

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA EM PORTO ALEGRE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E
BIOTECNOLOGIA

LETÍCIA NOEMI BRIZIO DA SILVA

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA DE GENES
CODIFICANTES DE LIPASES NO GÊNERO *Penicillium*

Trabalho de Conclusão de Curso II

PORTO ALEGRE

2022

LETÍCIA NOEMI BRIZIO DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA DE GENES
CODIFICANTES DE LIPASES NO GÊNERO *Penicillium***

Trabalho de Conclusão de Curso II

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Engenheiro de Bioprocessos e Biotecnologia na Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof.º Dr. Alexandro Cagliari

Co-Orientador: David Fagundes

PORTO ALEGRE

2022

LETÍCIA NOEMI BRIZIO DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA DE GENES
CODIFICANTES DE LIPASES NO GÊNERO *Penicillium***

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso II

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Engenheiro de Bioprocessos e Biotecnologia na Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof.^o Dr. Alexandro Cagliari

Co-Orientador: David Fagundes

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Ana Lucia Kern

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS

Prof.^a Dra. Débora Von Endt

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS

PORTO ALEGRE

2022

RESUMO

Diversos processos na indústria utilizam catalisadores para haver conversão química, de forma a obter um processo mais rápido sem afetar a qualidade dos produtos. Dentre os catalisadores com maior eficiência e menor agressão ao meio ambiente estão presentes os biocatalisadores. Com a biotecnologia temos o desenvolvimento de processos para a obtenção de biocatalisadores, favorecendo um produto com menor dano ambiental e com alto poder de reação. Dentre os biocatalisadores mais interessantes estão as Lipases, enzimas produzidas por diversos organismos, mas que neste estudo analisamos em específico as produzidas pelo gênero *Penicillium*. A lipase escolhida então por sua fácil obtenção e abundância é analisada dentro do gênero escolhido, para reconhecimento de sua filogenia entre as diversas espécies do gênero. Este estudo tem como objetivo trazer um conhecimento adicional para aqueles que desejam trabalhar com lipases de *Penicillium*, havendo um aprofundamento das características da enzima e da relação de ancestralidade dentro do gênero.

PALAVRAS-CHAVE: Lipase. *Penicillium*. Filogenia.

ABSTRACT

Several processes in the industry use catalysts for chemical conversion, in order to obtain a faster process without affecting the quality of the products. Among the catalysts, with greater efficiency and less aggression to the environment are present the biocatalysts. With biotechnology we have the development of processes to obtain biocatalysts, favoring a product with less environmental damage and with high reaction power. Among the most interesting biocatalysts are the Lipases, enzymes produced by several organisms. In this study we analyze specifically those produced by the genus *Penicillium*. The lipase chosen for its easy obtainment and abundance is then analyzed within the chosen genus, for recognition of its phylogeny among the various species of the genus. This study aims to bring additional knowledge to those who wish to work with *Penicillium* lipases, with a deepening of the enzyme's characteristics and the ancestry relationship within the genus.

KEYWORDS: Lipase. *Penicillium*. Phylogeny.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1- Mecanismo catalítico de lipase | 13 |
| Figura 2- resultado MEME. Conservação da sequência de aminoácidos que compõem o domínio funcional de lipases | 23 |
| Figura 3 - resultado TMHMM para predição de domínio | 23 |
| Figura 4 - resultado Euk-mPLoc 2.0 de predição local da proteína na célula | 24 |
| Figura 5 - árvore filogenética..... | 25 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1- Códigos de lipases e seus respectivos organismos | 22 |
|--|----|

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 8 |
| 1.1 OBJETIVOS..... | 10 |
| 1.1.1 Objetivo Geral | 10 |
| 1.1.2 Objetivos Específicos | 10 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 11 |
| 2.1 ENZIMAS..... | 11 |
| 2.1.1 Lipases | 11 |
| 2.1.2 Fungos como meio de obtenção de Lipases | 14 |
| 2.2 USO DE BIOINFORMÁTICA PARA IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS GÊNICOS..... | 15 |
| 2.2.1 Construção de filogenia | 16 |
| 3 METODOLOGIA | 17 |
| 3.1 LEVANTAMENTO DE DADOS..... | 17 |
| 3.2 ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS | 18 |
| 3.3 MONTAGEM DA ÁRVORE FILOGENÉTICA | 19 |
| 3.4 ANÁLISE DE CONSERVAÇÃO GÊNICA | 20 |
| 3.5 DOMÍNIO TRANSMEMBRANA | 20 |
| 3.6 LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR..... | 20 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 22 |
| CONCLUSÃO | 26 |
| REFERÊNCIAS..... | 27 |

1 INTRODUÇÃO

Muitos processos tecnológicos utilizam biocatalisadores em processos de conversão química. Esses compostos participam elevando consideravelmente a velocidade das reações de síntese e, principalmente, de degradação (WARNER *et al*, 2004). A utilização de enzimas nas indústrias tem possibilitado desenvolver processos tecnológicos tão eficientes quanto aos realizados pela natureza (HASAN *et al*, 2006), além de diminuir riscos ambientais, quando comparado à indústria química.

Lipases são um dos grupos de biocatalisadores com diversas aplicações industriais, principalmente na indústria alimentícia, química e farmacêutica. Estas enzimas não só tem a função de hidrolisar triacilglicerol (TAG) como também são capazes de catalisar processos de esterificação, transesterificação e amonólise (NING, ZONG, 2010).

As lipases são amplamente encontradas em diversos organismos, como animais, plantas e microrganismos. As lipases mais utilizadas comercialmente são advindas de microrganismos, principalmente leveduras, fungos e bactérias. Dentre as formas de obtenção, aquelas produzidas por fungos as são mais utilizadas para aplicações industriais, graças à sua robustez, versatilidade e facilidade de produção. (RAVEENDRAN *et al*, 2018).

Quanto à produção de lipases, os fungos filamentosos são especialmente valorizados pois as enzimas que eles produzem são normalmente extracelulares, o que facilita a sua recuperação do meio de fermentação, além de em sua maioria não serem nocivos à saúde humana (FERNANDEZ, 2007). Os gêneros de fungos filamentosos produtores de lipase que industrialmente tem maior destaque são os *Penicillium sp.*, *Rhizopus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Geotrichum sp.*, *Mucor sp.*, *Alternaria sp.*, *Ashbya sp.*, *Beauveria sp.*, *Eurotrium sp.*, *Humicola sp.*, *Rhizomucor sp.*, *Acremonium sp.*, e *Ophiotoma sp.* (BHARATHI, RAJALAKSHMI, 2019; CHANDRA, *et al.*, 2020).

Penicillium sp. são fungos versáteis e oportunistas, característicos patógenos pós-colheita, representando uma das causas mais comuns de

deterioração fúngica em frutas e legumes. No entanto, muitas espécies deste gênero servem ao homem. Um exemplo muito comum de utilização na área alimentícia são as espécies *P. roqueforti* e *P. camembertii* que fazem parte da produção de queijos (L. LEISTNER, 1990). Outra grande importância que *Penicillium sp.* apresenta historicamente para a humanidade é como o produtor do primeiro antibiótico, penicilina, com produtor original *Penicillium notatum*, descoberto por Fleming em 1928 (GRUMACH, FERRARONI, 2006). Atualmente, representantes do gênero *Penicillium* são também muito conhecidos como bons produtores de enzimas extracelulares como lipases, proteases, celulases e xilanases.

Graças às diversas aplicações reconhecidas das lipases produzidas pelo fungo *Penicillium sp.* se torna imperativo o conhecimento aprofundado dessas lipases. Uma das maneiras de se entender melhor a função de uma enzima, e do gene que a codifica, é estudando sua origem e como relacionam-se as diversas variações encontradas, como é o caso de um estudo filogenético.

A Filogenia consiste no estudo evolutivo de uma espécie ou qualquer outra organização biológica, trabalhando fundamentalmente em identificar as transformações nas populações de organismos ao longo do tempo e situar as linhagens com os seus representantes atuais, assistindo às diversas áreas da biologia que utilizam tais conhecimentos. A Filogenia Molecular é o método que aborda a informação genética, resultando em agrupamentos de genes que possuem origem comum. (SONG *et al*, 2018).

A razão para a abordagem deste tema consiste na elaboração de um material auxiliar para a pesquisa de Loeser, 2022. Com um de seus trabalhos sendo a identificação molecular de isolado fúngico ambiental produtor de lipase. Sendo este tema então uma colaboração dentro da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Este trabalho tem como objetivo realizar um estudo filogenético das lipases do gênero *Penicillium*, com foco na identificação e caracterização destas, utilizando ferramentas de bioinformática para análises *in silico*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Identificar e analisar filogeneticamente os genes codificantes de lipases do gênero *Penicillium sp.*

1.1.2 Objetivos Específicos

Identificar genes codificantes de lipase no gênero *Penicillium*.

Realizar um estudo evolutivo dos genes codificantes de lipase do gênero *Penicillium*, utilizando abordagem filogenética.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ENZIMAS

Enzimas são proteínas com propriedades de aceleração de reações químicas, ocorrendo *in vivo* e *in vitro*, e mais ecologicamente viáveis que catalisadores químicos (MONTEIRO *et al.*, 2009). De acordo com a União Internacional de Bioquímica as enzimas são classificadas em diferentes classes conforme sua função catalítica, sendo elas Oxirredutases, Hidrolases, Liases, Transferases, Isomerases, Ligases e Translocases.

As enzimas apresentam alta especificidade catalítica, capacidade de aumentar a velocidade da reação ao reduzir a energia de ativação, não havendo sua degradação durante o processo, estereoseletividade, atuação em pHs e temperaturas mais brandas além de serem de origem natural e biodegradável. Estas características são muito relevantes principalmente quando comparamos as enzimas com catalisadores químicos. (MOURA, 2012).

O interesse em enzimas e seu uso abrange desde a sua utilização em processos de tratamentos de resíduos dos mais diversos tipos de indústrias, como químicas e farmacêutica (MOURA, 2012). Dentre as enzimas mais utilizadas as lipases se destacam, com grande interesse biotecnológico estas enzimas possuem alta propriedade catalítica, sendo também versáteis ao atuar em diversas condições. Dessa forma as Lipases são aplicadas em diversos setores industriais, como alimentício, agroindustrial e de saúde. (PASCOAL, 2018).

2.1.1 Lipases

Enzimas contêm diversas classificações, dentre elas o grupo das serina hidrolases. Em tal grupo encontram-se as lipases, também quimicamente conhecidas como glicerol éster hidrolases, elas catalisam a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa, liberando ácidos graxos e glicerol (RAJENDRAN, 2009). (adicionar classificação EC, segundo Enzyme do expase)

As lipases contemplam diversos benefícios para os processos em que são utilizadas, como solubilidade em água, estabilidade em solventes orgânicos, sem necessidade de cofatores, especificidade de substrato, quimiosseletividade e enantiosseletividade. (ALMEIDA, 2013).

Lipases microbianas quando comparadas com aquelas derivadas de plantas e animais recebem mais atenção devido a sua capacidade funcional em temperaturas extremas, pH e estabilidade em solventes orgânicos, quimiosseletividade, regioseletividade e enantioseletividade. Além disso, apresentam maiores rendimentos de produção, facilidade de manipulação genética e rápido crescimento em meios de baixo custo o que possibilita a produção mais adequada (GEOFFRY, ACHUR, 2018)

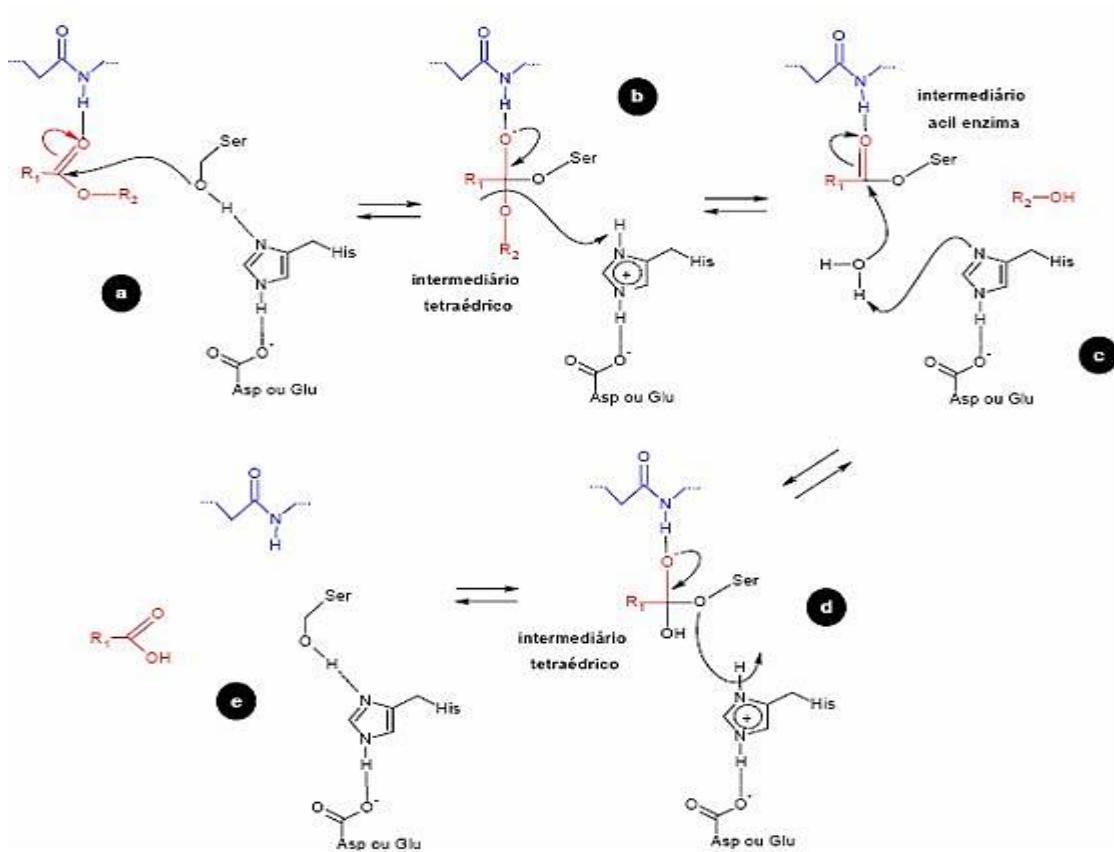
As lipases são proteínas estáveis em sistemas aquosos e não aquosos, em que catalisam reações reversas (esterificação e transesterificação) de grande interesse industrial (OLIVEIRA *et al.*, 2013). O sítio catalítico da lipase é uma tríade que geralmente contém: um resíduo nucleofílico (serina, cisteína ou aspartato); resíduos de ácido aspártico ou ácido glutâmico e um resíduo de histidina.

O mecanismo catalítico das lipases, como demonstrado na Figura 1, ocorre quando a serina é desprotonada por meio do ataque nucleofílico do par de elétrons não ligantes da molécula de histidina, seguido de um ataque nucleofílico ao carbono carbonílico da ligação éster da cadeia do substrato, assim originando um intermediário tetraédrico que é estabilizado por duas pontes de hidrogênio formadas com ligações amida, dos resíduos de aminoácidos (JAEGER *et. al.*, 1999). Com a liberação da molécula de álcool têm-se a formação de um complexo acil-enzima adicionalmente com a liberação do ácido graxo temos a enzima regenerada ao final.

As lipases são enzimas que contêm um mecanismo de ação específico, em que o sítio ativo geralmente é composto por uma tríade de aminoácidos: Serina, Histidina e Ácido Aspártico. O modelo que o mecanismo segue tem cinco etapas, iniciando com a histidina, que aumenta a nucleofilicidade do grupo hidroxila da serina que compõe o sítio catalítico, através de uma ligação de hidrogênio. Na segunda etapa o grupo hidroxila da serina age como uma base

atacando o carbono suscetível da ligação éster, com isso havendo uma abertura da ligação entre o carbono e o oxigênio e conseqüentemente formando um intermediário tetraédrico. Em seguida a formação é estabilizada por ligações de hidrogênio formadas com as ligações. Ao final a histidina atrai o hidrogênio liberado pela serina e o aspartato ou o glutamato estabilizam a carga positiva que é formada na histidina. O modelo está representado na Figura com a ordem seguindo: (a) ataque nucleofílico; (b) intermediário tetraédrico; (c) intermediário acil enzima + ataque nucleofílico da água; (d) intermediário tetraédrico; (e) enzima livre (VESCOVI, 2012).

Figura 1- Mecanismo catalítico de lipase



Fonte: Vescovi (2012)

As lipases catalisam a hidrólise de gorduras assim como reações reversas, entre as quais temos transesterificação, interesterificação, esterificação, aminólise, alcoólise e lactonização (PAQUES, 2006).

2.1.2 Fungos como meio de obtenção de Lipases

As lipases estão amplamente distribuídas em plantas e animais, bem como em microrganismos. No entanto, as lipases comercialmente mais úteis são de origem microbiana, principalmente bactérias, leveduras e fungos. (LAFUENTE, 2010. VAKHLU, 2006)

Inúmeros microrganismos são capazes de sintetizar lipases. Para encontrar novas biomoléculas, mais estáveis e seletivas é necessário realizar uma série de procedimentos, como uma triagem, entre os microrganismos produtores, utilizando testes que revelem moléculas capazes de realizar biocatálise e/ou biossíntese (SANDOVAL, MARTY, 2007).

Atualmente o método mais econômico de produzir de lipases é por microrganismos, sendo assim a forma mais viável para uma produção em larga escala, se comparada com as outras fontes (PASCOAL *et. al.*, 2018).

A utilização de fungos na produção de enzimas é um método comum, pois eles são produtores de enzimas extracelulares o que facilita a recuperação das enzimas do meio fermentativo. Além disso, os fungos são considerados proeminentes para aplicação industrial devido à sua melhor estabilidade e ampla especificidade do substrato. Outras facilidades em sua produção incluem os diversos métodos que podem ser aplicados para a produção de enzimas, com técnicas em que os microrganismos não necessitam grandes processos preparatórios para a produção, além de fácil remoção da molécula de interesse por diversos processos como filtragem e centrifugação (TREICHEL *et al.*, 2010).

Fungos filamentosos têm a propriedade de secretar grande variedade de proteínas que podem ser utilizadas em bioprocessos capazes ainda de realizar essa expressão em grande escala (RODRIGUES *et. al.* 2015). Os principais fungos utilizados nesse sentido pertencem aos gêneros *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Mucor sp.*, *Penicillium sp.*, *Rhizomucor sp.* (CHANDRA, P. *et al.*, 2020; CORTEZ *et. al.*, 2017).

Com a intenção de reduzir custos e utilização de diferentes meios de cultivo na produção de lipase, a procura por novos microrganismos e até enzimas até então não utilizadas é constante no meio científico. Com isso, fungos

filamentosos, como o *Penicillium sp.*, recebem grande atenção devido à sua versatilidade na produção de lipases com significativa atividade lipolítica.

O gênero *Penicillium* contém cerca de 150 espécies catalogadas, sendo a maioria capaz de deteriorar alimentos quando em baixas temperaturas, característica atribuída ao fato de serem resistentes às baixas temperaturas. Historicamente temos o conhecimento de que o uso desse microrganismo teve início com a produção de queijos, com um dos mais conhecidos sendo o *P. roqueforti*, utilizado na produção do famoso queijo azul (OLIVEIRA, 2010).

Existem cerca de 30 espécies conhecidas até então do gênero *Penicillium* capazes de produzir lipases com diferentes propriedades e aplicabilidades. O número de estudos das lipases deste gênero ainda são poucos, com os fungos desse gênero possuírem a capacidade não só de produzir lipases extracelulares, como também lipases ligadas ao micélio. (HECK, J. 2021).

2.2 USO DE BIOINFORMÁTICA PARA IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS GÊNICOS

A área conhecida como bioinformática, usa os conhecimentos adquiridos principalmente em biologia, ciência da computação e matemática para serem aplicados na solução de problemas biológicos. As técnicas de sequenciamento de DNA à medida que foram avançando trouxeram consigo um grande volume de dados, que foi disponibilizado aos pesquisadores. Agora com o uso de ferramentas computacionais temos a automatização de sistemas de processamento de dados com resultados de fácil compreensão (KISHI, *et al* 2012).

As plataformas de sequenciamento de ácidos nucleicos, que gerou um volume astronômico de dados (“big data”) desde sua popularização foi o início da bioinformática (PETTERSSON; LUNDEBERG; AHMADIAN, 2009). Com isso temos dados biológicos gerados de diversas maneiras, destacando-se o sequenciamento para a obtenção de sequências de ácidos nucleicos e de proteínas, e a espectrometria de massas gerando dados de proteínas, e interações gênicas ou proteicas por experimentos como duplo-híbrido de leveduras (BARH; KHAN; DAVIES, 2015).

Com a implementação de algoritmos temos uma forma de lidar com estes grandes volumes de dados, em que temos séries de instruções para execução de tarefas, como cálculos matemáticos, processamento de dados, e automação de processos (CAN, 2014). Estes algoritmos na análise de sequências nos permite a montagem e anotação de genomas, assim como a identificação de similaridades entre organismos e suas implicações evolutivas.

Com a bioinformática conseguimos realizar a integração de diversos tipos de dados biológicos. Dentre eles temos principalmente as sequências de DNA, estrutura de peptídeos, vias metabólicas e vias de sinalização. Assim conseguimos compreender melhor os processos biológicos como mudanças na expressão gênica, localização de proteínas e suas interações com genes e outras proteínas (VASSILEV *et al.*, 2005).

2.2.1 Construção de filogenia

Para a construção de filogenia utilizando a bioinformática temos diversos métodos, alguns mais custosos que outros. Tais métodos no geral se baseiam em alinhamento múltiplo de sequências. Esses métodos primeiro fazem uma estimativa aproximada de quão semelhante cada par de sequências é e usam essas informações para produzir uma árvore guia aproximada de relacionamentos entre sequências. Eles então constroem o alinhamento primeiro alinhando o par de sequências mais semelhante e adicionando progressivamente sequências relacionadas mais distantes, de acordo com a árvore guia, a esse alinhamento fixo. (KAPLI, *et al.* 2020).

Outra abordagem possível, não tão utilizada por ser computacionalmente mais exigente, é o método baseados em evolução. Este método assume um modelo evolutivo explícito de inserções e deleções e infere conjuntamente, em uma estrutura Bayesiana, tanto o alinhamento quanto a árvore relacionando as sequências. Este tipo de estatística é extremamente exigente a nível computacional para conjuntos de dados muito (LUNTER, 2005).

3 METODOLOGIA

3.1 LEVANTAMENTO DE DADOS

Para a realização buscas de sequências utilizou-se uma sequência bem descrita de um gene de uma Lipase de *Penicillium* sp. Para obtenção da proteína isca foi realizada uma busca textual no banco de dados UniProt, utilizando a palavra-chave “lipase” e filtrando por taxonomia, apenas para o gênero *Penicillium*. Com isso decidiu-se pela isca “>sp|P61870|MDLA_PENCA Monoand diacylglycerol lipase OS=*Penicillium camembertii* OX=5075”, reconhecida pelo acrônimo Pca1, presente no Quadro 1.

A decisão de utilizar determinada sequência foi devido à sua confiabilidade, sendo uma sequência já revisado e curada. Foi descrita pela primeira vez por Yamaguchi et al (1991). Utilizando a isca foi realizado um BLASTn para obter outras sequências de lipase de *Penicillium*, a partir das quais a árvore foi gerada.

A sequência de lipase acima descrita foi utilizada como isca para buscas sistemáticas nos bancos de dados NCBI e MycoCosm.

O GenBank. É um banco de dados de sequências genéticas produzido e mantido pelo NCBI (National Center of Biotechnology Information), O GenBank faz parte do International Nucleotide Sequence Database Collaboration, que compreende o DNA DataBank of Japan (DDBJ), o European Nucleotide Archive (ENA) e o GenBank no NCBI, contendo assim uma grande quantidade de informações de sequências genéticas (NCBI).

O MycoCosm é um banco de dados presente em um portal genômico chamado JGI (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm/>). O MycoCosm é um portal de genômica fúngica, desenvolvido pelo Departamento de Energia Instituto Conjunto de Genoma dos EUA para apoiar a integração, análise e disseminação de sequências genômicas de fungos, fornecendo ferramentas baseadas na web. O portal MycoCosm permite uma análise multidimensional profunda de genomas individuais e genômica comparativa eficiente de fungos, que pode ser aplicada a fungos filogeneticamente relacionados, ou àqueles que

compartilham o mesmo estilo de vida, nicho ecológico ou característica fenotípica (GRIGORIEV, 2014).

Após o levantamento de dados nos bancos supracitados foi realizada a utilização dos programas de alinhamento e análises filogenéticas, que serão apresentados a seguir.

3.2 ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS

Para a realização de análises de similaridade entre sequências é necessário utilizar ferramentas de alinhamento genético. A ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) encontra regiões de similaridade entre sequências biológicas. O programa compara sequências de nucleotídeos ou proteínas com bancos de dados de sequências e calcula a significância estatística entre elas. O BLAST pode ser usado para inferir relações funcionais e evolutivas entre sequências, assim como ajudar a identificar membros de famílias de genes. (NCBI, acesso: 20 de jun. 2022). Nesta ferramenta se tem a possibilidade de trabalhar tanto com nucleotídeos quanto com proteínas já codificadas.

Um algoritmo muito utilizado para o alinhamento de múltiplas sequencias chama-se MUSCLE. Este algoritmo é utilizado para criar vários alinhamentos de sequências de um grande número de sequências. Por este algoritmo é realizado um cálculo rápido da distância da sequência usando a contagem de k-mer, e uma função de perfil que calcula uma pontuação de expectativa de log e particionamento dependente da árvore das sequências analisadas. (EDGAR, 2004).

Outro programa de alinhamento disponível é o Clustal, disponível em diversas versões como Clustal W e Clustal Omega. Este programa infere o alinhamento de sequências de DNA ou proteínas e pode levar em conta a estrutura da proteína em formação. Seu diferencial é fornecer uma interface gráfica (KAPLI, 2020) Sua versão Clustal Omega gera alinhamento de múltiplas sequências utilizando árvores guia semeadas e técnicas de perfil de HMM (Hidden Markov Models) para gerar alinhamentos entre três ou mais sequências,

sendo capaz de alinhar até um total de 4000 sequências, sendo ainda uma ferramenta fácil de usar (EMBL-EBI, acesso: 20 de jun. 2022).

O software MEGA, (Molecular Evolutionary Genetic Analysis). Foi feito para preencher o vácuo entre o desenvolvimento e a análise de dados, sendo projetado para análise comparativa de sequências de genes homólogos de famílias multigênicas ou de diferentes espécies, com ênfase especial em inferir relações evolutivas e padrões de evolução de DNA e proteínas. Além das ferramentas para análise estatística de dados, o MEGA oferece muitas facilidades convenientes para a montagem de conjuntos de dados de sequência de arquivos ou repositórios baseados na web. Inclui ferramentas para apresentação visual dos resultados obtidos na forma de árvores filogenéticas interativas e matrizes de distância evolutiva (Kumar *et al.*, 2008).

Para esta pesquisa as sequências disponíveis de lipases de *Penicillium sp.* foram alinhadas usando o algoritmo Muscle, implementado em MEGA v.11 (Tamura *et al.*, 2021). Os parâmetros utilizados para o alinhamento foram os valores padrões do software MEGA. O valor de penalidade para abertura de gap foi de -400, com um método de clusterização UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean).

3.3 MONTAGEM DA ÁRVORE FILOGENÉTICA

O alinhamento das sequências identificadas foi realizado utilizando o algoritmo Muscle, implementado no software MEGA v.11 (Tamura *et al.*, 2021). A análise filogenética foi realizada através do método de inferência Bayesiana utilizando o software BEAST 2.5 (BOUCKAERT *et al.* 2019). Uma corrida de 20.000.000 de gerações foi realizada e as árvores formadas foram amostradas a cada 1000 gerações. O TRACER v.1.7 (RAMBAUT *et al.*, 2018) foi usado para verificar a convergência das cadeias de Monte Carlo Markov (MCMCs) e para um adequado tamanho de amostra (EES > 200), as primeiras 10% das gerações foram deletadas como burn-in. A amostra composta final foi usada para estimar a árvore de credibilidade máxima do clado com o programa TreeAnnotator que, que faz parte do pacote BEAST. O suporte estatístico para os clados foi

determinado calculando a probabilidade posterior bayesiana. As árvores foram visualizadas usando o software FigTree v.1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

3.4 ANÁLISE DE CONSERVAÇÃO GÊNICA

Para uma análise de conservação do gene nas sequências alinhadas o programa MEME foi utilizado. O MEME é um conjunto integrado de ferramentas para estudar motivos de sequência em proteínas, tanto DNA quanto RNA. Os motivos codificam muitas funções biológicas, sendo importantes no estudo das interações moleculares na célula, incluindo a regulação da expressão gênica. O MEME se encontra disponível gratuitamente para uso acadêmico em (<http://meme-suite.org>), e o código-fonte também está disponível para download e instalação local. (TIMOTHY *et al*, 2015)

3.5 DOMÍNIO TRANSMEMBRANA

Métodos confiáveis para discriminação entre proteínas de membrana e proteínas solúveis e para previsão de topologia têm aplicações importantes na análise do genoma e podem ser usados para extrair tendências globais na evolução de proteínas de membrana. Para tal a análise de proteína de membrana foi utilizada a ferramenta de TMHMM, um novo método baseado no modelo de Markov, que prevê 97% a 98% das hélices transmembrana foi utilizado. Este método pode ainda discriminar entre proteínas de membrana e proteínas solúveis com 99% de sensibilidade. A ferramenta MHMM está disponível em (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). (KROGH *et al*. 2001).

3.6 LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR

Para obter as informações de localizações subcelulares de proteínas foi utilizado o Euk-mPLoc 2.0, com acesso livre pelo link (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2/>). Esta ferramenta apresenta

informações do domínio funcional e informações evolutivas sequenciais por meio de três modos diferentes de composição de pseudoaminoácidos. Sendo assim, com o método que a ferramenta utiliza ela é capaz de trazer como resultado a localização celular da proteína, podendo localizar em 22 locais diferentes da célula.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca por sequências utilizando BLASTn gerou 19 sequências, sendo elas de 10 espécies diferentes. Descritas no Quadro 1.

Quadro 1- Códigos de depósito de sequência lipases e seus respectivos organismos

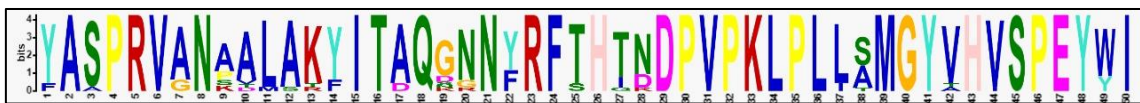
| Organismo | Código | Acrônimo |
|---------------------------------|--------------|----------|
| <i>Penicillium oxalicum</i> | XM_050109000 | Pox1 |
| <i>Penicillium oxalicum</i> | XM_050114786 | Pox2 |
| <i>Penicillium arizonense</i> | XM_022627129 | Par1 |
| <i>Penicillium solitum</i> | XM_040958558 | Pso1 |
| <i>Penicillium expansum</i> | XM_016744372 | Pex1 |
| <i>Penicillium digitatum</i> | XM_014678299 | Pdi1 |
| <i>Penicillium griseofulvum</i> | XM_040797185 | Pgr1 |
| <i>Penicillium chrysogenum</i> | XM_002568430 | Pch1 |
| <i>Penicillium roqueforti</i> | XM_039074475 | Pro1 |
| <i>Penicillium chrysogenum</i> | XM_002567666 | Pch2 |
| <i>Penicillium expansum</i> | XM_016746017 | Pex2 |
| <i>Penicillium solitum</i> | XM_040956257 | Pso2 |
| <i>Penicillium cyclopium</i> | HM135194 | Pcy1 |
| <i>Penicillium camemberti</i> | D90315 | Pca1 |
| <i>Penicillium cyclopium</i> | AF288219 | Pcy2 |
| <i>Penicillium cyclopium</i> | GU196249 | Pcy3 |
| <i>Penicillium roqueforti</i> | XM_039069150 | Pro2 |
| <i>Penicillium arizonense</i> | XM_022626832 | Par2 |

Fonte: Autores (2022).

A ferramenta MEME gerou como resultado a Figura 2, sendo a análise da região consenso da lipase Pca1 com as demais resultantes da busca por BLASTn. Analisando a Figura 2 foram encontrados domínios bem definidos,

em que a conservação dos aminoácidos que compõem o domínio conservado Lipase é apresentada. Para compreender melhor, a altura das letras (aminoácidos) demonstra o percentual que o aminoácido é conservado nas diferentes sequencias de lipase. De tal forma, a altura máxima demonstra que 100% das sequências possuem determinado aminoácido na posição demarcada.

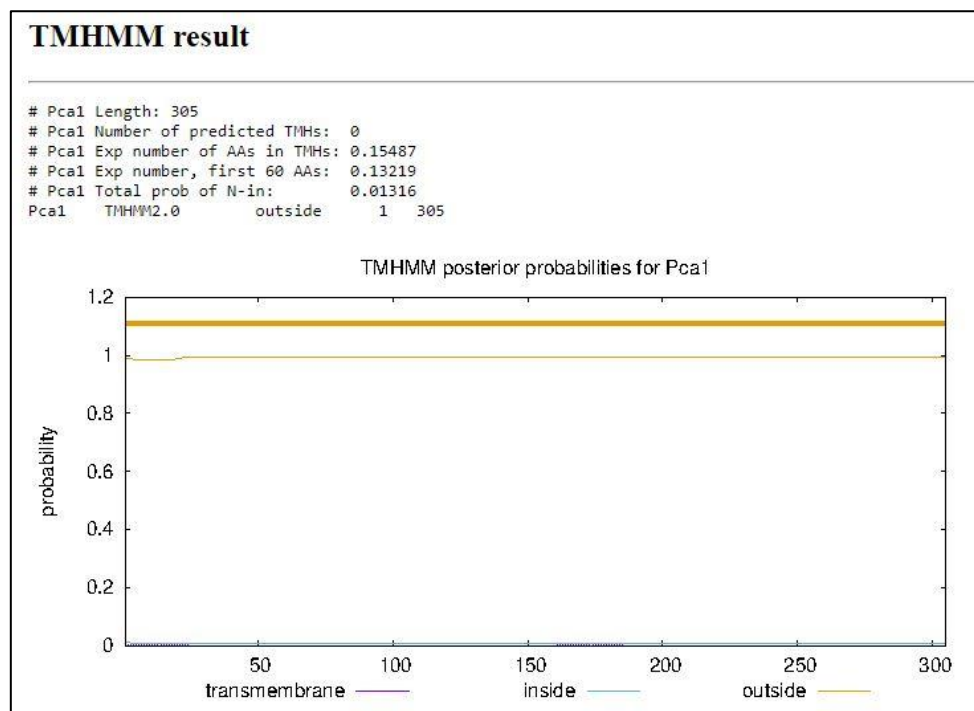
Figura 2- resultado MEME. Conservação da sequência de aminoácidos que compõem o domínio funcional de lipases



Fonte: Autores (2022)

A Figura 3 demonstra que não há predição de domínios transmembrana nas proteínas lipases analisadas, indicando que estas sejam proteínas solúveis.

Figura 3 - resultado TMHMM para predição de domínio



Fonte: Autores (2022).

Análises de localização subcelular indicaram que as proteínas lipases são direcionadas ao meio extracelular, sendo excretadas da célula para executar suas funções (Figura 4).

Figura 4 - resultado Euk-mPLOC 2.0 de predição local da proteína na célula

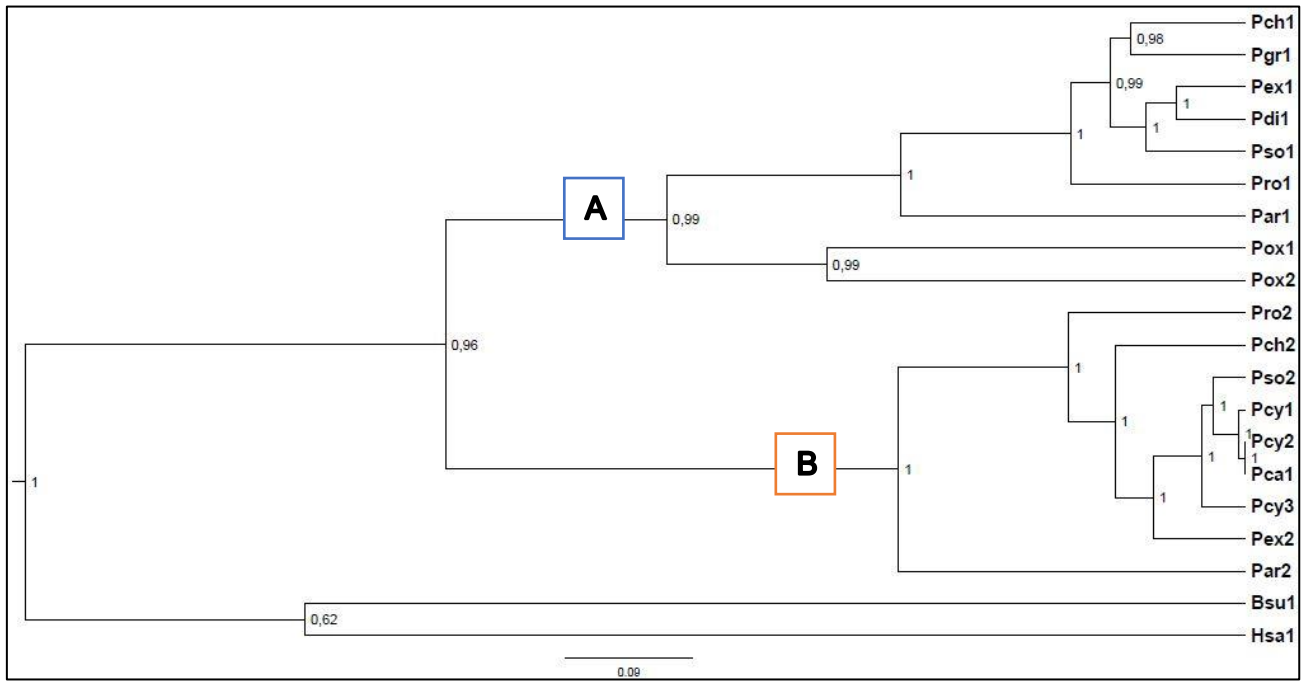
| ----- Euk-mPLOC 2.0 Computation Result ----- | |
|--|-----------------------|
| Query protein | Predicted location(s) |
| Pca1 | Extracell. |

Fonte: Autores (2022)

As sequências obtidas através da busca com BLASTn foram utilizadas em uma reconstrução filogenética das relações entre elas. A árvore gerada é apresentada na Figura 5.

A árvore resultante contém uma separação entre três grupos. Para esta análise foram adicionadas duas proteínas como grupos externos: uma lipase de *Homo sapiens*, (Hsa1) e uma lipase da bactéria *Bacillus subtilis* (Bsu1). Como resultado obtido temos que realmente há grande semelhança entre as lipases de *Penicillium* e pouca semelhança com as lipases de outros organismos, demonstrando a ancestralidade em comum da lipase no gênero *Penicillium*.

Figura 5 - árvore filogenética



Fonte: Autores (2022)

CONCLUSÃO

Análises in sílico demonstraram que as lipases de *Penicillium* são excretadas da célula, apresentando alto grau de conservação em seu domínio funcional.

Os resultados obtidos acerca da estrutura da lipase, que demonstraram uma estrutura hidrofílica e de atividade extracelular estão de acordo com as pesquisas de KHAN, 2017 e de YADAV, 1998.

As análises filogenéticas demonstram a separação das lipases em dois grupos filogenéticos apresentados como A e B na Figura 5. Observou-se que alguns organismos contêm lipases nos dois grupos principais, como é o caso do *Penicillium chrysogenum* e do *Penicillium roqueforti*, indicando que divergência das proteínas lipases nestas espécies ocorreu antes da divergência com demais espécies do gênero.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. F.; TAUK-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Acid Lipase from *Candida viswanathii*: Production, Biochemical Properties, and Potential Application. **BioMed Research International**, p. 1-10, 2013.
- BARH, D.; KHAN, M. S.; DAVIES, E. **PlantOmics: The Omics of Plant Science**. [s.l.] Springer India, 2015.
- BENJAMIN, S.; PANDEY, A. **Candida rugosa Lipases: Molecular Biology and Versatility in Biotechnology**. *Yeast*, 14, 1069–1087, 1998.
- BOUCKAERT, R.; VAUGHAN, T.G.; BARIDO-SOTTANI, J.; DUCHÊNE, S.; FOURMENT, M.; GAVRYUSHKINA, A.; *et al.* **BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis**. *PLoS computational biology*, 15(4), 2019.
- CAN, T. Introduction to Bioinformatics. In: YOUSEF, M.; ALLMER, J. **MirNomics: MicroRNA Biology and Computational Analysis**. Totowa, NJ: Humana Press, 2014. p. 51–71.
- CORTEZ, D. V.; CASTRO, H. F. de; ANDRADE, G. S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**, v. 40, n. 1, p. 85 – 96, 2017.
- EDGAR, R. Muscle: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC Bioinformatics**, 5, 113, 2004.
- GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. Screening and production of lipase from fungal organisms. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.14, p. 241-253, 2018.
- GRIGORIEV, I.V. *et al.* **MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes**. *Nucleic Acids Research*, Volume 42, Issue D1pg. D699–D704. 2014.
- GRUMACH, A. S.; FERRARONI, N. R. O papel da penicilina na medicina moderna. **DST – J bras Doenças Sex Transm**, 18, 1, 7-13, 2006.
- GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. *Appl. Microbiol.* **Biotechnol.** 64, 763–781, 2004.
- GUPTA, R.; KUMARI, A.; SYAL, P.; SINGH, Y. Molecular and Functional Diversity of Yeast and Fungal Lipases: Their Role in Biotechnology and Cellular Physiology. **Prog. Lipid Res.**, 57, 40–54, 2015.
- HAMLIN, P.F.; WALES, D.S.; SUGAR, B.F. **Extracellular Enzymes of Penicillium**. In: PEBERDY, J.F. (Ed.). *Biotechnology Handbooks V. 1: Penicillium and Acremonium*. Plenum press, New York, 1987.p. 260–265.
- HECK, J. **Uma abordagem sobre a produção de lipases do gênero Penicillium e suas potenciais aplicações biotecnológicas**. Dissertação

(Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Cascavél PR, 2021.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Curr. Opin. **Biotechnol.** 13, 390–397, 2002.

JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial Biocatalysis: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 315 – 351, 1999.

KAPLI, P.; YANG, Z.; TELFORD, M.J. Phylogenetic tree building in the genomic age. **Nat Rev Genet**, 21, 428–444, 2020.

KISHI, L. T. et al. **Bioinformática**. Biologia Molecular pg 273-312. São Paulo, EDUFPI, 2012

KUMAR, S.; NEI, M.; DUDLEY, J.; TAMURA, K.. **MEGA: biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences**. Brief Bioinformatics, Vol. 9, No. 4, pg.299–306. 2008.

LAFUENTE, R. F. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.62, 197-212, 2010.

LEISTNER, L. **Mould-fermented foods: Recent developments**. Food Biotechnol., 4, 433–441, 1990.

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

LUNTER, G.; MIKLÓS, I.; DRUMMOND, A.; JENSEN, J. L.; HEIN, J. Bayesian coestimation of phylogeny and sequence alignment. **BMC Bioinformatics**, 6, 83, 2005.

MONTEIRO, V.N.; SILVA, R.N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, 3, 9-23, 2009.

MOURA, C. V. R.; NUNES, A. S. L.; MOITA NETO, J. M.; NERES, H. L. S.; CARVALHO, L. M. G.; MOURA, E. M. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.23, 2012.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. National Library Of Medicine. **Visão geral do GenBank**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> . Acesso: 20/06/2022.

OLIVEIRA, A. C. D.; VARGAS, J. V. C.; RODRIGUES, M. L. F.; MARIANO, A. B. Utilização de resíduos da agroindústria para a produção de enzimas lipolíticas por fermentação submersa. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.15, n. 1, p. 19 – 26, 2013.

OLIVEIRA, F. C. **Proteção de lípases por *Penicillium roquefort* e sua aplicação na obtenção de aroma de queijo**. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade de São Paulo, 2010.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93 – 99, 2006.

- PASCOAL, A.; ESTEVINHO, L. M.; MARTINS, I. M.; CHOUPINA, A. B. Novel Sources and Functions of Microbial Lipases and Their Role in Infection Mechanisms. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 104, p. 1 – 28, 2018.
- PETTERSSON, E.; LUNDEBERG, J.; AHMADIAN, A. Generations of sequencing technologies. **Genomics**, v. 93, n. 2, p. 105–111, 2009.
- PRECIADO, A.; PEIMBERT, M.; MERINO, E. Genome Sequence Databases: Types of Data and Bioinformatic Tools. **Encyclopedia of Microbiology**, 211-236, 2009.
- RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. Lipase Catalyzed Ester Synthesis for Food Processing Industries. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 52, n. 1, p. 207 – 219, 2009.
- RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A.J.; XIE, D.; BAELE, G.; SUCHARD, M.A.. **Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7**. Systematic Biology, 2018.
- RAVEENDRAN, S. *et al.* Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. **Food Technol. Biotechnol**, Croatia, v. 56, n. 1, p. 16-30, jan. 2018.
- RODRIGUES, M. L. F.; SILVA, E. A. da; BROBA, C. E.; OLIVEIRA, A. C. D.; KRUGER, C.; RAIMUNDO, R. W.; SILVA, L.P.; RODRIGUES, M. L. F.; STUANI, B. T. Produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo endofítico *Penicillium* sp. isolado das folhas de *Ricinus communis* L.1. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 4, p. 129 – 145, 2015.
- SANDOVAL, G.; MARTY, A. Screening methods for synthetic activity of lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 3, p. 390 – 393, 2007.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. **Biotechnol. Adv.** 19, 627–662, 2001.
- SINGH, A.K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of Fungal Lipase: A Review. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 166, 486–520, 2012.
- SONG, L.; WU, S.; TSANG, A.. Phylogenetic Analysis of Protein Family. **Methods in Molecular Biology**, vol. 1775, 2018.
- STATALIGN. **Um pacote de software extensível para estimativa Bayesiana conjunta de alinhamentos e árvores evolutivas**. Disponível em: <https://statalign.github.io/index.html>. Acesso: 20/06/2022.
- TAMURA, K; STECHER, G; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. **Molecular Biology and Evolution** 38:3022-3027, 2021.
- TREICHEL, H. *et al.* A review on Microbial Lipases Production. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, 182-196, 2010.
- VAKHLU, J. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, 2006.

VASSILEV, D. *et al.* Application of bioinformatics in plant breeding. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 19, n. October, p. 139–152, 2005.

VESCOVI, V. **Extração, purificação e imobilização de lipases vegetais destinadas à síntese de biodiesel e ésteres**. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas e da Terra) Universidade Federal de São Carlos, 2012.

WOLSKI, E. *et al.* Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium* sp. in solid state and submerged fermentation: A comparative study. **LWT - Food Science and Technology**, 42, 1557–1560, 2009.

WOLSKI, E. *et al.* Response Surface Methodology for Optimization of Lipase Production by an Immobilized Newly Isolated *Penicillium* sp. **Ind. Eng. Chem. Res.** 47 n.23, 9651–9657, 2008.

CHOU, K-C; SHEN, H-B. A New Method for Predicting the Subcellular Localization of Eukaryotic Proteins with Both Single and Multiple **Sites: Euk-mPloc 2.0, PLoS ONE**, 2010, 5: e9931

KROGH, A; LARSSON, G; HEJINE, V; HEJINE, L; SONNHAMMER E. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. **Journal of Molecular Biology**, 305(3):567-580, January 2001.

BAILEY, T; JOHNSON, J; GRANT, C; NOBLE, W; The MEME Suite. **Nucleic Acids Research**, Volume 43, Issue W1, 1 July 2015, Pages W39–W49, <https://doi.org/10.1093/nar/gkv416>.

YAMAGUCHI, S; MASE, T; TAKEUCHI, K. Cloning and structure of the mono- and diacylglycerol lipase-encoding gene from *Penicillium camembertii* U-150. **Gene**. 1991 Jul 15; 103(1):61-7. doi: 10.1016/0378-1119(91)90391-n. PMID: 1879699.

LOESER, B. IDENTIFICAÇÃO MOLECULA DE ISOLADO FUNGICO AMBIENTAL PRODUTOR DE LIPASE. **Repositório UERGS**, 2022, <https://repositorio.uergs.edu.br/xmlui/handle/123456789/2338>.

YADAV, R; SAXENA, R; GUPTA, R.; DAVIDSON S. (1998). Lipase production by *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Folia Microbiologica**, 43(4), 373–378. doi:10.1007/bf02818576