

**Lipasas en actinomicetos: Caracterización bioinformática de una isoforma con la mayor  
identidad de secuencia con Lip B de *Candida antarctica***

Jorge Leonardo Mejía Sánchez

Trabajo de Grado para optar al título de Biólogo

Director

Jorge Hernández Torres

Ph.D. Doctorât ès Sciences

Codirectora

Leidy Rocío Pico Martínez

Bióloga, Candidata a Maestría en Biología

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2018

## Resumen

**Título:** Lipasas en actinomicetos: Caracterización bioinformática de una isoforma con la mayor identidad de secuencia con Lip B de *Candida antártica*.

**Autor:** Jorge Leonardo Mejía Sánchez<sup>1-2</sup>

**Palabras clave:** Lipasa, CALB, actinomicetos, modelamiento por homología, análisis estructural, simulaciones de dinámica molecular, estabilidad de la proteína, termoestabilidad, acoplamiento molecular

Las lipasas (EC 3.1.1.3) se encuentran entre las enzimas más utilizadas en procesos biotecnológicos y de las más exploradas en la producción de biodiesel. La lipasa B de *Candida antártica* (CALB) es un referente funcional en la industria de los biocombustibles; no obstante, la sobreexpresión heteróloga en *Escherichia coli* no alcanza los niveles de producción cuando se emplean hospederos fúngicos. La presencia de actinomicetos en ambientes oleosos y sus comprobadas actividades lipolíticas exógenas sugieren que las actinobacterias podrían codificar lipasas tan eficientes como CALB. Las bases de datos predicen un gran número de enzimas lipolíticas en actinomicetos que carecen de caracterización funcional y estructural. Esta investigación se enfocó en la selección y caracterización *in silico* de una isoforma de lipasa en actinomicetos, con la condición de presentar la mayor identidad de secuencia posible con CALB. Se eligió la secuencia de 321 aa de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 (Amyco\_LipB). Los análisis *in silico* revelaron la conservación de los aminoácidos Ser, Asp e His que componen la tríada catalítica, el pentapéptido “GXSXG” y el dipéptido HG encontrados comúnmente en las lipasas pertenecientes a la superfamilia del plegamiento  $\alpha/\beta$  hidrolasa. Se construyó un modelo 3D por homología y se realizaron simulaciones de acoplamiento molecular *in silico*. Los resultados de interacción enzima-sustrato con ésteres de pNP apuntan a que esta proteína es, en efecto, una lipasa/esterasa. Se realizaron simulaciones de dinámica molecular con el fin evaluar la estabilidad del modelo estructural en diferentes temperaturas. Tomados en conjunto, los resultados sugieren que la proteína de Amyco\_LipB podría reemplazar a CALB en reacciones de hidrólisis de triglicéridos, requisito indispensable para probar su potencial en reacciones de transesterificación. El paso por seguir será la sobreexpresión en *E. coli* para poner a prueba la nueva lipasa Amyco\_LipB en reacciones *in vitro*.

- 
1. Trabajo de grado.
  2. Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, UIS. Director: Jorge Hernández Torres, Ph.D.  
Co-directora: Leidy Rocío Pico Martínez, Bióloga.

### Abstract

**Title:** Lipases in actinomycetes: Bioinformatic characterization of an isoforme with the highest sequence identity with Lip B of of *Candida antarctica*.

**Author:** Jorge Leonardo Mejía Sánchez<sup>1-2</sup>

**Key words:** Lipase, CALB, actinomycetes, homology modelling, molecular dynamics simulations, protein stability, thermostability, molecular docking

Lipases (EC 3.1.1.3) are among the enzymes most commonly used in biotechnological processes and those most explored in the production of biodiesel. The lipase B of *Candida antarctica* (CALB) is a functional reference in the biofuels industry; However, heterologous overexpression in *Escherichia coli* does not reach production levels when fungal hosts are used. The presence of actinomycetes in oily environments and their proven exogenous lipolytic activities points that actinobacteria could encode lipases as efficient as CALB. The databases predict a large amount of lipolytic enzymes in actinomycetes that lack functional and structural characterization. This work focused on the selection and characterization in silico of an isoform of lipase in actinomycetes, with the condition of showing the highest possible sequence identity with CALB. The 321 aa sequence of *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 (Amyco\_LipB) was chosen. The silico analyzes revealed the conservation of the amino acids. Ser, Asp and His that make up the catalytic triad, the pentapeptide "GX SXG" and the dipeptide HG are included in the lipases belonging to the folding superfamily  $\alpha/\beta$  hydrolase. A 3D model was constructed by homology and simulations of in silico molecular coupling were performed. The results of the enzyme-substrate interaction with pNP esters suggest that this protein is, in effect, a lipase / esterase. Molecular dynamics simulations were carried out in order to evaluate the stability of the structural model at different temperatures. Taken together, the results of the Amyco\_LipB protein could replace CALB in triglyceride hydrolysis reactions, a prerequisite for testing its potential in transesterification reactions. The step to follow will be overexpression in *E. coli* to test the new Amyco\_LipB lipase in vitro reactions.

- 
1. Undergraduate paper.
  2. Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, UIS. Director: Jorge Hernández Torres, Ph.D. Co-directora: Leidy Rocío Pico Martínez, Bióloga.

### **Agradecimientos**

Este proyecto de grado es producto de gran esfuerzo y dedicación, en el cual participaron distintas personas opinando, aconsejándome, dándome ánimo, brindándome ayuda y apoyo cuando lo necesité, teniéndome paciencia, acompañándome en los momentos de estrés e incertidumbre, así como en los momentos de alegría y satisfacción. A lo largo del desarrollo de este proyecto, tuve la oportunidad de vivir diferentes experiencias que iban más allá del contexto académico. Por lo tanto, quisiera agradecer:

A la Universidad Industrial de Santander, por ser el lugar en el cual pude alcanzar mi objetivo de ser un profesional.

A la Escuela de Biología y todos sus docentes, por brindarme un camino lleno de conocimiento y experiencias inolvidables durante mis años de formación como Biólogo.

A mis directores, el profesor Jorge Hernández y la bióloga Leidy Pico, por su ayuda brindada en la realización de mi proyecto de grado, y su gran apoyo para poder culminarlo.

A la profesora María Isabel, y a todos los integrantes del laboratorio de Hidrobiología, por haberme acogido como un miembro más de su equipo, y darme la oportunidad de crecer personal y profesionalmente.

A mi compañera de estudios y gran amiga, Alejandra, por los momentos de crisis y satisfacción que compartimos durante nuestros años de estudio y durante el desarrollo de nuestros respectivos trabajos de grado, y en especial, por brindarme la herramienta que hizo posible la realización de mi proyecto.

A Jainy, por estar siempre ahí, dándome alientos en los momentos en los que más lo necesité. Por brindarme su amistad incondicional durante todos estos años, por todas las risas y lágrimas que compartimos, y por saber entenderme de una forma única.

A mis padres, Mónica y Leonardo, por su esfuerzo y lucha interminables por otorgarme todo lo que necesité para poder alcanzar mis objetivos académicos y profesionales. Por su cariño y amor, y por su compañía y apoyo incondicional desde mi ingreso a la universidad hasta la culminación de mis estudios. Por enseñarme que los sacrificios valen la pena y, por inculcarme en mi el carácter y las herramientas necesarias para poder lograr todo lo que me proponga. Este trabajo está especialmente dedicado a ustedes. No existen palabras para expresar cuán agradecido estoy.

A todos ustedes y a muchas personas que por evitar extenderme demasiado no pude nombrar, ¡muchísimas gracias!

## Contenido

Introducción	14
1. Objetivos de la investigación	17
1.1 Objetivo General	17
1.2 Objetivos específicos	17
2. Materiales y métodos	18
2.1 Selección y análisis de la secuencia	18
2.2 Análisis de la estructura primaria de Amyco_LipB	18
2.3 Modelado por homología de la estructura 3D y validación del modelo	18
2.4 Simulación de dinámica molecular y análisis de la trayectoria	19
2.5 Acoplamiento molecular de ésteres de para-nitrofenol (pNP) a la lipasa	20
3. Resultados	21
3.1 Selección y análisis de la secuencia	21
3.2 Análisis de la estructura primaria de Amyco_LipB	25
3.3 Modelado por homología de la estructura tridimensional	26
3.4 Estabilidad conformacional del modelo 3D de Amyco_LipB	33
3.4.1 Dinámica conformacional del modelo M1 en comparación con CALB	37
3.4.2 Dinámica conformacional del modelo M1 a diferentes temperaturas	39
3.4.3 Flexibilidad estructural y termoestabilidad de la enzima Amyco_LipB	47
3.5 Acoplamiento molecular de ésteres de pNP a la lipasa	49
4. Discusión	56
5. Conclusiones	60
Referencias bibliográficas	61

**Lista de tablas**

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la proteína Amyco_LipB determinadas con el servidor ProtParam.	22
Tabla 2. Resumen de las características de los dominios encontrados en Pfam e InterPro.	25
Tabla 3. Resultados comparativos de la validación de estructuras en los diferentes servidores de los modelos obtenidos.	31
Tabla 4. Estabilidad estructural en base al RSDM de los átomos del esqueleto de la proteína (backbone) y los residuos de la tríada catalítica (Ser-Asp-His). Los resultados se expresan en términos de nanómetros (nm). Los asteriscos (*) junto a las temperaturas hacen referencia a M1.	36
Tabla 5. Variables estimadas para determinar la estabilidad conformacional de los modelos durante la trayectoria. Los valores se expresan en términos de nanómetros (nm). Los asteriscos (*) junto a las temperaturas hacen referencia a M1. $\bar{x}$ = promedio aritmético.	43
Tabla 6. Comparación del promedio de energía de unión de M1 y 1TCB con ésteres de pNP antes y después del refinamiento estructural.	50
Tabla 7. Comparación de los enlaces de hidrógeno formados con los residuos de M1 con ésteres de pNP. Se muestran los datos correspondientes a los enlaces de interacción formados en la conformación de mayor energía de unión durante el acoplamiento.	53
Tabla 8. Aminoácidos del modelo M1 que presentan interacción con ésteres de pNP. a) pNP Acetato:C8 (morado), b) pNP Butirato:10 (rojo), c) pNP Palmitato:C22 (azul).	55

## Lista de figuras

- Figura 1. Arriba: Estructura primaria de Amyco\_LipB. Abajo, composición en aminoácidos. 23
- Figura 2. Perfil de hidrofobicidad en la escala de Kyte y Doolittle calculado en ProtScale.  
Tamaño de ventana de 9 aminoácidos. 24
- Figura 3. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de Amyco\_LipB. a) Alineamiento con la lipasa CALB de *C. antarctica*. Los aminoácidos putativos que conforman la tríada catalítica se encuentran indicados en el recuadro de color rojo. b) Alineamiento con lipasas de los géneros *Amycolatopsis* (A\_) y *Streptomyces* (S\_). Las posiciones de los aminoácidos putativos que conforman la tríada catalítica se encuentran indicadas en el recuadro de color rojo. El motivo GxSxG conservado y el dipéptido HG están subrayados en color azul. Los aminoácidos idénticos entre las secuencias están marcados con asteriscos. Los aminoácidos con sustituciones conservadas y semiconservadas se señalan con dos puntos y un punto, respectivamente. 27
- Figura 4. Superposición estructural de los modelos por homología con la estructura molde (1TBC). a) M1 (color verde). b) M2 (color negro). 28
- Figura 5. Diagrama de la calidad local de los modelos en base a la energía de interacción de sus residuos en ProSA web. a) 1TCB, b) M1, c) M2.* 29
- Figura 6. Diagrama de Ramachandran. Se observa la distribución de los aminoácidos de los modelos por homología y el molde. a) 1TCB, b) M1, c) M2. 30
- Figura 7. Estructuras secundarias de los modelos tridimensionales. Las figuras a (1TCB) y b (M1) muestran el diagrama simplificado del plegamiento de los modelos y la posición de los aminoácidos de la tríada catalítica (puntos de color negro). Las figuras c (1TCB) y d (M1) ilustran la representación espacial de las estructuras secundarias de los modelos 3D. La

tríada catalítica ubicada dentro núcleo del plegamiento en los bucles (color gris) se representa con barras y esferas de color blanco y negro, respectivamente. Los números hacen relación al orden consecutivo de la secuencia en que se codifican las hélices  $\alpha$  (color rojo) y láminas  $\beta$  (color morado) en el plegamiento estructural. 32

Figura 8. Alineamiento estructural de los modelos de CALB (gris) y M1 (verde). El acercamiento a la tríada catalítica muestra a los residuos Ser-Asp-His (azul) de M1 superpuestos sobre los residuos del sitio activo de la estructura de CALB (rojo). 32

Figura 9. Estructuras obtenidas a 300K después del refinamiento por minimización de energía. Alineamiento estructural de 1TCB (Figura 9a) y M1 (Figura 9b) con acercamiento a los residuos de la tríada catalítica. Colores: Gris = 1TCB, amarillo = 1TCB después de EM, verde = M1, rojo = M1 después de EM. 34

Figura 10. Equilibrio de la temperatura del sistema durante las simulaciones de dinámica molecular. 34

Figura 11. Estructuras del modelo M1 obtenidas después del refinamiento por EM en las simulaciones DM a diferentes temperaturas. a) M1-283K, b) M1-300K, c) M1-330K, d) M1-360K, e) M1-400K 35

Figura 12. RSDM del esqueleto de la proteína en el tiempo. Se realizaron 3 ensayos de simulación MD a cada sistema. Se observan las trayectorias correspondientes a los tres ensayos realizados para la estructura 1TCB (control) y el modelo M1 a diferentes temperaturas. 36

Figura 13. RSDM de los átomos de los residuos de la tríada catalítica Ser-Asp-His en el tiempo. Se realizaron 3 ensayos de simulación MD a cada sistema. Se observan las trayectorias

- correspondientes a los tres ensayos realizados para la estructura 1TCB (control) y el modelo M1 a diferentes temperaturas. 37
- Figura 14. Perfil de estabilidad estructural del sistema comparado entre 1TCB y M1 a 300K. 38
- Figura 15. RMSD de M1 durante la trayectoria. a) RMSD backbone. b) RMSD de los residuos de la tríada catalítica (Ser-Asp-His). 40
- Figura 16. Perfil de estabilidad estructural del modelo M1 comparado en diferentes temperaturas. 42
- Figura 17. Cambios conformacionales de la estructura M1 a diferentes temperaturas. En color gris se observa la conformación inicial de la enzima en cada simulación supuesta con su imagen estructural a los 10 ns, 20 ns, 30 ns, 40 ns. 45
- Figura 18. Distancias interatómicas entre los residuos Ser-Asp, Ser-His, Asp-His de la tríada catalítica de la enzima. 46
- Figura 19. Promedio de distancias interatómicas entre los residuos Ser-Asp, Ser-His, Asp-His de la tríada catalítica de la enzima. 46
- Figura 20. Perfiles de RMSF y Factor B del esqueleto de la proteína M1 a diferentes temperaturas. Las escalas fueron igualadas para facilitar su comparación. Las curvas interrumpidas del Factor B (B-factor) indican que los valores superan el umbral establecido para el eje Y (derecha). 48
- Figura 21. Ilustración del Factor B en la estructura M1 a diferentes temperaturas. Los valores cercanos a 0 indican regiones rígidas y los valores mayores o igual que 200 regiones flexibles de la enzima. 49
- Figura 22. Detalles estructurales de la interacción del modelo M1 con ésteres de pNP. Se ilustra la representación de la masa molecular (verde) de la enzima y la representación parcial de su

estructura secundaria (gris). a) pNP Acetato:C8 (morado), b) pNP Butirato:10 (rojo), c) pNP Palmitato:C22 (azul).

52

Figura 23. Interacción de los ésteres de pNP con el modelo M1. El sustrato y los residuos (gris) se representan con barras. Se demarcan los residuos con los que el sustrato presenta interacción cercana (verde) y los residuos con los que forma enlaces de hidrógeno (rojo) con círculos punteados. Las líneas de color verde indican la distancia de la interacción enzima-sustrato.

54

## Introducción

Las lipasas (EC 3.1.1.3) son enzimas que catalizan la hidrólisis de triacilgliceroles en glicerol y ácidos grasos libres (Sandoval, 2012). Además de esta función, también pueden actuar en reacciones de esterificación, interesterificación y transesterificación (Kiran *et al.*, 2016). Las lipasas hacen parte de la superfamilia de proteínas de plegamiento  $\alpha/\beta$  hidrolasa y su sitio activo se compone de una tríada catalítica de Ser, Asp/Glu y His, donde la serina se encuentra ubicada dentro del pentapéptido altamente conservado GXSXG (Kapoor & Gupta, 2012). Estas enzimas se encuentran en microorganismos, plantas y animales (Pahoja & Sethar, 2002). No obstante, las lipasas microbianas han despertado un interés creciente a nivel industrial, debido a su versatilidad, estereoselectividad, estabilidad y capacidad de síntesis en presencia de interfases acuosas y no acuosas (Dandavate *et al.*, 2009). Las lipasas microbianas representan el grupo de enzimas más usadas en procesos biotecnológicos y químicos (Javed *et al.*, 2017). Dentro de éstas, la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) es una enzima extensamente utilizada en biotecnología e investigación, debido a su amplia especificidad de sustratos y alta actividad en interfases. La diversidad aplicaciones incluye reacciones de transesterificación para producir biodiésel (Housaindokht *et al.*, 2012).

En la última década, se ha explorado el uso de lipasas microbianas en la producción de biodiésel como un catalizador energéticamente más rentable y ambientalmente favorable (Fjerbaek *et al.*, 2009). La lipasa de referencia, mayormente estudiada y con altas tasas de producción de biodiésel, es la lipasa CALB de *C. antarctica* (Gog *et al.*, 2012). A pesar de las grandes ventajas económicas y ecológicas, los altos costos de importación (~U.S.\$ 1000/kg) limitan su uso industrial (Budžaki *et al.*, 2018). Se ha reportado que la expresión de lipasas de hongos en hospederos bacterianos no es rentable. Por ejemplo, CALB sobreexpresada en *E. coli* presenta

bajos niveles de expresión atribuido a obstáculos traduccionales (Eom *et al.*, 2013). En consecuencia, la mayoría de las isoformas fúngicas se extrae directamente de los hongos en cultivo o son sobreexpresadas en hospederos eucariotas como *Pichia pastoris*, mejorándose la producción (Larsen *et al.*, 2008). En trabajos relativamente recientes, se ha demostrado que las bacterias producen sus propias lipasas con un potencial catalítico similar a las fúngicas (Terpe, 2006). Paralelamente, los sistemas de expresión bacterianos continúan siendo muy atractivos, debido a su bajo costo y alta productividad (Jaeger *et al.*, 1994a). En un ensayo de producción de biodiésel, la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 sobreexpresada en *E. coli* presentó mayor actividad catalítica comparada con la expresada en la levadura *P. pastoris* (Liu *et al.*, 2017).

Estudios recientes se han enfocado en la búsqueda de isoformas de lipasas bacterianas que compitan funcionalmente con las fúngicas y que se puedan producir localmente a escala industrial (Aceves & Castañeda, 2012; Javed *et al.*, 2017). La mayoría hace referencia a bacterias terrestres y muy escasamente a actinomicetos (Kumar *et al.*, 2017). Las bases de datos predicen una gran diversidad de enzimas lipolíticas en actinomicetos, pero nada se sabe sobre su actividad *in vitro*. No obstante, estas enzimas sin duda ostentan un uso potencial a nivel industrial (Dheeman *et al.*, 2010; Mukhtar *et al.*, 2017). Algunos de los actinomicetos con registro de estudios de actividad lipolítica son *Micrococcus* sp (Lawrence, 1967), *Streptomyces* sp (Vujaklija *et al.*, 2002), *Amycolatopsis* sp (Dheeman *et al.*, 2011) y *Rhodococcus* sp (Bassegoda *et al.*, 2012). No obstante, la mayor parte de la literatura disponible hace referencia a lipasas del género *Streptomyces* (Cardenas *et al.*, 2001; Côté & Shareck, 2008; Large *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2017; Vujaklija *et al.*, 2002). Por consiguiente, si bien las actinobacterias

son reconocidas por sus actividades lipolíticas exógenas, no se ha profundizado en el estudio de sus lipasas.

El propósito de este trabajo fue el de predecir mediante herramientas bioinformáticas actuales, las propiedades estructurales y funcionales de una lipasa del phylum Actinobacteria, clase Actinomycetos. Dado que la lipasa CALB es un referente en la industria, particularmente en la producción de biodiésel, esta investigación se enfocó en la selección y caracterización bioinformática de una lipasa de actinomycetos con la mayor identidad de secuencia con CALB. La estrategia computacional empleada consistió en: 1) Selección de la lipasa candidata; 2) análisis estructural a partir de la secuencia de aminoácidos; 3) predicción de características bioquímicas y fisicoquímicas; 4) modelado por homología y evaluación de la estabilidad conformacional por medio de simulaciones de dinámica molecular; y 5) simulación de interacción enzima-sustrato (*docking*). Los resultados obtenidos sugieren que la secuencia seleccionada, una potencial lipasa de *Amycolatopsis* sp, presenta características estructurales y funcionales similares a CALB. Los resultados justifican la evaluación *in vitro* de esta lipasa.

## 1. Objetivos de la investigación

### 1.1 Objetivo General

- Caracterizar bioinformáticamente una lipasa de actinomicetos con la mayor identidad de secuencia con la lipasa Lip B de *Candida antarctica*.

### 1.2 Objetivos específicos

- Seleccionar una lipasa de actinomicetos con la mayor identidad de secuencia con la lipasa LipB de *Candida antarctica*.
- Predecir las características bioquímicas y fisicoquímicas con base en la estructura primaria.
- Analizar con herramientas bioinformáticas la organización estructural de la lipasa seleccionada.
- Evaluar la estabilidad conformacional por medio de simulaciones de dinámica molecular y la interacción entre enzima y sustrato.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Selección y análisis de la secuencia

La lipasa de actinomicetos se seleccionó de las plataformas Genbank y HMMER. Las búsquedas se realizaron con las herramientas BLASTP del NCBI y PHMMER del EBI. Se tomó como referencia la estructura primaria de CALB de *Candida antarctica* (códigos PDB 1tcb, UniProt P41365). La búsqueda se efectuó específicamente entre los actinomicetos (Actinobacteria, taxid:1760), con los parámetros por defecto. Se seleccionó una secuencia con la mayor identidad y cobertura con respecto a CALB. La predicción de las características fisicoquímicas de la proteína se llevó a cabo con ayuda de las herramientas ProtParam y ProtScale del servidor ExPASy (Gasteiger *et al.*, 2005). Se eligió la tabla de hidrofobicidad de Kyte & Doolittle (1982) para predecir el perfil de hidrofobicidad. La presencia de un potencial péptido señal se determinó empleando el algoritmo de red neuronal artificial, del servidor SignalP 4.1 (Petersen *et al.*, 2011).

### 2.2 Análisis de la estructura primaria de Amyco\_LipB

Con la estructura primaria seleccionada se delimitaron los potenciales dominios en las bases de datos Pfam e InterPro (Bateman *et al.*, 2004; Hunter *et al.*, 2009). Se realizaron alineamientos con la secuencia de CALB y otras lipasas de actinobacterias, con las aplicaciones ClustalW y Muscle. La predicción del sitio activo se realizó en los servidores COFACTOR y MetaPocket 2.0 (Huang, 2009; Roy, Yang, & Zhang, 2012) y mediante alineamientos con CALB y otras lipasas de actinomicetos.

### 2.3 Modelado por homología de la estructura 3D y validación del modelo

La predicción de la estructura 3D se llevó a cabo utilizando el método de modelado por homología en los servidores Web I-TASSER y SWISS MODEL (Schwede *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2015). Se utilizó como molde (*template*) la estructura 3D de CALB (código PDB: 1TCB). Para la elección

del modelo más confiable, se tuvo en cuenta la desviación cuadrática media (RMSD) derivado de la superposición de estructuras con Matras 1.2 (Kawabata, 2003). La calidad de las estructuras modeladas se validó con las herramientas Verify3D y PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993; Lüthy, Bowie, & Eisenberg, 1992), disponibles en el servidor SAVES v5.0 y ProSA (Wiederstein & Sippl, 2007). Los archivos PDB se visualizaron con el software PyMOL v1.8.4.0 (DELANO & L., 2002).

#### **2.4 Simulación de dinámica molecular y análisis de la trayectoria**

Las simulaciones de dinámica molecular (DM) se llevaron a cabo con la programa GROMACS 4.6.5 (Pronk *et al.*, 2013) utilizando el campo de fuerza OPLS-AA (Potencial Optimizado para la Simulación de Líquidos) (Jorgensen, Jorgensen, Maxwell, & Tirado-rives, 1996) y fueron aplicadas condiciones de contorno periódicas. Se utilizó como control la estructura cristalográfica de CALB, código PDB 1tcb. El sistema fue solvatado dentro de una caja cúbica bajo el modelo de agua SPC-216 (carga puntual simple) (Berendsen *et al.*, 1981). La proteína se posicionó en el centro de la caja y se ubicó a 10 Å (1 nm) del borde con las opciones *-c* y *-d* del módulo *editconf*, respectivamente. Las cargas fueron neutralizadas bajo la asignación de iones por defecto del software. Se llevó a cabo una minimización de energía bajo el método de descenso más inclinado para alcanzar un valor de energía potencial máxima de 1000 kJ/mol. El sistema fue equilibrado bajo condiciones isotérmicas e isobáricas a temperatura (NVT) y presión (NPT) constantes durante 1 ns, en cada fase de equilibrio. Se realizaron simulaciones de DM a 5 temperaturas diferentes: 283 K, 300 K, 330 K, 360 K y 400 K, durante una fase de producción de 40 ns. La temperatura de 300 K se aplicó para el sistema modelado de CALB y el modelo por homología seleccionado para su posterior comparación. Las temperaturas fueron seleccionadas con base en trabajos previos que evalúan la termoestabilidad de CALB, en valores que deben soportar una lipasa para su uso a nivel

industrial (Abedi Karjiban *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2017b; Singh, Bulusu, & Mitra, 2015). Se realizaron 3 repeticiones de simulación de DM para cada ensayo de temperatura.

Las trayectorias obtenidas fueron analizadas bajo diferentes variables como la desviación cuadrática media (RMSD), la fluctuación cuadrática media y factor de temperatura (factor B) simulado, el radio de giro, el área de superficie accesible al solvente (SASA) y distancias atómicas. Estas variables se evaluaron para determinar la estabilidad en el tiempo del esqueleto (*backbone*) de la proteína y de los residuos de la triada catalítica. Se utilizaron las opciones *rms*, *RMSF*, *gyrate*, *sasa* y *distance* de GROMACS. El análisis visual de las gráficas y estructuras se llevó a cabo utilizando Xmgrace, Pymol y VDM (Visual Molecular Dynamics) (Humphrey, Dalke, & Schulten, 1996).

## **2.5 Acoplamiento molecular de ésteres de para-nitrofenol (pNP) a la lipasa**

Se realizaron pruebas de acoplamiento molecular para estudiar las interacciones entre el modelo seleccionado y ésteres de pNP (pNP acetato:C8, pNP butirato:C10 y pNP palmitato:C22). Las estructuras de los sustratos fueron obtenidas de la base de datos ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>). Se utilizaron las estructuras proteicas provenientes de la fase de minimización de energía durante las simulaciones de DM. El programa Autodock Tools se utilizó para preparar los complejos proteína-ligando y se ajustaron los siguientes parámetros: eliminación de hidrógenos polares; adición de cargas de Gasteiger; configuración del receptor: se mantuvo rígida durante la simulación; y se permitieron torsiones para los ligandos aceptando todos los enlaces giratorios. Adicionalmente, se delimitaron los posibles residuos aminoacídicos de la tríada catalítica de la lipasa para la determinación de la caja de acoplamiento. Las dimensiones de la caja para la simulación se ajustaron alrededor de los residuos aminoacídicos del sitio activo, con un tamaño de 50 x 60 x 50 Å, con un espaciado y direcciones x, y, z establecidos por defecto. El

acoplamiento molecular fue realizado por el software Autodock 4.2.6 (Morris *et al.*, 2009). Se obtuvieron 100 configuraciones posibles de acoplamiento de cada ligando con el receptor, mediante el algoritmo genético de Lamarck. Se utilizó un tamaño poblacional de 150 y un número máximo de evaluación de energía de 2.500.000. La cantidad máxima de generaciones, la tasa de mutación genética y la tasa de cruzamiento y otros parámetros para la búsqueda se usaron por defecto. Después de la simulación, cada estructura se analizó individualmente para comprobar que las moléculas de los ligandos estuvieran acopladas en los sitios de unión esperados y se estableció su interacción con los aminoácidos clave del sitio activo. Se realizaron 10 repeticiones para cada simulación de acoplamiento. Los resultados obtenidos de cada uno de los 100 cálculos se clasificaron según la energía de unión ligando-receptor (kcal/mol). La conformación con la energía de acoplamiento más baja (más negativa) se seleccionó como la interacción enzima-sustrato más favorable.

### 3. Resultados

#### 3.1 Selección y análisis de la secuencia

Para identificar una proteína de actinomicetos con la mayor identidad y cobertura posibles con la lipasa CALB de *C. antarctica*, se consultaron las bases de datos públicas Genbank y HMMER. Con ayuda de las herramientas de búsqueda BLASTP y PHMMER se eligió la secuencia de 321 aa de *Amycolatopsis sp.* ATCC 39116 (Genbank: WP\_020417691.1). La secuencia WP\_020417691.1, renombrada en este trabajo como Amyco\_LipB, presentó la mayor identidad y cobertura (36% y 93%, respectivamente) en relación con CALB. De acuerdo con la anotación sistematizada del NCBI, la secuencia de Amyco\_LipB pertenece a la categoría de “lipasa”. Los parámetros fisicoquímicos determinados en ProtParam (**Tabla 1**) sugieren que Amyco\_LipB tendría un peso molecular calculado de 33.2 kDa y un punto isoelectrico (pI) teórico de 4.92,

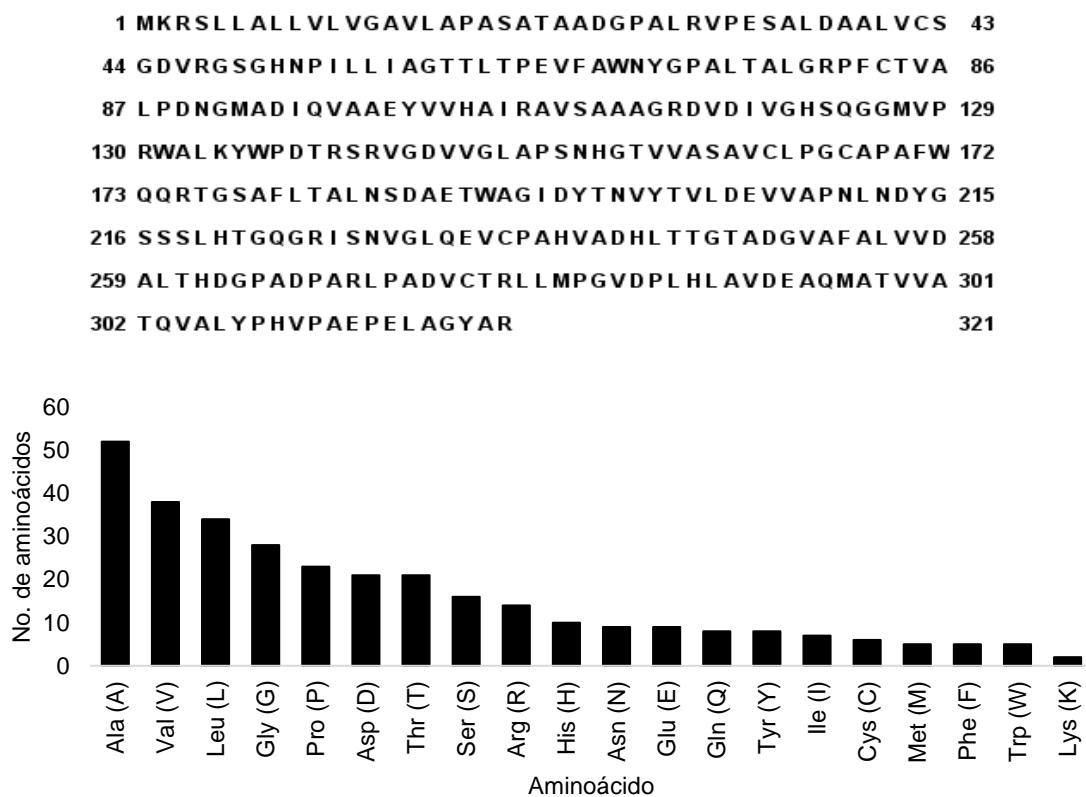
revelando el carácter ácido de la lipasa (Gasteiger, 2005). El programa ProtParam calcula dos índices que indican que la proteína es estable: el índice de inestabilidad (II) y el índice alifático (IA). El índice II provee un estimado de la estabilidad de la proteína en un tubo de ensayo. Valores de inestabilidad menores a 40 se consideran como estables y mayores a 40 inestables. El valor obtenido de 30.64 para II (<40) cataloga a la lipasa como estable. Por otro lado, el índice IA está relacionado con el volumen que ocupan las cadenas alifáticas (A, V, I y L) en la proteína (IKAI, 1980; Guruprasad, 1990; Gasteiger, 2005). El alto valor de AI (100.34) es un indicador positivo para la estabilidad térmica en proteínas globulares (**Tabla 1**). El valor del Promedio General de Hidropatía (GRAVY) refleja el carácter hidrofóbico o hidrofílico de un polipéptido y se calcula sumando los valores de hidropatía de todos los aminoácidos constituyentes, dividido por la suma por la longitud de la secuencia. El valor positivo estimado hace relación a la naturaleza hidrofóbica de los aminoácidos con cadenas alifáticas (Kyte, 1982; Liberman, 2005). Esto se evidencia con el alto porcentaje de Ala, Leu y Val en la composición de aminoácidos de Amyco\_LipB (**Figura 1**). El tiempo de vida media estimado indica que puede ser una proteína que tarda más de 10 h en desaparecer *in vivo*, después de ser sintetizada en *E. coli* (Bachmair, 1986; Gasteiger, 2005).

**Tabla 1.**

Propiedades fisicoquímicas de la proteína Amyco\_LipB determinadas con el servidor ProtParam.

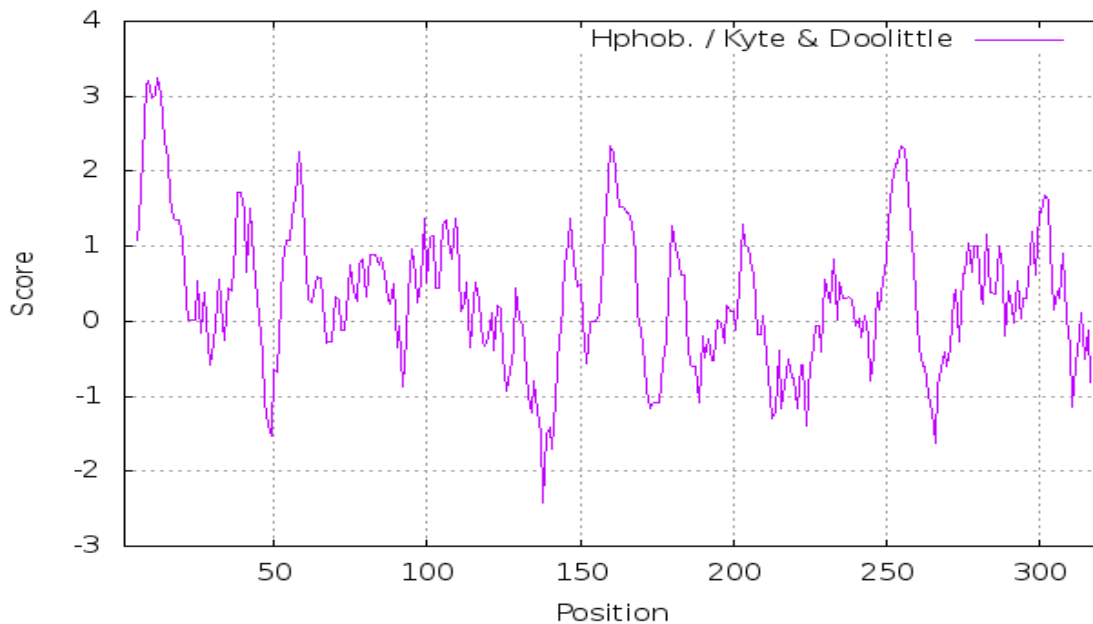
Propiedad fisicoquímica	Valor estimado
Peso molecular (kDa)	33.2
Punto isoeléctrico	4.92
Índice de inestabilidad	30.64
Vida media estimada	>10 h, <i>E. coli</i>
Índice alifático	100.34
Gran promedio de hidropatía (GRAVY)	0.295

El análisis del perfil hidrofóbico de Amyco\_LipB en ProtScale permitió reconocer las regiones hidrofóbicas e hidrofílicas de la proteína. Se eligió un tamaño de ventana de 9 aminoácidos. Las regiones hidrofóbicas se identifican por tener un puntaje positivo por encima de 0 y las regiones hidrofílicas, inferiores a 0 (Gasteiger *et al.*, 2005). El perfil de hidrofobicidad obtenido reveló una fuerte presencia de picos hidrofóbicos, intercalados con algunos segmentos solubles (**Figura 2**); esto sugiere que Amyco\_LipB podría ser de naturaleza preferiblemente hidrofóbica, en solución acuosa, lo que concuerda con el valor del índice GRAVY de 0.295. Como veremos más adelante, estos picos hidrofóbicos están relacionados con las posiciones de los aminoácidos que rodean la zona catalítica de la lipasa.



**Figura 1.** Arriba: Estructura primaria de Amyco\_LipB. Abajo, composición en aminoácidos.

Las proteínas secretadas, tanto de procariotas como eucariotas contienen secuencias conocidas como péptido señal (SP), los cuales direccionan los polipéptidos a su lugar de destino (Coleman *et al.*, 1985). Generalmente, el SP está localizado en la región N-terminal (Tsuchiya *et al.*, 2003). La predicción de un potencial péptido señal en Amyco\_LipB se realizó en el servidor SignalP 4.1. Se determinó la presencia de un posible SP ( $D\text{-cutoff}=0.450$ ) y un sitio de escisión ubicado entre las posiciones 23 y 24 en la secuencia ATA\_AD (**Figura 1**, arriba). Los SP muestran poca similitud a nivel de secuencia y se ha argumentado que el único requisito para su funcionamiento es que estén conformados exclusivamente, o en gran parte, de aminoácidos hidrofóbicos (Williams, Pal, & Hurst, 2000). Esto concuerda con el primer pico encontrado en el perfil de hidrofobicidad de Kyte y Doolittle (**Figura 2**), ubicado en la región de los primeros  $\approx 25$  aminoácidos de la proteína.



**Figura 2.** Perfil de hidrofobicidad en la escala de Kyte y Doolittle calculado en ProtScale. Tamaño de ventana de 9 aminoácidos.

### 3.2 Análisis de la estructura primaria de Amyco\_LipB

La predicción de motivos y dominios conservados de Amyco\_LipB arrojó la presencia del motivo “*Lipasa EstA/Esterasa EstB*” (Interpro: IPR002918) y el dominio “*Lipasa\_2*” (Pfam: PF01674). Estos dominios se encuentran en todas las enzimas lipasa/esterasa que pertenecen a la superfamilia del plegamiento  $\alpha/\beta$  hidrolasa (**Tabla 2**). Este resultado coincide con la anotación de la secuencia en la categoría de “*lipasa*” del NCBI.

**Tabla 2.**

Resumen de las características de los dominios encontrados en Pfam e InterPro.

Base de datos	Familia de proteína	Dominio	Posiciones (inicio - final)	Función
Pfam	Lipasa 2	Lipasa (clase 2)	96 - 242	Actividad hidrolasa
InterProScan 5	Lipasa EstA/Esterasa EstB	Plegamiento Alfa/Beta hidrolasa	22 - 321	Actividad hidrolasa

El análisis de los alineamientos mostró la conservación en Amyco\_LipB del pentapéptido GX SXG (GHSQG), dentro del cual se localiza la serina catalítica y el dipéptido HG que forma el orificio oxianión característico de las lipasas/esterasas (Jaeger *et al.*, 1994b). Mediante alineamiento con la secuencia de CALB y alineamientos múltiples de secuencia con otros géneros de Actinobacteria, se determinó el posible sitio activo de la lipasa: las posiciones Ser123, Asp204 y His242 están conservadas y podrían conformar la tríada catalítica de la lipasa (**Figura 3**). Los resultados obtenidos en los servidores MetaPocket 2.0 y COFACTOR indicaron que Ser123, Asp204 y His242 hacen parte del sitio activo. Adicionalmente, coinciden con la presencia de los aminoácidos Gly59, Thr60, His122, Gln124, Ser152 y Thr156 en la región que formaría el bolsillo de unión al sustrato de la enzima.

### 3.3 Modelado por homología de la estructura tridimensional

La estructura tridimensional se modeló en los servidores SWISS MODEL e I-TASSER, usando como molde la estructura cristalográfica de CALB alojada en la PDB (código 1tcb). Se obtuvieron 6 modelos: uno en SWISS MODEL (**M1**) y 5 en I-TASSER. En el caso de I-TASSER se seleccionó el mejor modelo, denominado **M2**, en base al C-score (-0.66), el cual es un valor de confianza que estima la calidad de las predicciones (rango de -5 a 2) (Yang *et al.*, 2015). La superposición de estructuras (**Figura 4**) evidenció que **M1** cuenta con el valor más bajo de RMSD (0.46 Å), comparado con **M2** (0.65 Å), sugiriendo una mayor similitud con la estructura de CALB. Los valores de RMSD obtenidos son similares a otros modelos por homología de lipasas y sus respectivos moldes. Por ejemplo, la superposición de los modelos con las estructuras molde de las lipasas de *Bacillus thermocatenulatus*, *Burkholderia glumae* y *Pseudomonas aeruginosa* presentaron un valor RMSD <1.2 Å (Hosseini *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2010).

Los modelos fueron evaluados de acuerdo con el puntaje Z (*Z-score*) de la herramienta ProSA, que busca errores posibles en los modelos de estructuras tridimensionales (Wiederstein & Sippl, 2007). Los valores de puntaje Z obtenidos para **M1** (-7.03) y **M2** (-5.88), indican que los modelos son correctos y se ubican dentro de valores que presentan estructuras 3D determinadas por cristalografía de rayos X y RMN. No obstante, **M1** presentó el valor más negativo, similar al puntaje Z de la estructura molde (-7.28). El servidor ProSA genera un análisis que indica la calidad local de los modelos. Las gráficas obtenidas representan las energías de interacción de los residuos y los valores negativos corresponden a partes estables de las moléculas. El diagrama obtenido para los modelos (**Figura 5**) exhibió mayores picos de valores positivos para la estructura **M2**, indicando errores en el modelo, ubicados en el extremo N terminal y en la región de aminoácidos de 250-300.

**a.**

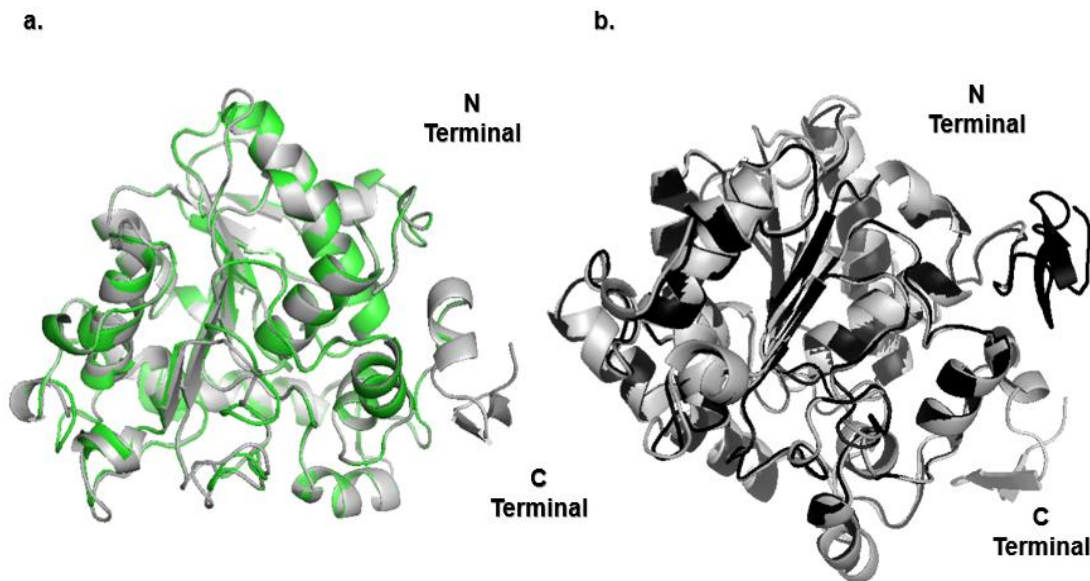
A_ATCC_39116	---	ADGPALRVPESALDAALVCSGDVRSNGHNPIILLIAGTT-LTPEVFAWNYGPFALTALG	56
1TCB		LPSGSDPAFSQPKSVLDAGLTCQGASPSVSKPILLVPGTGTGPOSFDSNWIPLSTQLG	60
		...**:* :*:***.*.*.* . * :****: ** * : * * : * * **	
A_ATCC_39116		RPFCTVALPDNGMADIQVAEEYVVHAIKRAVSAAGR-DVDIVGHSSOGGMVPRWALKYWPD	115
1TCB		YTPCWISPPPFMLNDTQVNTTEYMNATIALYAGSGNKKLPVLTWSSOGGLVAQWGLTFPFS	120
		* : : * : * ** :**:*:* * : * : . : : : ****:* :*.*.:*.	
A_ATCC_39116		TRSRVGDVVGLAPSNHGTVVASAV-CLPGCAPAFWQQRRTGS AFLTALNSDAETWAGIDYT	174
1TCB		IRSKVDRLMFAFDYKGTVLAGPLDALAVSAPSVWQQTGSALTALRNAGGLTQIVPTT	180
		**:* . : : :***. :****:* . : . * .***.*** ***: ***. . . : *	
A_ATCC_39116		NVYTVLDEVVAPNLNDYGSSS--LHTGQGRISNVGLQEVCPAH-VADHLLTTGTADGVAF	231
1TCB		NLYSATDEIVQPQVNSPLDSSYLFNGK----NVQAQAVCGPLFVIDHAGSL-T--SQFS	233
		*:* . **:* * : : : . * * . * : * * * * * * * * : : : * :	
A_ATCC_39116		LVVDA--L-THDGPADPARLPADVCTRLMPGVDPHLHVADEAQMATAVATQVALYPHVP	288
1TCB		YVGRSALRSTTGQARSADYGITDCNPLPANDLTPEQKVAA-AALLAPAAAAIVAGPKQN	292
		** . * : * * * * * . * * . : * : . . * : : . * : . . * :	
A_ATCC_39116		AEPELAGYAR-----	298
1TCB		CEPDLMPYARPFVAVGKRTCSGIVTP	317
		.*:* * **	

**b.**

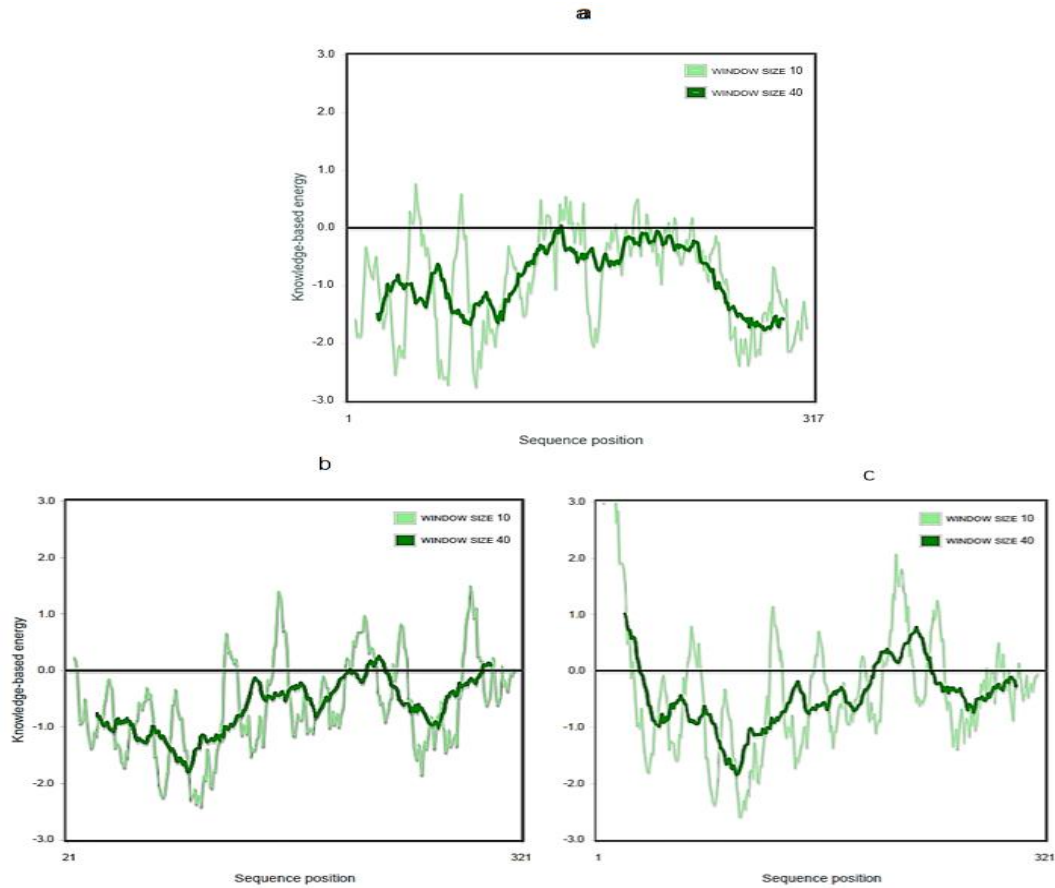
A_ATCC_39116		--DIQVAEEYVVHA-IRAVSAAGRVDIVGHSSOGGMVPRWALKYWPDRSRVGDVVGLA	127
S_coelicolor		LGDIKHSARQLADFDVDEVLRRRTGAQQVDLVGFSOGGMMPRYLNLALGG-GPKVHNVFGIS	165
S_cinnamoneus		--PIPOGAAELKDFVEAVRGATGAEKVDIVGHSSOGGMMPRYVVKFLGG-ADKVDDLVGIV	121
S_exfoliatus		LGPIAASAGQLDAYVDRVLAATGAPEADLVGHSSOGGMMPRYLKLFLGG-AEKVNLVGLA	130
A_mediterranei		VGPIADTTKALAAFGRKVLAAATGAAKLDVGHSSOGGMNVRYWIKYLGG-AGKISRLVGLS	148
S_rimosus		TGDIAKSAGQLDTFVDRVRAATGADKVDLVGHSSOGGMMPRYYIKNLGG-AAKIDKLVAFV	169
		* : : . : . . *:*.****** * : : . : : . * : :	
A_ATCC_39116		PSNHGTVVASAVC----L-----PGCAPAFWQQRRTGS AFLTALNSDAETWAGI	171
S_coelicolor		PSNHGVTQAQGLMNLARQIPGAVELLEQGA VGEVVPVWPQLQHDHFLFORELADLGETTEGV	225
S_cinnamoneus		PSNHGTKNP-----LAIPAG----WTFCPCVDQQVGSDDLKKNLNEGDETPAGP	166
S_exfoliatus		PDNHGTTLLGLTKLLPYFPGAEDLV----SAATPGLADQIAGSAFLTKLNEGDDTVPGV	185
A_mediterranei		PSNHGTDLFGLLSTLERIPGVPVAL----GTACQACNEQAVGSDFLTDLNAGGETVPGI	203
S_rimosus		PTNHGTSLLGFGLLARLIPGADVVA----GAVCPACEQVVGSRFIKELNAGGETDPAV	224
		* ***. : . : * : *	
A_ATCC_39116		DYTNVYTVLDEVVAPNLNDYGSSSLHTGQGRISNVGLQEVCPAHVADHLLTTGTADGVAF	231
S_coelicolor		RHTVIATQYDDVVTPYTSALAK---TEGCVNNIVLQDIDPDDHTPHVSM-PYNATVLN	281
S_cinnamoneus		DYTVVTRYDEVVIPYTSALLTG----PAERLTVNLQDKCPLDLYMHDQA-TKDPVVAQ	221
S_exfoliatus		RHVVIATQYDEVVTPYRSQYLS-----GPNVTNVLQDKCALDLSHVAIGTVDRVAFH	239
A_mediterranei		QYTVIQTRFDVVTPYTSAFLE----AAPNVKNVLLQNVCGLDFTDHLGI-TYDPVAEG	257
S_rimosus		DYTVITTWYDEVVTPYSSAFLA----PARNVNETVQSHCLIDPITHLNI-TYDRFATR	278
		: : * ** * * . : * : * . . * : : . .	

**Figura 3.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de Amyco\_LipB. a) Alineamiento con la lipasa CALB de *C. antarctica*. Los aminoácidos putativos que conforman la tríada catalítica se encuentran indicados en el recuadro de color rojo. b) Alineamiento con lipasas de los géneros *Amycolatopsis* (A\_) y *Streptomyces* (S\_). Las posiciones de los aminoácidos putativos que conforman la tríada catalítica se encuentran indicadas en el recuadro de color rojo. El motivo GxSxG conservado y el dipéptido HG están subrayados en color azul. Los aminoácidos idénticos entre las secuencias están marcados con asteriscos. Los aminoácidos con sustituciones conservadas y semiconservadas se señalan con dos puntos y un punto, respectivamente.

Los modelos fueron evaluados de acuerdo con el puntaje Z (*Z-score*) de la herramienta ProSA, que busca errores posibles en los modelos de estructuras tridimensionales (Wiederstein & Sippl, 2007). Los valores de puntaje Z obtenidos para **M1** (-7.03) y **M2** (-5.88), indican que los modelos son correctos y se ubican dentro de valores que presentan estructuras 3D determinadas por cristalografía de rayos X y RMN. No obstante, **M1** presentó el valor más negativo, similar al puntaje Z de la estructura molde (-7.28). El servidor ProSA genera un análisis que indica la calidad local de los modelos. Las gráficas obtenidas representan las energías de interacción de los residuos y los valores negativos corresponden a partes estables de las moléculas. El diagrama obtenido para los modelos (**Figura 5**) exhibió mayores picos de valores positivos para la estructura **M2**, indicando errores en el modelo, ubicados en el extremo N terminal y en la región de aminoácidos de 250-300.



**Figura 4.** Superposición estructural de los modelos por homología con la estructura molde (1TBC). a) **M1** (color verde). b) **M2** (color negro).

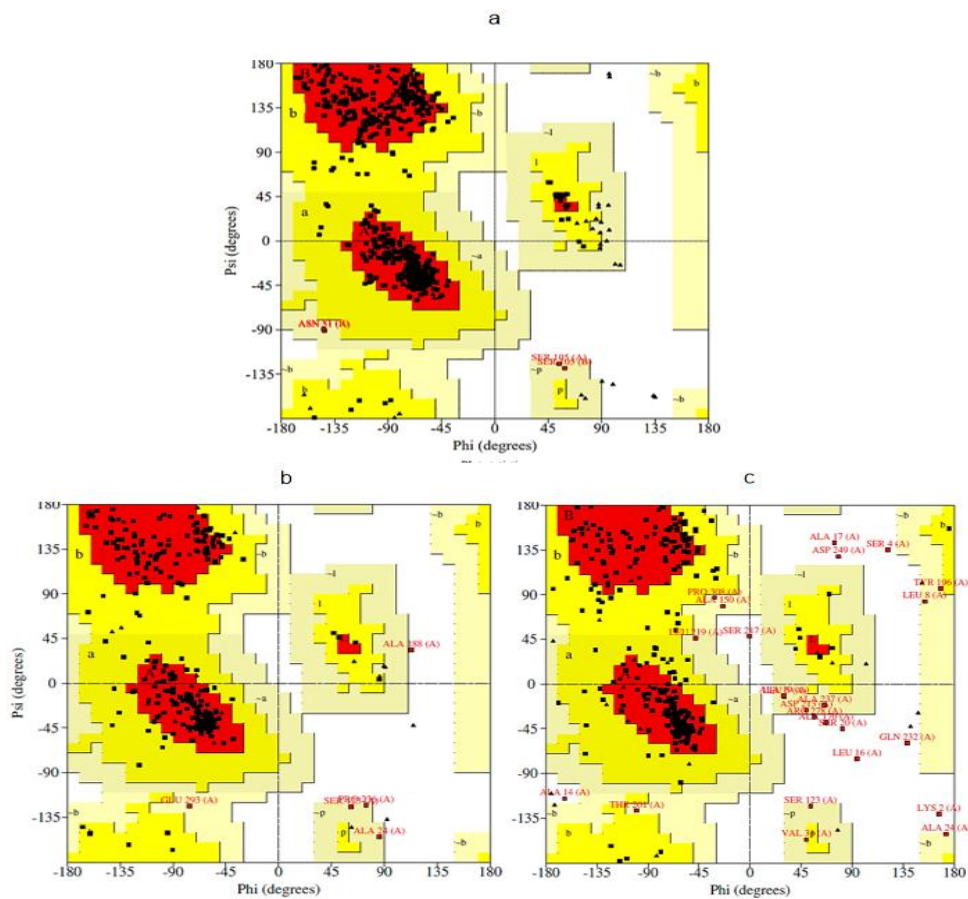


**Figura 5.** Diagrama de la calidad local de los modelos en base a la energía de interacción de sus residuos en ProSA web. a) 1TCB, b) **M1**, c) **M2**.

Para analizar la compatibilidad de la disposición espacial del modelo 3D con su secuencia de aminoácidos (1D), se utilizó la herramienta Verify3D (Lüthy *et al.*, 1992). **M1** presentó el valor más alto con un total de 85% de los aminoácidos con valor  $>0.2$ , lo que indica que es un modelo de buena calidad.

El diagrama de Ramachandran (Hoof, Sander, & Vriend, 1997) demuestra la precisión de un modelo generado mediante la ubicación de los aminoácidos de acuerdo con todas las posibles combinaciones de los ángulos diédricos  $\Psi$  (psi) contra  $\Phi$  (phi), los cuales contribuyen a la formación de las estructuras secundarias. En la **Figura 6** se muestra el diagrama de Ramachandran para Amyco\_LipB, construido con la herramienta PROCHECK (Laskowski *et*

*al.*, 1993). Se puede observar que **M1** mostró una distribución de aminoácidos similar a la de la estructura de CALB. Por otra parte, el diagrama de **M2** presentó una elevada cantidad de residuos fuera de las regiones permitidas, lo que concordó con la estimación de Verify3D y corroboró errores en el modelo. Las estadísticas calculadas en los gráficos revelaron los mejores valores para **M1**, con el 85.6% de residuos ubicados en regiones permitidas y 0.4% de residuos en regiones no permitidas. Tomados en conjunto estos resultados, resumidos en la **Tabla 3**, se consideró válido asumir a **M1** como el modelo más indicado para realizar los análisis posteriores.

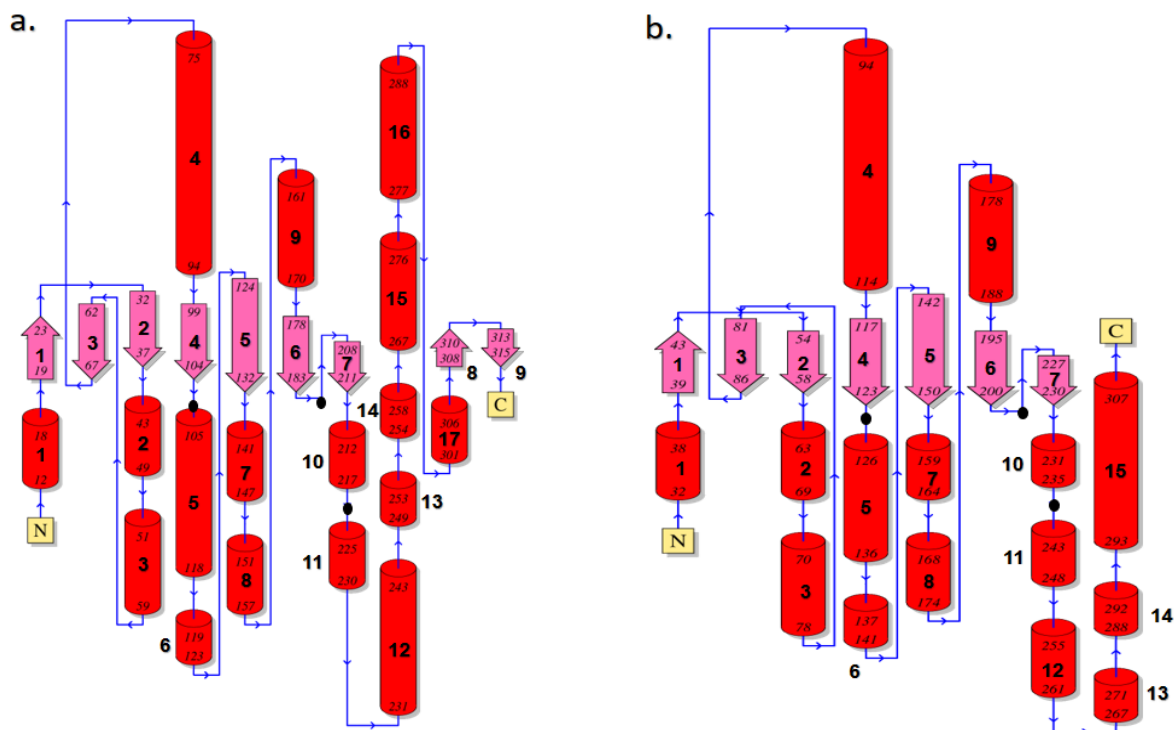


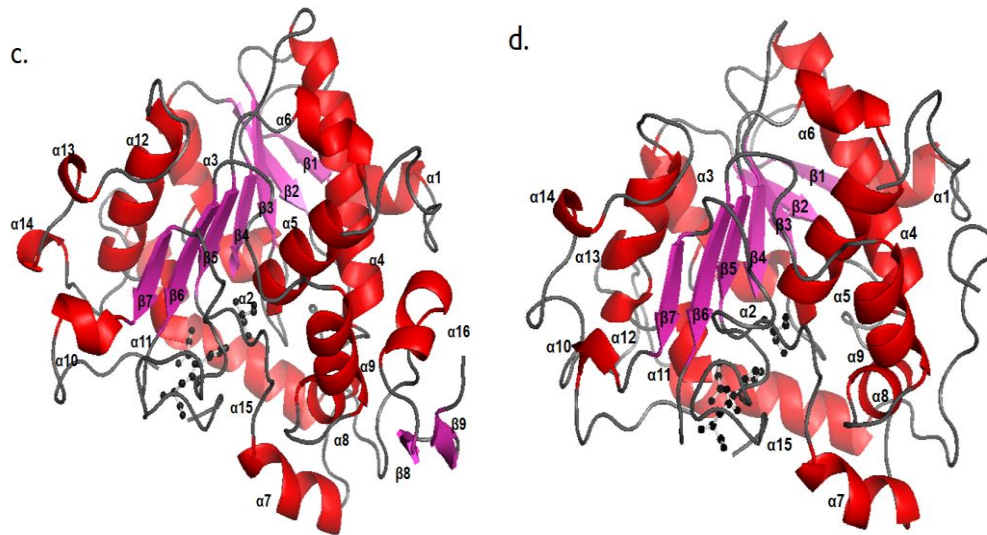
**Figura 6.** Diagrama de Ramachandran. Se observa la distribución de los aminoácidos de los modelos por homología y el molde. a) 1TCB, b) **M1**, c) **M2**.

**Tabla 3.**

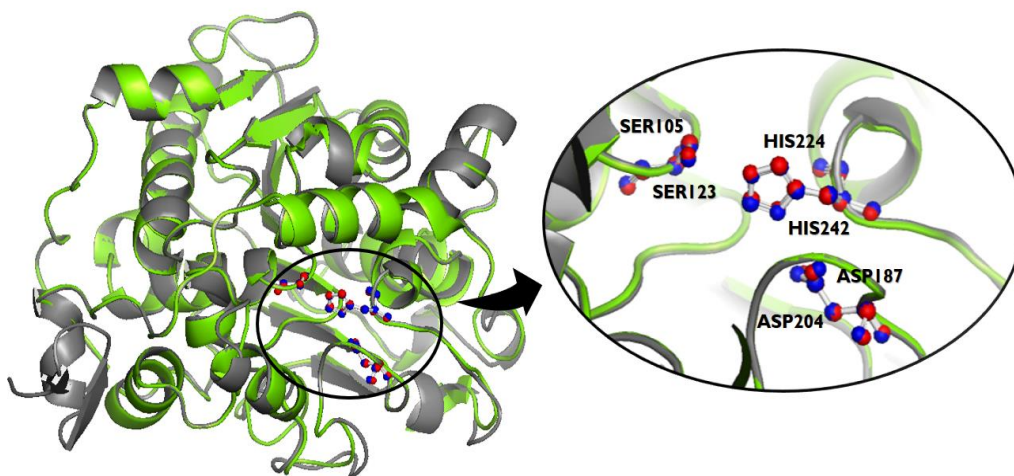
Resultados comparativos de la validación de estructuras en los diferentes servidores de los modelos obtenidos.

Servidor	Propiedad	M1	M2
Matras 1.2	RMS (Å)	0.46	0.65
ProSA Web	Z-score	-7.03	-5.68
Verify3D	3D-1D>0.2 (5)	85.38	74.77
Residuos en las regiones más favorecidas (%)		85.6	71.6
PROCHECK (Diagrama de Rachamandran)	Residuos en regiones permitidas adicionales (%)	12.8	19.8
	Residuos en regiones generosamente permitidas (%)	1.2	4.5
	Residuos en regiones no permitidas (%)	0.4	4.1





**Figura 7.** Estructuras secundarias de los modelos tridimensionales. Las figuras a (1TCB) y b (M1) muestran el diagrama simplificado del plegamiento de los modelos y la posición de los aminoácidos de la tríada catalítica (puntos de color negro). Las figuras c (1TCB) y d (M1) ilustran la representación espacial de las estructuras secundarias de los modelos 3D. La tríada catalítica ubicada dentro núcleo del plegamiento en los bucles (color gris) se representa con barras y esferas de color blanco y negro, respectivamente. Los números hacen relación al orden consecutivo de la secuencia en que se codifican las hélices  $\alpha$  (color rojo) y láminas  $\beta$  (color morado) en el plegamiento estructural.

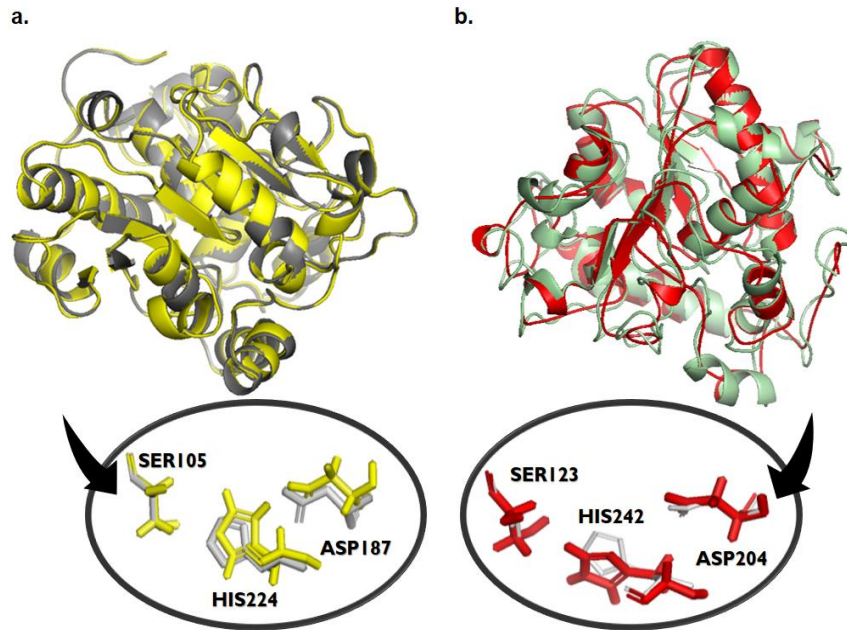


**Figura 8.** Alineamiento estructural de los modelos de CALB (gris) y M1 (verde). El acercamiento a la tríada catalítica muestra a los residuos Ser-Asp-His (azul) de M1 superpuestos sobre los residuos del sitio activo de la estructura de CALB (rojo).

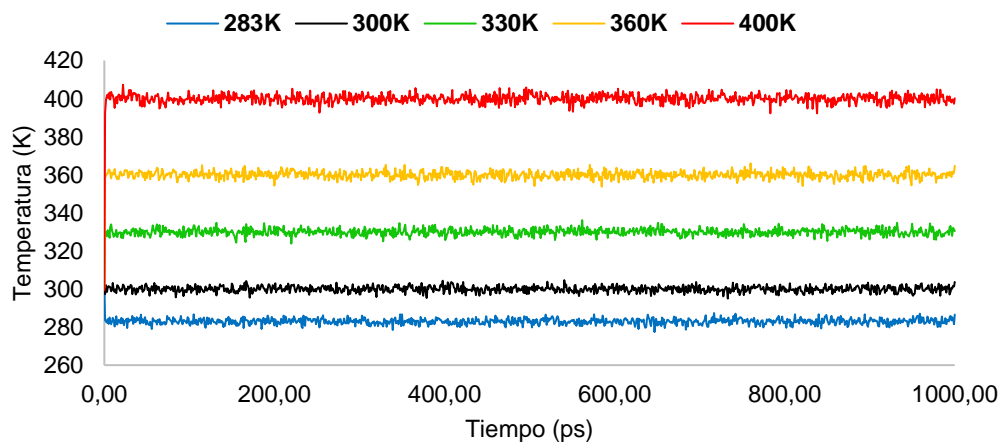
### 3.4 Estabilidad conformacional del modelo 3D de Amyco\_LipB

Con el objetivo de evaluar la estabilidad conformacional del modelo **M1** de Amyco\_LipB, se llevó a cabo una minimización de energía (ME) de la estructura 3D. Esta simulación permite determinar el conformero más estable que puede alcanzar la estructura mediante la optimización a su geometría (Standard, 2015). Para las posteriores comparaciones también se aplicó EM a la estructura control (1TCB). El valor de RMSD para las estructuras resultantes 1TCB y **M1** fue de 0.35 Å y 0.53 Å, respectivamente. Estos valores se reflejaron en el cambio en la longitud global de sus estructuras secundarias, especialmente con el aumento en las regiones desordenadas de bucles, y en la variación de posición espacial de los residuos de la tríada catalítica (**Figura 9**).

Las estructuras 3D de CALB y el modelo **M1** de Amyco\_LipB fueron sometidas a simulaciones de DM durante 40 ns, para comparar su dinámica estructural (1TCB y **M1**). Adicionalmente, con el fin de evaluar la termoestabilidad y flexibilidad de la estructura de la lipasa **M1**, el sistema se calentó a diferentes temperaturas (283K, 330K, 360K, 400K). La precisión del sistema se determinó mediante la fluctuación constante promedio de la temperatura. Todos los sistemas alcanzaron rápidamente su temperatura de simulación (283K a 400K) (**Figura 10**). Adicionalmente, se obtuvo la estructura después de la minimización de energía en cada temperatura (**Figura 11**) y se calculó el valor de RMSD. Se obtuvo un rango de 0.52 a 0.56 Å, lo que indicó que no hubo diferencias significativas entre las estructuras después del refinamiento.



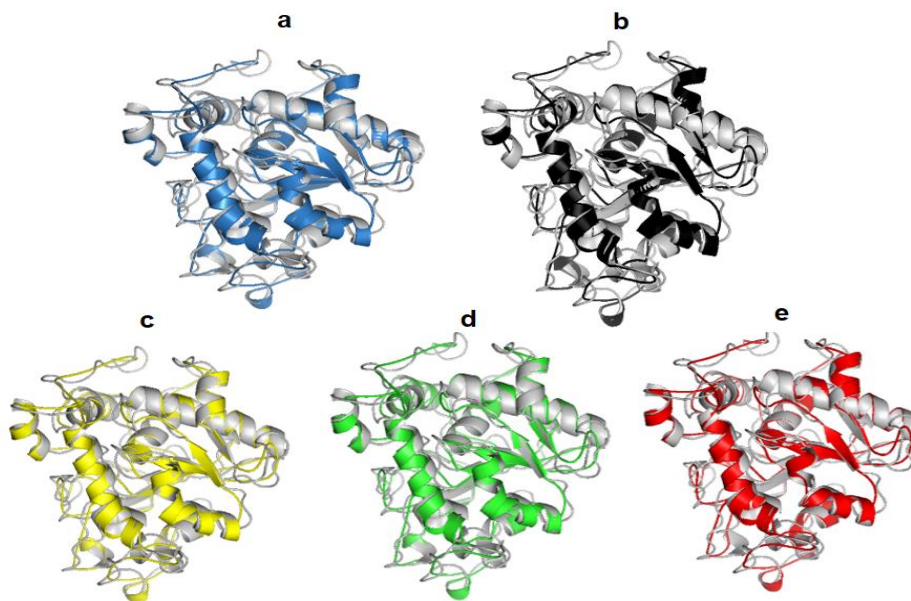
**Figura 9.** Estructuras obtenidas a 300K después del refinamiento por minimización de energía. Alineamiento estructural de 1TCB (**Figura 9a**) y M1 (**Figura 9b**) con acercamiento a los residuos de la tríada catalítica. Colores: Gris = 1TCB, amarillo = 1TCB después de EM, verde = M1, rojo = M1 después de EM.



**Figura 10.** Equilibrio de la temperatura del sistema durante las simulaciones de dinámica molecular.

El valor RMSD es una de las propiedades fundamentales utilizado para establecer si una proteína permanece estable y está cerca de su estructura experimental (Khan *et al.*, 2017b). La dinámica general de las simulaciones (ensayos) muestra diferentes patrones. Por lo tanto, para

analizar la estabilidad se seleccionaron los valores correspondientes al mejor promedio de RMSD. Se realizó un análisis por separado de las trayectorias de RMSD de la cadena principal y de los residuos de la tríada catalítica. Los resultados demostraron que los rangos de fluctuación de RMSD de la cadena principal y los residuos Ser-Asp-His presentaron diferencias entre CALB y **M1**, así como en los sistemas de **M1** a diferentes temperaturas (**Figura 12 y 13**). Los estadísticos básicos calculados se encuentran resumidos en la **Tabla 4**. Adicionalmente, con el fin de realizar un análisis más detallado, se evaluaron diferentes variables que estiman los cambios presentes durante la simulación de DM de diferentes formas que se complementan entre sí: fluctuación cuadrática media (RMSF), factor B, radio de giro (Rg), área superficial de acceso al solvente (SASA) y distancias atómicas (Burney *et al.*, 2015). Se evaluó el comportamiento del sistema **M1** a 300 K comparado con **CALB** (**Figura 14**), así como un análisis de estas variables para las simulaciones de **M1** sometido a diferentes temperaturas.



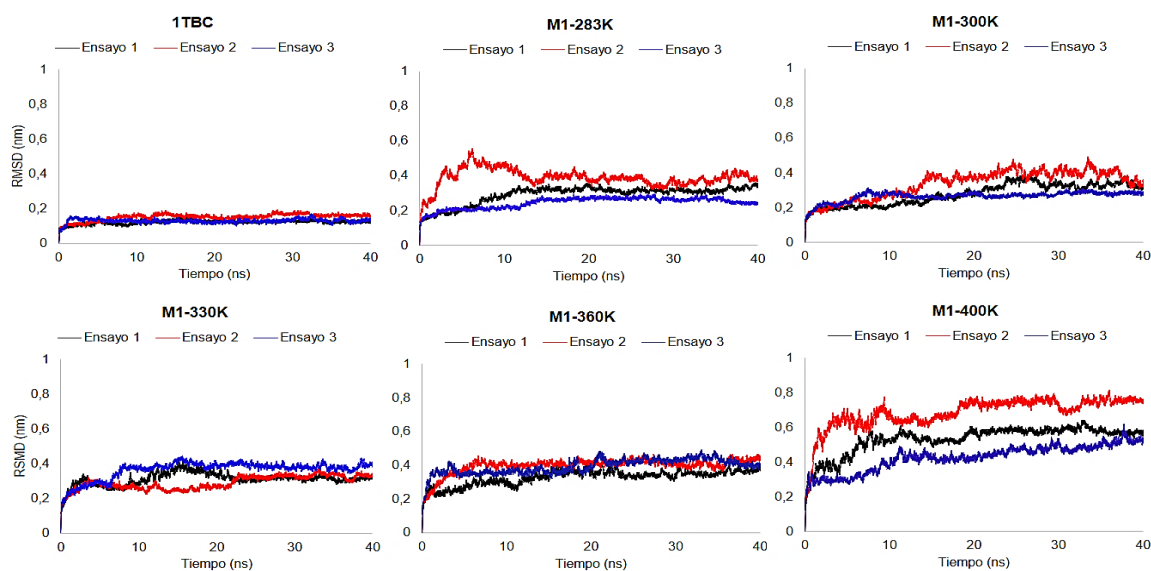
**Figura 11.** Estructuras del modelo **M1** obtenidas después del refinamiento por EM en las simulaciones DM a diferentes temperaturas. a) M1-283K, b) M1-300K, c) M1-330K, d) M1-360K, e) M1-400K

**Tabla 4.**

Estabilidad estructural en base al RSDM de los átomos del esqueleto de la proteína (*backbone*) y los residuos de la tríada catalítica (Ser-Asp-His). Los resultados se expresan en términos de nanómetros (nm). Los asteriscos (\*) junto a las temperaturas hacen referencia a **M1**.

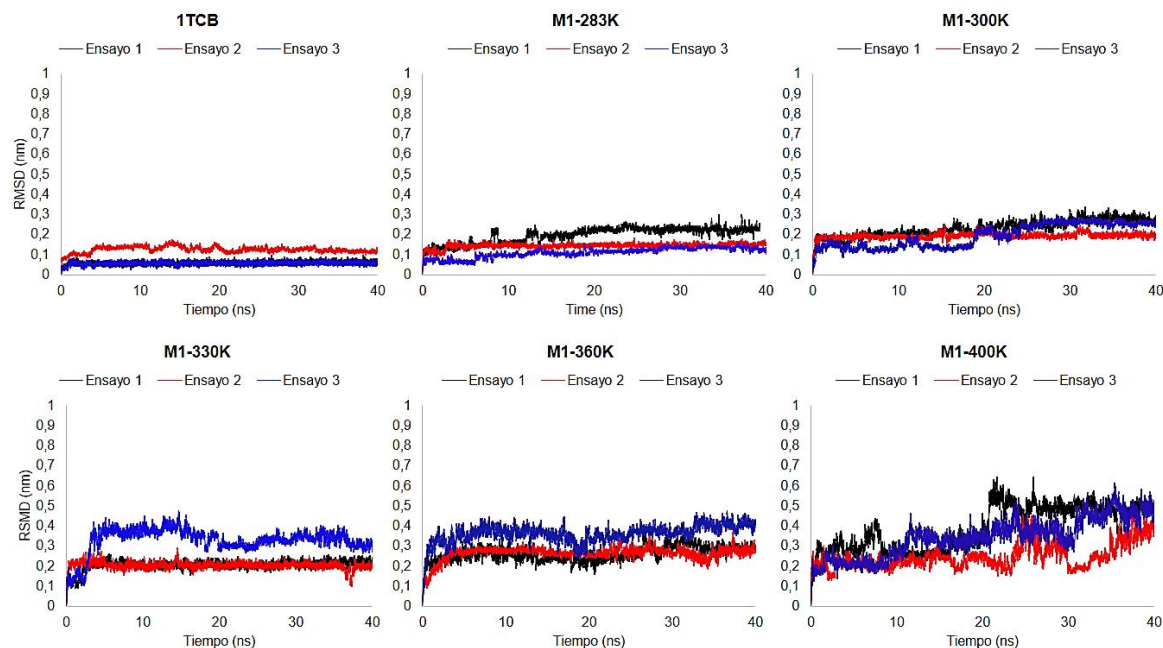
Estructura	Estadística	1TCB	283K*	300K*	330K*	360K*	400K*
<b>Backbone</b>	$\bar{x}$	0.1226	0.1098	0.2657	0.2913	0.3282	0.4253
	$\sigma$	0.0119	0.0245	0.0281	0.0395	0.0460	0.0758
	Mín	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005
	Max	0.1553	0.1585	0.3151	0.3716	0.4392	0.6180
<b>Tríada catalítica</b>	$\bar{x}$	0.0575	0.1098	0.1940	0.2022	0.2635	0.3428
	$\sigma$	0.0099	0.0245	0.0592	0.0185	0.0330	0.0978
	Mín	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0004
	Max	0.0986	0.1585	0.2948	0.2890	0.3670	0.6149

.  $\bar{x}$  = promedio aritmético.  $\sigma$  = Desviación estándar. Min = Mínimo. Max = Máximo.



**Figura 12.** RSDM del esqueleto de la proteína en el tiempo. Se realizaron 3 ensayos de simulación MD a cada sistema.

Se observan las trayectorias correspondientes a los tres ensayos realizados para la estructura 1TCB (control) y el modelo **M1** a diferentes temperaturas.



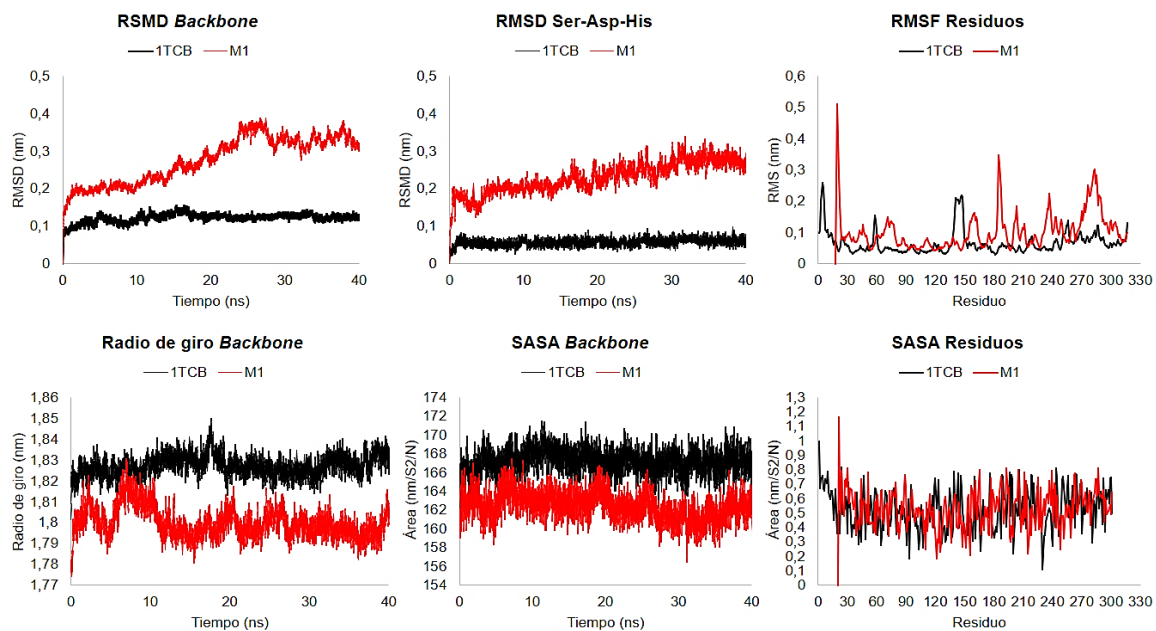
**Figura 13.** RSDM de los átomos de los residuos de la tríada catalítica Ser-Asp-His en el tiempo. Se realizaron 3 ensayos de simulación MD a cada sistema. Se observan las trayectorias correspondientes a los tres ensayos realizados para la estructura 1TCB (control) y el modelo **M1** a diferentes temperaturas.

### 3.4.1 Dinámica conformacional del modelo **M1** en comparación con CALB

Para comparar la estabilidad conformacional del modelo **M1** con la estructura de CALB se analizaron las diferentes trayectorias obtenidas en la simulación DM. En el sistema 1TCB-**M1** se observó un aumento en el valor de RSDM en el esqueleto de la proteína y los residuos Ser-Asp-His de la tríada catalítica de **M1**. En contraste con **M1**, 1TCB alcanzó rápidamente la convergencia con fluctuación constante en el orden de  $0.123 \pm 0.012$  nm. **M1** presentó el valor más alto de RSDM a los 26 ns ( $\approx 0.39$  nm) seguido de una disminución sin alcanzar la convergencia en el tiempo total de la simulación. Este resultado sugiere que la estructura **M1** presenta mayor cambio estructural a nivel general y local, con respecto a CALB.

La raíz cuadrada de la fluctuación media (RMSF) calcula las coordenadas promedio de la posición inicial de los átomos que conforman una proteína, en función del tiempo (Kuzmanic

& Zagrovic. 2010). Un alto valor de RMSF indica gran movilidad en los átomos y sus cadenas laterales (Yuan *et al.*, 2005). En concordancia con el RSDM, el perfil de RMSF presentó un aumento en **M1** frente a CALB. Los picos con los valores más altos se ubicaron en regiones diferentes en la secuencia de residuos y no se observó solapamiento entre ellos (**Figura 14. RMSF Residuos**). Los resultados expresan que la proteína **M1** presenta mayor cantidad de regiones flexibles. Estas regiones se relacionan con la distribución de las estructuras secundarias de la proteína (Bornot *et al.*, 2011). Los valores más altos se presentaron en el pico inicial y final, respectivamente. Estos hacen referencia a las hélices  $\alpha$  ubicadas en los extremos N y C terminal de la proteína y representan las regiones más flexibles.



**Figura 14.** Perfil de estabilidad estructural del sistema comparado entre 1TCB y **M1** a 300K.

El radio de giro ( $R_g$ ) es un parámetro que relaciona la estabilidad de una proteína con su volumen estructural y mide el cambio general de su deformación y compacidad en el tiempo. A medida que aumenta el valor de  $R_g$  la proteína es menos compacta (Monajjemil & Olliaey,

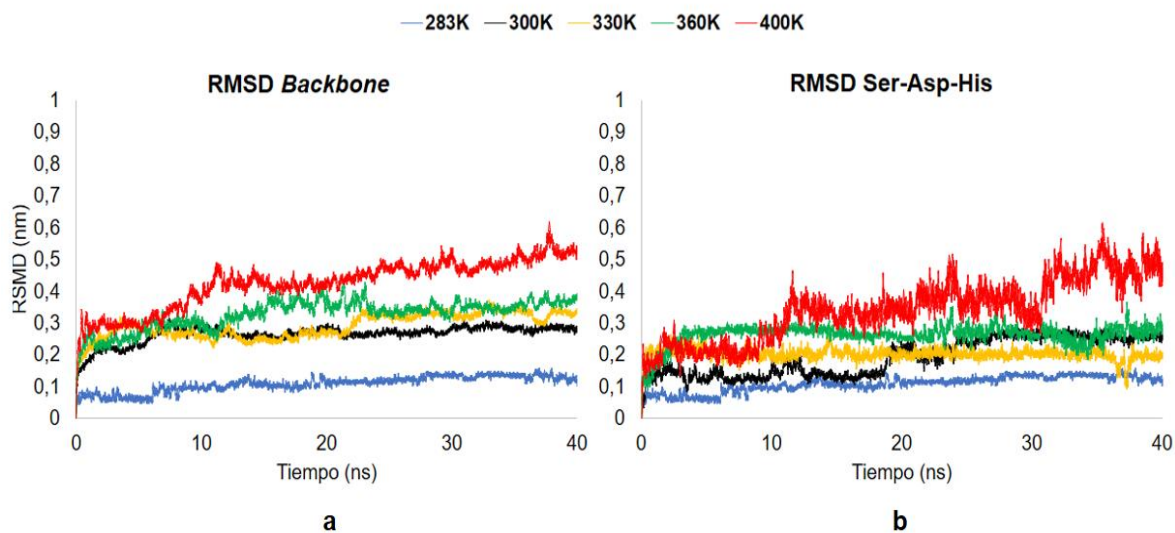
2009). El  $R_g$  que presentó **M1** fue menor en comparación con CALB con un rango aproximado de  $1.8 \pm 0.03$  nm y  $1.83 \pm 0.03$  nm, respectivamente. Estos resultados sugieren que la estructura **M1** es más compacta (Burney *et al.*, 2015). Sin embargo, a través de la trayectoria **M1** presentó mayor fluctuación de  $R_g$  que CALB posiblemente debido a que la proteína sufre un aumento en el número de deformaciones en el tiempo.

Por otra parte, se calculó el área de superficie accesible al solvente (SASA) para cuantificar cambios en el área superficial expuesta de la proteína (**Tabla 5**). SASA realiza una medición del área superficial de una proteína que interactúa con las moléculas de solvente. SASA está relacionado con  $R_g$ . Un aumento en el valor SASA está relacionado con desnaturalización de la estructura de las proteínas como resultado del despliegue de sus estructuras secundarias hidrofóbicas (Khan *et al.*, 2017b). El valor de SASA del esqueleto de la proteína presentó un comportamiento similar al  $R_g$  en **M1** y CALB (**Tabla 5**). En este caso, se observó un patrón de fluctuación semejante para las estructuras y refleja que no hay pérdida de la forma activa de las enzimas durante la simulación en ningún caso. Así mismo, el perfil de SASA calculado por residuos (**Figura 14**) reflejó picos relacionados con las estructuras secundarias hidrofóbicas e hidrofílicas. Los valores de  $R_g$  y SASA indicaron estabilidad global moderada de la estructura **M1** en el tiempo, a pesar de los cambios conformacionales que sugieren las medidas de desviación RMSD y RMSF. Estos resultados estiman que las proteínas mantienen una configuración que no altera su actividad catalítica por pérdida de la estructura.

### 3.4.2 Dinámica conformacional del modelo **M1** a diferentes temperaturas

Para evaluar el comportamiento del modelo **M1** a diferentes temperaturas se analizaron las diferentes trayectorias obtenidas en la simulación DM. El RMSD del esqueleto de la proteína y de los residuos Ser123-Asp204-His242 de la tríada catalítica de **M1**, a diferentes temperaturas de

simulación (283K a 400K), se muestran en la **Figura 15**. Se observó un incremento en el RMSD a medida que aumentó la temperatura. El valor más bajo de RMSD *backbone* (**Figura 15a**) se presentó en la simulación a 283K (0.158 nm) y el valor más alto para la temperatura de 400K (0.618 nm). Los sistemas correspondientes a 300K, 330K y 360K presentaron valores máximos dentro del rango de 0.315 nm a 0.489 nm. Todos los sistemas evidenciaron una tendencia hacia la convergencia después de 20 ns, a excepción de la simulación a 400K, que aumentó progresivamente durante la trayectoria. De igual forma, la gráfica de RMSD de la tríada catalítica (**Figura 15b**) presentó un comportamiento similar a 400K con un aumento marcado después de 30 ns.



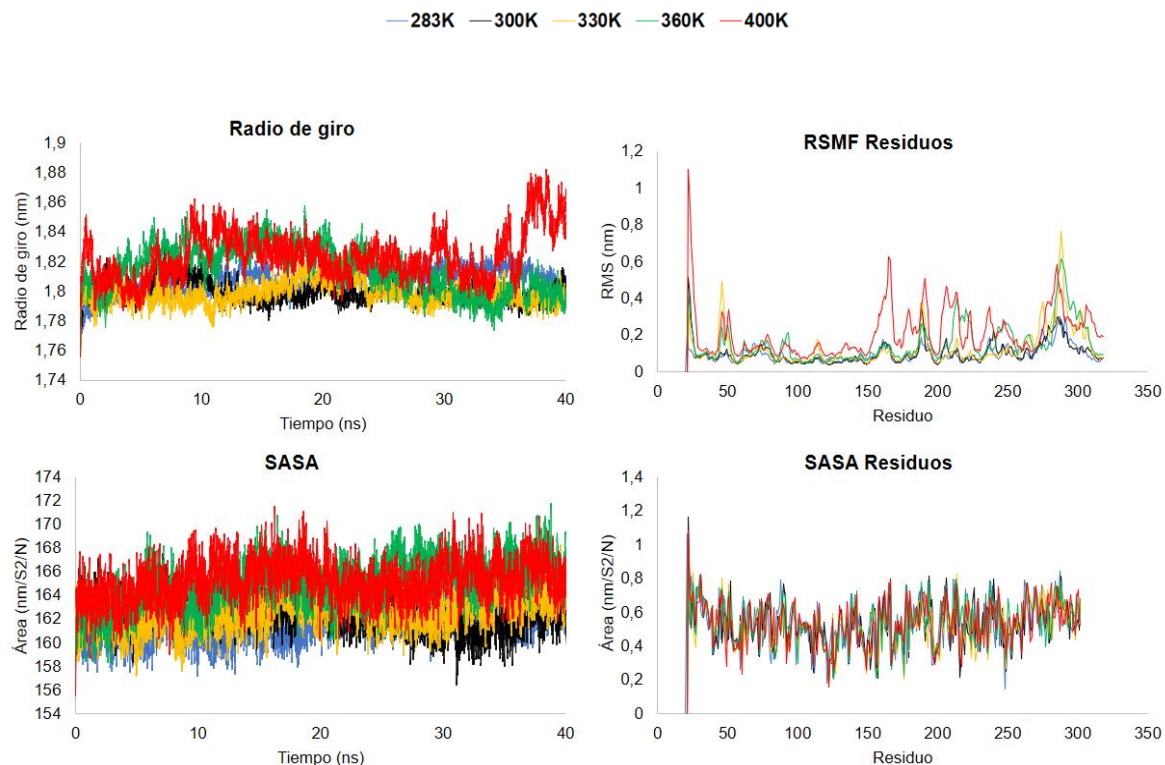
**Figura 15.** RMSD de M1 durante la trayectoria. a) RMSD backbone. b) RMSD de los residuos de la tríada catalítica (Ser-Asp-His).

En contraste, los demás sistemas alcanzaron un patrón de fluctuación constante, con tendencia al equilibrio. Esto ocurrió durante los primeros 6 ns, con un pico de disminución-aumento cerca de los 34 ns y 37 ns a 330K y 360K, respectivamente. Los cambios conformacionales de la estructura de Amyco\_LipB se reflejan en el constante movimiento de las regiones de bucles.

Estas regiones incluyen las posiciones de la tríada catalítica observadas en la visualización de la trayectoria en VDM. La variación del RMSD de la tríada catalítica presentó valores más bajos en comparación con la estructura global de la enzima.

La gráfica de RMSF de los residuos exhibió un patrón general en los picos de máxima fluctuación en todas las temperaturas (**Figura 16**). El promedio de RMSF para **M1** en el rango de 283K a 360K presentó una variación desde 0.096 nm hasta 0.153 nm. De acuerdo con valor máximo estimado, la estructura presentó los mejores valores a 283K, 300K y 360K. Los valores más altos se alcanzaron a 330K y 400K. Esto es un indicador de que la enzima presenta mayor flexibilidad en estas temperaturas. El promedio de fluctuación más alto, así como el valor más alto de RMSF se evidenció a 400K con valores de  $0.22 \pm 0.14$  nm y 1.18 nm, respectivamente. Esto sugiere, que las partes más sensibles a la temperatura se ubican en las regiones N y C terminal, con una tendencia marcada en el aumento de fluctuaciones en la región de aminoácidos de 150 a 250. En estas regiones se encuentran ubicados Asp204 y His242, por lo tanto, es posible que afecte la actividad de la enzima debido a los cambios estructurales presentados en los residuos que se encuentran en la región del sitio activo.

El cálculo de Rg indicó mayor fluctuación del empaquetamiento de la enzima a 400K con un aumento después de 35 ns. Los demás sistemas presentaron fluctuación constante sobre valores cercanos en un rango de promedio de 1.798 nm a 1.814 nm. Este parámetro sugiere que la enzima sufre mayores deformaciones a 400K que afectan su estabilidad mediante la pérdida de la compactación.



**Figura 16.** Perfil de estabilidad estructural del modelo **M1** comparado en diferentes temperaturas.

Por otro lado, la variación de SASA indicó que la enzima aumentó su superficie expuesta en todos los sistemas con el paso del tiempo en la simulación. Los promedios más bajos de SASA se alcanzaron en las temperaturas de 283K, 300K y 330K. Aunque se observó una tendencia hacia el aumento de SASA, con el incremento de la temperatura, no se identificaron grandes fluctuaciones que se puedan relacionar con la desnaturalización de la enzima. Esto fue corroborado con el perfil de SASA por residuos, el cual presentó un patrón de valores similares en todas las temperaturas. Los resultados anteriores sugieren que, la estructura **M1** presenta una configuración con estabilidad, en el rango de 283K a 360K. En contraste, ocurren mayores cambios conformacionales a 400K que pueden afectar a la función de la enzima. Estos cambios estructurales se visualizaron con la obtención de la estructura **M1** cada 10 ns en cada

temperatura y su comparación con la estructura inicial de cada sistema (**Figura 17**). Los estadísticos básicos calculados para todas las variables analizadas se encuentran en la **Tabla 5**.

Adicionalmente, se determinaron las distancias atómicas entre los carbonos  $\alpha$  de los residuos de la tríada catalítica. El análisis señaló cambios en las fluctuaciones en las distancias entre Ser123-Asp204, Ser123-His242 y Asp204-His242 que conforman el sitio activo de la enzima. En comparación con CALB, los residuos presentaron variaciones en sus distancias en todas las temperaturas de simulación a través del tiempo. La variación observada se relacionó con los perfiles de estabilidad de la enzima. Estos perfiles señalaron fluctuaciones relacionadas con la posición espacial de la tríada catalítica a partir del RMSD, además de la ubicación de regiones flexibles en la temperatura donde se localiza el sitio activo en relación con RMSF, Rg y SASA. Las distancias atómicas presentaron el mismo rango de variación en todas las temperaturas de 0.5 nm a 1.5 nm, a excepción de 400K que muestra un aumento de la distancia entre Ser123-His242 y Asp204-His242 y una mayor fluctuación en la distancia de Ser123-Asp204. Los cambios en las distancias atómicas de la tríada catalítica están directamente relacionados con la estabilidad de la enzima, un aumento en este parámetro sugiere problemas en la formación de enlaces de hidrógeno entre los residuos catalíticos (Mercado Malebrán, 2014). Por lo tanto, el perfil de distancias a 400K sugiere una posible pérdida de la actividad de la enzima a esta temperatura. Los resultados se observan en la **Figura 18**.

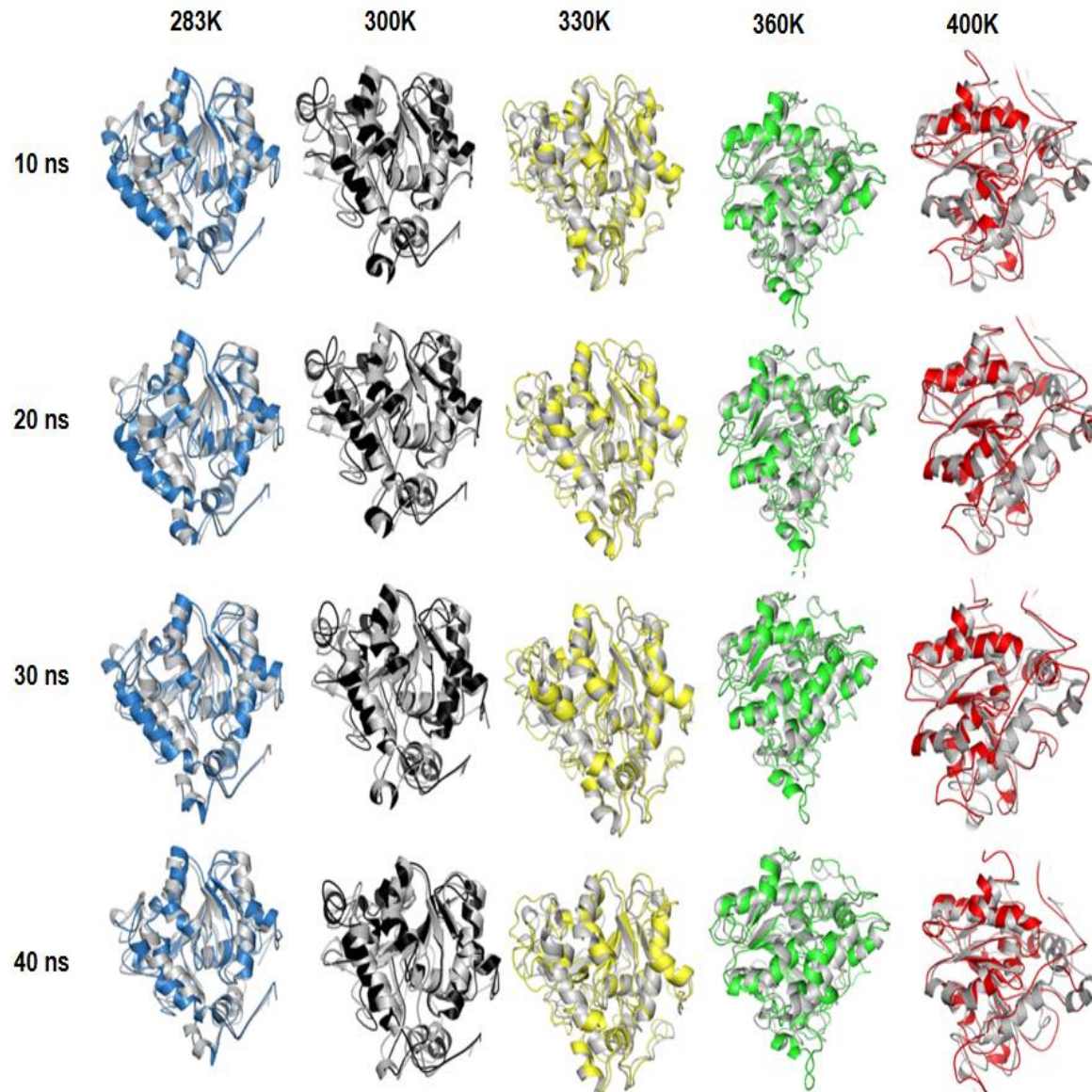
**Tabla 5.**

Variables estimadas para determinar la estabilidad conformacional de los modelos durante la trayectoria. Los valores se expresan en términos de nanómetros (nm). Los asteriscos (\*) junto a las temperaturas hacen referencia a **M1**.

Variable	Estadística	1TCB	283K	300K	330K	30K	400K
RMSF Átomos	$\bar{x}$	0.0671	0.0961	0.1035	0.1295	0.1530	0.2151

	$\sigma$	0.0373	0.0458	0.0612	0.1026	0.1033	0.1350
	<b>Mín</b>	0.0311	0.0437	0.0410	0.0476	0.0521	0.0742
	<b>Máx</b>	0.2771	0.3258	0.5582	0.7898	0.6333	1.1755
<b>RMSF*</b>	$\bar{x}$	0.0672	0.0961	0.1040	0.1297	0.1532	0.2154
	$\sigma$	0.0371	0.0457	0.0612	0.1023	0.1031	0.1348
	<b>Mín</b>	0.0317	0.0440	0.0419	0.0485	0.0524	0.0766
	<b>Máx</b>	0.2609	0.3024	0.5125	0.7637	0.6164	1.1003
	$\bar{x}$	15.4998	29.7817	38.0273	71.7912	89.6544	169.6196
	$\sigma$	23.6937	34.6362	62.7897	158.8434	146.0025	279.8606
<b>Factor B</b>	<b>Mín</b>	2.5500	5.0300	4.4300	5.9700	7.1300	14.4900
	<b>Máx</b>	202.0300	279.3900	820.1700	1641.5400	1055.6300	3636.5700
	$\bar{x}$	1.8274	1.8074	1.8001	1.7988	1.8147	1.8239
	$\sigma$	0.0293	0.0297	0.0294	0.0295	0.0326	0.0331
<b>Radio de giro</b>	<b>Mín</b>	1.8017	1.7573	1.7591	1.7596	1.7601	1.7557
	<b>Máx</b>	1.8501	1.8291	1.8308	1.8285	1.8577	1.8823
	$\bar{x}$	167.2238	161.7066	162.4535	162.6840	165.1131	165.2017
	$\sigma$	2.9298	2.9549	2.9596	3.0153	3.2975	3.1761
<b>SASA</b>	<b>Mín</b>	162.10	157.21	156.43	157.13	158.23	155.52
	<b>Máx</b>	171.55	166.79	167.53	168.33	171.73	171.53
	$\bar{x}$	0.5265	0.5372	0.5397	0.5405	0.5486	0.5489
	$\sigma$	0.1426	0.1416	0.1424	0.1372	0.1347	0.1330
<b>SASA*</b>	<b>Mín</b>	0.1120	0.1450	0.1880	0.1700	0.1880	0.1580
	<b>Máx</b>	0.9990	1.0660	1.1640	1.0250	1.0400	1.0810

$\bar{x}$  = promedio aritmético.  $\sigma$  = Desviación estándar. Min = Mínimo. Max = Máximo.



**Figura 17.** Cambios conformacionales de la estructura **M1** a diferentes temperaturas. En color gris se observa la conformación inicial de la enzima en cada simulación supuesta con su imagen estructural a los 10 ns, 20 ns, 30 ns, 40 ns.

Como complemento para este análisis se graficó el promedio de distancias entre pares de residuos de tríada catalítica para todos los sistemas (**Figura 19**). Los resultados señalaron un patrón similar entre **M1** a 283K y la estructura de CALB. Las distancias interatómicas más cortas se obtuvieron para el sistema a 300K, indicando mayor cercanía entre los residuos del

sitio activo. A 330K, 360K y 400K se observó un patrón general de aumento entre las distancias de Ser104-Asp204 y Asp204-His242, relacionado con los cambios conformacionales que sufrió la estructura a causa del aumento de la temperatura.

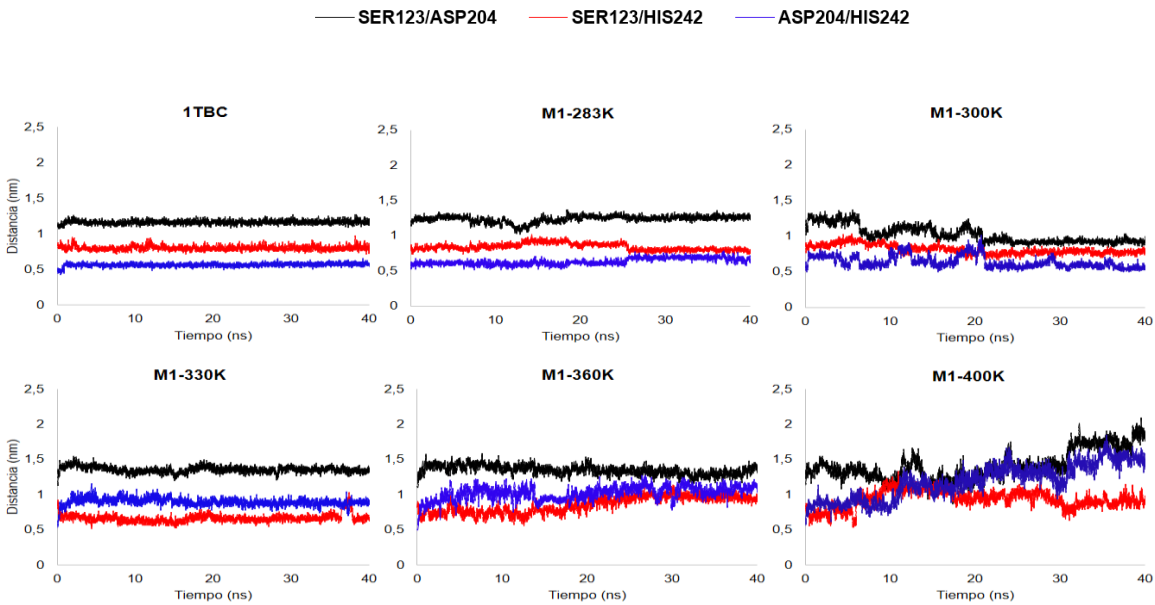


Figura 18. Distancias interatómicas entre los residuos Ser-Asp, Ser-His, Asp-His de la tríada catalítica de la enzima.

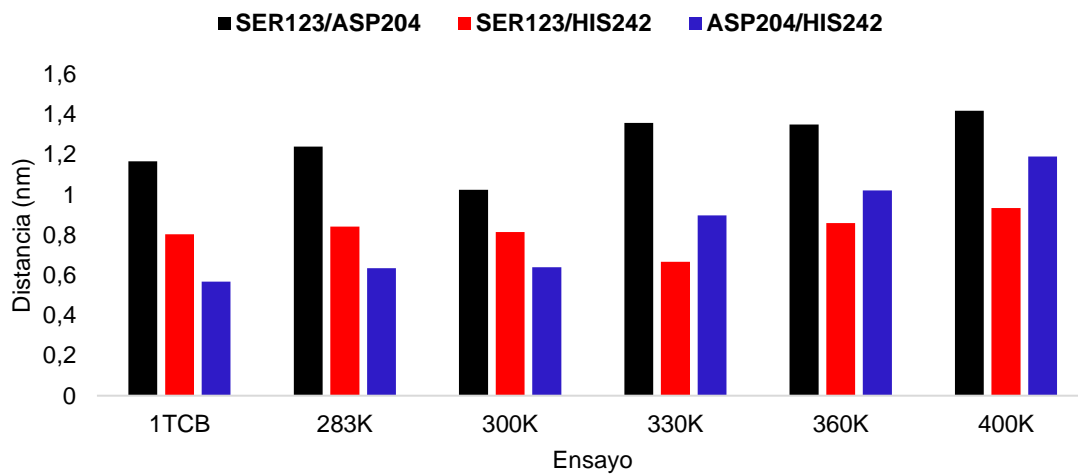
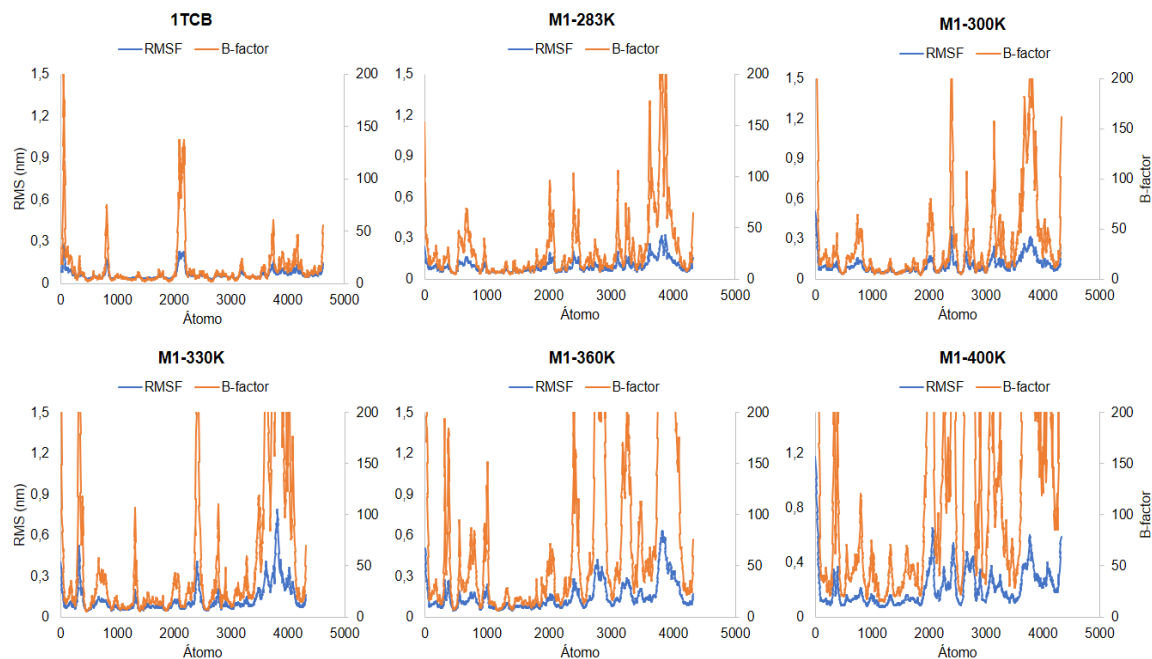


Figura 19. Promedio de distancias interatómicas entre los residuos Ser-Asp, Ser-His, Asp-His de la tríada catalítica de la enzima.

### 3.4.3 Flexibilidad estructural y termoestabilidad de la enzima Amyco\_LipB

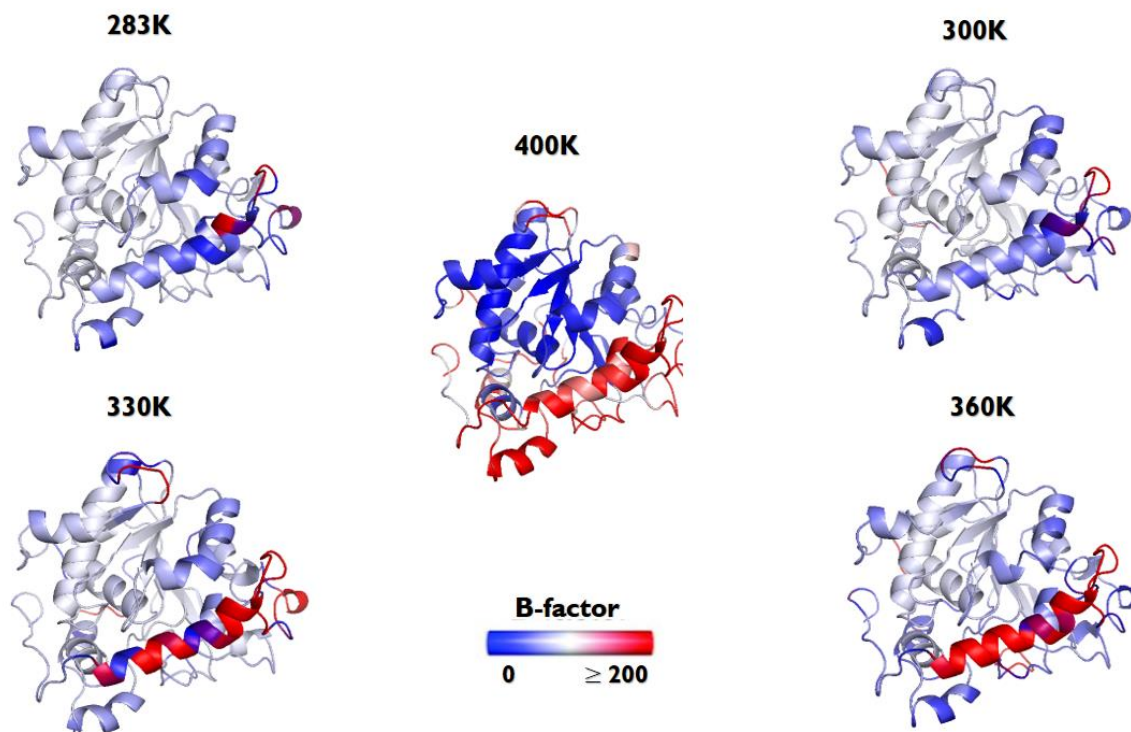
Para obtener información acerca de la flexibilidad estructural local, estabilidad térmica de las moléculas, predecir regiones desordenadas y detectar errores en estructuras de proteínas, se utiliza el valor de RMSF y Factor B simulado. El Factor B es un parámetro de desplazamiento atómico que refleja la dinámica promedio de la posición de los átomos de una estructura (Kuzmanic & Zagrovic, 2010). Estas variables están altamente relacionadas y se ven afectadas por el método de determinación de la estructura de una proteína y errores en su refinamiento. Así, un Factor B grande y un alto valor de RMSF indican gran movilidad de las estructuras tridimensionales de las proteínas (Yuan *et al.*, 2005).

Se estimaron los valores de Factor B para las estructuras de la simulación y se graficaron con el valor del RMSF atómico del esqueleto de la proteína. Los resultados se muestran en la **Figura 20**. Se observó un patrón compartido en el comportamiento de las variables con el incremento de la temperatura. Los valores del Factor B simulado coincidieron en la ubicación general de las estructuras móviles de la enzima. Además, este indicador señaló un aumento en la movilidad de la enzima con el incremento de la temperatura. Los altos valores del Factor B en la estructura enzimática reflejan errores en su estimación debido a su condición de ser un modelo predictivo (Yuan *et al.*, 2005). Sin embargo, es usado como una herramienta cualitativa para evidenciar la flexibilidad global de una estructura. Tal como se expuso anteriormente, la estructura **M1** presentó mayor flexibilidad para las regiones N y C terminal y la región en la que se ubica parte del sitio activo de la enzima. Además, las altas fluctuaciones observadas están relacionadas con regiones de alta movilidad como bucles de conexión, giros y curvas, además, aumenta la movilidad de las estructuras secundarias a medida que incrementa la temperatura.



**Figura 20.** Perfiles de RMSF y Factor B del esqueleto de la proteína **M1** a diferentes temperaturas. Las escalas fueron igualadas para facilitar su comparación. Las curvas interrumpidas del Factor B (B-factor) indican que los valores superan el umbral establecido para el eje Y (derecha).

Se observó alta movilidad global en la estructura, especialmente en las hélices  $\alpha 7$  (posiciones 157 a 164) y hélice  $\alpha 15$  (posiciones 298 a 307), las cuales se localizan espacialmente cerca de la región del sitio activo. Se ha demostrado que un aumento en la temperatura favorece la dinámica y flexibilidad de la enzima con la tendencia para abrir el párpado o tapa (*lid*) y así exponer el núcleo de la molécula al solvente (Karjiban *et al.*, 2009). Por lo tanto, estas estructuras pueden estar relacionadas con el dominio correspondiente a la tapa de la enzima. Los resultados se ilustraron mediante la coloración de las estructuras con el Factor B promedio calculado en cada simulación (**Figura 21**).



**Figura 21.** Ilustración del Factor B en la estructura **M1** a diferentes temperaturas. Los valores cercanos a 0 indican regiones rígidas y los valores mayores o igual que 200 regiones flexibles de la enzima.

### 3.5 Acoplamiento molecular de ésteres de pNP a la lipasa

Se realizaron simulaciones de acoplamiento molecular para determinar la afinidad de unión enzima-sustrato de la enzima Amyco\_LipB en comparación con CALB. Las lipasas catalizan la hidrólisis y síntesis de ésteres de triacilglicerol de cadena larga (más de 10 átomos de carbono), mientras que las esterasas hidrolizan sobre sustratos de cadena corta (10 o menos átomos de carbono). Uno de los métodos más usados experimentalmente para caracterizar la capacidad de catálisis de enzimas lipolíticas se basa en evaluar la hidrólisis de ésteres de pNP (Arpigny & Jaeger, 1999; Buerth *et al.*, 2014). Por lo tanto, se estimó la interacción de **M1** a partir de su afinidad de unión con ésteres de para-nitrofenol (pNP) de diferentes longitudes de cadena: pNPC8, pNPC10, pNPC22. Como control del procedimiento también se calcularon las interacciones de CALB con

estos sustratos. La afinidad enzima-sustrato se determinó a partir de los residuos involucrados en la formación de enlaces de hidrógeno y se realizó una comparación de la energía de acoplamiento antes y después del refinamiento estructural.

Se obtuvieron mayores promedios de afinidad (valores más negativos) con todos los sustratos para las estructuras antes de la minimización de energía, excepto en la interacción **M1** con pNPC8 (**Tabla 6**). En general, la estructura de CALB exhibió energías de unión inferiores para pNPC8 y pNP10, lo cual sugiere que la enzima **M1** tiene interacciones más favorables con estos sustratos. El sustrato pNPC10 presentó los mejores promedios de afinidad con **M1**. La energía de unión enzima-sustrato máxima se alcanzó con la interacción entre **M1** y pNPC22 (-7.08 y -6.49 kcal/mol, respectivamente). Sin embargo, esta interacción también presentó los valores mínimos de interacción más bajos (-0.95 y 0.27 kcal/mol).

**Tabla 6.**

Comparación del promedio de energía de unión de **M1** y **CALB** con ésteres de pNP antes y después del refinamiento estructural.

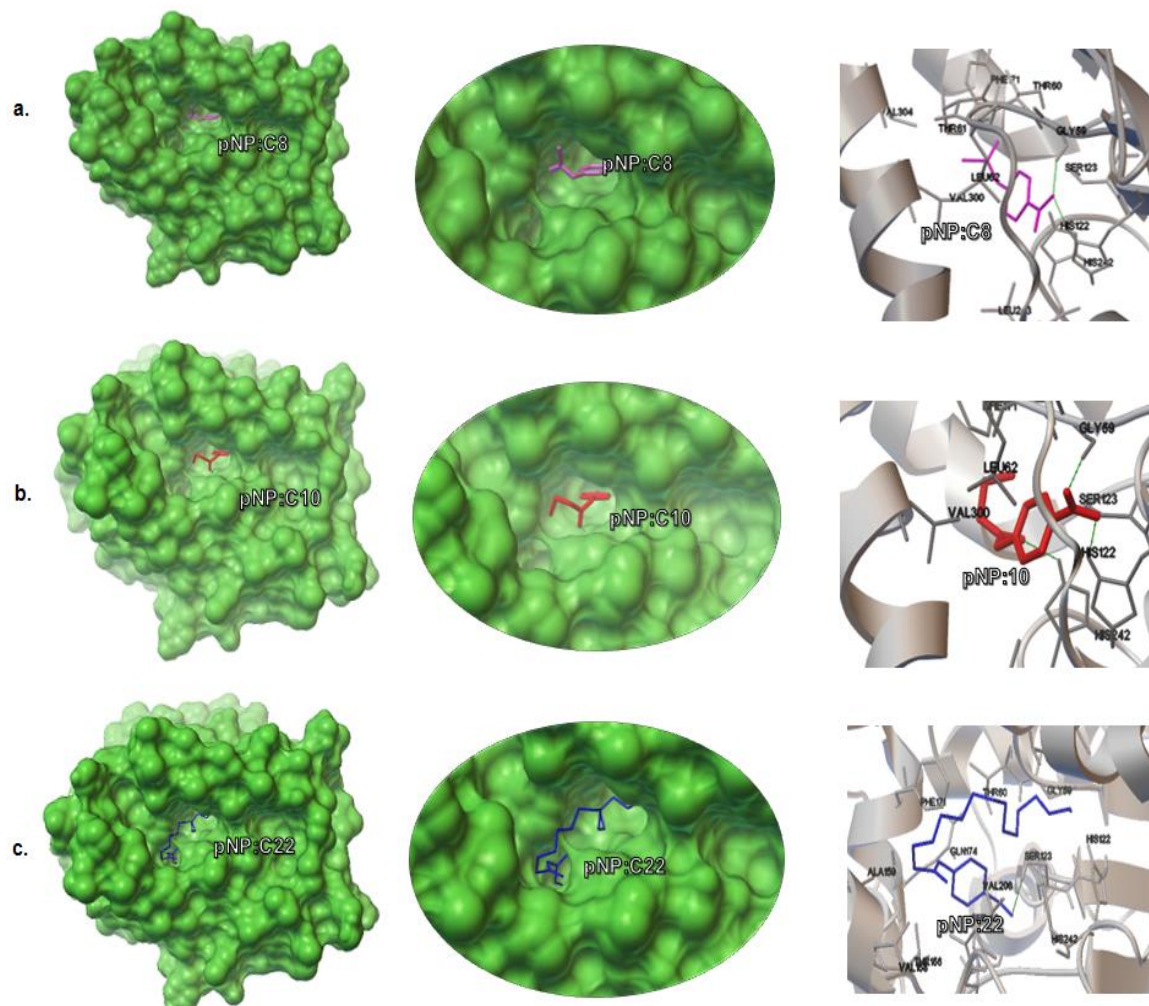
Estructura	Energía de Unión (kcal/mol)	Antes del refinamiento			Después del refinamiento		
		$\bar{x}$	Max	Min	$\bar{x}$	Max	Min
<b>M1</b>	pNP Acetato	-5,14	-5,45	-4,72	-5,16	-5,21	-4,94
	pNP Butirato	-5,54	-5,94	-4,79	-5,21	-6,07	-4,74
	pNP Palmitato	-3,95	-7,08	-0,95	-3,21	-6,49	0,27
<b>CALB</b>	pNP Acetato	-5,06	-5,12	-4,6	-4,83	-4,94	-4,24
	pNP Butirato	-5,44	-5,61	-4,69	-5,10	-5,39	-4,3
	pNP Palmitato	-3,98	-6,36	-1,3	-3,98	-6,56	-1,71

$\bar{x}$  = promedio aritmético. Min = Mínimo. Max = Máximo.

Todos los sustratos adoptaron diferentes configuraciones espaciales en **M1** en una hendidura en forma de túnel mediante la formación de enlaces de hidrógeno durante el acoplamiento

(Figura 22). Los enlaces de hidrógeno se formaron con diferentes residuos (Tabla 7). La interacción más favorable de **M1** con pNPC8 y pNPC10 (átomos O<sup>3</sup> y O<sup>4</sup>) se dio entre el grupo HN de GLY59 y el grupo HD1 de HIS122, con un rango de distancia entre 1.9 Å y 2.2 Å. Por otra parte, pNPC22 presentó el único enlace de unión directo con un residuo de la tríada catalítica, entre el átomo O<sup>3</sup> del sustrato y el grupo HG de SER123 a una distancia de 2.123 Å. Estos resultados son comparables con las energías de afinidad de unión y distancias de enlace con CALB reportados en un estudio de dinámica molecular y acoplamiento (Kumaresan *et al.*, 2011).

Por otra parte, la unión al grupo HN de GLY59 y su cercanía a SER123 puede estar relacionada con la estabilización de la carga negativa del sustrato mediante la formación del enlace de hidrógeno en el hueco oxianión (Suplatov *et al.*, 2012). La posición de HIS122, cerca de SER123 del sitio activo, puede compararse con la ubicación Trp104 de CALB. Trp104 comparte la vecindad con la serina catalítica y conduce a la formación de un sitio de unión a sustrato pequeño. Además, en las lipasas que conservan el peptapéptido GX SXG se forma un agujero oxianión adicional que con frecuencia ayuda al anclaje del sustrato en la enzima y consiste, generalmente, en dos residuos cercanos al residuo nucleofílico. Uno de estos residuos se ubica en la posición X1 que sigue al primer residuo de glicina conservado que es comparable con HIS122 de la estructura **M1** (Borrelli *et al.*, 2015; Kumaresan *et al.*, 2011).



**Figura 22.** Detalles estructurales de la interacción del modelo **M1** con ésteres de pNP. Se ilustra la representación de la masa molecular (verde) de la enzima y la representación parcial de su estructura secundaria (gris). a) pNP Acetato:C8 (morado), b) pNP Butirato:10 (rojo), c) pNP Palmitato:C22 (azul).

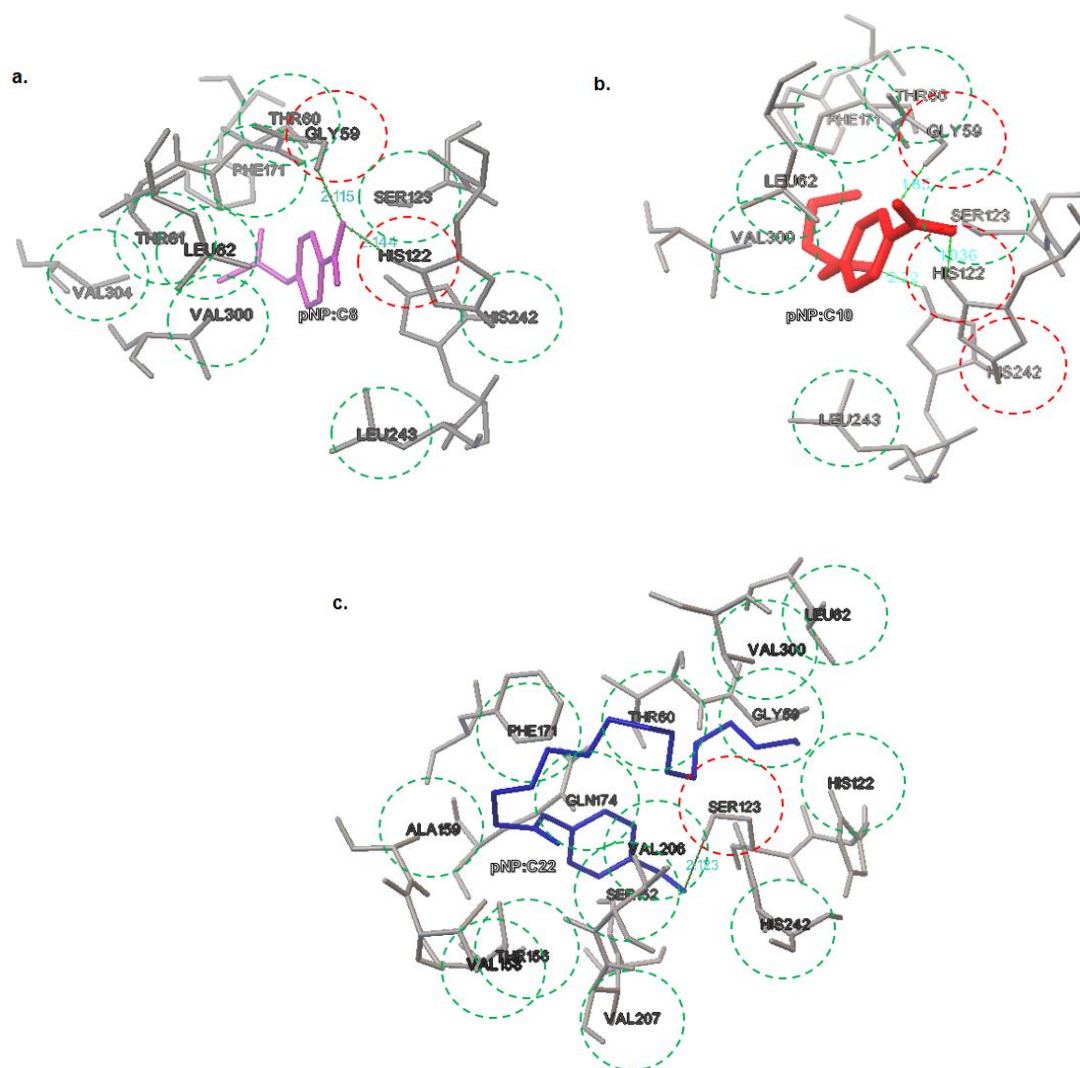
Este resultado se relacionó con la energía de unión más favorable hacia los sustratos de menor longitud de cadena, pNPC8 y pNPC10. Sumado a esto, los sustratos establecieron una serie variable de contactos con los residuos que forman la cavidad catalítica de la enzima. En la **Figura 23** se observan las diferentes interacciones enzima-sustrato de **M1** con los residuos cercanos en las configuraciones de energía de unión (promedio) más frecuente. A pesar de que no hubo formación de enlaces directos con residuos del sitio activo de **M1** con pNPC8 y

pNPC10, se observó alta similitud de los aminoácidos circundantes en la región de anclaje de los sustratos en la enzima. Entre estos residuos se encuentran SER123 y HIS242. La interacción con estos aminoácidos está directamente relacionada con la acción catalítica de la enzima, que sigue el mecanismo clásico de ataque nucleofílico de serina hidrolasa apoyado por la estabilización por parte de la histidina catalítica (Borrelli *et al.*, 2015). Las interacciones de **M1** con todos los sustratos compartieron contacto con los residuos Leu62, His122, Ser123, Ser152, Phe171, His242, Val300 (**Tabla 8**).

**Tabla 7.**

Comparación de los enlaces de hidrógeno formados con los residuos de **M1** con ésteres de pNP. Se muestran los datos correspondientes a los enlaces de interacción formados en la conformación de mayor energía de unión durante el acoplamiento.

Sustrato	Antes del refinamiento			Después del refinamiento		
	pNP	pNP	pNP	pNP	pNP	pNP
	Acetato	Butirato	Palmitato	Acetato	Butirato	Palmitato
<b>Energía de unión</b> (kcal/mol)	-5.45	-5.94	-7.08	-5,21	-6.07	-6.49
<b>Enlace de hidrógeno</b> (donador:aceptor)	SER152 <sup>H</sup> G:O <sup>4</sup>	SER123 <sup>H</sup> G:O <sup>1</sup> - SER152 <sup>H</sup> G:O <sup>3</sup>	HIS122 <sup>HD1</sup> :O <sup>4</sup>	GLY59 <sup>H</sup> N:O <sup>4</sup> - HIS122 <sup>H</sup>	GLY59 <sup>HN</sup> : O <sup>1</sup> - HIS122 <sup>HD1</sup> : O <sup>1</sup> ,O <sup>2</sup>	SER123 <sup>HG</sup> : O <sup>3</sup>
<b>Distancia (Å)</b>	2.237	1.601 – 2.01	1.928	2.115 – 2.144	2.2 – 1.991	2.123



**Figura 23.** Interacción de los ésteres de pNP con el modelo **M1**. El sustrato y los residuos (gris) se representan con barras. Se demarcan los residuos con los que el sustrato presenta interacción cercana (verde) y los residuos con los que forma enlaces de hidrógeno (rojo) con círculos punteados. Las líneas de color verde indican la distancia de la interacción enzima-sustrato.

Se confirmaron las posiciones Gly59, His122 y Ser152 estimadas durante la fase de la predicción del sitio activo y sitio de unión, además de los residuos que conforman la tríada catalítica. Estos residuos participan en la formación de la cavidad hidrofóbica en donde se incrustan los sustratos y aunque no intervienen directamente en la catálisis de la enzima, están

relacionados con el proceso de orientación funcional de los átomos de la cadena principal de la enzima (Suplatov *et al.*, 2011). Los residuos Val300 y Val304 están ubicados sobre la hélice  $\alpha 15$  y reafirman su implicación en la región catalítica de la enzima.

**Tabla 8.**

Aminoácidos del modelo **M1** que presentan interacción con ésteres de pNP. a) pNP Acetato:C8 (morado), b) pNP Butirato:10 (rojo), c) pNP Palmitato:C22 (azul).

Aminoácido	pNP Acetato	pNP Butirato	pNP Palmitato
Gly59	✓	✓	×
Thr60	✓	✓	×
Thr61	✓	×	✓
Leu62	✓	✓	✓
His122	✓	✓	✓
Ser123	✓	✓	✓
Ser152	✓	✓	✓
Thr153	×	×	✓
Val155	×	×	✓
Ala159	×	×	✓
Phe171	✓	✓	✓
Gln174	×	×	✓
Val206	×	×	✓
Val207	×	×	✓
His242	✓	✓	✓
Leu243	✓	✓	×
Val300	✓	✓	✓
Val304	✓	×	×

#### 4. Discusión

En este estudio se logró analizar con herramientas bioinformáticas la organización estructural y funcional *in silico* de la lipasa Amyco\_LipB. La comprensión del papel biológico de una enzima está relacionada con el conocimiento de su estructura tridimensional (Skolnick & Fetrow, 2000). A pesar de la alta precisión que ofrece la determinación experimental de estructuras de proteínas, actualmente los métodos predictivos que hacen uso de técnicas computacionales proporcionan información valiosa para las moléculas que no tiene una estructura determinada (Ginalski, 2006).

Los análisis comparativos a nivel de secuencia (**Figura 3**) evidenciaron que la proteína conserva el pentapéptido GX SXG, donde se localiza el residuo nucleofílico de la enzima, y el motivo dipéptido HG que son característicos de lipasas (Houde *et al.*, 2004). Se ubicaron los residuos de la tríada catalítica en las posiciones conservadas de Ser123, Asp204 y His242 a partir de alineamientos secuenciales con CALB y otras lipasas de actinobacterias. Por otra parte, mediante la visualización de la estructura 3D de la lipasa (**Figura 7**) se confirmó que la enzima está conformada por un núcleo central de 7 láminas  $\beta$  que se encuentra rodeado por 15 hélices  $\alpha$ , correspondiente al plegamiento de tipo  $\alpha/\beta$  hidrolasa. El modelo **M1** mantuvo alto grado de similitud con CALB con base en su bajo valor de RMSD en el alineamiento estructural y los buenos resultados ante los criterios de validación apoyaron la confiabilidad global del modelo (**Tabla 3**). El valor de 0.45 Å de RSDM obtenido concuerda con el umbral esperado para un modelo predictivo con más del 30% de identidad con su estructura molde. No obstante, el aumento en el RMSD después del refinamiento estructural, puede estar relacionado con errores en el modelamiento que pueden alterar el empaquetamiento de la cadena principal de la enzima, así como, el modelado de bucles y la alineación de los residuos en el espacio (Baker & Sali, 2001). Este efecto se evidenció especialmente en el desplazamiento y cambio en algunas

torsiones de la cadena lateral de los residuos que componen la tríada catalítica tanto de CALB como del modelo **M1** de la lipasa Amyco\_LipB (**Figura 9**).

El análisis de las trayectorias obtenidas (**Figura 14**) en las simulaciones de DM sugiere que el modelo **M1** presenta estabilidad estructural a 300K con un rango de variación de RMSD que no superó los 0.4 nm. El RMSD calcula los cambios conformacionales que ocurren en la estructura durante la trayectoria de DM mediante la superposición atómica con la estructura inicial (Ferrara, Apostolakis, & Caflisch, 2002). Altos valores de RMSD hacen referencia a un modelo estructuralmente vulnerable. Por lo tanto, se utiliza para estimar que no haya pérdida de la estructura de la proteína a gran escala o grandes movimientos de sus estructuras secundarias (Burney *et al.*, 2015; Housaindokht *et al.*, 2012). Aunque el valor de RMSD para **M1** fue mayor en comparación a la variación que se observó en CALB (>0.2 nm), la estabilidad del modelo fue apoyada por las fluctuaciones de la trayectoria del perfil de RMSF, Rg y SASA, que indica que la proteína mantiene su estructura global en el tiempo de la simulación (**Tabla 5**). Estos resultados son comparables con los valores de las fluctuaciones en las trayectorias de CALB en simulaciones de DM en agua reportados por Housaindokht *et al.*, 2012, que tuvieron mayores espectros de variación, especialmente para el RMSD. Por otra parte, las fluctuaciones presentadas durante las simulaciones a diferentes temperaturas sugieren que la enzima presenta termoestabilidad en un rango de 283K a 360K de acuerdo con los perfiles del RMSD (**Figura 15**), RMSF, Rg y SASA (**Figura 16**) tanto a nivel atómico como en su evaluación por residuos. El rango alcanzado de RMSD (<0.4nm) en estas temperaturas es aceptable. En contraste, la lipasa presentó mayores valores en todas las variables analizadas a 400K que señalan cambios conformacionales más grandes en la estructura. Estos cambios pueden estar relacionados con la posible pérdida de la forma activa de la enzima por desnaturalización apoyado por la alta

flexibilidad que sugiere el perfil de RMSF (**Figura 20**). Las zonas más flexibles presentaron en los residuos ubicados en la región del núcleo de la enzima donde se ubica el sitio activo y en los extremos N y C terminal. Estos resultados fueron similares a los reportados en el análisis funcional del modelo por homología de una lipasa termoestable de *Shewanella putrefaciens* (Khan *et al.*, 2017). Así mismo, estos resultados fueron apoyados por la variación de distancias atómicas de la tríada catalítica observada durante la simulación a 400 K que mostró la mayor variación.

Aunque la lipasa Amyco\_LipB no presenta investigaciones acerca de la estabilidad a diferentes temperaturas, estos resultados pueden relacionarse con estudios *in vitro* de la lipasa extracelular termoestable de *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 (Dheeman *et al.*, 2010). Esta lipasa mantiene su actividad en un rango de 50-60°C (323.15K y 333.15K, respectivamente), y presenta amplia especificidad hacia diferentes sustratos, las cuales son características favorables para aplicaciones en procesos biocatalíticos entre los que se encuentra la producción de biodiesel (Dheeman *et al.*, 2011). Adicionalmente, el análisis del perfil de RMSF atómico y Factor B sugieren que la enzima presenta mayor flexibilidad. Los resultados sugieren que a medida que incrementa la temperatura aumenta la flexibilidad. Se presentó alta movilidad de la hélice  $\alpha 15$  (**Figura 21**). Esta hélice puede estar relacionada con la región que corresponde al dominio de la tapa (*lid*) que presentan las lipasas. Debido a que, el aumento de la temperatura es uno de los estímulos más frecuentes que genera la apertura de este dominio dejando expuesto al sitio activo de la lipasa (Kumar *et al.*, 2017).

Las energías de interacción con ésteres de pNP obtenidas en los análisis de acoplamiento para las estructuras de CALB y **M1**, antes y después del refinamiento, presentaron rangos de afinidad entre -3.21 a -5.16 kcal/mol (**Tabla 6**). Los rangos de afinidad de unión fueron similares a otros

estudios de acoplamiento molecular con la lipasa CALB (Kumaresan *et al.*, 2011). La enzima **M1** presentó mayor afinidad para el sustrato pNP butirato (-5.16 kcal/mol) comparada con su interacción con CALB (-5.06 kcal/mol). Los demás sustratos presentaron valores semejantes de interacción con las dos estructuras, a excepción del sustrato pNP Palmitato que disminuyó su energía de unión con la estructura **M1** después del refinamiento. Generalmente, las lipasas pueden distinguir la escisión de pNP palmitato frente a pNP butirato, que es catalizado principalmente por esterases (Lopes *et al.*, 2011). Los valores similares de energía de unión que presentó la interacción favorable de los sustratos con las estructuras de CALB y **M1** son un indicador de que las enzimas comparten capacidad catalítica y actividad sobre la misma gama de sustratos. Los resultados indican que **M1** conserva la condición de lipasa/esterasa que caracteriza a CALB, debido a su capacidad de interacción con sustratos de cadena corta (pNP:C8), media (pNP:C10) y larga (pNP:C22). La interacción de la enzima con sustratos de cadena larga y su estabilidad estructural a temperaturas  $\geq 330\text{K}$  (56.85 C) sugiere que la lipasa Amyco\_LipB presenta características favorables para su aplicación en ensayos de transesterificación para la producción de biodiésel (Gomez *et al.*, 2017).

Los sustratos se ubicaron en una hendidura en forma de túnel que forma el bolsillo de unión de la enzima (**Figura 22**) y establecieron enlaces de hidrógeno con diferentes residuos ubicados en la región catalítica (**Figura 23**). En la mayoría de los casos, estos enlaces no se formaron directamente con residuos de la tríada catalítica, a excepción del enlace formado con pNP Palmitato con **M1** después del refinamiento (**Tabla 7**). La falta de enlaces de unión con los residuos de la tríada catalítica puede explicarse a partir de las modificaciones estructurales que se produjeron en el refinamiento del modelo **M1**. Como se mencionó anteriormente, el modelo puede contener errores en su estructura debido a fallas en el modelamiento (Baker & Sali, 2001).

Sin embargo, la interacción con el grupo HN de Gly59 y el grupo HD1 de His122 están relacionados con los huecos oxianión que presentan las lipasas para la estabilidad de la carga negativa de los sustratos y su correspondiente orientación al sitio activo. Además, los enlaces formados con His122 presentaron mayor energía de afinidad de unión con los sustratos de menor longitud de cadena, debido a que la posición de este residuo puede tener un papel funcional en la formación de un sitio de unión a sustrato pequeño (Borrelli *et al.*, 2015; Kumaresan *et al.*, 2011; Suplatov *et al.*, 2011). En conjunto, estos resultados respaldan la realización de pruebas de laboratorio para comprobar las propiedades predictivas acerca de la lipasa Amyco\_LipB, incluyendo su capacidad de producción de biodiesel mediante reacciones de transesterificación.

## 5. Conclusiones

Los análisis bioinformáticos demostraron que la lipasa bacteriana Amyco\_LipB mantiene características estructurales y funcionales similares a la lipasa fúngica CALB. La enzima presenta estabilidad a temperaturas elevadas hasta 360K y energía de unión favorable a ésteres de pNP comparable con CALB. Los resultados predictivos sugieren que la Amyco\_LipB mantiene la misma condición tipo lipasa/esterasa de CALB, debido a su capacidad de interacción con sustratos de diferente longitud de cadena. La afinidad de unión observada con sustratos de cadena larga está relacionada con la posible aplicación de la lipasa en reacciones de transesterificación para la producción de biodiésel. Por lo tanto, esta lipasa se considera como una gran candidata a ser evaluada mediante pruebas de laboratorio para determinar su potencial uso a nivel industrial.

### Referencias bibliográficas

- Abedi Karjiban, R., Abdul Rahman, M. B., Basri, M., Salleh, A. B., Jacobs, D., & Abdul Wahab, H. (2009). Molecular Dynamics Study of the Structure, Flexibility and Dynamics of Thermostable L1 Lipase at High Temperatures. *The Protein Journal*, 28(1), 14–23. <https://doi.org/10.1007/s10930-008-9159-7>
- Aceves Diez, A., & Castañeda Sandoval, L. U. de A. F. de Q. F. (2012). *Vitae. Vitae*, 19(3), 244–247. Retrieved from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-40042012000300001](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042012000300001)
- Arpigny, J. L., & Jaeger, K. E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *The Biochemical Journal*, 343 Pt 1(1), 177–183. <https://doi.org/10.1042/BJ3430177>
- Baker, D., & Sali, A. (2001). Protein structure prediction and structural genomics. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5540), 93–96. <https://doi.org/10.1126/science.1065659>
- Bassegoda, A., Pastor, F. I. J., & Diaz, P. (2012). Rhodococcus sp. strain CR-53 lipr, the first member of a new bacterial lipase family (Family X) displaying an unusual Y-type oxyanion hole, similar to the Candida antarctica lipase clan. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), 1724–1732. <https://doi.org/10.1128/AEM.06332-11>
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R. D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., ... Eddy, S. R. (2004). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, 32(90001), 138D–141. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh121>
- Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., & Hermans, J. (1981). Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration (pp. 331–342). Springer, Dordrecht.

[https://doi.org/10.1007/978-94-015-7658-1\\_21](https://doi.org/10.1007/978-94-015-7658-1_21)

- Bornot, A., Etchebest, C., & de Brevern, A. G. (2011). Predicting protein flexibility through the prediction of local structures. *Proteins*, 79(3), 839–852. <https://doi.org/10.1002/prot.22922>
- Borrelli, G., Trono, D., Borrelli, G. M., & Trono, D. (2015). Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 20774–20840. <https://doi.org/10.3390/ijms160920774>
- Budžaki, S., Miljić, G., Sundaram, S., Tišma, M., & Hessel, V. (2018). Cost analysis of enzymatic biodiesel production in small-scaled packed-bed reactors. *Applied Energy*, 210(June 2017), 268–278. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2017.11.026>
- Buerth, C., Kovacic, F., Stock, J., Terfrüchte, M., Wilhelm, S., Jaeger, K.-E., ... Tielker, D. (2014). Uml2 is a novel CalB-type lipase of *Ustilago maydis* with phospholipase A activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(11), 4963–4973. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5493-6>
- Burney, P. R., Nordwald, E. M., Hickman, K., Kaar, J. L., & Pfaendtner, J. (2015). Molecular dynamics investigation of the ionic liquid/enzyme interface: Application to engineering enzyme surface charge. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 83(4), 670–680. <https://doi.org/10.1002/prot.24757>
- Cardenas, F., Alvarez, E., De Castro-Alvarez, M. S., Sanchez-Montero, J. M., Elson, S., & Sinisterra, J. V. (2001). Three new lipases from actinomycetes and their use in organic reactions. *Biocatalysis and Biotransformation*, 19(4), 315–329. <https://doi.org/10.3109/10242420109003647>

- Coleman, J., Inukai, M., & Inouye, M. (1985). Dual functions of the signal peptide in protein transfer across the membrane. *Cell*, 43(1), 351–360. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3907854>
- Côté, A., & Shareck, F. (2008). Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Enzyme and Microbial Technology*, 42(5), 381–388. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.01.009>
- Dandavate, V., Jinjala, J., Keharia, H., & Madamwar, D. (2009). Production, partial purification and characterization of organic solvent tolerant lipase from *Burkholderia multivorans* V2 and its application for ester synthesis. *Bioresource Technology*, 100(13), 3374–3381. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2009.02.011>
- DELANO, & L., W. (2002). The PyMOL Molecular Graphics System. <Http://Www.Pymol.Org>. Retrieved from <https://ci.nii.ac.jp/naid/10020095229/>
- Dheeman, D. S., Frias, J. M., & Henehan, G. T. M. (2010). Influence of cultivation conditions on the production of a thermostable extracellular lipase from *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 37(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0643-7>
- Dheeman, D. S., Henehan, G. T. M., & Frías, J. M. (2011). Purification and properties of *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 lipase and its potential in flavour ester synthesis. *Bioresource Technology*, 102(3), 3373–3379. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.074>
- Eom, G. T., Lee, S. H., Song, B. K., Chung, K. W., Kim, Y. W., & Song, J. K. (2013). High-level extracellular production and characterization of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116(2), 165–170.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.02.016>

Ferrara, P., Apostolakis, J., & Caflisch, A. (2002). Evaluation of a fast implicit solvent model for molecular dynamics simulations. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 46(1), 24–33.

<https://doi.org/10.1002/prot.10001>

Fjerbaek, L., Christensen, K. V., & Norddahl, B. (2009). A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(5),

1298–1315. <https://doi.org/10.1002/bit.22256>

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocols Handbook* (pp. 571–607). Totowa, NJ: Humana Press.

<https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>

Ginalski, K. (2006). Comparative modeling for protein structure prediction. *Current Opinion in Structural Biology*, 16(2), 172–177. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2006.02.003>

Gog, A., Roman, M., Toşa, M., Paizs, C., & Irimie, F. D. (2012). Biodiesel production using enzymatic transesterification - Current state and perspectives. *Renewable Energy*, 39(1), 10–

16. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.08.007>

Gomez, M. del R. F., Meza, D. L. M., & Rodriguez, L. P. (2017). Producción de biodiesel mediante transesterificación enzimática de aceite extraído de residuos de la industria alimenticia/Biodiesel production by enzymatic transesterification of oil extracted from food industrial... *Prospectiva*, 16(1), 26–33. <https://doi.org/10.15665/RP.V16I1.1164>

Holmquist, M. (2000). Alpha Beta-Hydrolase Fold Enzymes Structures, Functions and

- Mechanisms. *Current Protein and Peptide Science*, 1(2), 209–235.  
<https://doi.org/10.2174/1389203003381405>
- Hosseini, M., Karkhane, A. A., Yakhchali, B., Shamsara, M., Aminzadeh, S., Morshedi, D., ... Safari, Z. (2013). In Silico and Experimental Characterization of Chimeric *Bacillus thermocatenuatus* Lipase with the Complete Conserved Pentapeptide of *Candida rugosa* Lipase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169(3), 773–785.  
<https://doi.org/10.1007/s12010-012-0014-0>
- Houde, A., Kademi, A., & Leblanc, D. (2004). Lipases and Their Industrial Applications: An Overview. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118(1–3), 155–170.  
<https://doi.org/10.1385/ABAB:118:1-3:155>
- Housaindokht, M. R., Bozorgmehr, M. R., & Monhemi, H. (2012). Structural behavior of *Candida antarctica* lipase B in water and supercritical carbon dioxide: A molecular dynamic simulation study. *Journal of Supercritical Fluids*, 63, 180–186.  
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2011.12.010>
- Huang, B. (2009). MetaPocket: A Meta Approach to Improve Protein Ligand Binding Site Prediction. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 13(4), 325–330.  
<https://doi.org/10.1089/omi.2009.0045>
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- Hunter, S., Apweiler, R., Attwood, T. K., Bairoch, A., Bateman, A., Binns, D., ... Yeats, C. (2009). InterPro: the integrative protein signature database. *Nucleic Acids Research*, 37(Database), D211–D215. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn785>

- Jaeger, K.-E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Heuvel, M., & Misset, O. (1994a). Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*, *15*(1), 29–63. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00121.x>
- Jaeger, K.-E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Heuvel, M., & Misset, O. (1994b). Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*, *15*(1), 29–63. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00121.x>
- Javed, S., Azeem, F., Hussain, S., Rasul, I., Siddique, M. H., Riaz, M., ... Nadeem, H. (2017). Bacterial lipases: A review on purification and characterization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, (August). <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014>
- Jorgensen, W. L., Jorgensen, W. L., Maxwell, D. S., & Tirado-rives, J. (1996). Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J. AM. CHEM. SOC.*, 11225--11236. Retrieved from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.334.2959>
- Kapoor, M., & Gupta, M. N. (2012). Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, *47*(4), 555–569. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.011>
- Kawabata, T. (2003). MATRAS: a program for protein 3D structure comparison. *Nucleic Acids Research*, *31*(13), 3367–3369. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg581>
- Khan, F. I., Nizami, B., Anwer, R., Gu, K.-R., Bisetty, K., Hassan, M. I., & Wei, D.-Q. (2017a). Structure prediction and functional analyses of a thermostable lipase obtained from *Shewanella putrefaciens*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *35*(10), 2123–2135. <https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1206837>

- Khan, F. I., Nizami, B., Anwer, R., Gu, K. R., Bisetty, K., Hassan, M. I., & Wei, D. Q. (2017b). Structure prediction and functional analyses of a thermostable lipase obtained from *Shewanella putrefaciens*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 35(10), 2123–2135. <https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1206837>
- Kiran, S., Arshad, Z., Nosheen, S., Kamal, S., Gulzar, T., Majeed, M. S., ... Rafique, M. A. (2016). Microbial Lipases: Production and Applications: A Review. *Jbcbb*, 1(2), 7–20.
- Kumar, A., Sharma, A., Kaur, G., Makkar, P., & Kaur, J. (2017). Functional characterization of hypothetical proteins of *Mycobacterium tuberculosis* with possible esterase/lipase signature: a cumulative in silico and in vitro approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 35(6), 1226–1243. <https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1174738>
- Kumaresan, J., Kothai, T., & Lakshmi, B. S. (2011). In silico approaches towards understanding CALB using molecular dynamics simulation and docking. *Molecular Simulation*, 37(12), 1053–1061. <https://doi.org/10.1080/08927022.2011.589050>
- Kuzmanic, A., & Zagrovic, B. (2010). Determination of Ensemble-Average Pairwise Root Mean-Square Deviation from Experimental B-Factors. *Biophysical Journal*, 98(5), 861–871. <https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2009.11.011>
- Large, K. P., Mirjalili, N., Peacock, M. O. L. M., Zormpaidis, V., Walsh, M., Cavanagh, M. E., ... Ison, A. P. (1999). Lipase activity in Streptomycetes. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(7), 569–575. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00080-0](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00080-0)
- Larsen, M. W., Bornscheuer, U. T., & Hult, K. (2008). Expression of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris* and various *Escherichia coli* systems. *Protein Expression and Purification*, 62(1), 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.07.012>

- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., Thornton, J. M., & IUCr. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26(2), 283–291. <https://doi.org/10.1107/S0021889892009944>
- Lawrence, R. C. (1967). The Production and Characterization of Lipases from a Micrococcus and a Pseudomonad. *J. Gen. Microbid*, 48(1967), 401–418. <https://doi.org/10.1099/00221287-48-3-401>
- Liu, W., Li, M., & Yan, Y. (2017). Heterologous expression and characterization of a new lipase from *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 and used for biodiesel production. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16036-7>
- Lopes, D. B., Fraga, L. P., Fleuri, L. F., & Macedo, G. A. (2011). Lipase and esterase: to what extent can this classification be applied accurately? *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31(3), 603–613. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000300009>
- Lüthy, R., Bowie, J. U., & Eisenberg, D. (1992). Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*, 356(6364), 83–85. <https://doi.org/10.1038/356083a0>
- Mala Pahoja, V., & Ali Sethar, mumtaz. (n.d.). A Review of Enzymatic Properties of Lipase in Plants, Animals and Microorganisms. Retrieved from <http://www.docsdrive.com/pdfs/ansinet/jas/2002/474-484.pdf>
- Mercado Malebrán, F. (2014). Modelamiento estructural y caracterización de una lipasa activa a bajas temperaturas mediante ingeniería de proteínas. Retrieved from <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/129840>
- Monajjemil, M., & Olliaey2, A. R. (2009). Gyration Radius and Energy Study at Different

- Temperatures for Acetylcholine Receptor Protein in Gas Phase by Monte Carlo, Molecular and Langevin Dynamics Simulations. *Journal of Physical and Theoretical Chemistry of Islamic Azad University of Iran*, 5(4), 195–201. Retrieved from [www.pdb.org](http://www.pdb.org)
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Pique, M. E., Lindstrom, W. L., Huey, R., Hart, W. E., ... Olson, A. J. (2009). AutoDock Version 4.2. *User Guide*, 1–49.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8(10), 785–786. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1701>
- Praveen Kumar, P., Sagaya Jansi, R., Saravana Kumar, P., Nimal Christudas, I. V. S., Preetam Raj, J. P., Vijayakumar, A., ... Ignacimuthu, S. (2017). Optimization of biosynthesis parameters, partial purification and characterization of extracellular lipase from soil derived *Streptomyces* sp. Loyola Lipase-1. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12(June), 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.10.011>
- Pronk, S., Páll, S., Schulz, R., Larsson, P., Bjelkmar, P., Apostolov, R., ... Lindahl, E. (2013). GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics*, 29(7), 845–854. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt055>
- Roy, A., Yang, J., & Zhang, Y. (2012). COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation. *Nucleic Acids Research*, 40(W1), W471–W477. <https://doi.org/10.1093/nar/gks372>
- Sandoval, G. (2012). *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols*. *Life Sciences* (Vol. 531). [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1_1)

- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., & Peitsch, M. C. (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*, *31*(13), 3381–3385. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg520>
- Singh, B., Bulusu, G., & Mitra, A. (2015). Understanding the thermostability and activity of bacillus subtilis lipase mutants: Insights from molecular dynamics simulations. *Journal of Physical Chemistry B*, *119*(2), 392–409. <https://doi.org/10.1021/jp5079554>
- Skolnick, J., & Fetrow, J. S. (2000). From genes to protein structure and function: novel applications of computational approaches in the genomic era. *Trends in Biotechnology*, *18*(1), 34–39. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(99\)01398-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(99)01398-0)
- Standard, J. (2015). *Energy Minimization Methods*. Retrieved from [https://about.illinoisstate.edu/standard/Documents/CHE 380.37/Handouts/380.37emin.pdf](https://about.illinoisstate.edu/standard/Documents/CHE%20380.37/Handouts/380.37emin.pdf)
- Suplatov, D. A., Arzhanik, V. K., & Švedas, V. K. (2011). Comparative Bioinformatic Analysis of Active Site Structures in Evolutionarily Remote Homologues of  $\alpha,\beta$ -Hydrolase Superfamily Enzymes. *ACTA NATURAE*, *3*(18). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3347592/pdf/AN20758251-08-093.pdf>
- Suplatov, D. A., Besenmatter, W., Švedas, V. K., & Svendsen, A. (2012). Bioinformatic analysis of alpha/beta-hydrolase fold enzymes reveals subfamily-specific positions responsible for discrimination of amidase and lipase activities. *Protein Engineering, Design and Selection*, *25*(11), 689–697. <https://doi.org/10.1093/protein/gzs068>
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *72*(2), 211–222. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0465->

8

- Tsuchiya, Y., Morioka, K., Shirai, J., Yokomizo, Y., & Yoshida, K. (2003). Gene design of signal sequence for effective secretion of protein. *Nucleic Acids Symposium Series*, 3(1), 261–262. <https://doi.org/10.1093/nass/3.1.261>
- Vujaklija, D., Schröder, W., Abramić, M., Zou, P., Leščić, I., Franke, P., & Pigac, J. (2002). A novel streptomycete lipase: Cloning, sequencing and high-level expression of the *Streptomyces rimosus* GDS(L)-lipase gene. *Archives of Microbiology*, 178(2), 124–130. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0430-6>
- Wiederstein, M., & Sippl, M. J. (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, 35(Web Server), W407–W410. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm290>
- Williams, E. J. B., Pal, C., & Hurst, L. D. (2000). The molecular evolution of signal peptides. *Gene*, 253(2), 313–322. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00233-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00233-X)
- Xu, T., Gao, B., Zhang, L., Lin, J., Wang, X., & Wei, D. (2010). Template-based modeling of a psychrophilic lipase: Conformational changes, novel structural features and its application in predicting the enantioselectivity of lipase catalyzed transesterification of secondary alcohols. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(12), 2183–2190. <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2010.08.012>
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12(1), 7–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>

Yuan, Z., Bailey, T. L., & Teasdale, R. D. (2005). Prediction of protein B-factor profiles. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 58(4), 905–912. <https://doi.org/10.1002/prot.20375>