. C. **Production of extracellular alkaline proteases by *Aspergillus clavatus*.** *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 21, p. 169–172, 2005.

VERMELHO, A. B. *et al.* **Enzimas Proteolíticas: aplicações biotecnológicas.** In: *Interciência* (Ed). Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicação e mercado, p. 273-287, 2008.

VRANOVA, V.; REJSEK, K.; FORMANEK, P. **Proteolytic activity in soil: A review.** *Applied Soil Ecology*, v. 70, p. 23–32, 2013.

WANDERLEY, J. M. D. N.; WANDERLEY, M. C. A.; LIMA, C. A.; PORTO, A. L. F. **Single step purification via magnetic nanoparticles of new broad pH active protease from *Penicillium aurantiogriseum*.** *Protein Expression and Purification* (2018), doi: 10.1016/j.pep.2018.01.016.

WARD, O. P. **Production of recombinant proteins by filamentous fungi.** *Biotechnol Adv*, v. 30, p.1119-1139, 2011.

XIAO, Y.; ZHAO, S.; LIN, W.; GAO, X. **Statistical Optimization of Alkaline Protease Production from *Penicillium citrinum* YL-1 Under Solid-State Fermentation.** *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, v. 45, p. 447–462, 2015.

XIE, L.; XIAO, Y.; GAO, X. **Purification and characterization of a halotolerant alkaline serine protease from *Penicillium citrinum* YL-1 Isolated from traditional chinese fish sauce.** *Food Biotechnology*, v. 30, n. 2, p.137–153, 2016.

ZANPHORLIN, L. M.; CABRAL, H.; ARANTES, E.; ASSIS, D.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A.; DA-SILVA, R.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. **Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora sp.*** *Process Biochemistry*, v. 46, p. 2137–2143, 2011.

ZHU, H.; TIAN, Y.; HOU, Y.; WANG, T. **Purification and characterization of the cold-active alkaline protease from marine cold-adaptive *Penicillium chrysogenum* FS010.** *Mol Biol Rep*, v. 36, p. 2169–2174, 2009.