

TRABAJOS ORIGINALES

Determinación de secuencia y modelaje por homología de la lipasa de *Marinobacter* sp. LB

Sequence determination and homology modeling of lipase from *Marinobacter* sp. LB

Jhosep Avila¹, Amparo Iris Zavaleta¹, Mercedes Palomino¹, Christian Solis-Calero²

¹ Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Lab. de Biología Molecular. Jirón Puno 1002 Cercado de Lima, Perú.

² Departamento de Biología Estructural e Funcional. Universidade Estadual de Campinas.

E-mail Jhosep Avila: shonatan@hotmail.com,

E-mail Amparo Iris Zavaleta: azavaletap@unmsm.edu.pe,

E-mail Mercedes Palomino: mepa_8815@hotmail.com.

E-mail Christian Solis Calero: c180276@dac.unicamp.br

Resumen

Las lipasas de la familia I son reconocidas a nivel industrial por sus actividades catalíticas de esterificación, interesterificación y transesterificación. En esta investigación se caracterizó por análisis *in silico* a la lipasa de *Marinobacter* sp. LB aislado de las Salinas de Pilluana, San Martín. Con tal finalidad, se amplificó el gen *lip* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final y la secuencia nucleotídica fue analizada *in silico*. Se elucidó la estructura terciaria empleando como molde a la lipasa 1EX9 de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y se ejecutó el acoplamiento molecular con tres sustratos. El gen *lip* presentó 927 pb y la proteína madura, 284 aminoácidos. La lipasa posee un peso molecular de 29.99 kDa y un pI de 8.89. Asimismo, se identificaron residuos Ser78, Asp229 e His251, típicos de la triada catalítica de una lipasa de la familia I. Además, se evidenciaron once α -hélices periféricas y siete láminas- β internas. La región del bolsillo de unión y su afinidad por lípidos fue demostrada realizando acoplamientos moleculares con trioctanoína, tributirina y trioleína, con energías de -314.28, -248.11 y -215.44 kcal/mol, respectivamente; siendo los aminoácidos de interacción Asn167, Lys106, Trp172, Thr164, Ala179. En conclusión, la estructura tridimensional de la lipasa de *Marinobacter* sp. LB fue construida por modelamiento homólogo y validada en base a la calidad estereoquímica y el entorno de sus aminoácidos; mientras que, los análisis de acoplamiento con sustratos de lipasas permitieron evidenciar los aminoácidos que participan en el bolsillo de unión.

Palabras clave: Lipasa; *Marinobacter*; análisis *in silico*.

Abstract

Family I lipases are industrially recognized for their catalytic activities of esterification, interesterification and transesterification. In this study, *Marinobacter* sp. LB lipase isolated from Salinas de Pilluana, San Martín was characterized by *in silico* analysis. For this purpose, *lip* gene was amplified by conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) and nucleotide sequence was analyzed *in silico*. The tertiary structure was elucidated using the 1EX9 lipase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a template and molecular docking was executed with three substrates. The *lip* gene had 927 bp and mature protein, 284 amino acids. The lipase had a molecular weight of 29.99 kDa and pI of 8.89. Also typical catalytic triad residues of family I lipases (Ser78, Asp229 and His251) were identified. In addition, eleven peripheral α -helixes and seven internal β -sheets were found. Binding pocket and its affinity for lipids were demonstrated by making molecular couplings with trioctanoin, tributyrin and triolein, with energies of -314.28, -248.11 and -215.44 kcal/mol, respectively; amino acids of interaction being Asn167, Lys106, Trp172, Thr164, Ala179. In conclusion, a 3D structure of *Marinobacter* sp. LB lipase was built using homologous modeling and validated based on the stereochemical quality and amino acids environment; while docking analysis with lipases substrates allowed to demonstrate the amino acids that participate in the binding pocket.

Keywords: Lipase; *Marinobacter*; *in silico* analysis.

Citación:

Avila J., A.I. Zavaleta, M. Palomino, C. Solis-Calero. 2018. Determinación de secuencia y modelaje por homología de la lipasa de *Marinobacter* sp. LB. Revista peruana de biología 25(3): 249 - 258 (Agosto 2018). doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v25i3.15208>

Presentado: 27/11/2017
Aceptado: 12/09/2018
Publicado online: 25/09/2018

Fuentes de financiamiento: Este estudio fue financiado parcialmente por los contratos 017-FINCYT-PIBAP-2008 y 007-FONDECYT-2014.

Información sobre los autores:

JA realizó las pruebas experimentales, análisis bioinformático. AIZ realizó la asesoría del trabajo, pruebas experimentales, análisis bioinformático. MP realizó las pruebas experimentales. CS-C realizó el análisis bioinformático. Todos los autores participaron en la redacción, revisión y aprobación del manuscrito.

Los autores no incurren en conflictos de intereses.

Journal home page: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/index>

© Los autores. Este artículo es publicado por la Revista Peruana de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citadas. Para uso comercial, por favor póngase en contacto con editor.revperubiol@gmail.com.

Introducción

Las lipasas (EC 3.1.1.3) son un grupo de enzimas con gran interés industrial, científico y tecnológico, debido a su capacidad catalítica en reacciones de esterificación, interesterificación y transesterificación en medios no acuosos (Houde et al. 2004). En ese sentido, son utilizadas en las industrias: farmacéutica, cosmética, médica, alimentaria, oleoquímica, química, papelería, textilera, entre otras (Louwrier 1998, Schiraldi et al. 2002, Hasan et al. 2006, Wang et al. 2008, Monsia & Monsia 2013).

La primera clasificación de lipasas bacterianas realizada por Jaeger et al. (1999) consideró seis familias, dentro de las cuales destaca la familia I, verdaderas lipasas, con su miembro más representativo, la de *Pseudomonas aeruginosa*. En los meses sucesivos, la clasificación se extendió con las familias VII y VIII (Arpigny & Jaeger 1999).

Las características de las verdaderas lipasas según Kim et al. (2004) son:

1. La triada catalítica conformada por serina, ácido aspártico e histidina, donde la serina está dentro del pentapéptido conservado Gly-X-Ser-X-Gly.
2. La región del agujero oxianión constituida por los residuos His-Gly y ubicada en la región amino terminal, cadena arriba entre 70 a 100 aminoácidos (aa) del pentapéptido.
3. La secuencia señal localizada entre 10 a 40 aminoácidos por encima de la secuencia His-Gly.

Las propiedades y características de las lipasas se pueden determinar por diversas metodologías, entre las más utilizadas son las técnicas moleculares que permiten identificar, caracterizar y expresar genes específicos en hospederos conocidos y fáciles de manipular (Jorgensen et al. 1991, Ihara et al. 1991, Tan & Miller 1992, Saeed et al. 2006, Ruiz et al. 2002, An et al. 2003).

Por otro lado, los análisis *in silico* permiten predecir de manera rápida y económica algunas propiedades de las enzimas, tales como el peso molecular, punto isoeléctrico (pI), estructura tridimensional, sitio activo, especificidad de sustratos, entre otros. Así, Wohlfarth et al. (1992) clonaron el gen *lipA* de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 de 936 pares de bases (bp) determinando con métodos bioinformáticos un peso molecular de 30.134 kDa y la presencia del pentapéptido Gly-His-Ser-His-Gly. De forma similar, Alquati et al. (2002) amplificaron y clonaron el gen de una lipasa de 879 bp perteneciente a *Pseudomonas fragi* IFO3458 y mediante análisis *in silico* determinaron una secuencia proteica de 293 aa, con 32.086 kDa y pI de 9.33. Adicionalmente, Messaoudi et al. (2011) obtuvieron de la base de datos NCBI una lipasa de *Arabidopsis thaliana* de 379 aa y 44.23 kDa con la finalidad de generar un modelo de homología, para lo cual eligieron como molde una lipasa humana con 32% de identidad. La estructura fue validada y sometida al análisis de acoplamiento molecular identificando dos bolsillos de interacción con los sustratos ensayados. Posteriormente, Ali et al. (2013) modelaron una lipasa de *Pseudomonas* sp. AMS8 de 476 aa y 50 kDa, extraída de la base de datos, en este estudio, utilizaron como posibles plantillas a las lipasas de *Serratia marcescens* (80% de identidad) y *Pseudomonas* sp. MIS38 (69% de identidad); sin embargo, sus análisis generaron un mejor modelo con la lipasa de *Pseudomonas* sp. MIS38, evidenciando que los porcentajes de identidad altos no

brindan necesariamente los mejores modelos. Por último, Gupta et al. (2015) y Lanka et al. (2015), realizaron el modelamiento homólogo, la validación de la estructura y los estudios de acoplamiento de lipasas de *Pseudomonas fluorescens* y *Emericella nidulans* NFCCI 3643, respectivamente. En ambos casos, el bolsillo de interacción fue único para los sustratos ensayados.

Marinobacter sp. LB es una bacteria halófila moderada, aislada de las Salinas de Pilluana (San Martín-Perú), presenta una lipasa extracelular versátil ante condiciones de estrés salino (Fernández-Jerí et al. 2013). Sin embargo, el cultivo de esta bacteria en medios salinos dificulta los procesos de filtración, precipitación, diálisis y cromatografía, evitando su caracterización total. Por este motivo se decidió realizar el análisis *in silico* del gen *lip* y de la secuencia aminoacídica, con la finalidad de pronosticar la estructura de la enzima, sus características y su mecanismo de interacción con sustratos.

Material y métodos

Extracción de ADN genómico.- Se utilizó *Marinobacter* sp. LB proveniente del cepario del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. A partir de la cual se prepararon cultivos frescos de 12 h a 37 °C en caldo tripticasa de soya y NaCl al 3%. A continuación, se centrifugó 1.5 mL de cultivo a 12000 rpm por 10 min, eliminando el sobrenadante. El pellet fue resuspendido con 200 µL de tampón PBS 1X y NaCl 3%, se centrifugó nuevamente a 12000 rpm por 10 min, eliminando el sobrenadante. Con la finalidad de lisar las membranas celulares, se adicionaron 200 µL de agua bidestilada y las células fueron sometidas a un choque térmico de 100 °C por 10 min y -20 °C por 2 min. Luego, se centrifugó a 12000 rpm por 10 min y se conservó el sobrenadante. Para verificar la calidad del ADN genómico, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% (Biorad) con tampón TAE 1X y marcador *DNA Ladder* 1 kb (Invitrogen).

Amplificación del gen *lip* mediante PCR.- Para la amplificación del gen *lip* mediante PCR se utilizaron los cebadores *forward* 5'-ATACTCCCTGTTGCATGTCG-3' y *reverse* 5'-TGGACTGGTGCTTCATAACC-3' diseñados con el programa primer3 (Untergasser et al. 2012, Koressaar & Remm 2007). El volumen final fue de 25 µL y la mezcla de reacción contenía KCl 50 mM, Tris/HCl 10 mM, tritón X-100 0.1% (v/v), MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 200 µM, 20 µmoles de cada cebador, *Taq* ADN-polimerasa 1 U y 50 ng de ADN genómico. La PCR se inició con una desnaturalización del ADN a 94 °C por 4 min seguido de 35 ciclos repetitivos a 94 °C por 45 s, 45 °C por 55 s y 72 °C por 45 s, con una extensión final a 72 °C por 7 min. La verificación de los productos amplificados se realizó por electroforesis en gel de agarosa 1% con tampón TBE 0.5X. La secuencia nucleotídica del gen *lip* de *Marinobacter* sp. LB se obtuvo con el método de Sanger a través de los servicios de secuenciación de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Análisis del gen *lip* y modelado de la Lipasa de *Marinobacter* sp. LB.- La transcripción y traducción del gen *lip*, se realizó con el programa Bioedit (Hall 1999) considerando un marco de lectura +1. La secuencia de aminoácidos fue sometida a un alineamiento local utilizando la herramienta BLAST, de la base de datos GenBank, y se extrajo algunas secuencias de lipasas de la Familia I.

Posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple con el programa ClustalX 2.1 (Thompson et al. 1997). Se compararon 21 secuencias de lipasas, entre las cuales figuraba la secuencia de *Marinobacter* sp. LB, las del GenBank y lipasas representativas de la Familia I obtenidas de Arpigny y Jaeger (1999). Este segundo alineamiento se realizó con la finalidad de verificar la familia a la que pertenece nuestra enzima y elucidar las regiones conservadas como el pentapéptido Gly-X-Ser-X-Gly.

Con ayuda del programa SignalP (Petersen et al. 2011), se determinó el péptido señal en la región amino terminal de la proteína en estudio. Para éste análisis se consideró que *Marinobacter* sp. LB es una bacteria Gram negativa y la lipasa producida es extracelular (Chávez-Hidalgo 2010, Fernandez-Jerí et al. 2013).

Selección de la estructura molde.- Para seleccionar a la mejor estructura molde, se buscaron secuencias proteicas obtenidas a partir de estudios cristalográficos en las bases de datos *Protein Data Bank* (PDB) y *UniProtKB*. Las secuencias encontradas se compararon con la obtenida en este estudio. El molde elegido fue la lipasa codificada como 1EX9 (secuencia plantilla), perteneciente a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Modelamiento homólogo.- El modelamiento homólogo se construyó utilizando el programa Swiss-PDB Viewer 4.0.4 (Guex & Peitsch 1997) en modo proyecto, el cual permite analizar la estructura tridimensional de las proteínas. Este análisis se basa en el alineamiento entre la secuencia blanco (secuencia en estudio) con la plantilla. Durante este proceso, se identifican las estructuras secundarias y terciarias de la plantilla, mapeando los residuos similares con la secuencia blanco. Así, se alinearon las secuencias, luego se realizó la inspección visual y se editó manualmente el alineamiento, para aumentar sitios conservados y finalmente, se superpuso las secuencias de aminoácidos. Asimismo, se calculó la raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) con el mismo programa para evaluar la confiabilidad de la estructura modelada.

La superficie electrostática de la lipasa modelada se determinó empleando APBS (*Adaptive Poisson-Boltzmann Solver*) que realiza cálculos electrostáticos de Poisson-Boltzmann sobre biomoléculas (Baker et al. 2001) para describir la complementariedad ligando-proteína basado en la estructura geométrica e interacciones electrostáticas pues desempeñan un papel importante en la catálisis enzimática. El modelo se visualizó utilizando el programa PyMOL (DeLano 2002).

Validación del modelamiento.- El proceso de validación se realizó para verificar que el modelado de la lipasa cumple con los requisitos mínimos de calidad. En consecuencia, el modelo fue sometido a los análisis de: evaluación de la calidad estereoquímica de los puntos de Ramachandran, con el programa RAMPAGE (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>); evaluación del entorno de los aminoácidos considerando la calidad de la estructura proteica, con Verify 3D (Bowie et al. 1991, Lüthy et al. 1992) y análisis de las regiones plegadas, utilizando ERRAT (Colovos & Yeates 1993). Los dos últimos programas estuvieron en el servidor del Instituto DOE de la Universidad de California, Los Ángeles (<http://www.doe-mbi.ucla.edu/>).

Acoplamiento molecular .- Con la finalidad de obtener las energías de acoplamiento y el posible modo de interacción entre la lipasa de *Marinobacter* sp. LB y los tres sustratos seleccionados, se realizaron los dos análisis descritos a continuación:

El primero se realizó con el programa HEX 8.0.0 (Ritchie et al. 2008), los sustratos fueron tributirina (CID: 6050), trioctanoína (CID: 10850) y trioleína (CID: 11970724), extraídos de la base de datos de moléculas químicas del NCBI (PubChem). Los parámetros utilizados fueron predeterminados por el programa que simuló varias orientaciones posibles con sus respectivas energías de acoplamiento, brindando el modelo más viable. El tipo de correlación y la salida del post procesamiento para el receptor y el ligando se mantuvieron con base a la forma, el potencial electrostático y la minimización de la mecánica molecular (MM). El acoplamiento se llevó a cabo a rotación total del ligando manteniendo la posición del receptor fija en el espacio. Este programa fue validado reproduciendo tres modelos cristalográficos de lipasas pertenecientes a *Pseudomonas aeruginosa* (PDBID: 1EX9), *Burkholderia cepacia* (PDBID: 1YS1) y *Pseudomonas cepacia* (PDBID: 1HQD) en interacción con RC-(R₃SP)-1,2-dioctil carbamoil-glicero-3-O-octilfosfonato (CID: 445454), ácido hexilfosfónico (R)-2-metil-3-fenil propil ester (CID: 4369425) y 1-fenoxi-2-acetoxibutano (CID: 446123), respectivamente. Los acoplamientos para la validación fueron realizados retirando los sustratos de los modelos cristalográficos con ayuda del programa Swiss-PDB Viewer 4.0.4 (Guex & Peitsch 1997) y acoplándolos nuevamente con el programa HEX 8.0.0 (Ritchie et al. 2008). Además, las interacciones se analizaron con el programa Discovery Studio 2017 R2 (Dassault Systèmes BIOVIA, San Diego, CA, USA).

El segundo análisis de acoplamiento para tributirina, trioctanoína y trioleína fue realizado con el módulo de acoplamiento FlexX del programa LeadIT 2.1.8 (<https://www.biosolveit.de/>); los resultados fueron evaluados usando la función de puntuación HYDE en SEESAR 70 (<https://www.biosolveit.de/>). El punto de partida fue la estructura obtenida por modelamiento homólogo de la lipasa de *Marinobacter* sp. LB. Para éste estudio, el sitio de unión en la proteína se limitó a 10 Å y las 50 soluciones con mejores puntuaciones (FlexX) de cada ligando fueron conservadas y posteriormente analizadas para obtener las puntuaciones subsecuentes con SEESAR; por último, se seleccionaron las posturas con las mejores puntuaciones.

Resultados

Amplificación del gen *lip*.- A partir del ADN amplificado y separado en gel de agarosa 1% (Fig. 1), se calculó que el gen *lip* de *Marinobacter* sp. LB midió aproximadamente 998 pb. Este cálculo fue realizado por regresión lineal y el producto amplificado fue secuenciado. El electroferograma mostró picos bien definidos para cada base, sin ruido ni superposiciones.

Análisis del gen *lip* y modelamiento de la lipasa de *Marinobacter* sp. LB.- La secuencia génica de la lipasa de *Marinobacter* sp. LB, desde el codón de inicio hasta el de término, fue de 927 nucleótidos y se analizó con Bioedit (Hall 1999) para obtener una cadena aminoacídica de 308 aminoácidos (material complementario 1).

Para el estudio de la estructura primaria se utilizaron 21 secuencias proteicas: once descritas por Arpigny y Jaeger (1999); nueve obtenidas de la base de datos GenBank y una perteneciente a nuestra lipasa. De todas las enzimas, las secuencias de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC31156, *Burkholderia glumae* CBS322.89, *Burkholderia cepacia*, *Chromobacterium viscosum* ATCC6918 son representativas de la familia I (Tabla 1).

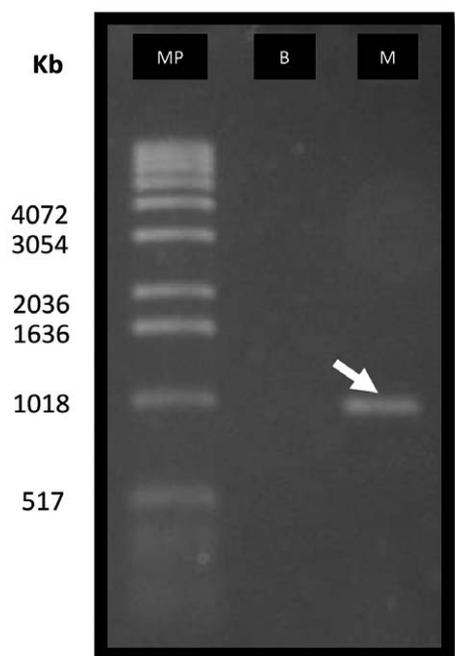
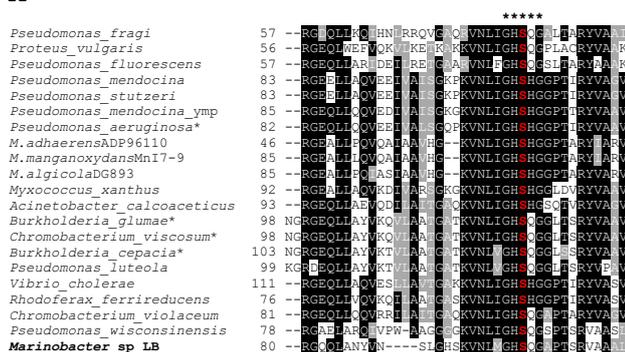


Figura 1. Gel de agarosa 1%, mostrando el producto del gen *lip* de *Marinobacter* sp. LB. Líneas: B, blanco; MP, marcador de peso molecular; M, gen *lip* (flecha).

A



B

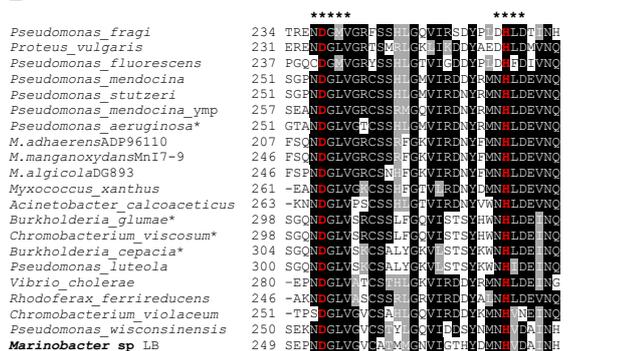


Figura 2. Alineamiento de lipasas de la familia I incluido *Marinobacter* sp. LB. Letras: en rojo indican, triada catalítica (Ser-Asp-His); con cuadros negros, aminoácidos conservados; con cuadros plomos, aminoácidos con propiedades similares. A, regiones cercanas al extremo N-terminal que incluyen al pentapéptido Gly-X-Ser-X-Gly, en asteriscos. B, regiones cercanas al extremo C-terminal que incluyen las secuencias Asn-Asp-Gly-Leu-Val y Asn(Asp)-His-Leu-Asp, en asteriscos.

Tabla 1. Códigos de las secuencias aminoacídicas de lipasas de la familia I utilizadas en el análisis bioinformático

Especie	Cepa	Código de acceso (gb/emb/dbj)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	C9	AAC15585.1
<i>P. fragi</i>	IFO-12049	CAA32193.1
<i>P. aeruginosa</i> ¹	ATCC31156	BAA09135.1
<i>P. mendocina</i>	ymp	WP_003239806.1
<i>P. mendocina</i>	PK-12CS	AAM14701.1
<i>P. stutzeri</i>	-	WP_011913157
<i>P. wisconsinensis</i>	LMG P-15151	AAB53647.1
<i>P. luteola</i>	-	AAC05510.1
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	BD413	CAA56780.1
<i>Proteus vulgaris</i>	K80	AAB01071.1
<i>Burkholderia glumae</i> ¹	CBS 322.89	CAA49812.1
<i>B. cepacia</i> ¹	-	AAA50466.1
<i>Vibrio cholerae</i>	12129(1)	EEN99655
<i>Rhodoferrax ferrireducens</i>	T118	WP_011465630.1
<i>Myxococcus xanthus</i>	-	WP_011555480.1
<i>Chromobacterium violaceum</i>	ATCC12472	NP_902384.1
<i>C. viscosum</i> ¹	ATCC6918	Q05489.1
<i>Marinobacter adherens</i> ²	HP15	CP001978.1
<i>M. manganoxydans</i> ²	Mn17-9	NZ_AGTR01000039.1
<i>M. algicola</i> ²	DG893	NZ_ABCP01000010.1

¹ Secuencias representativas de lipasas de la Familia I (verdaderas lipasas).
² Secuencias de aminoácidos obtenidas a partir del genoma completo.

El tamaño aproximado (incluido los gaps) de las secuencias alineadas fue de 391 posiciones y se pudo evidenciar la triada catalítica (Ser-Asp-His) dentro de las regiones conservadas presentes en las lipasas del género *Marinobacter* y de la familia I (Fig. 2). Tales regiones incluyeron: el pentapéptido conservado Gly-His-Ser-Gln(His)-Gly, que contiene al primer aminoácido catalítico (Ser); la región Asn-Asp-Gly-Leu-Val, presenta al segundo aminoácido catalítico (Asp); y la secuencia Asn(Asp)-His-Leu-Asp, posee al tercer aminoácido catalítico (His).

El tamaño de la proteína inmadura es de 308 aa, constituida en mayor proporción por glicina (11%), alanina (9.4%) y leucina (9.1%); en forma minoritaria, por ácido glutámico (1.9%), triptófano (1.9%) y cisteína (0.6%). La secuencia del péptido señal detectada por SignalP (Petersen et al. 2011) está en la región N-terminal de la proteína, compuesta por los primeros 24 aa. Por lo tanto, la lipasa madura extracelular tendría un tamaño teórico de 284 residuos con peso molecular de 29.99 kDa, pI de 8.89. En base al alineamiento múltiple, se pronosticó que los aminoácidos catalíticos de nuestra lipasa son Ser78, Asp229 e His251. Mientras que, la Cys180 y Cys235 participan en la formación del puente disulfuro. Cabe señalar que las lipasas son dependientes de calcio (Jaeger et al. 1999), siendo los posibles residuos de unión a este cofactor Asp210 y Asp253 (Fig. 3).

Para la selección de la estructura molde y posterior modelamiento de la lipasa se comparó la secuencia aminoacídica en estudio con las bases de datos (PDB, UniProtKB) y se encontró seis proteínas equivalentes provenientes de diferentes especies

```

1 atgcgttttgcccattccatccggcttggtggccgaattctcatg
M R F A M P I R L V A G I L M
46 ctggtgttctcggtactgagccacgcccagctacacccagaccggt
L V F S V L S H A S Y T Q T R 6
91 catccgattgtgctgtaacacgggttaaccggcttcaactctt
H P I V L V H G V T G F N T L 21
136 ggcggtctgatcaactacttccacaccattccctggaaaccttgaa
G G L I N Y F H T L E W N L E 36
181 cgcagtgccgcaaaaggtctataccgccagcgtgctctcgtgaac
R S G A K V Y T A S V S F V N 51
226 agcagcgaacagcgtggccagcaactggccaattacgtcaacagc
S S E Q R G Q Q L A N Y V N S 66
271 ctgggccacagcaaggtcaatctgatggggcacagtcagggtgccc
L G H S K V N L M G H S O G A 81
316 cccacctcccggtggcagcggctctgattccccacaagattgcc
P T S R V A A A A L I P H K I A 96
361 tcggtcagctcgaatgacggcgaacaagggctccaaagtgtct
S V T S I D G V N K G S K V A 111
406 gacgttatccggggcatcatccctcccgagcgtatgttgaagg
D V I R G I I P P G S Y V E G 126
451 ggccgagcgcattggccaacgcccctgggagcgtgatcaatgcc
G A D A I A N A L G G I I N A 141
496 ctgtccggagccagcaaccccgaggtgattggccgcccggaa
L S G A S N P O D G I A A L E 156
541 accctgaccctccggcaccacccgctgaacgacgcccctgggt
T L T T P G T T S L N D A L G 171
586 tggaaaggggttaatcgtaatgcctgcccgggtaccagcgaagat
W K G V N R N A C A G T S E D 186
631 gtctggatcagtgccagaaagatcaagttttctcctggaccgga
V W I S G Q K I K E E S W T G 201
676 cgcgctgatggaccaacggttctgacattaccgatccgttccctg
R A V W T N V F B I T D P F I 216
721 ggctgacccctccgctttggcagcagcccaatgatggtctg
G V T S L A F G S E E N B G L 231
766 gtcggtctctgcccaccatgatgggcaatgtcatcgccaccac
V G V C A T M M G N V I G T H 246
811 tacgacatgaaccagttgatgccatcaaccatctgctggcgccc
Y D M N H V B A I N H I L G A 261
856 cgttctctctggaccaaccgggtctcactctaccgcagccagcc
R S I W T N P V S L Y F S Q A 276
901 aaccgtctgaaaaaccgggtctctgta
N R L K N R G L * 284
    
```

Figura 3. Estructura primaria de la lipasa de *Marinobacter* sp. LB. — — —, secuencia madura de la lipasa con 284 aa; **GXSXG**, pentapéptido conservado de la familia I; **SDH**, triada catalítica; **C**, residuos de cisteínas formadoras del puente disulfuro; **D**, posibles residuos de ácido aspártico que forman enlaces con Ca²⁺.

bacterianas (Tabla 2). De las cuales, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (43%), *Proteus mirabilis* (37%) y *Pseudomonas glumae* (34%) presentan estudios por cristalografía. Los análisis evolutivos demuestran que las especies de *Marinobacter* tienen mayor relación evolutiva con *Pseudomonas aeruginosa* y menor relación con el género *Proteus* (Anzai et al. 2000). El porcentaje de identidad, la estructura cristalográfica y la relación evolutiva fueron los factores que determinaron a la lipasa 1EX9, perteneciente a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, como molde (plantilla) para el modelaje por homología.

El modelo fue construido con el programa Swiss-PDB Viewer (Guex & Peitsch 1997), para lo cual, primero se realizó el alineamiento de nuestra secuencia madura con la lipasa 1EX9 de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Durante la ejecución del programa, se logró reconocer las estructuras secundarias propias de la plantilla, en base a su estructura cristalográfica. Por tal motivo, en las regiones donde los aminoácidos de ambas secuencias coincidían, se construyó la estructura terciaria de la lipasa de *Marinobacter* sp. LB. La raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) obtenido con el mismo programa, en donde se ajustaron los carbonos alfa de la estructura en mención, fue 0.32 Å.

La representación gráfica del modelaje por homología de la lipasa se observó con el programa Discovery Studio 2017 R2 (Dassault Systèmes BIOVIA, San Diego, CA, USA), diferenciando que 11 α-hélices se encuentran distribuidas en toda la proteína, mientras que 7 de las 9 láminas-β se agrupan en la región central de la biomolécula (Fig. 4). La lipasa madura de *Marinobacter* sp. LB no presenta el péptido señal, motivo por el cual el porcentaje de identidad con la lipasa (PBDID: 1EX9)

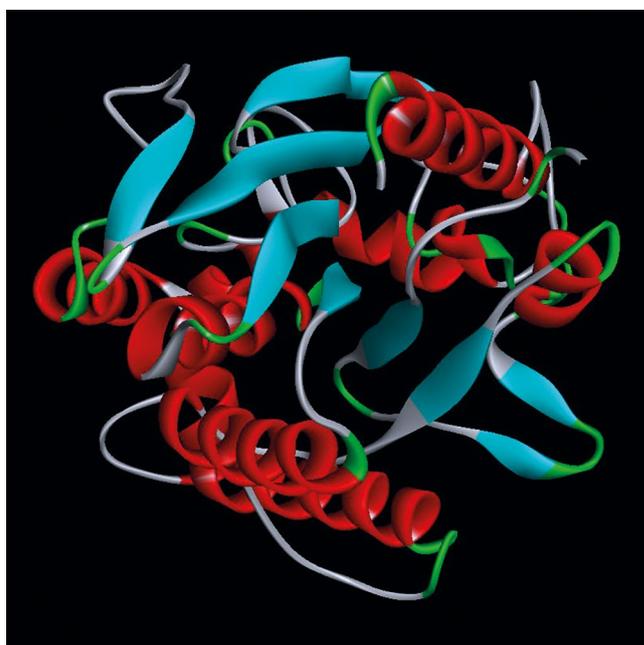


Figura 4. Representación de la lipasa de *Marinobacter* sp. LB modelada con Swiss-PDB Viewer y visualizada con Discovery Studio 2017 R2. Láminas turquesa, láminas-β. Espirales rojas, α-hélices.

Tabla 2. Porcentaje de identidad de la secuencia aminoacídica de la lipasa de *Marinobacter* sp. LB con lipasas de referencia

Bacteria	Enzima	Código de acceso	Identidad (%)	Base de datos
<i>Vibrio cholerae</i>	Triacilglicerol lipasa	P15493.2	51	UniProtKB
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 ¹	Lipasa	1EX9	43	PDB
<i>Proteus mirabilis</i>	Lipasa	4HS9	37	PDB
<i>Pseudomonas</i> sp. 109	Lipasa	P26877	43	UniProtKB
<i>Pseudomonas</i> sp. KWI-56	Triacilglicerol lipasa	P25275	35	UniProtKB
<i>Pseudomonas glumae</i> ¹	Lipasa	1TAH	34	PDB

¹presentan estructura cristalográfica

aumenta a 45.85%. En la Figura 4 se observa que nuestra enzima es monomérica. La superficie electrostática de la enzima (Fig. 5) evidencia que la polaridad del ligando y de la superficie de la lipasa modelada, son complementarias.

Validación del modelamiento.- Previo al acoplamiento molecular, el modelo desarrollado fue validado mediante la evaluación de la calidad estereoquímica y del entorno de los aminoácidos. En la primera evaluación, el programa RAMPAGE generó el diagrama de Ramachandran (Fig. 6) a partir de la conformación de los aminoácidos, en base a los giros que existen entre los enlaces del carbono alfa con los grupos amino y carboxilo, denominados ángulos phi (Φ) y psi (Ψ), respectivamente. La figura 6A presenta tres regiones definidas, evidenciando la presencia de láminas- β , α -hélices con giros a la derecha e izquierda. La figura 6B indica la posición de los aminoácidos, en donde el 92.6% están en la región “favorecida” (zonas oscuras), 6% en la “permitida” (zonas claras) y 1.4% en la “desfavorable” (zonas blancas).

En la segunda evaluación, el programa ERRAT (Colovos & Yeates 1993) identificó la presencia de regiones incorrectamente plegadas, pues 12 aa pertenecen a regiones inconsistentes. Sin embargo, 272 aa forman parte de regiones plegadas dentro del límite permitido (Fig. 7), por lo que el programa brindó un “Factor de calidad general” del 95.604 %. Por otra parte, se analizó la compatibilidad de la estructura terciaria (3D) con la primaria (1D) usando el programa Verify 3D (Bowie et al. 1991, Lüthy et al. 1992), con puntuaciones que varían desde -1 (puntaje malo)

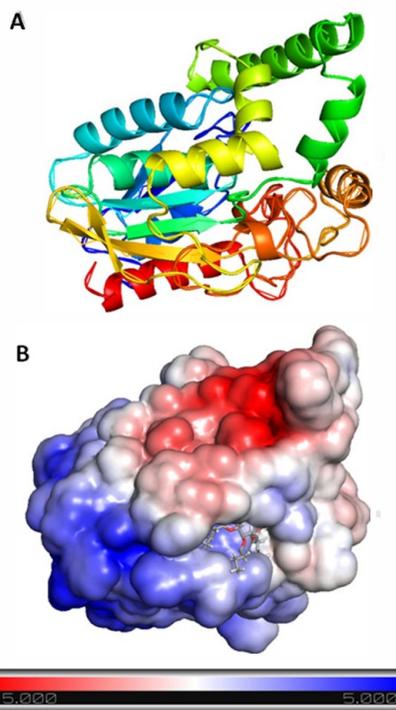


Figura 5. A, Representación de las estructuras secundarias de la lipasa modelada de *Marinobacter* sp. LB usando el programa PyMOL. B, Cálculo de superficie electrostática usando el programa APBS (*Adaptative Poisson-Boltzman Solver*). Las superficies con carga negativa y positiva están de rojo (-5 kT e-1) y azul (+5 kT e-1), respectivamente.

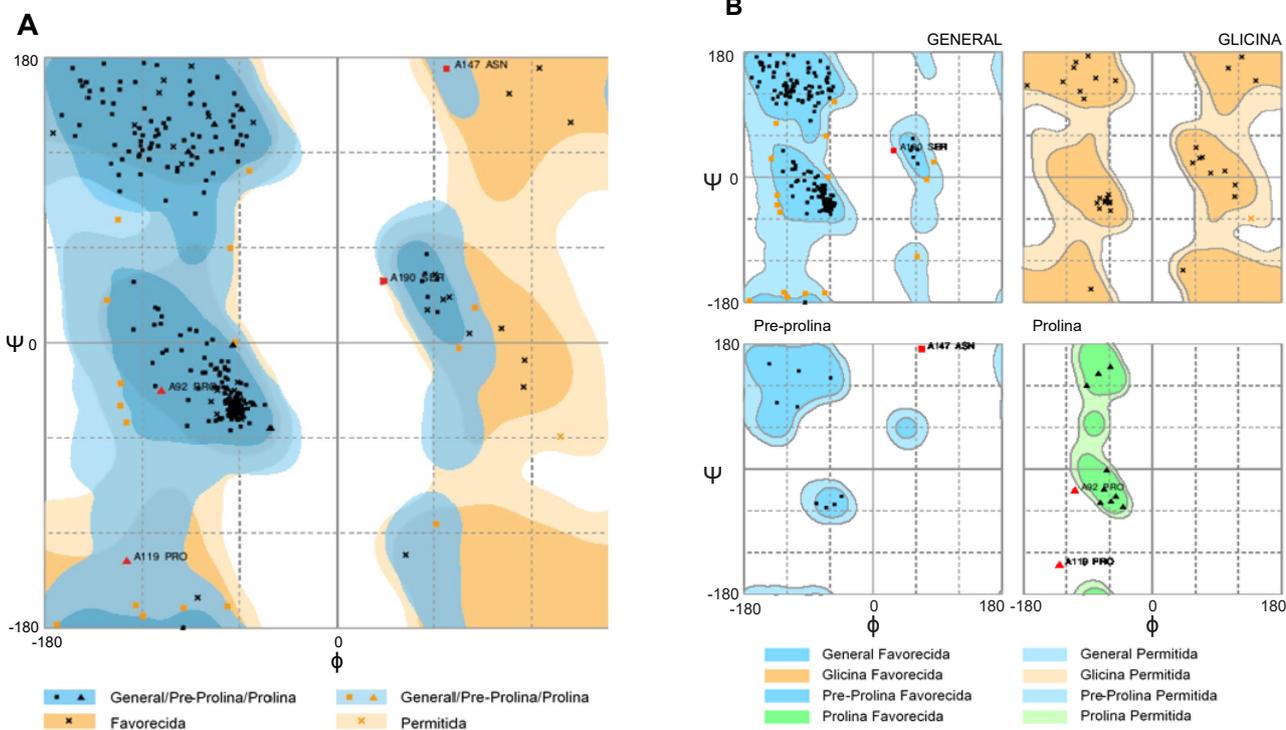


Figura 6. Diagrama Ramachandran de la lipasa modelada de *Marinobacter* sp. LB, donde se visualiza las regiones energéticamente permitidas para los ángulos Phi (Φ) y Psi (Ψ). A, la región media derecha, superior y media izquierda, pertenecen a las α -hélices con giro a la izquierda, láminas- β y α -hélices con giro a la derecha, respectivamente. B, Diagrama Ramachandran desglosado mostrando las regiones favorecidas (zonas oscuras), permitidas (zonas claras) y rechazadas (zona blanca), el diagrama muestra las parcelas de los posibles ángulos Φ y Ψ de los aminoácidos en general, glicina, pre-prolina y prolina.

hasta +1 (puntaje bueno), en este caso la compatibilidad fue del 78.52% que representa un “puntaje promedio 3D-1D” $\geq +0.2$.

Acoplamiento molecular.- Las energías de acoplamiento molecular fueron determinadas enfrentando la lipasa modelada con los sustratos. Para este fin, se realizó evaluaciones con el programa HEX (Ritchie et al. 2008) en donde se emplearon 2000 soluciones de acoplamiento en cada caso y se obtuvo las energías -248.11, -314.28 y -215.44 kcal/mol para tributirina, trioctanoína y trioleína, respectivamente (Tabla 3).

Las mismas condiciones fueron utilizadas para validar el programa HEX (Ritchie et al. 2008), donde se reprodujo el acoplamiento de las lipasas 1EX9, 1YS1 y 1HQD con sus respectivos sustratos, dando energías de acoplamiento muy bajas, lo que significa que existe una alta probabilidad para estas interacciones. Con el uso del programa Discovery Studio 2017 R2, se encontró que varios aminoácidos de cada bolsillo de unión de las estructuras cristalográficas (Tabla 4) también participaban del reconocimiento de los ligandos en los modelos pronosticados.

Además, el programa HEX (Ritchie et al. 2008) brindó coordenadas de interacción enzima-sustrato para la lipasa de *Marinobacter* sp. LB obteniéndose valores muy similares para tributirina, trioctanoína y trioleína. Éstas coordenadas en conjunto con el modelo homólogo de la lipasa fueron utilizadas como punto de partida en los estudios de acoplamiento molecular realizados con el programa con LeadIT, el cual reveló que los tres sustratos se unen en el mismo bolsillo de unión (Fig. 8). La postura de los sustratos en la región de la enzima fue evaluada usando el programa HYDE, donde las puntuaciones son producto de la predicción de la afinidad de los ligandos a la proteína mediante los valores de la constante de disociación K_i (Tabla 3), un menor valor de K_i representa una mayor afinidad de la enzima por su sustrato, en consecuencia esto significa que las bajas concentraciones de sustrato pueden ser reconocidas por la enzima y ejercer su efecto. Los aminoácidos del bolsillo que interaccionan con los tres sustratos son Asn167, Lys106, Trp172, Thr164, Ala179, además Arg177 y Cys235 coinciden para tributirina y trioctanoína, tal como se muestra en la Figura 8.

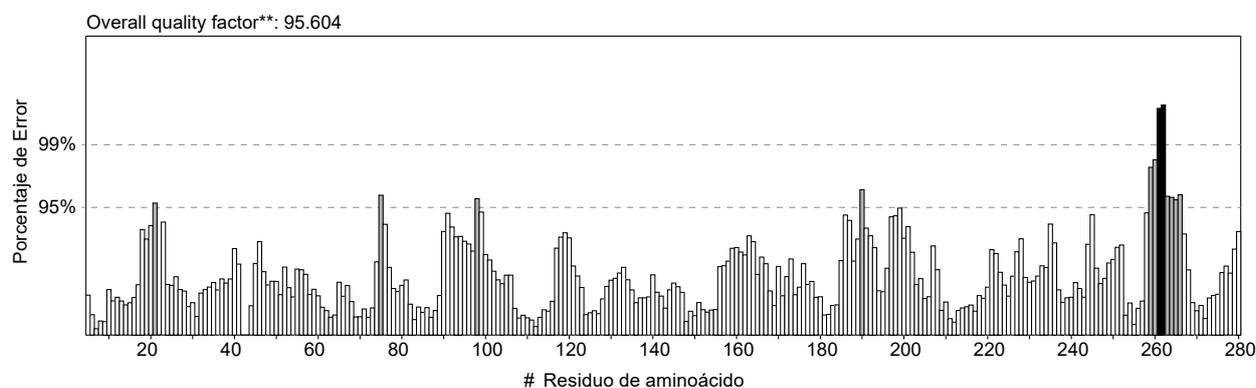


Figura 7. Diagrama ERRAT para la lipasa modelada de *Marinobacter* sp. LB. Las barras blancas representan regiones con menor tasa de error para el plegamiento de proteínas, las negras indican regiones plegadas de manera errónea y las grises representan regiones con error entre el 95 y 99%.

Tabla 3. Puntuación de los métodos utilizados para realizar el acoplamiento molecular.

Sustrato	Puntuación HYDE ¹ (uM)	Puntuación HEX ² (Kcal/mol)
Trioctanoína	2.761>K _i Hyde>0.028	-314.28
Tributirina	443.692>K _i Hyde>4.466	-248.11
Trioleína	1766.043>K _i Hyde>17.775	-215.44

¹ puntuación para la mejor posición.

² puntuación para el mejor acoplamiento.

Tabla 4. Lipasas utilizadas en la validación del programa HEX.

Bacteria	Sustrato	Energía de acoplamiento (Kcal/mol) ¹	Aminoácidos que coinciden en los bolsillos de unión ²
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	RC-(RP,SP)-1,2-dioctil carbamoil-glicero-3-O-octilfosfonato	-390.15	Ser82, Met16, Leu118
<i>Burkholderia cepacia</i>	ácido hexilfosfónico (R)-2-metil-3-fenil propil ester	-256.14	Gln88, Leu17, Leu167
<i>Pseudomonas cepacia</i>	1-fenoxi-2-acetoxibutano	-216.50	Leu167, Leu17

¹ Determinado por el programa HEX 8.0.0

² Bolsillos de unión de la estructura cristalina y pronóstico del HEX 8.0.0

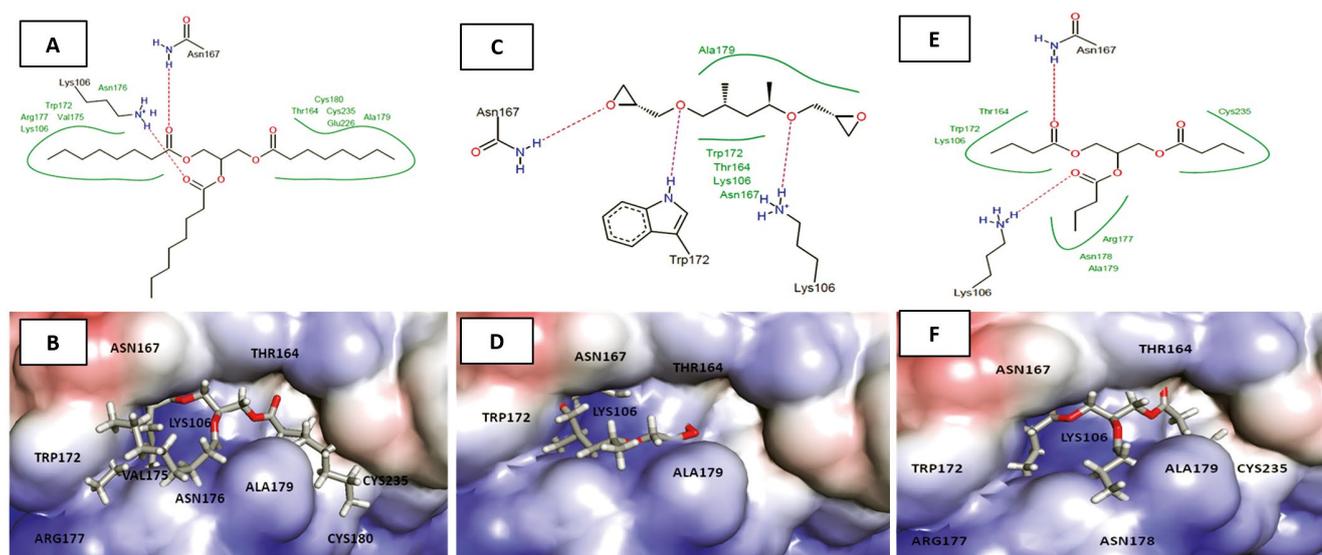


Figura 8. Representación de las mejores posturas de acoplamiento de los sustratos trioleína (A-B), trioleína (C-D) y tributirina (E-F), usando el modelo de homología de la lipasa de *Marinobacter* sp. LB generado por el módulo de acoplamiento FlexX del programa LeadIT, seguido de evaluaciones usando la función de puntuación de HYDE en SEESAR. A, C, E, indican diagramas de las interacciones de los complejos sustrato-enzima, las líneas punteadas rojas y continuas verdes indican puentes de hidrógeno e interacciones de Van Der Waals, respectivamente. B, D, F, presentan la vista lateral de las interacciones del complejo enzima-sustrato. La superficie de la lipasa se generó mediante cálculo de superficie electrostática usando APBS.

Discusión

La clasificación de las lipasas fue propuesta por Arpigny y Jaeger (1999) resaltando regiones conservadas en la familia I las que contienen a los aminoácidos de la triada catalítica, las mismas que están en la lipasa en estudio (Fig. 2). Por tal motivo, se podría considerar a esta enzima dentro del grupo de las verdaderas lipasas. La secuencia aminoacídica inmadura es de 308 residuos, el tamaño de estas proteínas depende de la familia a la que pertenece, la especie y del espacio donde actúa. Así mismo, las lipasas extracelulares bacterianas por lo general presentan un péptido señal (Ihara et al. 1991, Frenken et al. 1992, Sangeetha et al. 2014, Sullivan et al. 1999, Park et al. 2009) en la región N-terminal, reconocido por receptores de membrana y proteínas de secreción que permiten su salida al medio externo (Jaeger et al. 1999). En tal sentido, el reconocimiento de un péptido señal de 24 aa en la secuencia de la lipasa, se puede sustentar con los trabajos realizados por Alejandro-Paredes (2012) y Fernández-Jerí et al. (2013) quienes describen que la lipasa de *Marinobacter* sp. LB es extracelular.

La secuencia madura de la lipasa presentó 284 residuos, 29.99 kDa y pI de 8.89. Los aminoácidos de la triada catalítica son Ser78, Asp229 e His251, también se reconocieron los residuos de unión al Ca²⁺ en las posiciones Asp210 y Asp253. Hallazgos similares fueron reportados por Ihara et al. (1991) quienes describen lipasas de *Pseudomonas* nov. sp. 109, cuya secuencia madura presenta 311 aa, 30.149 kDa y pI de 7; Frenken et al. (1992) caracterizaron una lipasa de *Pseudomonas glumae* PG1, con una secuencia madura de 319 aa, 33.1 kDa y pI de 7.2, los residuos catalíticos descritos fueron Ser87, Asp241 e His285; Sullivan et al. (1999) presentaron una lipasa de *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 de 313 aa, 32.5 kDa y pI de 6.16, identificaron los residuos Asp240 y Asp281 como los de unión al Ca²⁺, mientras que los aminoácidos catalíticos fueron Ser111, Asp258 e His280; Alquati et al. (2002) reportaron una lipasa

de *Pseudomonas fragi* IFO 3458 con 293 aa, 32.086 kDa y pI de 9.33, la triada catalítica fue Ser83, Asp238 e His260; An et al. (2003) identificaron una lipasa de *Pseudomonas* sp. SW-3, con 311 aa y 31 kDa, los residuos catalíticos fueron Ser108, Asp255 e His277, y los residuos de unión al Ca²⁺ descritos como Asp240 y Asp279.

El porcentaje de identidad entre la lipasa en estudio con la de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 fue de 45.85%, otros modelos como el desarrollado por Gupta et al. (2015) utilizan 80.5% de identidad entre su lipasa y la estructura molde. Sin embargo, un porcentaje mayor no asegura el desarrollo de un buen modelo homólogo (Ali et al. 2013). Así lo demuestran Messaoudi et al. (2011) y Lanka et al. (2015) quienes modelaron lipasas con identidades del 32% y 32.77%, respectivamente. Más aún, Yang et al. (2000) demuestran que porcentajes de identidad mayores al 25% indican estructuras tridimensionales semejantes entre dos proteínas.

La estructura tridimensional de la lipasa de *Marinobacter* sp. LB, presentó 11 α-hélices periféricas y 9 láminas-β ubicadas principalmente en la región central, similar a lo descrito por Messaoudi et al. (2011) quienes describen en su modelo 8 láminas-β centrales. El plegamiento y estabilidad de nuestra lipasa depende de: los puentes de hidrógeno, entre aminoácidos polares; interacciones hidrofóbicas, entre residuos apolares (glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina); y un puente disulfuro generado entre los grupos tiol (-SH) de los residuos Cys180 y Cys235, también descrito por Frenken et al. (1992), An et al. (2003), Sangeetha et al. (2014) y Sullivan et al. (1999). En relación al RMSD, los modelos que presentan un porcentaje de identidad entre 90% a 95%, suelen tener valores entre 1 y 0.5 Å (Rost 1999, Vivas-Reyes et al. 2010), por lo que puntuaciones inferiores a 0.5 Å deben considerarse estructuralmente confiables, tal como sucede con el valor de 0.32 Å obtenido con Swiss-PDB Viewer (Guex & Peitsch 1997).

En la validación de la estructura de la lipasa (Fig. 4), el programa RAMPAGE determinó tres regiones: favorecida (92.6%), permitida (6%) y atípica (1.4%). Cabe resaltar que el programa recomienda valores aproximados al 98% en la región favorecida, sin embargo, el puntaje obtenido es aceptable por ser un modelo predictivo y no una estructura cristalográfica completamente resuelta (Ali et al. 2013). Al respecto, Messaoudi et al. (2011) y Ali et al. (2013), mencionan que valores superiores al 90% indican modelos con buena calidad estereoquímica.

El programa ERRAT (Colovos & Yeates 1993) asignó un "Factor de calidad general" de 95.60% que indica un buen modelo estructural debido a que el programa recomienda valores superiores a 95%. A pesar de esto, se han validado estructuras con 84.67% (Lanka et al., 2015). Por otro lado, el programa Verify 3D muestra que el 78.52% de los aminoácidos presenta un "Puntaje promedio 3D-1D" mayor a +0.2. En este contexto, Bowie et al. (1991) y Lüthy et al. (1992), indican que por lo menos el 65% de aminoácidos deben tener puntajes mayores a +0.2, lo cual demuestra una buena relación entre el modelo tridimensional y la estructura primaria. Así, todos los análisis reflejan un modelo predictivo adecuado de la lipasa de *Marinobacter* sp. LB.

En los análisis de acoplamiento, los tres sustratos se unieron al mismo bolsillo, en interacción con los aminoácidos Asn167, Lys106, Trp172, Thr164, Ala179, y parcialmente con Arg177, Cys235, Val175, Asn176, Cys180, Asn178. La ausencia de los residuos de la triada catalítica indica que los aminoácidos catalíticos son los más reactivos y en consecuencia importantes en la catálisis enzimática, pero no necesariamente intervienen en la unión enzima-sustrato. De manera similar, Gupta et al. (2015) describen el acoplamiento de una lipasa de *Pseudomonas fluorescens* con p-nitrofenil, ión acetato y dietil fosfonato, mediante los residuos Leu26, Tyr29, Asn31, Asp33, Pro315 y Thr316. Por otro lado, las energías de acoplamiento y constantes de disociación K_i (tabla 3) indican que la lipasa de *Marinobacter* sp. LB tiene mayor afinidad por la trioctanoína, seguido por tributirina y trioleína, puesto que la menor energía utilizada en la unión enzima-sustrato genera mayor probabilidad de acoplamiento (Ritchie et al. 2008) y valores bajos de la constante K_i indican que la enzima puede reconocer bajas concentraciones del sustrato y ejercer su efecto catalítico. Los estudios experimentales realizados por Alejandro-Paredes (2012), donde la lipasa de *Marinobacter* sp. LB degrada más tributirina que trioleína, refuerzan lo antes mencionado. Adicionalmente, describen que las lipasas interactúan con bajas energías de acoplamiento con trioctanoína, tributirina y trioleína (Messaoudi et al. 2011, Lanka et al. 2015).

Conclusión

La lipasa de *Marinobacter* sp. LB fue construida por modelamiento homólogo, la estructura tridimensional fue validada en base a la calidad estereoquímica y el entorno de sus aminoácidos. Los análisis de acoplamiento con sustratos naturales de lipasas, permitieron evidenciar los aminoácidos que participan en el bolsillo de unión. Este trabajo propone alternativas para la caracterización parcial y total de proteínas a partir de secuencias génicas. Se recomienda para futuras investigaciones de esta lipasa, realizar estudios de optimización por dinámica molecular.

Agradecimientos

A BioSolveIT GmbH de la Universidad Estadual de Campinas por el acceso a los programas LeadIT 2.1.8 y Scesar 70 para el análisis quimioinformático.

Literatura citada

- Alejandro-Paredes A. 2012. Producción en cultivo discontinuo y caracterización parcial de lipasas de *Marinobacter* sp. aislada de las salinas de Pilluana [Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico]. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Ali M.S.M., S.F.M. Fuzi, M. Ganasen, R.N.Z.R.A. Rahman, M. Basri & A.B. Salleh. 2013. Structural Adaptation of Cold-Active RTX Lipase from *Pseudomonas* sp. Strain AMS8 Revealed via Homology and Molecular Dynamics Simulation Approaches. *BioMed Research International* 2013: 1-9. <https://doi.org/10.1155/2013/925373>
- Alquati C., L. De Gioia, G. Santarossa, L. Alberghina, P. Fantucci & M. Lotti. 2002. The cold-active lipase of *Pseudomonas fragi*. Heterologous expression, biochemical characterization and molecular modeling. *European Journal Biochemistry* 269: 3321-3328. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03012.x>
- An S.Y., S-W. Kim, Y.L. Choi, Y.S. Cho, W.H. Joo & Y.C. Lee. 2003. Cloning, expression in *Escherichia coli*, and enzymatic properties of a lipase from *Pseudomonas* sp. SW-3. *Journal of Microbiology* 41(2): 95-101.
- Anzai Y., H. Kim, J-Y. Park, H. Wakabayashi, & H. Oyaizu. 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50: 1563-1589. doi: 10.1099/00207713-50-4-1563
- Arpigny J.L. & K.E. Jaeger. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical Journal* 343(1): 177-183. <http://dx.doi.org/10.1042/bj3430177>
- Baker N.A., D. Sept, S. Joseph, M.J. Holst & J.A. McCammon. 2001. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 98(18): 10037-10041. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.181342398>
- Bowie J.U., R. Lüthy & D. Eisenberg. 1991. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science* 253(5016): 164-170. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1853201>
- Chávez-Hidalgo E. 2010. Bacterias halófilas moderadas con actividad lipolítica aisladas de las salinas de Pilluana-San Martín. [Tesis para obtener el grado de Magister]. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Colovos C. & T.O. Yeates. 1993. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Science* 2(9): 1511-1519. <http://dx.doi.org/10.1002/pro.5560020916>
- DeLano W.L. 2002. The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA; <http://www.pymol.org>
- Fernández-Jerí Y., A. Zavaleta, L. Alejandro-Paredes & V. Izaguirre. 2013. Caracterización parcial de una lipasa extracelular de *Marinobacter* sp. empleando la metodología de superficie respuesta. *Ciencia e Investigación* 16(1): 12-17.
- Frenken L.G.J., M.R. Egmond, A.M. Batenburg, J.W. Bos, C. Visser & C.T. Verrips. 1992. Cloning of the *Pseudomonas glumae* lipase gene and determination of the active site residues. *Applied Environmental Microbiology* 58(12): 3787-3791.
- Guex N. & M.C. Peitsch. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18(15): 2714-2723. <http://dx.doi.org/10.1002/elps.1150181505>
- Gupta G.N., V.K. Singh & V. Prakash. 2015. Molecular modeling and docking studies of cold active lipase from *Pseudomonas fluorescens*. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* 6: 59-66.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hasan F., A.A. Shah & A. Hameed. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 235-251. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.016>
- Houde A., A. Kademi & D. Leblanc. 2004. Lipases and their industrial applications: an overview. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 118(1-3): 155-170. <http://dx.doi.org/10.1385/ABAB:118:1-3:155>

- Ihara F., Y. Kageyama, M. Hirata, T. Nihira & Y. Yamada. 1991. Purification, characterization, and molecular cloning of lactonizing lipase from *Pseudomonas* Species. *Journal of Biological Chemistry* 266(27): 18135-18140.
- Jaeger K.E., B.W. Dijkstra & M.T. Reetz. 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Review of Microbiology* 53: 315-351. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.315>
- Jorgensen S., K. Skov & B. Diderichsen. 1991. Cloning, sequence, and expression of a lipase gene from *Pseudomonas cepacia*: Lipase production in heterologous hosts requires two *Pseudomonas* genes. *Journal of Bacteriology* 173: 559-567. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.173.2.559-567.1991>
- Kim H.K., Y-J. Jung, W-C. Choi, H.S. Ryu, T-K. Oh & J-K. Lee. 2004. Sequence-based approach to finding functional lipases from microbial genome databases. *FEMS Microbiology Letters* 235: 349-355. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09609.x>
- Koressaar T. & M. Remm. 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23(10): 1289-91. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btm091>
- Lanka S., V. R. Talluri, V. Ganesh & J.N.L. Latha. 2015. Homology Modeling, Molecular Dynamic Simulations and Docking Studies of a New Cold Active Extracellular Lipase, EnL A from *Emericella nidulans* NFCCI 3643. *Trends in Bioinformatics* 8(2): 37-51. <http://dx.doi.org/10.3923/tb.2015.37.51>
- Louwrier A. 1998. Industrial products: the return to carbohydrate-based industries. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 27: 1-8. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1470-8744.1998.tb01368.x>
- Lüthy R., J.U. Bowie & D. Eisenberg. 1992. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* 356: 83-85. <http://dx.doi.org/10.1038/356083a0>
- Messaoudi A., H. Belguith & J.B. Hamida. 2011. Three-Dimensional Structure of *Arabidopsis thaliana* Lipase Predicted by Homology Modeling Method. *Evolutionary Bioinformatics* 7: 99-105. <http://dx.doi.org/10.4137/EBO.S7122>
- Monsia T. & P. Monsia. 2013. A review on "microbial lipase-versatile tool for industrial applications". *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research* 2: 1-16.
- Park I.H., S.H. Kim, Y.S. Lee, S.C. Lee, Y. Zhou, C.M. Kim, S.C. Ahn & Y.L. Choi. 2009. Gene Cloning, Purification, and Characterization of a Cold-Adapted Lipase Produced by *Acinetobacter baumannii* BD5. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19(2): 128-135. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.0802.130>
- Petersen T.N., S. Brunak, G. Heijne & H. Nielsen. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8: 785-786. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1701>
- Ritchie D.W., D. Kozakov & S. Vajda. 2008. Accelerating and Focusing Protein-Protein Docking Correlations Using Multi-Dimensional Rotational FFT Generating Functions. *Bioinformatics* 24(17): 1865-1873. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btn334>
- Rost B. 1999. Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Engineering* 12: 85-94. <https://doi.org/10.1093/protein/12.2.85>
- Ruiz C., A. Blanco, F.I. Pastor & P. Diaz. 2002. Analysis of *Bacillus megaterium* lipolytic system and cloning of LipA, a novel subfamily I.4 bacterial lipase. *FEMS Microbiology Letters* 217(2): 263-267. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11485.x>
- Saeed H.M., T.I. Zaghoul, A.I. Khalil & M.T. Abdelbaeth. 2006. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of *Pseudomonas aeruginosa* lipase gene. *Biotechnology* 5(1): 62-68. <http://dx.doi.org/10.3923/biotech.2006.62.68>
- Sangeetha R., I. Arulpandi & A. Geetha. 2014. Molecular characterization of a proteolysis-resistant lipase from *Bacillus pumilus* SG2. *Brazilian Journal of Microbiology* 45(2): 389-393. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822014000200004>
- Schiraldi C., M. Giuliano & M. De Rosa. 2002. Perspectives on biotechnological applications of archaea. *Archaea* 1(2): 75-86. <http://dx.doi.org/10.1155/2002/436561>
- Sullivan E.R., J.G. Leahy & R.R. Colwell. 1999. Cloning and sequence analysis of the lipase and lipase chaperone-encoding genes from *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1, and redefinition of a Proteobacterial lipase family and an analogous lipase chaperone family. *Gene* 230(2): 277-285. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00026-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00026-8)
- Tan Y. & K.J. Miller. 1992. Cloning, expression, and nucleotide sequence of a lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* B52. *Applied and Environmental Microbiology* 58(4): 1402-1407.
- Thompson J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin & D.G. Higgins. 1997. The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25(24): 4876-4882. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>
- Untergasser A., I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B.C. Faircloth & M. Remm, S.G. Rozen. 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15): e115. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Vivas-Reyes R., M. Ahumado & J. Cabezas. 2010. Modelamiento por homología de la estructura tridimensional de la fosfolipasa A₂ citosólica pancreática dependiente de calcio presente en *Rattus norvegicus*. *Revista colombiana de química* 39(2): 181-197. <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim>
- Wang C., R. Guo, H. Yu & Y. Jia. 2008. Cloning and sequence analysis of a novel cold-adapted Lipase Gene from strain lip 35 (*Pseudomonas* sp.). *Agricultural Sciences in China* 7: 1216-1221. [http://dx.doi.org/10.1016/S1671-2927\(08\)60167-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1671-2927(08)60167-4)
- Wohlfarth S., C. Hoesche, C. Strunk & U.K. Winkler. 1992. Molecular genetics of the extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of General Microbiology* 138(7): 1325-1335. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-138-7-1325>
- Yang A.S. & B. Honig. 2000. An integrated approach to the analysis and modeling of protein sequences and structures. III. A comparative study of sequence conservation in protein structural families using multiple structural alignments. *Journal of Molecular Biology* 301: 665-711. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.2000.3975>