



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA E CIÊNCIAS SOCIAIS –
DTCS - CAMPUS III - JUAZEIRO
COLEGIADO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E
BIOTECNOLOGIA**

Identificação *in silico* de espécie do fungo *Aspergillus*
produtora de Lipase

CINDY THAYNÁ DA SILVA PEREIRA ROCHA

**JUAZEIRO-BA
2024**

CINDY THAYNÁ DA SILVA PEREIRA ROCHA

**Identificação *in silico* de espécie do fungo *Aspergillus*
produtora de Lipase**

Trabalho de conclusão de curso a ser apresentado ao Colegiado de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade do Estado da Bahia – UNEB Campus III, como requisito parcial para avaliação da disciplina de Trabalho de Conclusão do Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Igor Costa de Amorim

Coorientadora: Prof^a Dra. Gabriela Macêdo Aretakis de Almeida.

**JUAZEIRO-BA
2024**

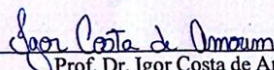
CINDY THAYNÁ DA SILVA PEREIRA ROCHA

**Identificação *in silico* de espécie do fungo
Aspergillus produtora de Lipase**

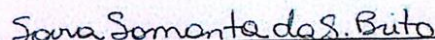
Trabalho de conclusão de curso aprovado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, pelo Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, Campus III, da Universidade do Estado da Bahia.

Aprovado em 10/12/2024

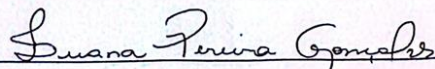
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Igor Costa de Amorim
(Presidente/Orientador)
Universidade do Estado da Bahia – UNEB



Profª Dra. Sara Samanta Brito
Universidade do Estado da Bahia – UNEB



Profª Dra Luana Pereira Gonçalves
Universidade do Estado da Bahia – UNEB

JUAZEIRO-BA

2024

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVO GERAL	13
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
3.1 Lipases: Características gerais, aplicações e espécies produtoras	13
2.2 Uso de bioinformática para identificação e caracterização de produtos gênicos	15
3.METODOLOGIA	17
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	4
5. CONCLUSÃO	7
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	8

DEDICATÓRIA

**Ao meu filho, José Luiz,
você é minha razão de viver e
motivação diária que me
impulsiona a ser alguém melhor.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu Deus, por ter me sustentado até aqui e por todos as pessoas maravilhosas que Ele colocou em minha trajetória acadêmica.

Agradeço aos meus avós maternos, que são meus pais de criação e coração, por tudo que fizeram por mim desde a infância até os dias de hoje, por acreditarem em meu potencial, e investirem tudo o que tinham em minha educação, a vocês Nilmar Batista e Cicera Maria, minha eterna gratidão, sem vocês eu nada seria.

Agradeço ao meu esposo, por todo apoio, incentivo e compreensão durante esses anos de graduação, seu apoio foi essencial para que eu chegasse até aqui.

Agradeço a minha mãe, meu pai, meu tio Ricardo, que foram pessoas que sempre me incentivaram a estudar, e sempre mesmo de forma indireta sempre me ajudaram de alguma forma.

Agradeço ao meu Orientador, Prof Dr Igor Costa de Amorim por toda dedicação, empenho, compreensão, incentivo e paciência durante todo o trabalho. Minha sincera gratidão, por tudo.

Agradeço a minha coorientadora Professora Dra Gabriela Aretakis por toda contribuição ao trabalho, dando suporte sempre que preciso.

Agradeço a Gabriela Rocha, uma colega a quem sou grata por toda ajuda e por compartilhar comigo seus conhecimentos da área.

Agradeço as minhas amigas de graduação Graziela Menezes e Camila Goes, por sempre caminharem lado a lado durante toda a trajetória acadêmica. Agradeço também as minhas amigas Maryanna Soares e Emilly Luany, uma amizade que começou nesta reta final mas que fez toda a diferença, obrigada meninas por todo apoio.

RESUMO

As lipases são enzimas versáteis, amplamente utilizadas em variados setores industriais, devido à sua capacidade de catalisar reações de hidrólise e síntese de lipídeos. Embora sejam produzidas por diversos táxons, os microrganismos (especialmente os fungos) destacam-se como principais fontes de lipases, graças à alta produtividade, adaptabilidade e liberação de enzimas extracelulares, facilitando os processos produtivos. Nos últimos anos, a bioinformática vem contribuindo para a descobertas de novos organismos produtores de metabólitos de interesse (incluído lipases), promovendo diversas inovações. Dessa forma, o trabalho teve como objetivo identificar uma nova espécie de fungo produtora de lipase no gênero *Aspergillus*, utilizando ferramentas de bioinformática. Inicialmente foi feito um levantamento das espécies produtoras de lipases do gênero *Aspergillus* no NCBI e de espécies desse gênero com dados brutos de sequenciamento no SRA. Com base nessas informações e em critérios pré-estabelecidos, foi selecionada a espécie *Aspergillus Spinulosporus* para analisar se ela é produtora de lipase. Para isso, foi realizado um tBLASTn utilizando os dados brutos de sequenciamento genômico da espécie (disponível no banco SRA) e sequências proteicas de lipases de espécies do gênero *Aspergillus*. Os resultados indicam que a espécie é produtora de diferentes tipos de lipases, incluindo: hidrolases, esterases, carboxilesteras e fosfolipases. Revelaram ainda, que a espécie deve secretar diversas enzimas para o meio extracelular, tornando-a uma espécie candidata para a produção de lipases comerciais. O estudo traz um conhecimento adicional para aqueles que desejam trabalhar com lipases de *Aspergillus*, mostrando que existem outras espécies do gênero a serem exploradas.

Palavras-chave: Bioinformática, hidrolases, Análises genômicas.

ABSTRACT

Lipases are versatile enzymes, widely used in various industrial sectors, due to their ability to catalyze lipid hydrolysis and synthesis reactions. Although they are produced by several taxa, microorganisms (especially fungi) stand out as the main sources of lipases, due to their high productivity, adaptability and release of extracellular enzymes, facilitating production processes. In recent years, bioinformatics has contributed to the discovery of new organisms that produce metabolites of interest (including lipases), promoting several innovations. Thus, the study aimed to identify a new lipase-producing fungus species in the genus *Aspergillus*, using bioinformatics tools. Initially, a survey of lipase-producing species of the genus *Aspergillus* was carried out in the NCBI and of species of this genus with raw sequencing data in the SRA. Based on this information and pre-established criteria, the species *Aspergillus Spinulosporus* was selected to analyze whether it is a lipase producer. For this purpose, a tBLASTn was performed using the raw genome sequencing data of the species (available in the SRA database) and protein sequences of lipases from species of the genus *Aspergillus*. The results indicate that the species produces different types of lipases, including: hydrolases, esterases, carboxylesteres and phospholipases. They also revealed that the species must secrete several enzymes into the extracellular medium, making it a candidate species for the production of commercial lipases. The study provides additional knowledge for those who wish to work with *Aspergillus* lipases, showing that there are other species of the genus to be explored.

Keywords: Bioinformatics, hydrolases, Genomic analyses.

1. INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas que desempenham um importante papel no metabolismo lipídico, atuando na síntese, degradação e modificação estrutural de moléculas lipídicas, incluindo reações como transesterificação, esterificação e amonólise (Ning, Zong, 2010). Essa capacidade catalítica torna-se de grande interesse em diversas áreas industriais, como na indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética, de produtos de limpeza, na produção de biocombustíveis, bem como na biorremediação ambiental (Soni, 2021). Quando comparadas aos catalisadores químicos, as lipases possuem algumas propriedades vantajosas, como a alta especificidade ao substrato e, em alguns casos, maior estabilidade em diferentes condições de pH, temperatura e solventes orgânicos (Kumar; Chauhan, 2021). Além disso, as lipases também possuem outras características interessantes, como sua capacidade de atuar em interfaces hidrofóbicas e hidrofílicas, tornando-a uma enzima valiosa para a exploração biotecnológica que atua em diversos substratos (Kumar & Chaun, 2021; Goswami, 2021).

Devido a sua importância industrial, o mercado tem demandado cada vez mais o uso de lipases comerciais. Nesse contexto, os microrganismos, em particular os fungos, destacam-se como fontes promissoras para a produção de lipases comerciais, devido à sua alta produtividade enzimática e à capacidade de crescer em distintos substratos e condições ambientais (Ezema et al., 2022). Dentre os microrganismos mais explorados para essa produção, destacam-se os fungos do gênero *Aspergillus*, que possuem a capacidade de produzir várias enzimas extracelulares, simplificando os métodos de obtenção e purificação dessas enzimas (Nie et al., 2024). Diversas espécies de *Aspergillus* já foram descritas como excelentes produtoras de lipases, no entanto, esse gênero possui ainda um número significativo de espécies não exploradas quanto ao seu potencial enzimático, que podem apresentar características relevantes comercialmente (Chandra et al., 2021; Ezema et al., 2022).

Nos últimos anos, a bioinformática tem se tornado uma ferramenta essencial para a predição e anotação funcional de genes, a partir de genomas sequenciados. Com base nisso, as análises *in silico* são capazes de identificar novas espécies produtoras e tipos de lipases, ampliando a disponibilidade dessas enzimas para o uso comercial. Essas análises aceleraram descobertas científicas importantes, uma vez que são capazes de fornecer informações relevantes com base em bancos de dados, suprimindo etapas de experimentação laboratorial, e tornando assim o processo mais eficiente e menos

custoso. Além disso, as análises *in silico* permitem identificar características estruturais e funcionais das enzimas, como a estabilidade em altas temperaturas e em meios alcalinos, além de mutações que podem aumentar a atividade enzimática (Singab et al., 2022). Essas características são cruciais para determinar as possíveis aplicações industriais dessas enzimas (Martinez, et al. 2020). Diante desse cenário, o presente trabalho teve como objetivo identificar espécies produtoras de lipases nos fungos do gênero *Aspergillus*, que ainda não tenha sido descrita na literatura (como produtora de lipase) com base em uma análise *in silico*, visando sua aplicação biotecnológica.

2. OBJETIVO GERAL

Identificar espécies produtoras de lipases nos fungos do gênero *Aspergillus*, que ainda não tenha sido descrita na literatura (como produtora de lipase) com base em uma análise *in silico*, visando sua aplicação biotecnológica.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Lipases: Características gerais, aplicações e espécies produtoras

As lipases são enzimas classificadas pelo código EC 3.1.1.3 da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB). Essas enzimas são responsáveis pela quebra de triacilgliceróis em ácidos graxos livres e glicerol, um processo conhecido como hidrólise de ésteres de glicerol. Além disso, podem realizar outras reações catalíticas em ambientes livres de água, como esterificação, interesterificação e transesterificação (Ollis et al., 1992; Belle et al., 2007).

As lipases possuem estruturas complexas, divididas em diversas regiões e domínios proteicos, que podem variar dependendo da enzima. Mas no geral, elas possuem as seguintes estruturas: (1) Domínio catalítico, que contém aminoácidos essenciais para a atividade enzimática, como serina, histidina e ácido aspártico; (2) Domínio de ligação ao substrato, que garante a especificidade e ligação adequada ao substrato; (3) Região responsável pelo dobramento e pela manutenção da estrutura tridimensional da enzima; (4) Região reguladora, que altera a atividade enzimática em resposta a presença de inibidores e/ou ativadores; (5) Domínio de anexação, que possibilita a sua ligação a diferentes superfícies (ex. membranas celulares), sendo crucial em sistemas biológicos (Casas, 2018). Além disso, domínios característicos

como GDSL esterase, Patatin-like phospholipase, PLAT/LH2, SGNH hydrolases e Abhydro_lipase (Ramanadham et al, 2015).

Considerando a sua versatilidade e alta especificidade, as lipases têm se mostrado valiosas em diversos setores industriais, como na indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética, de produtos de limpeza e na produção de biocombustíveis (Reetz et al., 2006). Na indústria farmacêutica, essas enzimas são importantes na síntese de compostos quirais, essenciais na produção de fármacos com alta pureza enantiomérica (Lafuente, 2010). Além disso, são usadas em terapias de reposição enzimática, para tratar distúrbios digestivos, como a insuficiência pancreática exócrina (Watson, 2015). Na indústria de produtos de limpeza, lipases são utilizadas na formulação de detergentes, tornando o processo de lavagem mais eficiente e reduzindo o consumo de energia (Priyanka et al., 2019). Nos últimos anos, as lipases têm sido exploradas também na produção de biodiesel, oferecendo vantagens sobre os processos químicos tradicionais, como menor produção de resíduos e operação em condições mais brandas, o que o torna ambientalmente mais atrativo (Filho; Silva; Guidini, 2019).

As lipases estão amplamente distribuídas em plantas, animais e microrganismos, sendo que, do ponto de vista comercial, as de origem microbiana, especialmente de bactérias e fungos, apresentam o maior potencial de aplicação (Hasan et al., 2006). Comparado com outras fontes, a produção de enzimas em microrganismos é o método mais econômico e viável para fabricação em larga escala (Vakhlu, 2006; Pascoal et al., 2018). Entre os microrganismos, os fungos são amplamente empregados devido à sua capacidade de secretar enzimas extracelulares, diretamente no meio de cultivo, simplificando o processo de uso direto do fungo ou recuperação e purificação dessas enzimas. Essas características, somadas à facilidade de manipulação em processos fermentativos e à sua alta capacidade produtiva, fazem dos fungos uma escolha promissora e eficiente para a biotecnologia industrial, especialmente na produção de enzimas em larga escala (Pascoal et al., 2018; Rodrigues et al., 2015). Dessa forma, a identificação de novas espécies de fungos produtoras de lipases é fundamental para o avanço de diferentes setores industriais. Os principais fungos utilizados nesse sentido pertencem aos gêneros *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Miucor* sp., *Penicillium* sp., *Rhizomucor* sp. (Chandra et al., 2020; Cortez et. al., 2017).

O gênero *Aspergillus* possui espécies amplamente reconhecidos pela capacidade de produzir enzimas extracelulares, incluindo as lipases. Além disso, as espécies deste

gênero possuem a capacidade de adaptação a diferentes tipos de substratos e condições ambientais, o que as torna uma fonte promissora na produção de biocatalisadores (Klich, 2002). Dentre as espécies mais estudadas, *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* se destacam por sua versatilidade e eficiência em processos biotecnológicos, mas o gênero ainda inclui muitas espécies inexploradas quanto ao seu potencial enzimático, especialmente para a produção de lipases (Nie et al., 2024). Essa lacuna oferece oportunidades para estudos que buscam identificar e caracterizar novas espécies produtoras de lipases ou de tipos de lipases para o uso industrial.

Com a intenção de reduzir custos e descobrir novos tipos de enzimas, a procura por novos microrganismos produtores de lipases é constante no meio científico. Essas pesquisas permitem selecionar espécies/cepas promissoras para aplicações biotecnológicas e industriais. No entanto, esse processo pode ser demorado e oneroso, dependendo dos métodos e experimentos utilizados. Como alternativa, o uso de ferramentas *in silico*, por bioinformática, emerge como uma alternativa eficiente, rápida e de baixo custo para triar e selecionar possíveis espécies produtora de lipase (Ovando et al., 2020).

2.2 Uso de bioinformática para identificação e caracterização de produtos gênicos

A bioinformática é um ramo científico que consiste na convergência da biologia, ciência da computação e estatística, permitindo a obtenção de informações integradas de dados biológicos por meio da análise massiva de bancos de dados. Esse campo tornou-se essencial para a biologia molecular e genômica moderna, especialmente para a interpretação de sequências genômicas de diversos organismos. Com o advento das tecnologias de sequenciamento de nova geração, tornou-se possível acessar uma quantidade sem precedentes de informações genéticas, muitas vezes compartilhadas nos bancos de dados biológicos. No entanto, a identificação e caracterização eficazes dos produtos gênicos dependem de ferramentas e técnicas bioinformáticas sofisticadas (McKee et al., 2021).

Os bancos de dados públicos biológicos, como o National Center for Biotechnology Information (NCBI) e seu repositório de dados brutos, o Sequence Read Archive (SRA), são essenciais para o avanço científico. Disponibilizando sequências genéticas gratuitamente, eles permitem que pesquisadores em todo o mundo analisem e identifiquem novos produtos gênicos, como enzimas, usando apenas ferramentas de

bioinformática e expertise técnica, sem custos adicionais. Essa acessibilidade promove inovação à ciência, viabilizando aplicações biotecnológicas a partir de dados já existentes.

A bioinformática pode ser utilizada como uma importante ferramenta para identificar genes codificadores de proteínas em genomas recém-sequenciados, através da busca por quadros de leitura abertos (Open Reading Frames, ou ORFs) e a aplicação de algoritmos de predição gênica. Esses algoritmos inferem a presença de genes a partir de características como códons de iniciação e terminação, composição GC e padrões conservados, conhecidos como motivos e domínios, sendo esse último geralmente verificado com a ferramenta *Conserved Domain Search* (CD Search). Além disso, ferramentas como o BLAST e o HMMER também são amplamente utilizadas para comparar sequências com bancos de dados conhecidos, permitindo a inferência de possíveis produtos gênicos com base na similaridade das sequências (Krusche et al., 2019; Koboldt et al., 2020).

A análise estrutural das proteínas é outro aspecto essencial na caracterização de produtos gênicos, pois a estrutura de uma proteína está intrinsecamente ligada à sua função. Para tanto, métodos de modelagem por homologia e de predição de estruturas secundárias e terciárias são amplamente empregados. Ferramentas como SWISS-MODEL possibilitam a construção de modelos tridimensionais (3D) das proteínas (Marchesi & Ravel, 2015; Schloss et al., 2009).

O uso das informações obtidas por meio de ferramentas da bioinformática, utilizadas para identificação e caracterização de produtos gênicos, tem implicações práticas significativas. Na área da saúde, por exemplo, a bioinformática contribui para a medicina personalizada, permitindo a identificação de mutações genéticas associadas a doenças (Kameoka et al., 2019; Moossavi et al., 2020). Na agronomia, a bioinformática auxilia na identificação de genes associados a características de interesse comercial, como a resistência a pragas e a tolerância ao estresse. Além disso, na biotecnologia, a caracterização de produtos gênicos através da bioinformática permite ainda a descoberta de novas enzimas industriais, de novas espécies produtoras de enzimas e/ou biofármacos, promovendo avanços significativos em diversos setores da indústria (Ettinger; Laura; Jonathan, 2021).

3.METODOLOGIA

3.1 Levantamento de dados

Para a realização deste estudo, foi efetuado um levantamento das espécies de fungos do gênero *Aspergillus* produtoras de lipase no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), o maior banco de dados genético disponível. Para isso, utilizou-se a ferramenta de busca no banco de nucleotídeos, aplicando os descritores “*Aspergillus* AND Lipase”. Para cada espécie identificada, foram anotados um de seus códigos de acesso no NCBI (referente à primeira lipase identificada da espécie). Em seguida, foi realizada uma consulta no banco de dados Taxonomy do NCBI, para determinar o número total de espécies cadastradas do gênero *Aspergillus*. Com esses dados, foi possível calcular a porcentagem de espécies de *Aspergillus* conhecidas por produzir lipases em relação ao total de espécies registradas.

Posteriormente, foi realizado o levantamento das espécies de *Aspergillus* que possuem dados brutos de sequenciamento genômico, disponíveis no banco de dados de *Short Read Archive* (SRA) do NCBI. O objetivo desta etapa foi cruzar as informações obtidas anteriormente, para identificar espécies de *Aspergillus* com sequências brutas de sequenciamento, mas que ainda não tinham suas lipases identificadas. Buscando ampliar o conhecimento sobre novas fontes de lipases, foi selecionada uma espécie para análise, com base nos seguintes critérios de inclusão: Dados de sequenciamento obtidos na plataforma Illumina, método de sequenciamento PAIRED, arquivo FASTQ disponível, dados brutos de sequenciamento acima de 3Gb e que a espécie não seja provavelmente patogênica. A primeira espécie que apresentou todos esses critérios foi selecionada para a análise, sendo ela a *Aspergillus spinulosporus*.

3.2 Identificação de espécie de *Aspergillus* produtora de lipase

Nesse trabalho, o Galaxy Europe foi utilizado como servidor para processamento e análise da maioria de seus dados. Os dados brutos de sequenciamento genômico da espécie *Aspergillus spinulosporus*, disponível no banco SRA do NCBI (código de acesso SRX11807843), foi carregado diretamente no servidor galaxy europeu com o auxílio da ferramenta Download and Extract Reads in FASTQ. Em seguida, foi realizada uma análise de qualidade inicial das leituras (dados brutos), utilizando a

ferramenta FASTQC. As leituras de sequenciamento foram tratadas com a ferramenta TRIMMOMATIC, que removeu bases de baixa qualidade (com valor menor a Q20) e adaptadores, assegurando a utilização de dados mais confiáveis para as etapas subsequentes. Posteriormente, a ferramenta FASTQ Interlacer foi aplicada para parear as leituras em formato PAIRED. Após o tratamento, o arquivo no formato FASTQ foi convertido para o formato FASTA, utilizando a ferramenta *Fastq to Fasta Converter*.

De forma independente, foi construído um banco de dados local contendo sequências proteicas de lipases (com 87 sequências) de todas as espécies de *Aspergillus* produtora dessa enzima (segundo o levantamento no NCBI, como será mostrado nos resultados) (Quadro 1). Essas sequências foram usadas como 'semente' para identificar genes de lipase nos dados brutos de sequenciamento do genoma de *Aspergillus spinulosporus* (arquivo fasta descrito anteriormente), utilizando a ferramenta tBLASTn no Galaxy Europe. Essa análise permitiu identificar possíveis genes produtores de lipases no genoma de *A. spinulosporus*. As sequências desses genes (obtidas no tBLASTn) foram submetidas a montagem de genoma, com auxílio da ferramenta CAP 3 e, as sequências resultantes foram analisadas na ferramenta DeepTMHMM, que é um programa especializado na predição de regiões transmembranares (TM) e sinais peptídicos em proteínas. Além disso, foram analisadas no servidor *NCBI Conserved Domain Search (CD-Search)*, para identificar os domínios enzimáticos de lipase.

Quadro 1: Espécies do gênero *Aspergillus* produtoras de lipase, segundo o levantamento no NCBI.

N°	Espécies de <i>Aspergillus</i>	N° de acesso no NCBI	N°	Espécies de <i>Aspergillus</i>	N° de acesso no NCBI	N°	Espécies de <i>Aspergillus</i>	N° de acesso no NCBI
1	<i>A. aculeatinus</i>	XM_025645716.1	30	<i>A. heteromorphus</i>	XM_025544486.1	59	<i>A. pseudocaelatus</i>	KAE8417546.1
2	<i>A. awamori</i>	EF524197.1	31	<i>A. homomorphus</i>	XM_025698741.1	60	<i>A. parasiticus</i>	AF404488.1
3	<i>A. affinis</i>	XM_053101134.1	32	<i>A. hancockii</i>	MBFL02000011.1	61	<i>A. pseudotamarii</i>	XM_032063549.1
4	<i>A. arachidicola</i>	NEXV01000020.1	33	<i>A. ibericus</i>	XM_025714550.1	62	<i>A. pseudoviridnutans</i>	XM_043303555.1
5	<i>A. alliaceus</i>	XM_032039637.1	34	<i>A. indologenus</i>	PYI33292.1	63	<i>A. puulaauensis</i>	XP_041550304.1
6	<i>A. albertensis</i>	XM_032045168.1	35	<i>A. japonicus</i>	XM_025668583.1	64	<i>A. phoenicis</i>	RDK39393.1
7	<i>A. avenaceus</i>	ML742072.1	36	<i>A. kawachii</i>	DF126462.1	65	<i>A. pachycristatus</i>	QFQ50478.1
8	<i>A. brunneoviolaceus</i>	XM_025589964.1	37	<i>A. luchuensis</i>	XM_041688552.1	66	<i>A. piperis</i>	XM_025661280.1
9	<i>A. bombycis</i>	XM_022538046.1	38	<i>A. lentulus</i>	XM_033555615.1	67	<i>A. ruber</i>	XM_040779801.1
10	<i>A. bertholletius</i>	ML736229.1	39	<i>A. lacticoffeatus</i>	PYH54623.1	68	<i>A. rambellii</i>	KKK24686.1
11	<i>A. brasiliensis</i>	BROR01000021.1	40	<i>A. leporis</i>	KAB8067963.1	69	<i>A. steynii</i>	XM_024849067.1
12	<i>A. caelatus</i>	XM_032072345.1	41	<i>A. minisclerotigenes</i>	KAB8278056.1	70	<i>A. sclerotioniger</i>	XM_025606280.1
13	<i>A. costaricaensis</i>	XM_025689011.1	42	<i>A. mulundensis</i>	XM_026744568.1	71	<i>A. saccharolyticus</i>	XP_025427769.1
14	<i>A. campestris</i>	XM_024836632.1	43	<i>A. melleus</i>	XM_046090533.1	72	<i>A. sclerotialis</i>	RJE20452.1
15	<i>A. candidus</i>	XM_024812330.1	44	<i>A. niger</i>	XM_025601616.1	73	<i>A. sclerotii carbonarius</i>	PYI09730.1
16	<i>A. chevalieri</i>	LC597467.1	45	<i>A. nomius</i>	XM_015546725.1	74	<i>A. sergii</i>	KAE8322827.1
17	<i>A. carlsbadensis</i>	MU628221.1	46	<i>A. neoniger</i>	XM_025620839.1	75	<i>A. thermomutatus</i>	XM_026755608.1
18	<i>A. clavatus</i>	XM_001276336.1	47	<i>A. novoparasiticus</i>	KAB8215977.1	76	<i>A. tanneri</i>	XM_033567964.1
19	<i>A. calidoustus</i>	CDMC01000005.1	48	<i>A. nomiae</i>	XP_015411255.1	77	<i>A. tamarii</i>	EF198417.1
20	<i>A. coremiiformis</i>	ML739034.1	49	<i>A. novofumigatus</i>	XM_024824626.1	78	<i>A. tubingensis</i>	XM_035506216.1
21	<i>A. cristatus</i>	ODM16538.1	50	<i>A. nidulans</i>	MF612152.1	79	<i>A. terreus</i>	KAG2411581.1
22	<i>A. eucalypticola</i>	XM_025528869.1	51	<i>A. nanangensis</i>	VCAU01000072.1	80	<i>A. transmontanensis</i>	KAE8308998.1
23	<i>A. ellipticus</i>	KZ825871.1	52	<i>A. oryzae</i>	MN399852.1	81	<i>A. taichungensis</i>	PLN83091.1
24	<i>A. egyptiacus</i>	MU628438.1	53	<i>A. ochraceoroseus</i>	KKK21465.1	82	<i>A. turcosus</i>	RLM00318.1
25	<i>A. flavus</i>	AF404489.1	54	<i>A. ochraceus</i>	PP619269.1	83	<i>A. uvarum</i>	XM_025636738.1
26	<i>A. fijiensis</i>	XM_040939579.1	55	<i>A. pseudonomiae</i>	XM_032080411.1	84	<i>A. ustus</i>	KIA76019.1
27	<i>A. fumigatus</i>	KU575864.1	56	<i>A. pseudoglaucus</i>	LC597472.1	85	<i>A. udagawae</i>	XM_043286557.1
28	<i>A. fischeri</i>	XM_001266328.1	57	<i>A. pseudonomius</i>	KAE8398733.1	86	<i>A. vadensis</i>	XM_025707597.1
29	<i>A. flavipes</i>	MH472977.1	58	<i>A. parvisclerotigenus</i>	KAB8244753.1	87	<i>A. violaceofuscus</i>	PYI21649.1

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

O levantamento no NCBI revelou que 87 espécies do gênero *Aspergillus* foram anotadas como produtoras de lipase. Esse número corresponde a apenas 16% do total de 565 espécies do gênero, descritas no banco Taxonomy do NCBI. A ausência nas outras espécies pode ser explicada pela falta de pesquisas de sequenciamento e/ou anotação genica, uma vez que esse tipo de enzima é essencial para metabolizar lipídios que é a principal fonte de crescimento para fungos do gênero *Aspergillus* (Reinehr et al., 2014). Esse resultado demonstra a carência e o potencial que esse gênero ainda tem para ser utilizado na produção de Lipases comerciais, assim como outras espécies desse gênero que já são utilizadas para esta finalidade (Nie et al., 2024).

Em relação à busca feita no banco de dados SRA, foram observadas poucas espécies do gênero *Aspergillus* com dados brutos de sequenciamento genômico disponível, apenas 10 espécies do gênero. Destas, somente seis espécies tiveram a anotação do gene de lipase descrita, revelando uma carência de estudos genômicos neste gênero. Enquanto isso, as espécies *Aspergillus spinulosporus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus neotritici* e *Aspergillus amoenus* ainda não possuem registro no NCBI que as identifique como produtoras dessa enzima (Tabela 1). Com base nos critérios de inclusão (item 3.2), a espécie selecionada para este trabalho foi a *Aspergillus Spinulosporus* (SRX11807843).

Tabela 1. Quantidade de dados brutos de sequenciamento genômico no banco de dados *Short Read Archive* (SRA), para espécies do gênero *Aspergillus*, e sua classificação como produtoras de lipase, segundo dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Espécie	Número de dados brutos de genomas depositados	Produtor de lipase pelo NCBI
<i>Aspergillus fumigatus</i>	171	Sim
<i>Aspergillus flavus</i>	16	Sim
<i>Aspergillus niger</i>	4	Sim
<i>Aspergillus tamaritii</i>	2	Sim
<i>Aspergillus spinulosporus</i>	2	Não
<i>Aspergillus tubingensis</i>	1	Sim
<i>Aspergillus neotritici</i>	1	Não
<i>Aspergillus melleus</i>	1	Sim
<i>Aspergillus amoenus</i>	1	Não

Após o tratamento no trimmomatic, foram recuperadas cerca de 15 bilhões de sequências genômicas, com boa qualidade, de *Aspergillus Spinulosporus*. Destas, 15.460 possuem similaridade aos genes de lipases (segundo as análises no tBLASTn), as quais foram montadas em apenas 133 *contigs* (pelo CAP3). De acordo com as

predições do DeepTMHMM, esses *contigs* correspondem a genes codificadores de proteínas globulares, sem características de transmembranação (alfa hélices ou folha beta transmembranares) e ausência de peptídeo sinal. Além disso, a maioria delas possui funções extracelulares (Tabela 2), sugerindo que a espécie excreta as possíveis enzimas para o meio extracelular, tornando-a promissora para a produção comercial de lipases, segundo critérios da literatura (Pascoal et al., 2018; Rodrigues et al., 2015).

Tabela 2. Predição de regiões proteicas pelo DeepTMHMM em *Aspergillus Spinulosporus*.

Classificação das proteínas e predição de regiões específicas	Número de proteínas
Tipo globular (GLOB)	133
Hélices transmembranares (TMhelix)	0
Peptídeo sinal	0
Intracelulares	14
Extracelulares	119
Folhas beta transmembranares (TMbeta)	0

Por sua vez, as análises no *Conserved Domain Search (CD-Search)* revelaram 16 diferentes domínios conservados de lipases em *A. Spinulosporus* (Quadro 2), sendo eles completos, parcialmente completos ou incompletos (Figura 1 e 2). A presença de domínios incompletos não sugere que de fato esses genes estão incompletos na espécie, pode se tratar somente de uma limitação das análises feitas neste trabalho, pela quantidade de sequências obtidas (Disponível no SRA), ou pelo método de montagem.

Quadro 2. Classificação dos domínios identificados com relação a lipase, as quantidades de vezes que foram descritas e a integridade do domínio em *Aspergillus spinulosporus*.

Domínios	Relacionados à lipase ou não	Quantidades de vezes descritas	Integridade do Domínio
Hidrolases alfa/beta	Sim	50	Completo/incompleto
Lipase	Sim	1	Incompleto
Lipase (Classe 3)	Sim	8	Incompleto
Lipase de triacilglicerol	Sim	2	Completo/Incompleto
Carboxilesterase tipo B	Sim	12	Incompleto
Triacilglicerol esterase	Sim	4	Incompleto
Acetil esterase/lipase	Sim	7	Incompleto
Esterase FrsA	Sim	1	Incompleto
Subfamília de hidrolases SGNH	Não	4	Incompleto
Fosfolipase A2 citoplasmática	Sim	1	Incompleto
Patatinas e Fosfolipases	Sim	8	Incompleto
Superfamília RmIC	Não	1	Incompleto
Ligação à celulose fúngica	Não	6	Incompleto
NUDIX hidrolase superfamily	Não	2	Incompleto
Protease de cisteína	Não	1	Incompleto
CLN3 Protein	Não	2	Incompleto

Figura 1: Domínio característico de lipase completo

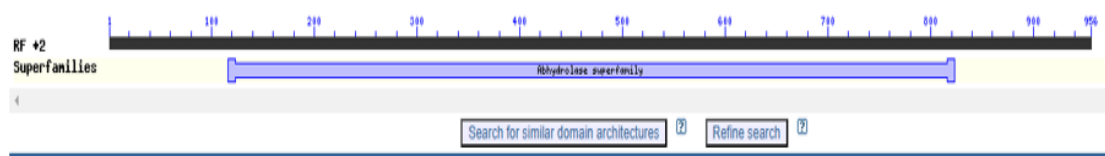
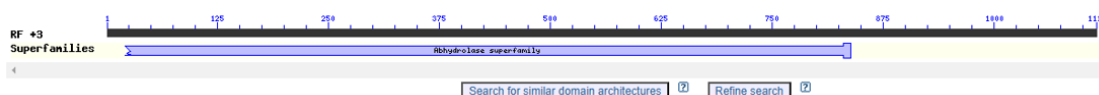


Figura 2: Domínio característico de lipase incompleto



A análise dos 16 domínios identificados em *Aspergillus spinulosporus* sugere que apenas 12 estão relacionados com lipase (Quadro 2), incluindo: Alpha/beta hidrolases, Triacylglycerol lipase e Lipase (class 3). Nessa espécie, a presença desses domínios é um achado esperado, pois estão associados a enzimas que desempenham papéis importantes nos fungos do gênero *Aspergillus* (Sharma et. al. 2001). Nesse contexto, a detecção do domínio de dobras α/β -hidrolase indica que a enzima possui flexibilidade para interagir com uma variedade de substratos, esse domínio está diretamente ligado a lipases e é amplamente diverso em sequência, formas estruturais e funções catalíticas (Bauer TL et. al., 2020). A presença de triacilgliceróis de lipase (TGLs) sugere-se estar relacionada com a produção de diacilgliceróis e ácidos graxos na espécie (necessários para produção de energia e/ou componentes de membrana) (Nakatsukasa et al., 2022). Enquanto as lipases (Classe 3) devem catalisar a hidrólise de triglicerídeos de cadeia longa (Singh et al, 2011).

Os resultados revelaram ainda os seguintes domínios relacionados com as esterases: Carboxilesterase tipo B, Triacilglicerol esterase, Acetil esterase e Esterase FrsA. Em *A. spinulosporus*, esses domínios indicam a presença de enzimas que utilizam substratos contendo ésteres, facilitando a hidrólise de compostos naturais e sintéticos. A Carboxilesterase tipo B, que têm sido associadas à biodegradação de pesticidas e outros compostos xenobióticos, bem como à adaptação do fungo a ambientes ricos em substratos complexos (Bornscheuer, 2002). Enquanto as Acetil esterases são um componente importante dos fungos para degradar a biomassa vegetal (Venegas et al, 2022). Por sua vez, as Esterase FrsA desempenham um papel importante no controle do fluxo metabólico entre as vias de respiração e fermentação dos fungos (Wang et al, 2019). E as Triacilglicerol esterase estão associadas a degradação de gorduras primárias.

Os resultados indicam a presença de fosfolipases em *A. spinulosporus*, com os domínios para; Fosfolipase A2 citoplasmática; Patatinas e Fosfolipases. As fosfolipases são enzimas que tem a função de clivar o ácido graxo na posição dois dos fosfolipídios, sendo essencial para diversas atividades fisiológicas (Phascoal,2015). Desses domínios podemos destacar à patatina (PNPLAs), características de enzimas intracelulares (Ramanadham et al, 2015), indicando a produção também de lipases intracelular em *A. spinulosporus*.

A análise no *CD-Search* revelou também domínios não relacionados com lipase, incluindo: Superfamília RmIC, Ligação à celulose fúngica, Protease de cisteína, CLN3 Protein, NUDIX hidrolase (Quadro 2) e SGNH . A presença desses domínios pode estar relacionada com o fato de alguns tipos de enzimas (diferentes) poderem apresentar regiões com similaridade estrutural ou funcional e, por isso, homologia em suas seqüências. Já o SGNH é um grupo de proteínas relacionadas com uma dobra catalítica altamente conservada, composto principalmente por uma gama diversificada de enzimas modificadoras de carboidratos (Anderson et al, 2022). Resultados como estes, corroboram a necessidade de análises *in silico* complementares (como o *cdd search*) e/ou análises de validação experimental, para confirmação dessas enzimas.

Em *A. spinulosporus*, os resultados em geral indicam a produção de diferentes tipos de lipases, com atuação intracelular ou extracelular. Esses resultados revelam a capacidade desse fungo de atuar na biodegradação de óleos e gorduras, além de seu potencial para aplicações biotecnológicas, como produção industrial de lipases, biorremediação e na indústria alimentícia. Resultados semelhantes foram encontrados em outras espécies do gênero, como *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*, reconhecidas por sua alta capacidade de produção de lipases extracelulares(Nie et al., 2024)

5. CONCLUSÃO

Análises *in silico* sugerem que a espécie *Aspergillus spinulosporus* é uma produtora de diferentes tipos de lipase, entretanto análises de bancadas precisam ser feitas para complementar a validação desses resultados (Ovando et al., 2020). No geral, essas enzimas são excretadas da célula, permitindo a fácil obtenção e purificação dessas enzimas, tornando uma espécie candidata para a produção de lipases comerciais, com importante potencial biotecnológico, após validação experimental e funcional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, A. C.; STANGHERLIN, S.; PIMENTEL, K. N.; WEADGE, J. T.; CLARKE, A. J. The SGNH hydrolase family: a template for carbohydrate diversity. *Glycobiology*, v. 32, n. 10, p. 826-848, 19 set. 2022. DOI: 10.1093/glycob/cwac045. PMID: 35871440; PMCID: PMC9487903.

Bakala N'Goma JC , Amara S , Dridi K , Jannin V , Carriere F . Compreendendo os processos de digestão de lipídios no trato GI antes de projetar sistemas de administração de medicamentos baseados em lipídios . *Ther Deliv* . 2012 ; 3 : 105 – 124 .

Bauer TL, Buchholz PCF, Pleiss J. The modular structure of α/β -hydrolases. *FEBS J*. 2020 Mar;287(5):1035-1053. doi: 10.1111/febs.15071. Epub 2019 Oct 10. PMID: 31545554.

Casas-Godoy L, Gasteazoro F, Duquesne S, Bordes F, Marty A, Sandoval G. Lipases: An Overview. *Methods Mol Biol*. 2018;1835:3-38. doi: 10.1007/978-1-4939-8672-9_1. PMID: 30109644.

Castilla, A., Giordano, S. R., & Irazoqui, G. (2022). Extremophilic lipases and esterases: Characteristics and industrial applications. In *Microbial Extremozymes* (pp. 207-222). Academic Press.

Chandra P, Enespa, Singh R, Arora PK. Lipases microbianas e suas aplicações industriais: uma revisão abrangente. *Microb Cell Fact*. 2020 26 de agosto;19(1):169. doi: 10.1186/s12934-020-01428-8. PMID: 32847584; PMCID: PMC7449042.

Costanzo LS . Fisiologia gastrointestinal . Em: Costanzo LS , ed. *Fisiologia* . 6^a ed . Elsevier ; 2018 : 339 – 393 .

Ettinger, C. L., Vann, L. E., & Eisen, J. A. (2021). Global diversity and biogeography of the *Zostera marina* mycobiome. *Applied and environmental microbiology*, 87(12), e02795-20.

Ezema BO, Omeje KO, Bill RM, Goddard AD, O Eze SO, Fernandez-Castane A. Caracterização bioinformática de uma lipase de triacilglicerol produzida por *Aspergillus flavus* isolada da semente em decomposição de *Cucumeropsis mannii* . *J Biomol Estrutura Dyn*. 2023 abril;41(6):2587-2601. doi: 10.1080/07391102.2022.2035821. Epub 2022, 11 de fevereiro. PMID: 35147487.

Filho DG, Silva AG, Guidini CZ. Lipases: fontes, métodos de imobilização e aplicações industriais. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019 Set;103(18):7399-7423. doi: 10.1007/s00253-019-10027-6. Epub 2019 Ago 2. PMID: 31375880.

Flores-Gallegos, Adriana C., Mariana Delgado-García, Juan A. Ascacio-Valdés, Sandra Villareal-Morales, Mariela R. Michel-Michel, Cristóbal Noé Aguilar-González, and Raúl Rodríguez-Herrera. "Hydrolases of halophilic origin with importance for the food industry." In *Enzymes in food biotechnology*, pp. 197-219. Academic Press, 2019.

Goswami D. Lipase Catalysis in Presence of Nonionic Surfactants. *Appl Biochem Biotechnol*. 2020 Jun;191(2):744-762. doi: 10.1007/s12010-019-03212-w. Epub 2019 Dec 18. PMID: 31853875.

Hecker N , Sharma V , Hiller M . Perdas genéticas convergentes iluminam mudanças metabólicas e fisiológicas em herbívoros e carnívoros . *Proc Natl Acad Sci EUA* . 2019 ; 116 : 3036 – 3041.

Klich, M. A. (2002). *Identification of common Aspergillus species*. Utrecht, Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures.

Koboldt, D. C. (2020). Best practices for variant calling in clinical sequencing. *Genome Medicine*, 12(1), 91.

Krusche, P., Trigg, L., Boutros, P. C., Mason, C. E., De La Vega, F. M., Moore, B. L., ... & Global Alliance for Genomics and Health Benchmarking Team. (2019). Best practices for benchmarking germline small-variant calls in human genomes. *Nature biotechnology*, 37(5), 555-560.

Kumar A, Chauhan S. Pancreatic lipase inhibitors: The road voyaged and successes. *Life Sci*. 2021 Apr 15;271:119115. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119115. Epub 2021 Jan 28. PMID: 33515565.
Lim SY , Xenoulis PG , Stavroulaki EM ,et al. O ensaio de lipase do ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico-(6'-metilresorufina) éster (DGGR) em cães e gatos não é específico para lipase pancreática . *Vet Clin Pathol* . 2020 ; 49 : 607 – 613.

Mahfoudhi A, Benmabrouk S, Fendri A, Sayari A. Lipases fúngicas como biocatalisadores: uma plataforma promissora em diversas aplicações de biotecnologia industrial. *Biotechnol Bioeng*. 2022 dez;119(12):3370-3392. doi: 10.1002/bit.28245. Epub 2022 out 4. PMID: 36137755.

McKee, K. E., Serrano, D., Girvan, M., & Marbach-Ad, G. (2021). An integrated model for interdisciplinary graduate education: Computation and mathematics for biological networks. *Plos one*, 16(9), e0257872.

McLennan AG. The Nudix hydrolase superfamily. *Cell Mol Life Sci*. 2006 Jan;63(2):123-43. doi: 10.1007/s00018-005-5386-7. PMID: 16378245; PMCID: PMC11136074.

Mhetras, Nutan, Sonal Patil, and Digambar Gokhale. "Lipase of *Aspergillus niger* NCIM 1207: a potential biocatalyst for synthesis of isoamyl acetate." *Indian Journal of Microbiology* 50 (2010): 432-437.

Moossavi, S., Atakora, F., Fehr, K., & Khafipour, E. (2020). Biological observations in microbiota analysis are robust to the choice of 16S rRNA gene sequencing processing algorithm: case study on human milk microbiota. *BMC microbiology*, 20, 1-9.

Nakatsukasa K, Fujisawa M, Yang X, Kawarasaki T, Okumura F, Kamura T. Triacylglycerol lipase Tgl4 is a stable protein and its dephosphorylation is regulated in a cell cycle-dependent manner in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2022 Oct 20;626:85-91. doi: 10.1016/j.bbrc.2022.08.022. Epub 2022 Aug 11. PMID: 35981421.

Nie H, Zhang Y, Li M, Wang W, Wang Z, Zheng J. Expressão de lipase microbiana em fungo filamentoso *Aspergillus niger*: uma revisão. *3 Biotech*. 2024 julho;14(7):172. doi: 10.1007/s13205-024-03998-5. Epub 2024 junho 3. PMID: 38841267; PMCID: PMC11147998.

Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken SM, Harel M, Remington SJ, Silman I, Schrag J, et al. The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng.* 1992 Apr;5(3):197-211. doi: 10.1093/protein/5.3.197. PMID: 1409539.

Ovando-Chacon, S. L., Tacias-Pascacio, V. G., Ovando-Chacon, G. E., Rosales-Quintero, A., Rodriguez-Leon, A., Ruiz-Valdiviezo, V. M., & Servin-Martinez, A. (2020). Characterization of thermophilic microorganisms in the geothermal water flow of el chichón volcano crater lake. *Water*, 12(8), 2172.

Pleiss, J., et al. (1998). Lipase engineering database: understanding and exploiting sequence-structure-function relationships. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 5(1-4), 49-64.

Reetz, M. T., et al. (2006). Directed evolution of a thermostable lipase by a combination of directed evolution and rational design. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(8), 1236-1241.

Ramanadham S, Ali T, Ashley JW, Bone RN, Hancock WD, Lei X. Calcium-independent phospholipases A2 and their roles in biological processes and diseases. *J Lipid Res.* 2015 Sep;56(9):1643-68. doi: 10.1194/jlr.R058701. Epub 2015 May 28. PMID: 26023050; PMCID: PMC4548770.

Sarmah, Nipon, D. Revathi, G. Sheelu, K. Yamuna Rani, S. Sridhar, V. Mehtab, and C. Sumana. "Recent advances on sources and industrial applications of lipases." *Biotechnology progress* 34, no. 1 (2018): 5-28.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.

Singab ANB, Mostafa NM, Elkhawas YA, Al-Sayed E, Bishr MM, Elissawy AM, Elnaggar MS, Fawzy IM, Salama OM, Tsai YH, Chang FR. Ciclopeptídeos: isolamento de fungos endofíticos de *Sarcophyton ehrenbergi* e verificação de sua atividade larvívica por meio de estudos in vitro e in silico. *Mar Drugs*. 18 de maio de 2022;20(5):331. doi: 10.3390/md20050331. PMID: 35621982; PMCID: PMC9146806.

Singh AK, Mukhopadhyay M. Overview of fungal lipase: a review. *Appl Biochem Biotechnol.* 2012 Jan;166(2):486-520. doi: 10.1007/s12010-011-9444-3. Epub 2011 Nov 10. PMID: 22072143.

Soni S. Trends in lipase engineering for enhanced biocatalysis. *Biotechnol Appl Biochem.* 2022 Feb;69(1):265-272. doi: 10.1002/bab.2105. Epub 2021 Jan 22. PMID: 33438779.

Stewart, R. D., Auffret, M. D., Warr, A., Wisner, A. H., Press, M. O., Langford, K. W., ... & Watson, M. (2018). Assembly of 913 microbial genomes from metagenomic sequencing of the cow rumen. *Nature communications*, 9(1), 870.

Uwe T. Bornscheuer, Carboxil esterases microbianas: classificação, propriedades e aplicação em biocatálise, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 26, Edição 1, março de 2002, Páginas 73–81

Venegas FA, Koutaniemi S, Langeveld SMJ, Bellemare A, Chong SL, Dilokpimol A, Lowden MJ, Hilden KS, Leyva-Illades JF, Mäkelä MR, My Pham TT, Peng M, Hancock MA, Zheng Y, Tsang A, Tenkanen M, Powlowski J, de Vries RP. Carbohydrate esterase family 16 contains fungal hemicellulose acetyl esterases (HAEs) with varying specificity. *N Biotechnol.* 2022 Sep 25;70:28-38. doi: 10.1016/j.nbt.2022.04.003. Epub 2022 Apr 9. PMID: 35405333.

Watson P. Pancreatite em cães e gatos: definições e fisiopatologia. *J Small Anim Pract*. 2015; 56: 3 – 12.

Wang X, Li ZM, Li Q, Shi M, Bao L, Xu D, Li Z. Purification and biochemical characterization of FrsA protein from *Vibrio vulnificus* as an esterase. *PLoS One*. 2019 Apr 5;14(4):e0215084. doi: 10.1371/journal.pone.0215084. PMID: 30951551; PMCID: PMC6450606.

Yasin, M. T., Ali, Y., Ahmad, K., Ghani, A., Amanat, K., Basheir, M. M., ... & Bokhari, S. A. I. (2021). Alkaline lipase production by novel meso-tolerant psychrophilic *Exiguobacterium* sp. strain (AMBL-20) isolated from glacier of northeastern Pakistan. *Archives of Microbiology*, 203, 1309-1320.