

## O FUNGO AMAZÔNICO *Penicillium purpurogenum* CFAM 214 PRODUZ PROTEASES ALCALINAS TERMOESTÁVEIS QUANDO CULTIVADO EM MEIO SABOURAUD

Kemily Nunes da Silva Moya<sup>1</sup>, Genésio Pontes Batista Junior<sup>2</sup>,  
Paulo Alexandre Lima Santiago<sup>3</sup>, Ketlen Christine Ohse<sup>4</sup>,  
Salomão Rocha Martim<sup>5</sup>, Priscila Ferreira de Aquino<sup>6</sup>

**Resumo:** O gênero *Penicillium* é amplamente utilizado na produção de biomoléculas com diversas aplicações industriais, e o uso de linhagens amazônicas é especialmente importante devido à sua diversidade genética única, que pode resultar na produção de enzimas com propriedades bioativas distintas. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a produção de proteínas e caracterizar as proteases de *P. purpurogenum* CFAM 214. A linhagem fúngica foi reativada da Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM), cultivada em diferentes meios de cultura, Batata Dextrose e Levedura (BDL), Yeast Extract Sucrose (YES), International Streptomyces Project 2 (ISP2) e Sabouraud (SB), que foram subsequentemente analisados por Cromatografia Líquida acoplado ao Espectrômetro de Massas (LC-MS). Entre esses, um meio de cultura foi selecionado e realizada a curva de produção de proteínas e proteases durante 168 horas. Além disso, foi analisado o perfil proteico por eletroforese unidimensional. O efeito do pH

- 
- 1 Mestre e Doutoranda em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro pelo ILMD/FIOCRUZ Amazônia – Instituto Leônidas e Maria Deane; e-mail: kemilysilva23@hotmail.com
  - 2 Bacharel em Biomedicina pela Faculdade Estácio do Amazonas; Especialista em Bioquímica, Microbiologia e Parasitologia pela Faculdade Metropolitana; e-mail: genesiojr9@gmail.com
  - 3 Doutor em Química pela UFAM – Universidade Federal do Amazonas; Professor assistente da UEA – Universidade do Estado do Amazonas; e-mail: santiago\_fro@hotmail.com
  - 4 Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia pela UFAM – Universidade Federal do Amazonas; Pós-doutorado na FIOCRUZ Ceará; e-mail: ketlenohse@gmail.com
  - 5 Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia pela UFAM – Universidade Federal do Amazonas; Professor Adjunto nível I da Universidade Nilton Lin; e-mail: salomao.martim@gmail.com
  - 6 Doutora em Bioquímica pela UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro; Pesquisadora em Saúde Pública do ILMD/FIOCRUZ Amazônia – Instituto Leônidas e Maria Deane; e-mail: priscila.aquino@fiocruz.br

e da temperatura na atividade proteolítica foi avaliado variando essas condições. Os dados foram analisados com análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. A análise cromatográfica revelou que o meio SB induziu a maior diversidade de biomoléculas, seguido por YES e BDL. No meio SB, a produção de proteínas totais atingiu um pico de 1,7 µg/µL em 120 horas. A análise por eletroforese unidimensional indicou proteínas extracelulares predominantes entre 50 e 150 kDa. A atividade proteolítica foi máxima em 104,23 U/mL também em 120 horas e as proteases apresentaram estabilidade em pH 8 e 50°C. Portanto, esses resultados indicam que *P. purpurogenum* CFAM 214 é uma fonte promissora de proteases, com potencial para aplicações industriais nas áreas de limpeza, alimentos, medicamentos e têxteis.

**Palavras-chave:** Fungo filamentosos; secretoma; perfil cromatográfico; perfil proteico.

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Penicillium* está entre os mais comuns fungos anamórficos, amplamente distribuído em diversos ambientes e que demonstra fácil adaptação, sendo capaz de crescer em condições variadas de temperatura, umidade, pH e concentração de oxigênio (Alves *et al.*, 2022; Barbosa *et al.*, 2022). Essa plasticidade ecológica permite que espécies de *Penicillium* prosperem em diferentes nichos, o que tem despertado grande interesse em suas propriedades biotecnológicas (Li *et al.*, 2024). Essas espécies são frequentemente exploradas como fontes de biocompostos que, além de degradarem substratos orgânicos, possuem propriedades antioxidantes, anticancerígenas e antibacterianas. Tais características tornam esses fungos valiosos para aplicações industriais nas áreas de alimentos, medicamentos, biocombustíveis e em processos de biorremediação (Akaniro *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2021).

O meio de cultivo é um dos fatores-chave que influenciam a produção de metabólitos secundários e compostos bioativos por fungos filamentosos. A composição e os parâmetros do meio impactam diretamente a quantidade e a diversidade dos biocompostos produzidos (Araujo *et al.*, 2022). Tradicionalmente, o batata dextrose ágar (BDA) é amplamente utilizado para o isolamento e crescimento de microfungos, mas estudos recentes têm demonstrado que a otimização dos meios de cultura pode aumentar significativamente a síntese de biomoléculas de interesse industrial, como antibióticos, enzimas e outras moléculas bioativas (Ferreira *et al.*, 2019; Shruthi; Achur; Nayaka Boramuthi, 2020).

Entre os compostos bioativos sintetizados por *Penicillium* sp., destacam-se as proteases, enzimas que atuam na clivagem de proteínas em aminoácidos e peptídeos (Oyeagu *et al.*, 2023). Esses biocatalisadores têm ampla aplicação na fabricação de queijos, bebidas, detergentes e no beneficiamento do couro (Nouri; Sadeghi; Marefat, 2024; Pawar; Singh; Singh, 2023). O mercado global de proteases, avaliado em aproximadamente US\$ 3 bilhões, continua em expansão com uma taxa de crescimento anual projetada de 6,1% até 2024, impulsionada

pela demanda em setores como os de biotecnologia, farmacêutico e alimentício (Song *et al.*, 2023; Troncoso; Sánchez; Ferreira, 2022).

Para aproveitar o potencial biotecnológico dos biocatalisadores proteolíticos de *Penicillium* sp., são necessários estudos de caracterização bioquímica para identificar as condições ótimas de atividade catalítica (Behera *et al.*, 2021). Baseado nisso, em testes *in vitro*, são avaliados geralmente os efeitos do pH e da temperatura na atividade de proteases, entre outros. As proteases de *P. chrysogenum*, com atividade ótima em pH 10 a 80 °C, mostraram potencial para uso na indústria têxtil (Benmrad *et al.*, 2018), enquanto enzimas proteolíticas de *P. citrinum* demonstraram atividade significativa em pH 8 a 40 °C, sendo indicadas para uso na elaboração de molhos de peixes (Xie; Xiao; Gao, 2016).

Diante disso, o presente estudo visa reconhecer o potencial biotecnológico das proteases produzidas pelo fungo amazônico *Penicillium purpurogenum* CFAM 214, com foco na avaliação de sua atividade enzimática em diferentes condições, objetivando identificar possíveis aplicações industriais.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Microrganismos

Nesta pesquisa foi utilizada a linhagem de *Penicillium purpurogenum* CFAM 214, cedida pela Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM), do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/Fiocruz Amazônia), Manaus, Amazonas, Brasil. Da cultura preservada em água destilada esterilizada, o *P. purpurogenum* CFAM 214 foi transferido para ágar extrato de malte (MEA), em placas de Petri (Pitt, 1990). Os cultivos foram mantidos a 28 °C, por sete dias.

### 2.2 Preparo de inóculo

Para obtenção da suspensão de esporos, foi adicionado 1 mL de água destilada esterilizada em cada cultura de *P. purpurogenum* CFAM 214, mantidas em tubos de ensaio contendo Batata Dextrose Ágar (BDA), por sete dias. Após esse período, foram preparadas soluções de esporos ( $1 \times 10^6$  esporos/mL) para uso nos bioprocessos em meio líquido (Batista Junior *et al.*, 2021).

### 2.3 Avaliação dos meios de cultivo para produção de biocompostos

Para selecionar o meio de cultivo que induz a produção de compostos bioativos, foram utilizados os meios descritos na Tabela 1. O bioprocessos foi conduzido em frascos Erlenmeyer de 50 mL, contendo 25 mL de cada meio, durante sete dias a 28 °C, em condições estacionárias (Batista Junior *et al.*, 2021).

Tabela 1 – Composição dos meios de cultivo utilizados para produção de biocompostos por *P. purpurogenum* CFAM 214.

Meios de cultivo	Composição (g/L)
Batata Dextrose e Levedura (BDL)	Batata (200), dextrose (20), extrato de levedura (4)
Yeast Extract Sucrose (YES)	Sacarose (150), extrato de levedura (20),
International Streptomyces Project 2 (ISP2)	Amido (10), extrato de levedura (4), glicose (10), extrato de malte (4)
Sabouraud (SB)	Dextrose (20), peptona (10)

Ao término do bioprocesso, os secretomas foram separados da massa micelial por filtração a vácuo, seguida de duas etapas de filtração com seringa, utilizando membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com porosidade de 0,45 µm e 0,22 µm, respectivamente. Em seguida, o caldo foi misturado com acetato de etila por 48 horas. Após esse período, o solvente foi evaporado e os extratos orgânicos foram submetidos à avaliação do perfil cromatográfico para identificar o meio de cultivo que melhor induziu a produção de biocompostos (Batista Junior *et al.*, 2021).

#### 2.4 Análise do perfil cromatográfico

Uma quantidade de 1 mg dos extratos obtidos com acetato de etila foi ressuspensa em 1 mL de metanol grau HPLC e homogeneizada em banho ultrassônico para melhor solubilização. As amostras foram analisadas por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS) utilizando um cromatógrafo Acella® (ThermoScientific), com detecção simultânea por um detector de arranjo de diodos (PDA) e um detector de espectrômetro de massas (EM) (Thermo Scientific TSQ Quantum Access). A região do UV analisada foi de 200 a 400 nm e a coluna foi de C18, onde se empregou um gradiente exploratório, no qual A era o metanol e B a água na proporção 10:90 (v/v).

#### 2.5 Cultivo submerso e proteínas totais

Foi preparada uma suspensão de conídios em água destilada, a partir da qual foram inoculadas (concentração de  $2,0 \times 10^5$  conídios/mL) no frasco Erlenmeyer contendo 75 mL do meio de cultura Sabouraud. O experimento foi realizado em duplicata, com cultivo submerso em condições estáticas a 28°C, durante 168 horas. A cada 24 horas, duas alíquotas foram retiradas para análise.

Para avaliar a concentração de proteínas totais em cada secretoma, foram utilizadas as alíquotas coletadas a cada 24 horas. A quantificação foi realizada utilizando o ensaio fluorimétrico Qubit® 3.0, seguindo instruções do fabricante.

## 2.6 Análise por eletroforese unidimensional

Uma suspensão (concentração de  $2,0 \times 10^5$  conídios/mL) foi inoculada em 150 mL de meio de cultura Sabouraud. A fermentação submersa aconteceu a 28°C por 120 horas, em duplicata. Após o cultivo, o caldo fermentado foi separado do micélio por filtração a vácuo, seguido por filtração com membranas de polifluoreto de vinilideno (PVDF) de 0,45 µm e 0,22 µm. Os sobrenadantes foram concentrados em cartucho centriprep 3kDa através de sucessivas centrifugações a 4400 rpm, resultando em um concentrado de 5 mL.

As proteínas das amostras foram precipitadas com acetona gelada e ácido tricloroacético, na proporção de 1:0,6 (amostra/solvente), agitadas em vórtex e incubadas por 24 horas. A solubilização proteica foi realizada com a solução ureia/tioureia (8M/2M). A quantificação das proteínas totais foi feita com o ensaio fluorimétrico Qubit® 3.0.

Para visualização do perfil proteico do *P. purpurogenum*, 35 µg de proteínas foram diluídos em tampão Laemmli [2x] e preparados para eletroforese em gel de poli(acrilamida) a 15%. A eletroforese foi realizada a 80 volts e 15 mA/gel por 3 horas. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 e escaneados.

## 2.7 Determinação da atividade proteolítica

Para determinar a atividade proteolítica, os secretomas obtidos nos intervalos a cada 24 horas (item 2.5) foram submetidos à avaliação quantitativa de proteases. Adicionou-se 0,5 mL de extrato bruto a tubos de ensaio contendo 1,5 mL de solução caseína 2% (p/v) e 1 mL de tampão fosfato 0,15 M, pH 7,5. A mistura reacional foi mantida a 28°C por 30 minutos. Após esse período, a reação foi paralisada com 3 mL de ácido tricloroacético 0,4M, seguido de centrifugação a 4000 rpm, a 4 °C por 20 minutos. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância de 0,01 em 1 hora a 280 nm, com os resultados expressos em U/mL (Fleuri; Sato, 2008).

## 2.8 Efeito do pH e da temperatura na atividade proteolítica

Para avaliar o pH ótimo, a caseína foi diluída em solução tampão 0,1M: acetato de sódio (pH 6,5 e 7,0), Tris-HCl (pH 7,5 e 8,0) e glicina-NaOH (pH 8,5 e 9,0). Após uma hora de reação a 25°C, a atividade proteolítica foi determinada conforme descrito no item 2.7. Para determinar o efeito da temperatura na atividade proteolítica, o extrato enzimático e a solução de caseína foram incubados em uma faixa de 30°C a 70°C durante uma hora. Os resultados foram expressos como atividade relativa em todos os experimentos (Martim *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2015).

## 2.9 Análise estatística

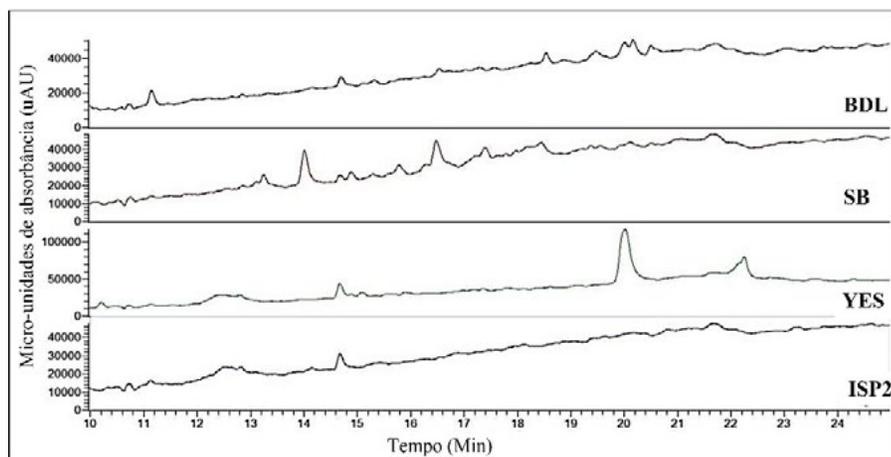
Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) com teste de Tukey a 5% de significância, utilizando o programa Minitab 18.0.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Seleção do meio de cultivo para produção de biocompostos

Os perfis cromatográficos dos extratos de *P. purpurogenum* cultivados em diferentes meios de cultura (BDL, SB, YES e ISP2) revelaram variações significativas nos compostos produzidos, conforme ilustrado na Figura 1. No meio SB, observou-se um perfil complexo, com picos distribuídos principalmente entre 14 e 20 minutos, indicando a presença de uma ampla gama de biocompostos. Em comparação, o meio BDL apresentou picos menos intensos e concentrados entre 15 e 18 minutos, enquanto o meio YES destacou-se com um pico significativo em aproximadamente 19 minutos, mas com menor diversidade de picos adicionais. O perfil cromatográfico do meio ISP2 mostrou alguns picos relevantes, embora menos diversificados do que o SB.

Figura 1 – Perfis cromatográficos de *Penicillium purpurogenum* CFAM 214 cultivado em diferentes meios de cultura, obtidos por LC-MS com detecção UV (200-400nm) e tempo de retenção de 25 minutos. BDL – Batata Dextrose e Levedura; SB – Sabouraud; YES – Yeast Extract Sucrose; ISP2 – International Streptomyces Project 2.

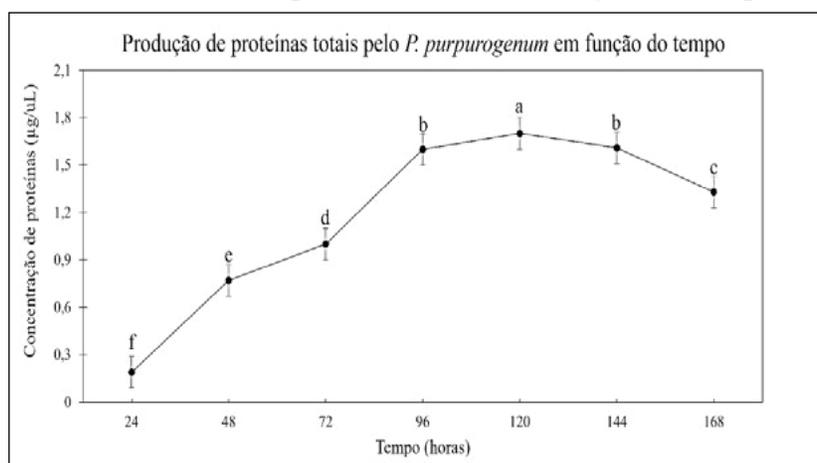


Com base nesses resultados, o meio SB foi selecionado para as análises subsequentes devido à sua capacidade de promover a produção de uma maior diversidade de compostos.

### 3.2 Produção de proteínas e análise do perfil proteico por eletroforese

A curva da Figura 2 mostra a variação na produção de proteínas totais ao longo de 168 horas de cultivo de *P. purpurogenum*. A produção foi baixa nas primeiras 24 horas (0,19 µg/µL), aumentando continuamente até 72 horas (1,0 µg/µL) e atingindo o pico em 120 horas (1,7 µg/µL). Após esse pico, houve uma leve redução para 1,6 µg/µL em 144 horas e 1,33 µg/µL em 168 horas. Além disso, o teste de Tukey mostrou diferenças significativas entre os tempos de cultivo ( $p < 0,05$ ), com o pico em 120 horas sendo significativamente superior aos demais.

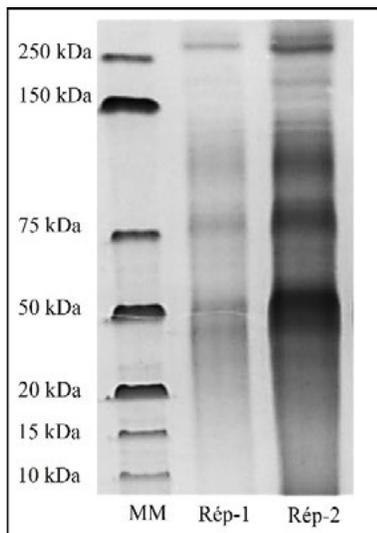
Figura 2 – Curva de produção de proteínas totais no meio de cultura Sabouraud pelo fungo *Penicillium purpurogenum* CFAM 214 durante 168 horas. As letras (a-f) diferentes indicam que há uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ).



A análise por eletroforese unidimensional do secretoma de *P. purpurogenum* em 120 horas de cultivo revelou a presença de várias proteínas extracelulares em uma ampla faixa de pesos moleculares, variando entre 50 e 150 kDa (Figura 3). A principal concentração de proteínas foi observada na faixa entre 75 e 150 kDa, com bandas de maior intensidade (Figura 3 – Rép 1 e 2). A repetição desse perfil nas duas réplicas biológicas, indicam uma consistência na produção de proteínas nesse intervalo de pesos moleculares.

As bandas de menor intensidade, localizadas abaixo de 75 kDa, também foram observadas. De forma complementar, a ausência de bandas significativas abaixo de 50 kDa sugere uma menor produção de proteínas de baixo peso molecular no período de 120 horas de cultivo (Figura 3).

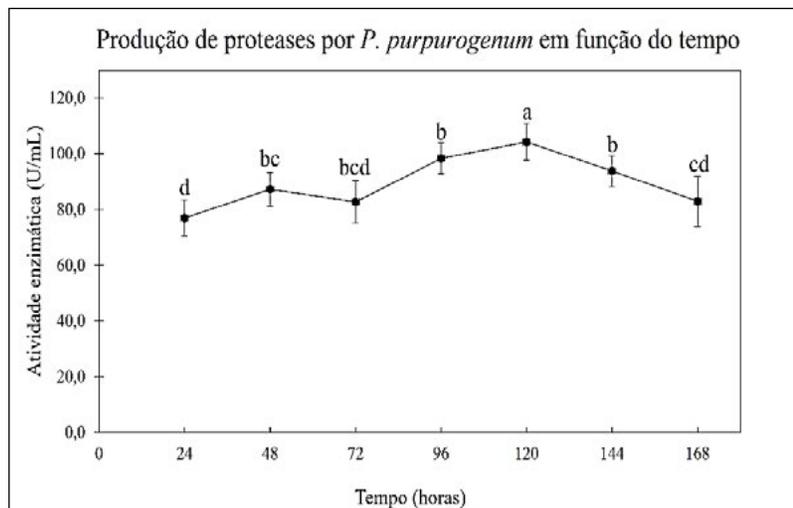
Figura 3 – Perfil proteico por eletroforese unidimensional do secretoma de *Penicillium purpurogenum* CFAM 214 no meio de cultura Sabouraud no período de 120 horas. MM – marcador molecular; Rép-1 – amostra da réplica biológica 1; Rép-2 – amostra da réplica biológica 2.



### 3.3 Produção e caracterização físico-química das enzimas proteolíticas

A produção de proteases por *P. purpurogenum* apresentou diferenças significativas ao longo do tempo de cultivo. O pico máximo foi observado em 120 horas, com uma atividade de 104,23 U/mL, sendo estatisticamente superior aos demais tempos ( $p < 0,05$ ). Inicialmente, a atividade proteolítica aumentou progressivamente desde 24 horas (76,90 U/mL) até 96 horas (98,37 U/mL). Após o pico, houve uma queda significativa, com a atividade reduzida para 82,93 U/mL em 168 horas.

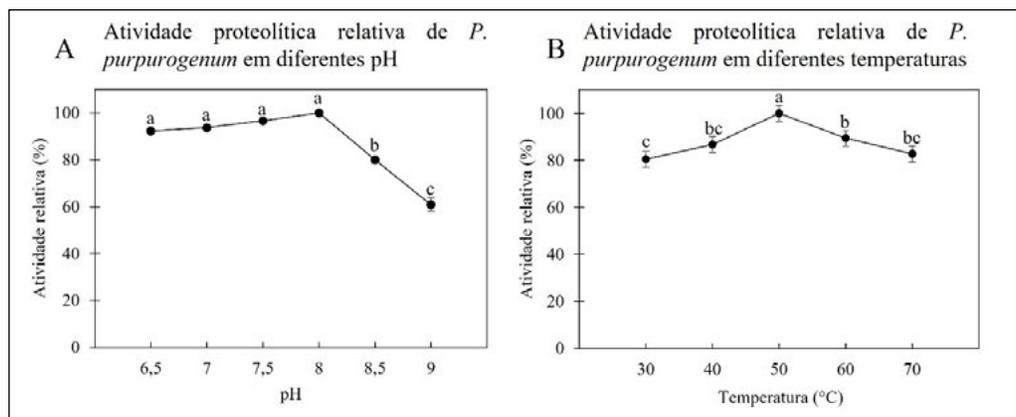
Figura 4 – Curva de produção da enzima protease no meio de cultura Sabouraud pelo fungo *Penicillium purpurogenum* CFAM 214 durante 168 horas. As letras (a-d) diferentes indicam que há uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ).



Para caracterizar as proteases da linhagem *P. purpurogenum* CFAM 214, verificou-se a estabilidade da atividade enzimática em diferentes pH e temperaturas (Figura 5). Com isso, observou-se que a enzima se manteve ativa em uma ampla faixa de pH, com atividade próxima de 100% nos pH 6,5, 7,0 e 7,5. A atividade máxima foi registrada no pH 8, com valor estatisticamente igual aos pH anteriores ( $p > 0,05$ ). Entretanto, a partir do pH 8,5, houve uma redução significativa na atividade proteolítica (Figura 5-A).

Em relação à influência da temperatura na atividade proteolítica de *P. purpurogenum*, a enzima demonstrou estabilidade e manteve-se ativa em temperaturas elevadas, com a atividade relativa aumentando significativamente com o incremento da temperatura, atingindo o pico a 50°C, onde a atividade foi estatisticamente superior ( $p < 0,05$ ) em relação às outras temperaturas. Já em 60°C e 70°C, houve redução na atividade enzimática, que foi significativamente menor do que a observada a 50°C ( $p < 0,05$ ) (Figura 5-B).

Figura 5 – Efeito do pH (A) e da temperatura (B) nas atividades da protease presente no secretoma de *Penicillium purpurogenum* CFAM 214 produzido em 120 horas. As letras (a-c) diferentes indicam que há uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ).



#### 4 DISCUSSÃO

No presente estudo, verificou-se que a composição nutricional dos meios de cultivo influenciou a síntese de biomoléculas pela linhagem Amazônica *P. purpurogenum* CFAM 214, como evidenciado pelas diferenças entre os perfis cromatográficos. Zain *et al.* (2011) observaram que *P. janthinellum*, quando cultivado em SB e YES, sintetizou diferentes compostos bioativos, incluindo o ácido kójico, um importante agente despigmentante com ampla aplicação na indústria de cosméticos. Elias *et al.* (2006) e Zain *et al.* (2011) também constataram que a composição do meio de cultura influenciou a síntese de moléculas por *P. verrucosum* e *P. duclauxii*, respectivamente.

Os processos biotecnológicos com *Penicillium* são influenciados por fatores como a quantidade e relação de carbono e nitrogênio, minerais, íons inorgânicos, água, pH, luminosidade e oxigênio. Esses parâmetros afetam a esporulação, produção de compostos bioativo e biomassa (Boratyński *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2015; Zukovski *et al.*, 2017). Nesse sentido, a literatura científica demonstra que o meio de cultura Sabouraud possui características nutricionais que favorecem seu uso em bioprocessos com espécies de *Penicillium*. No estudo de Barboráková *et al.* (2012), verificaram que, com a utilização da glicose, existe uma dose-dependência bastante específica para a otimização da produção de compostos antimicrobianos por *P. scabrosum*. Em concordância com resultados de diversos estudos com outros fungos, Alhelli *et al.* (2018) constataram que a adição ao substrato de peptona, uma fonte de nitrogênio, incrementou a produção de lipase por *P. candidum*. Além disso, Acharya e Hare (2022) mencionaram que, como um ingrediente do meio Sabouraud, a peptona

fornece nitrogênio, carbono e aminoácidos essenciais para o crescimento ideal de fungos.

Em relação as proteínas totais, este variou ao longo do bioprocessos em meio líquido. No secretoma de *P. purpurogenum* CFAM 214, a concentração de proteínas alcançou um valor significativo de 1,7 µg/µL após 120 horas, o que é superior ao observado em outras espécies de *Penicillium* relatadas na literatura. Por exemplo, *P. nalgiovense* apresentou 1,0 µg/µL (Papagianni; Sergelidis, 2014), *P. chrysogenum* registrou 1,0 µg/µL (Benito *et al.*, 2002) e *P. citrinum* alcançou 1,22 µg/µL (Wen; Guo; Chen, 2014). Essa concentração, embora significativa para *P. purpurogenum* CFAM 214, é inferior aos valores observados em outras culturas de fungos, onde rendimentos entre 2 e 10 µg/µL de proteínas totais são comuns sob condições otimizadas, dependendo se as proteínas são extraídas de hifas, esporos ou do secretoma (Benmradi *et al.*, 2018; Garrigues *et al.*, 2017). Esse fator enfatiza a necessidade de levar em conta a origem do material biológico ao analisar o rendimento proteico. Além disso, sugere que ainda há potencial para melhorar os parâmetros de cultivo dessa cepa. A análise da biossíntese e secreção de proteínas durante o processo fermentativo serve como base inicial para determinar as condições ótimas de produção e possibilitar o aproveitamento industrial dessas biomoléculas (Alhelli *et al.*, 2018).

Apesar do rendimento proteico modesto de *P. purpurogenum* CFAM 214, o perfil de eletroforese revelou a presença de proteínas com pesos moleculares variando entre 50kDa e 150kDa. Em contraste, estudos de Aissaoui *et al.* (2014); Benito *et al.* (2002); Xie; Xiao; Gao (2016) mostraram que, nos extratos de *P. chrysogenum*, *P. digitatum* e *P. citrinum*, os pesos moleculares das proteases foram de 35 kDa, 30 kDa e 32,27 kDa, respectivamente. Além disso, as proteases podem apresentar uma ampla gama de pesos moleculares, dependendo do organismo e da classe, como as metaloproteases, que têm pesos moleculares mais elevados, variando de 30 a 90 kDa (Monod *et al.*, 1993; Pereira *et al.*, 2009).

Quanto à produção de proteases, resultados de outras cepas amazônicas de *Penicillium* também foram reportados por Souza *et al.* (2015). O fungo do presente estudo, *P. purpurogenum* CFAM 214, apresentou atividade proteolítica de 104,23 U/mL após 120 horas de cultivo em meio Sabouraud. Embora essa produção seja inferior à de outras cepas estudadas por Souza *et al.* (2015), é importante ressaltar que a análise da linhagem CFAM 214 é fundamental para identificar seus potenciais aplicações na biotecnologia. Resultados de cepas como *P. citrinum* CFAM 233, que atingiu 378,89 U/mL, e *P. fellutanum* CFAM 60, com 329,33 U/mL, indicam a variabilidade na produção de proteases entre as espécies (Souza *et al.*, 2015).

A atividade proteolítica do fungo *P. purpurogenum* CFAM 214, com um valor de 104,23 U/mL após 120 horas de cultivo a um pH de 8 e temperatura de 50 °C, destaca-se em comparação com outras espécies do gênero *Penicillium*, conforme apresentado na Tabela 2. Por exemplo, *P. chrysogenum* apresenta uma atividade proteolítica significativamente menor, com apenas 12,79 U/mL em 72

horas a um pH de 7 e temperatura de 30 °C (Ikram-Ul-Haq; Umber, 2006). Essa diferença pode ser atribuída a condições de cultivo para *P. purpurogenum*, que revela a sua capacidade superior de produzir enzimas proteolíticas alcalinas com atividades em temperaturas elevadas, evidenciando seu potencial industrial para aplicações que requerem condições não ideais para outras espécies.

Em relação ao tempo de incubação, *P. purpurogenum* necessitou de 120 horas para alcançar sua atividade proteolítica, o que é intermediário se comparado a outras espécies, como *P. digitatum*, que atingiu 184,2 U/mL em 216 horas (Aissaoui *et al.*, 2014). No entanto, é importante notar que, apesar de um tempo de incubação mais longo, *P. citrinum* obteve uma atividade proteolítica ainda maior, com 213,61 U/mL em 144 horas (Xie; Xiao; Gao, 2016). Esses resultados sugerem que, embora *P. purpurogenum* CFAM 214 apresente um desempenho competitivo em termos de atividade proteolítica, a otimização do tempo de incubação poderia ser um aspecto a ser explorado para melhorar ainda mais sua produção enzimática (Tabela 2).

Quanto ao pH e à temperatura, os valores otimizados para *P. purpurogenum* (pH 8 e 50 °C) também se destacam em comparação com outras cepas de *Penicillium* apresentadas na Tabela 2. Por exemplo, *P. citrinum* foi avaliada em seu pH ótimo de 6 e temperatura de 35 °C, resultando em uma atividade proteolítica de 15,94 U/mL (Oyeagu *et al.*, 2023). Da mesma forma, uma cepa de *Penicillium* sp. apresentou as condições ideais de pH 6,5 e temperatura de 45 °C, obtendo resultados significativamente mais baixos (Germano *et al.*, 2003).

Tabela 2 – Comparação da atividade proteolítica de diferentes espécies de *Penicillium*

Espécie <i>Penicillium</i>	Referência	Atividade proteolítica (U/mL)	Tempo (horas)	pH	Temperatura (°C)
<i>P. purpurogenum</i> CFAM 214	Este trabalho	104,23	120	8	50
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Ikram-ul-haq; Umber (2006)	12,79	72	7	30
<i>P. citrinum</i>	Xie; Xiao; Gao (2016)	213,61	144	8	40
<i>P. digitatum</i>	Aissaoui <i>et al.</i> (2014)	184,2	216	7	55
<i>Penicillium</i> sp.	Germano <i>et al.</i> (2003)	43,00	48	6,5	45
<i>P. citrinum</i>	Oyeagu <i>et al.</i> (2023)	15,94	96	6	35

A tabela apresenta as espécies analisadas, acompanhadas de suas respectivas referências. Os parâmetros incluídos são: atividade proteolítica (U/mL), que mede a capacidade da enzima proteolítica de cada espécie em unidades de atividade enzimática por mililitro; tempo (horas), que indica a duração do cultivo para a avaliação da atividade enzimática; pH, que representa o valor ótimo do pH no qual a enzima mantém sua máxima atividade; e temperatura (°C), que especifica a temperatura ótima em graus Celsius nas quais a enzima mantém seu desempenho máximo.

Esses dados indicam que, embora *P. purpurogenum* CFAM 214 tenha um desempenho superior em atividade proteolítica, sua condição ótima é distinta, permitindo-lhe adaptar-se melhor a condições mais extremas. Essa característica pode ser valiosa para aplicações biotecnológicas que requerem a degradação de proteínas em ambientes menos favoráveis. Baseado nisso, este estudo fornece uma base importante para futuras pesquisas sobre a otimização de processos biotecnológicos envolvendo a linhagem amazônica *P. purpurogenum* CFAM 214, e abre caminhos para investigar como ajustar as condições de cultivo para maximizar a produção de enzimas e possíveis outros compostos bioativos.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo revelaram que o meio Sabouraud promoveu um perfil cromatográfico mais complexo e diversificado para a linhagem amazônica *Penicillium purpurogenum* CFAM 214. A análise SDS-PAGE indicou a presença predominante de proteínas extracelulares na faixa de 50 a 150 kDa, enquanto a produção de proteínas abaixo de 50 kDa foi significativamente menor. O pico de produção de proteínas alcançou 1,7 µg/µL em 120 horas, período em que também foi observada a atividade proteolítica máxima de 104,23 U/mL. Embora esses resultados sejam inferiores aos de outras espécies de *Penicillium*, as proteases mostraram excelente desempenho em pH 8 e 50 °C. Essa estabilidade em condições alcalinas e a altas temperaturas torna essas enzimas especialmente promissoras para diversas aplicações industriais. Portanto, os dados sugerem que *P. purpurogenum* CFAM 214 pode ser uma fonte valiosa de proteases para bioprocessos industriais que requerem eficiência e estabilidade enzimática em ambientes extremos.

## AGRADECIMENTOS

À Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM), ao Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/Fiocruz Amazônia), à Fundação de Apoio à Fiocruz (FIOTEC) por meio do programa PROEP-LABS/ILMD FIOCRUZ AMAZÔNIA, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por meio do convênio Fiocruz/CNPq – LabsAmazônia, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) por meio do Programa

de Infraestrutura para Jovens Pesquisadores – Programa Primeiros Projetos (PPP), Programa de Apoio à Iniciação Científica (PAIC) e ao Programa de Apoio à Pós-Graduação (POSGRAD) pelo suporte e apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

ACHARYA, Tankeshwar; HARE, Janelle. Sabouraud Agar and Other Fungal Growth Media. *Em*: GUPTA, Vijai Kumar; TUOHY, Maria (org.). **Laboratory Protocols in Fungal Biology**. Fungal Biology Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 69–86. DOI: 10.1007/978-3-030-83749-5\_2. Disponível em: [https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-83749-5\\_2](https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-83749-5_2). Acesso em: 28 ago. 2024.

AISSAOUI, Neysse; ABIDI, Ferid; MAHAT, Safa; MARZOUKI, M. Nejib. Purification and biochemical characterization of a novel protease from *Penicillium digitatum* – Use in bioactive peptides production. **Journal of Basic Microbiology**, [S. l.], v. 54, n. S1, 2014. DOI: 10.1002/jobm.201400179. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jobm.201400179>. Acesso em: 28 ago. 2024.

AKANIRO, Ifunanya R.; CHIBUIKE, Ikenna V.; ONWUJEKWE, Emmanuel C.; GBADAMOSI, Francis A.; ENYI, Deborah O.; ONWE, Oge N. *Penicillium* species as chassis for biomanufacturing and environmental sustainability in the modern era: Progress, challenges, and future perspective. **Fungal Biology Reviews**, [S. l.], v. 46, p. 100326, 2023. DOI: 10.1016/j.fbr.2023.100326.

ALHELLI, A. M.; MANAP, M. Y.; MOHAMMED, A.; MIRHOSSEINI, S. H.; SUKOR, R.; MOHAMMED, N. K.; KHALIL, E. S.; HUSSIN, A. S. M. The extraction of crude enzyme of lipase from *Penicillium candidum* PCA 1/ TT031 by way of solid state fermentation. **International Food Research Journal**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. S1–S11, 2018.

ALVES, Amanda Lucia; SANTOS, Ana Carla Da Silva; BARBOSA, Renan Do Nascimento; SOUZA-MOTTA, Cristina Maria De; MELO, Roger Fagner Ribeiro; TIAGO, Patricia Vieira. *Penicillium gercinae* and *Penicillium stangiae* (Eurotiomycetes, Ascomycota), two new species from soil in Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, [S. l.], v. 36, n. 1, p. e2022abb0006, 2022. DOI: 10.1590/0102-33062022abb0006.

ARAUJO, Nailson Correia De; SILVA, Geraldo H.; MACÊDO, Adriely Valerio De; ANDRADE, João Victor; JESUS, Ester Gonçalves De; SANTOS, Mario Ferreira Conceição. Study of the culture medium variation in the production of secondary metabolite pyrophen by endophytic fungus *Aspergillus niger* from *Harconia speciosa*. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 16, p. e242111638088, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i16.38088.

BARBORÁKOVÁ, Zuzana; LABUDA, Roman; HÄUBL, Georg; TANČINOVÁ, Dana. Effect of glucose concentration and growth conditions on the fungal biomass, pH of media and production of fumagillin by a non-pathogenic strain *Penicillium scabrosum*. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, [S. l.], v. 1, n. 4, p. 466–477, 2012.

BARBOSA, Renan Do Nascimento; SANTOS, José Ewerton Felinto Dos; BEZERRA, Jadson Diogo Pereira; ISTEŁ, Łukasz; HOUBRAKEN, Jos; OLIVEIRA, Neiva Tinti; SOUZA-MOTTA, Cristina Maria De. Brazilian Atlantic Forest and Pampa Biomes in the spotlight: an overview of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* (Eurotiales) species and the description of *Penicillium nordestinense* sp. nov. **Acta Botanica Brasilica**, [S. l.], v. 36, n. 1, p. e2021abb0390, 2022. DOI: 10.1590/0102-33062021abb0390.

BATISTA JUNIOR, Genésio Pontes; DA SILVA, Kemily Nunes; SANTIAGO, Paulo Alexandre Lima; SANTIAGO, Sarah Raquel Silveira Da Silva; OHSE, Ketlen Christine; MARTIM, Salomão Rocha; DE AQUINO, Priscila Ferreira. Prospecção enzimática e atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* isoladas do Bioma Amazônico / Enzyme prospectation and antimicrobial activity of *Penicillium* species isolated from the Amazon Biome. **Brazilian Journal of Development**, [S. l.], v. 7, n. 7, p. 75011–75025, 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n7-603.

BEHERA, Bikash Chandra; SETHI, Bijay Kumar; MOHAPATRA, Sonali; THATOI, Hrudayanath; MISHRA, Rashmi Ranjan. Bio-production of alkaline protease by *Trichoderma longibrachiatum* and *Penicillium rubidurum* using different agro-industrial products. **Novel Research in Microbiology Journal**, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 1241–1255, 2021. DOI: 10.21608/nrmj.2021.178300.

BENITO, María J.; RODRÍGUEZ, Mar; NÚÑEZ, Félix; ASENSIO, Miguel A.; BERMÚDEZ, María E.; CÓRDOBA, Juan J. Purification and Characterization of an Extracellular Protease from *Penicillium chrysogenum* Pg222 Active against Meat Proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 68, n. 7, p. 3532–3536, 2002. DOI: 10.1128/AEM.68.7.3532-3536.2002.

BENMRAD, Maroua Omrane; MOUJEHED, Emna; BEN ELHOUL, Mouna; MECHRI, Sondes; BEJAR, Samir; ZOUARI, Riadh; BAFFOUN, Ayda; JAOUADI, Bassem. Production, purification, and biochemical characterization of serine alkaline protease from *Penicillium chrysogenum* strain X5 used as excellent bio-additive for textile processing. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 119, p. 1002–1016, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.07.194.

BORATYŃSKI, Filip; SZCZEPAŃSKA, Ewa; GRUDNIEWSKA, Aleksandra; GNIŁKA, Radosław; OLEJNICZAK, Teresa. Improving of hydrolases biosynthesis by solid-state fermentation of *Penicillium camemberti* on rapeseed cake. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 10157, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-28412-y.

ELIAS, Barbara Casellato; SAID, Suraia; DE ALBUQUERQUE, Sérgio; PUPO, Mônica Tallarico. The influence of culture conditions on the biosynthesis of secondary metabolites by *Penicillium verrucosum* Dierck. **Microbiological Research**, [S. l.], v. 161, n. 3, p. 273–280, 2006. DOI: 10.1016/j.micres.2005.10.003.

FERREIRA, Ana Beatriz Monteiro; FISCHER, Ivan Herman; LEITE, Luís Garrigós; PADOVANI, Carlos Roberto; BUENO, César Júnior. Culture media to detect and criteria to evaluate and report the activity of extracellular enzymes produced by

phytopathogenic fungi. **Arquivos do Instituto Biológico**, [S. l.], v. 86, p. e0592017, 2019. DOI: 10.1590/1808-1657000592017.

FLEURI, Luciana Francisco; SATO, Hélia Harumi. Estudo da influência de diferentes parâmetros na produção de enzimas líticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 299–310, 2008. DOI: 10.1590/S0101-20612008000200006.

GARRIGUES, Sandra; GANDÍA, Mónica; POPA, Crina; BORICS, Attila; MARX, Florentine; COCA, María; MARCOS, Jose F.; MANZANARES, Paloma. Efficient production and characterization of the novel and highly active antifungal protein AfpB from *Penicillium digitatum*. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 14663, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-15277-w.

GERMANO, Sandro; PANDEY, Ashok; OSAKU, Clarice A.; ROCHA, Saul N.; SOCCOL, Carlos R. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 32, n. 2, p. 246–251, 2003. DOI: 10.1016/S0141-0229(02)00283-1.

IKRAM-UL-HAQ, HAMID MUKHTAR; UMBER, HINA. Production of Protease by *Penicillium chrysogenum* Through Optimization of Environmental Conditions. **Journal of agriculture & social sciences**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 23–25, 2006.

LI, Zimu *et al.* Insights into the mechanism of extracellular proteases from *Penicillium* on myofibrillar protein hydrolysis and volatile compound evolutions. **Food Research International**, [S. l.], v. 175, p. 113774, 2024. DOI: 10.1016/j.foodres.2023.113774.

MARTIM, Salomão Rocha; SILVA, Larissa Svetlana Cavalcanti; ALECRIM, Mircella Marialva; DE SOUZA, Bianca Cordeiro; OLIVEIRA, Ila Maria De Aguiar; TEIXEIRA, Maria Francisca Simas. Proteases ácidas de cogumelo comestível da Amazônia para aplicabilidade industrial. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi - Ciências Naturais**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 353–362, 2017. DOI: 10.46357/bcnaturais.v12i3.86.

MONOD, M.; PARIS, S.; SANGLARD, D.; JATON-OGAY, K.; BILLE, J.; LATGÉ, J. P. Isolation and characterization of a secreted metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*. **Infection and Immunity**, [S. l.], v. 61, n. 10, p. 4099–4104, 1993. DOI: 10.1128/iai.61.10.4099-4104.1993.

NOURI, Negin; SADEGHI, Leila; MAREFAT, Arezu. Production of alkaline protease by *Aspergillus niger* in a new combinational paper waste culture medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S. l.], v. 137, n. 3, p. 173–178, 2024. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2023.12.010.

OYEAGU, Uchenna; UGHAMBA, Kingsley T.; EKWEM, Ogechi H.; UGWU, Francis S. O.; EZEH, Chukwuemeka C. *Penicillium citrinum*: A Promising Candidate for Protease Production. **Tropical Journal of Natural Product Research**, [S. l.], v. 7, n. 9, p. 4092–4098, 2023.

PAPAGIANNI, M.; SERGELIDIS, D. Purification and Biochemical Characterization of a Novel Alkaline Protease Produced by *Penicillium nalgiovense*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 172, n. 8, p. 3926–3938, 2014. DOI: 10.1007/s12010-014-0824-3.

PAWAR, Kadambari Subhash; SINGH, Paras Nath; SINGH, Sanjay Kumar. Fungal alkaline proteases and their potential applications in different industries. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 14, p. 1138401, 2023. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1138401.

PEREIRA, Martha Machado; SILVA, Bianca Alcântara; PINTO, Marcia Ribeiro; BARRETO-BERGTER, Eliana; DOS SANTOS, André Luis Souza. Proteins and Peptidases from Conidia and Mycelia of *Scedosporium apiospermum* Strain HLPB. **Mycopathologia**, [S. l.], v. 167, n. 1, p. 25–30, 2009. DOI: 10.1007/s11046-008-9147-7.

PITT, J. I. Pennane, a New Computer Key to Common *Penicillium* Species. Em: SAMSON, Robert A.; PITT, John I. (org.). **Modern Concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* Classification**. Boston, MA: Springer US, 1990. p. 279–281. DOI: 10.1007/978-1-4899-3579-3\_24. Disponível em: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4899-3579-3\\_24](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4899-3579-3_24). Acesso em: 28 ago. 2024.

SHRUTHI, Balakrishna Rao; ACHUR, Rajeshwara Nagappa Hegde; NAYAKA BORAMUTHI, Thippeswamy. Optimized Solid-State Fermentation Medium Enhances the Multienzymes Production from *Penicillium citrinum* and *Aspergillus clavatus*. **Current Microbiology**, [S. l.], v. 77, n. 9, p. 2192–2206, 2020. DOI: 10.1007/s00284-020-02036-w.

SONG, Peng; ZHANG, Xue; WANG, Shuhua; XU, Wei; WANG, Fei; FU, Rongzhao; WEI, Feng. Microbial proteases and their applications. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 1236368, 2023. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1236368.

SOUZA, Thayana C. De; ARAÚJO, Cláudia P. M. De; RODRIGUES, Josy C.; FILHO, Raimundo Felipe C.; FERNANDES, Ormezinda 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**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 107–113, 2015.

TRONCOSO, Franco David; SÁNCHEZ, Daniel Alberto; FERREIRA, María Luján. Production of Plant Proteases and New Biotechnological Applications: An Updated Review. **ChemistryOpen**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. e202200017, 2022. DOI: 10.1002/open.202200017.

WEN, Chao; GUO, Wenbin; CHEN, Xinhua. Purification and Identification of a Novel Antifungal Protein Secreted by *Penicillium citrinum* from the Southwest Indian Ocean. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 24, n. 10, p. 1337–1345, 2014. DOI: 10.4014/jmb.1405.05008.

XIE, Li; XIAO, Yunzhu; GAO, Xiangyang. Purification and Characterization of a Halotolerant Alkaline Serine Protease from *Penicillium citrinum* YL-1 Isolated from

Traditional Chinese Fish Sauce. **Food Biotechnology**, [S. l.], v. 30, n. 2, p. 137–153, 2016. DOI: 10.1080/08905436.2016.1168305.

ZAIN, M. E.; EL-SHEIKH, H. H.; SOLIMAN, H. G.; KHALIL, A. M. Effect of certain chemical compounds on secondary metabolites of *Penicillium janthinellum* and *P. duclauxii*. **Journal of Saudi Chemical Society**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 239–246, 2011. DOI: 10.1016/j.jscs.2010.09.004.

ZHANG, Jing *et al.* Enzyme Production Potential of *Penicillium oxalicum* M1816 and Its Application in Ferulic Acid Production. **Foods**, [S. l.], v. 10, n. 11, p. 2577, 2021. DOI: 10.3390/foods10112577.

ZUKOVSKI, L.; FONTANA, R. C.; PAULETTI, G.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Fodder radish cake (*Raphanus sativus* L.) as an alternative biomass for the production of cellulases and xylanases in solid-state cultivation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 709–714, 2017. DOI: 10.1590/0104-6632.20170343s20150818.