

УДК 633.85: 631.95: 577.3

# Молекулярный *in silico* скрининг и докинг потенциальных ингибиторов активности ферментов растительного сырья

Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева

## КОРРЕСПОНДЕНЦИЯ:

**Иванов Николай Викторович**

Адрес: 127434, г. Москва, Тимирязевская ул., 49.

E-mail: nikolay.ivanov@rgau-msha.ru

## ЗАЯВЛЕНИЕ О ДОСТУПНОСТИ ДАННЫХ:

данные текущего исследования доступны по запросу у корреспондирующего автора.

## ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:

Иванов, Н. В. (2023). Молекулярный *in silico* скрининг и докинг потенциальных ингибиторов активности ферментов растительного сырья. *Хранение и переработка сельхозсырья*, (1), 117–135. <https://doi.org/10.36107/spfp.2023.399>

ПОСТУПИЛА: 15.02.2023

ПРИНЯТА: 10.03.2023

ОПУБЛИКОВАНА: 30.03.2023

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ:

авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.



Н. В. Иванов

## АННОТАЦИЯ

**Введение.** Липолиз триацилглицеринов под действием собственной ферментативной системы в семенах подсолнечника является естественным биохимическим процессом, в рамках которого образуются моно- и диглицериды жирных кислот. Эти вещества являются предшественниками токсичных пищевых контаминантов – эфиров глицидола и монохлорпропандиола, которые образуются в технологии переработки жиров. Чтобы снизить вероятность их образования, представляет высокий практический интерес изучение влияния компонентов состава масличного сырья на естественные биохимические процессы в семенах подсолнечника в хранении.

**Цель.** Изучить механизмы влияния молекулярных взаимодействий минорных компонентов состава семян подсолнечника с ферментной системой на биохимический процесс распада триацилглицеринов.

**Методы.** В работе использовались моделирование трехмерной структуры липазы по гомологии, филогенетический анализ, множественное выравнивание аминокислотных последовательностей, анализ карт Раманчандрана, молекулярный докинг.

**Результаты.** Наиболее близким к липазе семян подсолнечника по строению аминокислотной последовательности является панкреатическая липаза собаки (*Canis lupus familiaris*), кодируемая геном MPL1. Определено, что согласно множественному выравниванию аминокислотных последовательностей активные центры изучаемых липаз ATLIP1, LIPG, MPL1 не входят в консервативные участки, однако активные центры липазы подсолнечника MPL1 наиболее близки к консервативным участкам потенциального шаблона для моделирования.

**Выводы.** По итогам множественного выравнивания аминокислотных последовательностей и филогенетического анализа было определено, что выбранные шаблоны для построения модели липаз подсолнечника являются близкородственными и могут быть использованы для гомологичного моделирования. Ингибиторы липазной активности микробного происхождения показали устойчивую корреляционную зависимость со значениями концентрации полумаксимального ингибирования IC50. По результатам молекулярного докинга минорных компонентов масличного сырья показано, что наибольшим родством к липазе обладают хлорогеновая и неохлорогеновая кислоты и даидзеин.

## КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

липаза подсолнечника, гомологичное моделирование, филогенетический анализ, молекулярный докинг

# Molecular *in Silico* Screening and Docking of Potential Inhibitors of Enzyme Activity of Plant Raw Materials

Russian State Agrarian University –  
Moscow Timiryazev Agricultural  
Academy

## CORRESPONDENCE:

**Nikolay V. Ivanov**

Address: 49, Timiryazevskaya str.,  
Moscow, 127434, Russia  
E-mail: nikolay.ivanov@rgau-msha.ru

## FOR CITATIONS:

Ivanov, N. V. (2023). Molecular in silico screening and docking of potential inhibitors of enzyme activity of plant raw materials. *Storage and Processing of Farm Products*, (1), 117–135. <https://doi.org/10.36107/spfp.2023.399>

RECEIVED: 15.02.2023

ACCEPTED: 10.03.2023

PUBLISHED: 30.03.2023

## DECLARATION OF COMPETING

INTEREST: none declared.



Nikolay V. Ivanov

## ABSTRACT

**Background.** Lipolysis of triacylglycerols under the action of its own enzymatic system in sunflower seeds is a natural biochemical process in which mono- and diglycerides of fatty acids are formed. These substances are precursors of toxic food contaminants - glycidol and monochloropropanediol esters, which are formed in the technology of fat processing. In order to reduce the likelihood of their formation, it is of high practical interest to study the effect of the components of the composition of oilseed raw materials on the natural biochemical processes in sunflower seeds in storage.

**Methods.** The work used modeling of the three-dimensional structure of lipase by homology, phylogenetic analysis, multiple alignment of amino acid sequences, analysis of Ramachandran maps, molecular docking.

**Results.** It is shown that the closest to the lipase of sunflower seeds in the amino acid sequence is the pancreatic lipase of a dog (*Canis lupus familiaris*), encoded by the MPL1 gene. It was determined that according to the multiple alignment of amino acid sequences, the active centers of the studied sunflower lipases ATLIP1, LIPG, MPL1 are not included in the conservative sites, but the active centers of sunflower lipase MPL1 are closest to the conservative sites of a potential template for modeling.

**Conclusions.** Based on the results of multiple alignment of amino acid sequences and phylogenetic analysis, it was determined that the selected templates for constructing a model of sunflower lipases are closely related and can be used for homologous modeling. Inhibitors of lipase activity of microbial origin showed a stable correlation with the values of the concentration of semi-maximal inhibition of IC50. According to the results of molecular docking of minor components of oilseed raw materials, it was shown that chlorogenic and neochlorogenic acids and daidzein have the greatest affinity for lipase.

## KEYWORDS

sunflower lipase, homologous modeling, phylogenetic analysis, molecular docking

## ВВЕДЕНИЕ

Процесс производства растительных масел включает этап хранения масличных семян, который характеризуется биохимическими и физиологическими процессами внутри семечка, направленными на сохранение жизнеспособности для дальнейшего проращивания. Среди естественных биохимических процессов, происходящих в семенах, представляет интерес изучение гидролиз (липолиз) запасных липидов семян — триацилглицеринов, под действием собственной ферментной системы — гидролитического фермента липазы. Гидролиз приводит к образованию моно- и диацилглицеридов жирных кислот, которые, в свою очередь, являются технологическими предшественниками эфиров глицидола и монохлорпропандиола<sup>1</sup>, которые обладают канцерогенными (Schultrich et al., 2020), мутагенными, генотоксичными свойствами (MacMahon & Beekman, 2022). Кроме того, свободные жирные кислоты как продукт гидролиза, также являются фактором, ухудшающим потребительские характеристики масла.

Одним из принципиально важных биохимических показателей устойчивости семян в хранении является показатель активности липазы, который в значительной степени зависит от условий среды: наибольшей активностью липаза семян подсолнечника обладает при pH 7,5 и температуре 50 °C (Sagiroglu & Arabaci, 2005).

В настоящее время одним из интересных методологических подходов к теоретическому предсказанию активности ферментов является молекулярное моделирование их взаимодействия фермент-субстрат. Для проведения подобных экспериментов в условиях *in silico* применяются трехмерные структуры белков, полученные методами рентгеновской кристаллографии, либо ЯМР-спектроскопии и находящиеся в открытом доступе в базах данных, например таких как RCSB Protein Databank (*Research Collaborative for Structural Bioinformatics PDB, США*) (Berman et al., 2003; Burley et al., 2023). На момент проведения данного исследования не существует адекватных моделей липазы масличного сырья, в частности подсолнечника, в связи с чем нет ин-

формации о том, как лиганды взаимодействуют с липазами. Это может препятствовать точному пониманию механизма взаимодействия липаз с элементами состава масличного сырья, а также характеристики их физиологических функций в рамках проводимого исследования.

Тем не менее нельзя не отметить, что уже проводились исследования по гомологичному моделированию липазы на основе шаблонов. В работе была создана трехмерная структура липазы *S. Xylosus*, охарактеризованы ее свойства, в частности взаимодействие ее каталитической триады Ser-Asp-His с ионами металлов, оценено их влияние на липолитическую активность фермента (Bertoldo et al., 2011).

Были получены молекулярные модели, где в качестве шаблонов использовались кристаллические структуры липаз *Pseudomonas sp.*, *Serratia marcescens*. Авторы отмечают, что ионы металлов, присутствующие в прогнозируемой структуре фермента, могут придавать ей дополнительную структурную стабильность, однако отсутствие аргинина, солевого мостика и низкий процент пролина способствуют адаптации психрофильных ферментов при низких температурах (Mohamad Ali et al., 2013).

Необходимо отметить интересную работу коллег из Японии, которым удалось охарактеризовать семейство эволюционно родственных триглицеридлипаз: липопропротеинлипазы, печеночной и эндотелиальной липазы, рентгенокристаллографических структур которых, аналогично липазам семян подсолнечника, нет в открытых источниках информации. Авторами было проведено моделирование структур липаз по гомологии, оценка качества полученных моделей и молекулярный докинг для валидации этих структур на известных субстратах-ингибиторах. В работе идентифицировали связывающие карманы, получили информацию о степени связывания специфических и неспецифических ингибиторов. Отмечается, что конформационные характеристики активного центра эндотелиальной липазы выше, чем у родственных ей липаз. Кроме того, авторами подчеркивается, что ингибирующая активность липазы является

<sup>1</sup> Code of practice for the reduction of 3-monochloropropane-1,2- diol esters (3-mcpdes) and glycidyl esters (ges) in refined oils and food products made with refined oils. (2019). [https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%3A%2F%2Fworkspace.fao.org%2Fsites%2Fcodex%2FStandards%2FCXC+79-2019%2FCXC\\_079e.pdf](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%3A%2F%2Fworkspace.fao.org%2Fsites%2Fcodex%2FStandards%2FCXC+79-2019%2FCXC_079e.pdf)

результатом блокирования каталитического сайта, а не образования сильного взаимодействия с каталитическими остатками (Wang et al., 2013).

Еще одно интересное исследование было проведено в Тунисе на липазе широко используемого в биологических исследованиях растения Резуховидка Таля (*Arabidopsis thaliana*), в рамках которого была получена трехмерная структура липазы данного растения. При этом в качестве образца (шаблона) для построения модели использовалась панкреатическая липаза человека. Была получена модель высокого качества с большим процентом (91,5%) аминокислотных остатков в благоприятной зоне карты Раманчандрана (Messaoudi et al., 2011).

Авторами во многих работах была показана определенная ингибирующая способность по отношению к панкреатической липазе человека таких биологически активных химических веществ как хлорогеновой кислоты, катехина (Sikiru et al., 2022), гликозида алоэина А (*Aloe vera* (L.) (Deora et al., 2023), алкалоидов конофиллинов восточно-индийского олеандра (*Tabernaemontana divaricata*) (Sridhar et al., 2017), флавонов и стеролов агарового дерева (*Aquilaria subintegra*) (Ibrahim et al., 2020).

Химический состав семян подсолнечника характеризуется наличием значительного числа соединений (Anjum et al., 2012). Большой интерес представляет изучение влияния этих веществ матрикса семян на активность процесса липолиза. Можно предположить наличие такого влияния исходя из данных (Nebeg et al., 2019), где было показано на микробальной липазе *Candida rugosa* и дикорастущем растении тапсия гарганская (*T. Garganica*), что нортриболид и триболид, содержащиеся в семенах этого растения, являются наиболее эффективными ингибиторами липазы с высокой степенью сродства к данному ферменту. В аналогичной работе оценивалось ингибирующая роль биоактивных соединений состава гарцинии королевской (*Garcinia prainiana* King) на активность панкреатической липазы человека. Показано, что аментофлавоны, соединения, входящие в состав многих лекарственных растений и относящиеся к группе флавоноидов, демонстрирует высокую ингибирующую активность по отношению к панкреатической липазе человека, образуя с ее каталитическими остатками Ser152 и His263 две водородные связи и гидрофобные взаимодей-

ствия с Ala260 и Ala259 (Supian et al., 2022). Не менее интересной можно назвать работу, в которой оценивалась ингибирующая способность компонентов состава корней солодки (*Glycyrrhiza glabra*) на панкреатическую липазу человека. Из 12 изученных авторами флавоноидов наибольшую ингибирующую способность продемонстрировал изоликувиритигенин с показателем сродства к липазе — 23,7 Ккал/моль и водородными связями с аминокислотными остатками His263, Phe215, Asp79, Arg256 (Birari et al., 2011).

Литературные данные убедительно свидетельствуют об активных исследованиях определения механизмов активности ферментов, однако замечен недостаток информации в части изучения биохимических и молекулярных механизмов взаимодействия ферментов масличного сырья, в частности липазы, и компонентов состава семян, которые потенциально могут изменять скорость протекания биохимических реакций, обусловленный в том числе отсутствием трехмерной структуры липазы семян подсолнечника, получаемой методом рентгенструктурного анализа.

Целью данной работы стала разработка модели липазы подсолнечника в условиях *in silico*, оценка степени сродства и механизмов связывания с ней минорных компонентов масличного сырья. Задачи исследования: (1) получение трехмерных структур моделей липаз семян подсолнечника; (2) оценка качества полученных моделей; (3) валидация разработанной модели липазы семян подсолнечника; скрининг взаимодействия трехмерной структуры липазы семени подсолнечника и минорных компонентов состава подсолнечника.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Объекты исследования

В качестве объектов исследования использовали аминокислотные последовательности трех липаз подсолнечника, кодируемых генами MPL1, ATGP1 и LIPG, а также липаз, которые по литературным данным относятся к семейству эукариотических липаз. В качестве лигандов изучали вещества, которые согласно литературным данным, могут являться конкурентными ингибиторами ферментативной активности и отчасти минорными ком-



понентами масличного сырья. Полный перечень приведен в дополнительных материалах к статье (Таблицы S1, S2).

## Методы

### *Филогенетический анализ ферментов*

Филогенетический анализ осуществлялся с применением программы Mega X (Институт геномики и эволюционной медицины, Университет Темпл, Филадельфия, Пенсильвания, США) согласно (Kumar et al., 2018). Для построения филогенетического дерева применялся метод максимального или наибольшего правдоподобия (англ. Maximum Likelihood method). Тест на филогению был проведен методом Бутстреп (англ. Bootstrap method) с заданным количеством загрузочных копий (англ. No. of Bootstrap Replications) в размере 500. Исходные деревья для эвристического поиска были получены путем применения метода ближайшего соседства к матрице попарных расстояний, оцененных с использованием модели Джонсона-Тейлора-Торнтон JTT (Jones-Taylor-Thorton) (Jones et al., 1992).

### *Гомологичное моделирование трехмерных моделей структур липаз подсолнечника*

Построение трехмерных структур моделей липаз подсолнечника осуществлялось методом моделирования по гомологии с использованием Swiss-Model (Swiss Institute of Bioinformatics) согласно (Waterhouse et al., 2018) по аминокислотным последовательностям, липаз, взятых из базы данных uniprot.org. Входными данными служили аминокислотные последовательности липаз подсолнечника в формате FASTA. Они были необходимы для поиска шаблона — эволюционных белковых структур из библиотеки шаблонов Swiss-Model SMTL (Biasini et al., 2014). Использовался алгоритм поиска базы данных BLAST (Altschul et al., 1997, Camacho et al., 2009).

### *Оценка качества полученных моделей липаз*

Полученные в результате моделирования трехмерные шаблоны моделей выбирались в зависимости от их качества согласно показателям: глобальной оценке качества модели (QMEAN) (Waterhouse et al., 2018) и оценке качества по третичной и четвер-

тичной структурам белка GMQE (Bertoni et al., 2018; Benkert et al., 2011; Bienert et al., 2016). В программе UCSF Chimera (UCSF, США) проводилось построение и анализ карт Рамачандрана для липаз (Pettersen et al., 2004).

### *Выравнивание последовательностей липаз подсолнечника*

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей исследуемых липаз подсолнечника и гомологичных им липаз осуществлялось с использованием UCSF Chimera (UCSF, США) (Meng et al., 2004).

## Молекулярный докинг

Для процедуры молекулярного докинга использовалось программное обеспечение AutoDock Vina. Центр связывания липазы с лигандами представили в виде области размером 40x40x40 Å вокруг аминокислотных остатков активного центра липазы (Ser186, Asp356, His389), что обусловлено целью получить как можно большее число вариантов связывания лиганда с активными центрами фермента. Параметр «exhaustiveness», показывающий количество вычислительных усилий при процедуре стыковочного эксперимента, был задан 15, для получения воспроизводимого результата молекулярного докинга. Параметр «energy\_range» был установлен 4 (Trott et al., 2010).

## Интерпретация данных молекулярного докинга

Интерпретация полученных данных проводилась с использованием сервиса Proteins.Plus (Центр биоинформатики (ZBH)) Университета Гамбурга (Schöning et al., 2020). Все необходимые преобразования форматов файлов проводили с использованием OpenBabel (версия 3.1.1) (O'boyle et al., 2011).

## Анализ данных

Корреляционный анализ данных осуществлялся в программе MS Excel 2019 (Корпорация Майкрософт, США). Корреляционный анализ использовался для установления силы связи между основными

характеристиками моделей липаз семян подсолнечника в рамках нуль-гипотезы корреляционного анализа:  $r=0$ . Для этого был использован коэффициент корреляции Спирмена, а также вычисление частных корреляций между моделями липаз семян подсолнечника. Таким образом, можно не только установить силу связи между переменными, но и влияние моделей липаз семян подсолнечника на входные данные их основных характеристик. Использование коэффициента корреляции Спирмена обусловлено непараметрическим методом корреляционного анализа, не требующего проверки на нормальность распределения и условие равенства дисперсий. Уровень значимости был принят на уровне 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Поиск аминокислотных последовательностей липаз подсолнечника для моделирования

С применением алгоритма BLAST в программе UCSF Chimera были найдены 3 (три) PDB-струк-

туры: панкреатическая липаза человека (*Homo Sapiens*), PDB: 1HLG; лизосомальная липаза человека (*Homo Sapiens*), PDB: 6V7N; панкреатическая липаза собаки (*Canis lupus familiaris*), PDB 1K8Q, которые послужили белками-гомологами изучаемым липазам подсолнечника.

### Филогенетический анализ трехмерных структур липаз подсолнечника

На следующем этапе исследований был проведен филогенетический анализ с построением филогенетических деревьев изучаемых липаз подсолнечника, липаз, отобранных программой Chimera (алгоритм Blast Protein), а также липаз, которые согласно базе данных PIRSF(Wu et al., 2004) образуют крупное семейство эукариотических липаз. В общей сложности было проанализировано 14 липаз, информация о которых представлена в Таблице 1.

Анализ проводили методом, основанным на принципе наибольшего правдоподобия (англ. maximum likelihood method) (Рисунок 1)

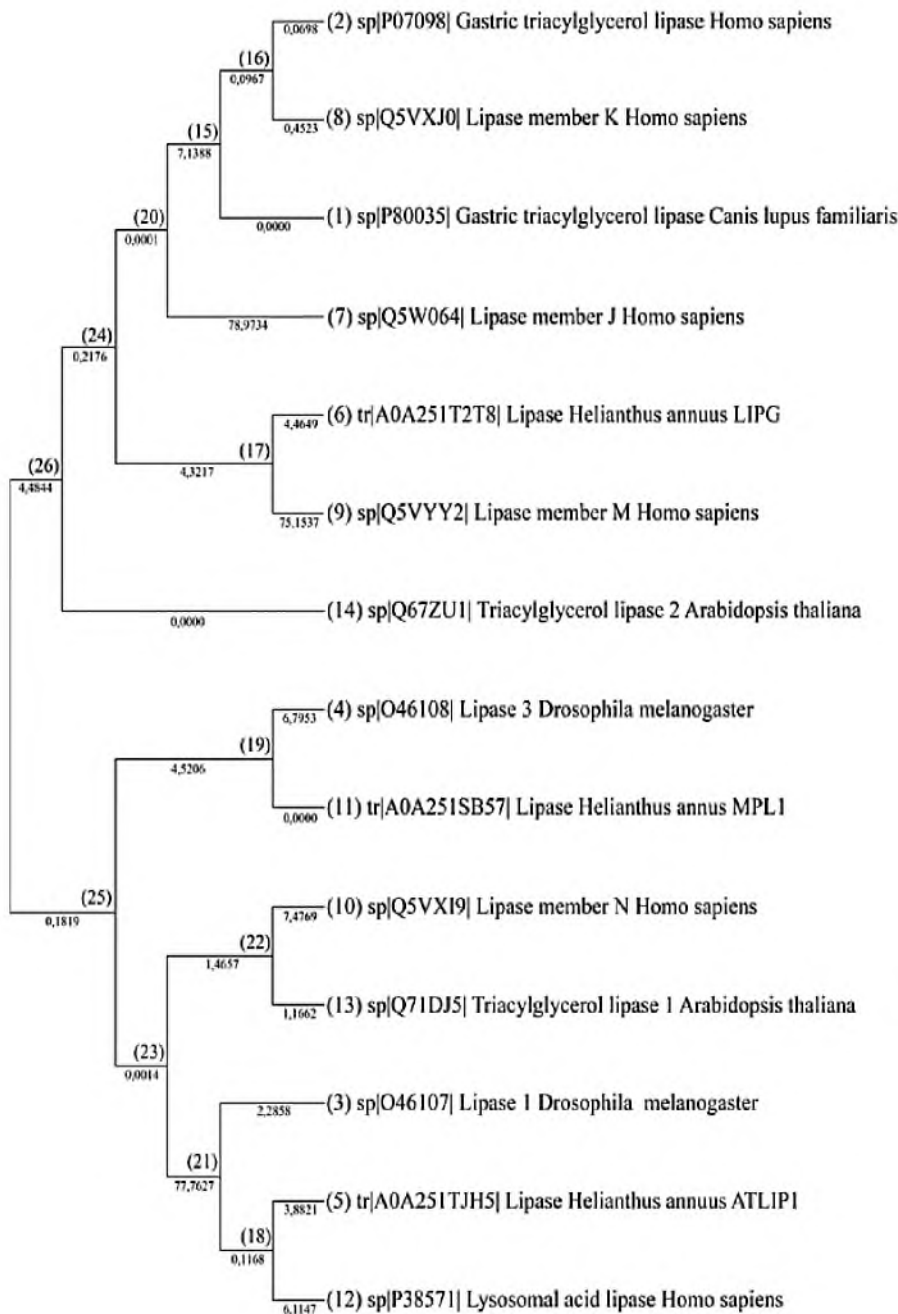
Таблица 1

Данные об изучаемых липазах

Липаза	Ген	PDB	UniProtKB	Организм	Эволюционное расстояние, $d$
Растительная липаза	MPL1	—	A0A251SB57	Подсолнечник ( <i>Helianthus annuus</i> )	0.0000
Триацилглицерол липаза 2	LIP2	—	Q67ZU1	Резуховидка Таля ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	0.0000
Панкреатическая липаза	LIPF	1K8Q	P80035	Собака ( <i>Canis lupus familiaris</i> )	0.0000
Панкреатическая липаза	LIPF	1HLG	P07098	Человек ( <i>Homo sapiens</i> )	0.0698
член липазы К	LIPK	—	Q5VXJ0	Человек( <i>Homo sapiens</i> )	0.4523
Триацилглицерол липаза 1	LIP1	—	Q71DJ5	Резуховидка Таля ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	1.1662
Липаза 1	LIP1	—	O46107	Муха Дрозофила фруктовая ( <i>Drosophila melanogaster Fruit fly</i> )	2.2858
Растительная липаза	ATLIP1	—	A0A251TJH5	Подсолнечник ( <i>Helianthus annuus</i> )	3.8821
Растительная липаза	LIPG	—	A0A251T2T8	Подсолнечник ( <i>Helianthus annuus</i> )	3.4649
Лизосомальная липаза	LIPA	6V7N	P38571	Человек ( <i>Homo sapiens</i> )	6.1147
Липаза 3	LIP3	—	O46108	Муха Дрозофила фруктовая ( <i>Drosophila melanogaster Fruit fly</i> )	6.7953
член липазы Н	LIPN	—	Q5VXI9	Человек ( <i>Homo sapiens</i> )	7.4769
Член липазы М	LIPM	—	Q5VYY2	Человек ( <i>Homo sapiens</i> )	75.1537
член липазы J	LIPJ	—	Q5W064	Человек ( <i>Homo sapiens</i> )	78.9734

**Рисунок 1**

Филогенетическое дерево ферментов.



*Примечание.* (1) панкреатическая липаза собаки (*Canis lupus familiaris*), PDB 1K8Q; (2) панкреатическая липаза человека (*Homo Sapiens*), PDB: 1HLG; (3) липаза 1 мухи дрозофилы (*Drosophila melanogaster*); (4) липаза 3 мухи дрозофилы фруктовой (*Drosophila melanogaster Fruit fly*); (5) липаза подсолнечника (*Helianthus annuus*) ATLIP1; (6) липаза подсолнечника (*Helianthus annuus*) LIPG; (7) липаза J человека (*Homo Sapiens*); (8) липаза K человека (*Homo Sapiens*); (9) липаза M человека (*Homo Sapiens*); (10) липаза N человека (*Homo Sapiens*); (11) липаза подсолнечника (*Helianthus annuus*) MPL1; (12) лизосомальная кислая липаза человека (*Homo sapiens*), PDB: 6V7N; (13) триацилглицерол липаза 1 человека (*Homo sapiens*); (14) триацилглицерол липаза 2 человека (*Homo sapiens*); (15) терминальный узел; (16) внутренний узел; (17) внутренний узел; (18) терминальный узел; (19) внутренний узел; (20) внутренний узел; (21) внутренний узел; (22) внутренний узел; (23) внутренний узел; (24) внутренний узел; (25) внутренний узел; (26) внутренний узел. Цифрами показаны эволюционные расстояния.

Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия (англ. *Maximum Likelihood method*) (Рисунок 1) состоит из одного корня и двадцати шести узлов, 2 из которых (№ 15 и 18) являются внешними — терминальными (*Terminal nodes*), а остальные 24 — внутренними (*Internal nodes*). Липаза подсолнечника ATLIP1 и лизосомальная липаза человека образуют кладу (*clade*) (узел 18), тем самым данная базальная группа показывает сестринское родство. Данные липазы также образуют кладу с Липазой 1 мухи дрозофилы (узел 21). Липаза подсолнечника ATLIP1 имеет сходие с лизосомальной липазой человека функции осуществления внутриклеточной деградации эфиров стероидов и триацилглицеринов (Ameis et al., 1994; Warner et al., 1984). В каталитической активности лизосомальной липазы в большей степени играет роль His108 (Ries et al., 1998).

Аналогично, панкреатическая липаза человека и панкреатическая липаза собаки также образуют кладу и показывают сестринское родство (узел 15). В данном случае, также с учетом, показанных ранее результатов множественного выравнивания аминокислотных последовательностей, можно отметить, что панкреатические липазы человека и собаки имеют известные общие функции по расщеплению сложноэфирных связей в молекулах триацилглицеринов с образованием моно- и диглицеридов жирных кислот в желудочно-кишечных трактах соответственно человека (Roussel et al., 1999; Rogalska et al., 1990) и собаки (Carriere et al., 1991; Carrière et al., 1992). Эти две панкреатические липазы также образуют кладу с липазой К человека (узел 16), которые, в свою очередь, образуют большую кладу с липазой J человека (узел 20).

Липаза подсолнечника MPL1 образует кладу с липазой 3 мухи дрозофилы (узел 19). Клада этих двух липаз образует крупную кладу с ранее описанными четырьмя липазами — панкреатическими человека и собаки, а также липазами К и J человека. Липаза подсолнечника LIPG образует кладу с липазой М человека (узел 17). Описанные липазы формируют крупные кладу (узлы 26 и 24). Формирование общего филогенетического дерева осуществлено крупными кладами (узлы 23 и 25). Цифрами на рисунке показаны эволюционные расстояния.

Значение наивысшего логарифмического правдоподобия дерева составило -15236.08. Деревья для

эвристического поиска были получены автоматически путем применения алгоритмов ближайшего соседства и BioNJ к матрице попарных расстояний, оцененных с использованием модели Джонсона-Тейлора-Торнтон (JTT (Jones-Taylor-Thorton) (Jones et al., 1992). Эволюционные дистанции между липазами и ближайшими узлами представлены в Таблице 1.

Все три изучаемых липазы подсолнечника принадлежат к крупному семейству эукариотических липаз, в которое входят, по данным PIRSF (Wu et al., 2004), в общей сложности 11 липаз. Это семейство липаз состоит из структурных доменов гидролитических ферментов, имеющих альфа / бета складку. Ядро каждого фермента представляет собой альфа / бета-лист, содержащий 8 нитей, соединенных спиралями (David et al., 1992). Эти ферменты произошли от общего предка, сохранив расположение каталитических остатков. Каждый из ферментов имеет каталитическую триаду, элементы которой расположены на петлях, которые являются наиболее хорошо сохранившимися структурными особенностями складки. В большинстве членов семейства бета-цепи параллельны, но у некоторых есть инверсия первых цепей, что придает им антипараллельную ориентацию. Остатки каталитической триады представлены в виде петель. Один из них — нуклеофильный локоть, наиболее консервативный элемент складки. У некоторых других членов отсутствует один или все каталитические остатки.

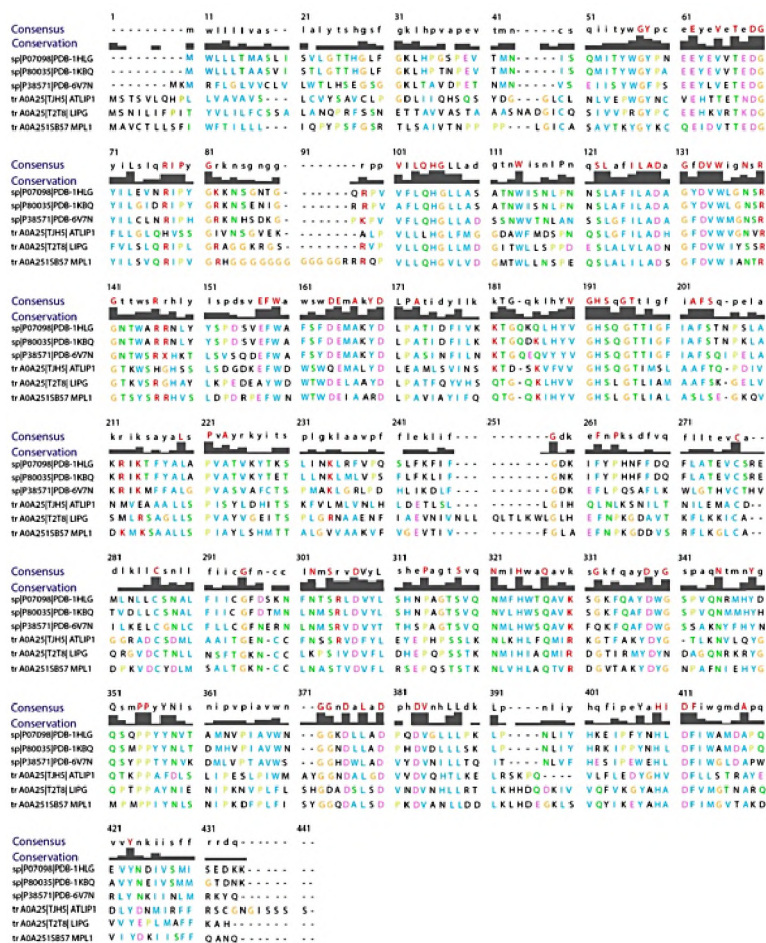
По результатам филогенетического анализа и множественного выравнивания аминокислотных последовательностей, анализа баз данных можно сказать, что изучаемые в данной работе липазы подсолнечника MPL1, ATLIP1 и LIPG, а также панкреатические липазы человека и собаки, лизосомальная липаза человека входят в одно семейство эукариотических липаз и обладают высоким сродством.

## Выравнивание первичных последовательностей липаз

На следующем этапе построения модели было проведено множественное выравнивание первичных последовательностей отобранных липаз и гомологичных им белков. На Рисунке 2 первую строку занимает консенсусная последовательность. Вторую строку занимает параметр консервации. Остальные



Выравнивание первичных последовательностей липаз подсолнечника с последовательностями липаз других организмов — панкреатической липазы человека (*Homo Sapiens*)



и 295–412. Данные участки являются преимущественно альфа-спиралями в структуре белка. Из данных рисунка видно, что активные центры липазы подсолнечника LIPG Ser184, Asp363, His396 не являются консервативными. Также активные центры липазы подсолнечника ATLIP1 Ser178, Asp347, His376 не входят в консервативные участки аминокислотных последовательностей. Активные центры липазы подсолнечника MPL1 Ser186, Asp356, His389 тоже не входят в консервативные участки аминокислотной последовательности, однако данные активные центры наиболее близки к консервативным участкам — аминокислотным остаткам под номерами 190, 355, 387, 388, 391.

Кроме того, как показано на рисунке, активные центры панкреатической липазы человека 1HLG Arg172, Ile343, Ser372 не входят в консервативные участки, у аминокислотного остатка Ser372, который расположен наиболее близко к консервативному участку 373, есть разрыв, показанный точками. Активные центры лизосомальной липазы человека 6V7N Lys174 и Met374 также расположены наиболее близко к консервативным участкам 173 и 373.

Панкреатическая липаза собаки 1K8Q имеет сходство с панкреатической липазой человека 1HLG активные центры Arg172, Ile343, Ser372. Характеристики расположения данных активных центров по отношению к консервативным участкам идентичны, чем, вероятно, обуславливается сходство их аминокислотных последовательностей, составляющее 85.7 % (Selvan et al., 2010). Общее количество последовательностей согласно рисунку, равно 442, из которых 11 % консервативны.

## Гомологичное моделирование трехмерных структур молекул липаз подсолнечника

По трем первичным аминокислотным последовательностям липаз подсолнечника методом гомологичного моделирования в программе Swiss-Model были получены три трехмерных структуры, построенные на основе шаблонов, найденных программой в процессе моделирования. Результаты проведенного моделирования представлены в Таблице 1. Из данных таблицы видно, что показатель идентичности у липазы MPL1 выше, чем у других изучаемых липаз и составляет 36.80 %. Согласно литературным данным, ранее проводились исследования по гомологичному моделированию липазы растительного происхождения. В (Messaoudi et al., 2011) была построена трехмерная структура липазы арабидопсиса с использованием в качестве шаблона панкреатической липазы человека (*Homo Sapiens*), PDB: 1HLG, используемой в нашем исследовании как гомолог липазы подсолнечника. Согласно данным авторов, показатель идентичности между липазой арабидопсиса и 1HLG составил 32 %. Липаза 1HLG имеет молекулярную массу 50 кДа и является высокогликолизированной молекулой, имеющей 4 участка гликолизирования. Кроме того, данная липаза использовалась ранее как шаблон для гомологичного моделирования и изучения ферментативной активности *in silico* на примере *Pseudomonas*

*sp. USM 4–55 PHA* синтетазы (Wahab et al., 2006). Описание полученных нами структур представлено в Таблице 2.

**Таблица 2**

Характеристики моделей липаз семян подсолнечника

Характеристики	Липаза / Ген		
	LIPG	ATLIP1	MPL1
QMEAN	–3.48	–3.40	–3.70
Атомы C $\beta$	–1.94	–3.01	–3.11
Все атомы	–2.43	–2.31	–2.50
Разрешение	–0.77	–0.68	–0.85
Скручивание	–2.86	–2.54	–2.82
GMQE	0.59	0.60	0.63
Шаблон	1k8q.1.A	6v7n.1.A	1k8q.1.A
Идентичность	36.73 %	34.30 %	38.80 %
Описание шаблона	Кристаллическая структура панкреатической липазы собаки в комплексе с фосфонатным ингибитором	Кристаллическая структура лизосомальной кислой липазы	Кристаллическая структура панкреатической липазы собаки в комплексе с фосфонатным ингибитором
Активные центры	Ser184, Asp363, His396	Ser178, Asp347, His376	Ser186, Asp356, His389

QMEAN у каждой из липаз представлен отрицательным значением. Наиболее низкая оценка у липазы подсолнечника MPL1: –3.60. Индексы C $\beta$  и разрешения оказались самыми низкими также у липазы MPL1, однако индекс скручивания самый низкий у липазы LIPG и равен –2.86.

Значения показателя GMQE варьируются от 0 до 1. Чем выше значение, тем выше показатель качества и, следовательно, надёжность полученной модели белка (Camacho et al., 2010). В нашем случае этот показатель наиболее высокий у липазы подсолнечника MPL1 и равен 0.63.

Был проведен корреляционный анализ основных характеристик моделей липаз семян подсолнечника по данным Таблицы 2. Коэффициент корреляции Спирмена между LIPG и ATLIP1 составил 0,80;

между LIPG и MPL1 составил 0,82; между ATLIP1 и MPL1 составил 0,98. Также были вычислены частные корреляции: между LIPG и ATLIP1, исключая влияние MPL1 частная корреляция составила -0,06; между LIPG и MPL1, исключая влияние ATLIP1 частная корреляция составила 0,29; между ATLIP1 и MPL1, исключая влияние LIPG частная корреляция составила 0,96. Установлено, что основные характеристики моделей липаз семян подсолнечника обладают сильной связью. При этом, установлено с использованием частного корреляционного анализа, что MPL1 и ATLIP1 обладают существенным влиянием на корреляцию между моделями липаз семян подсолнечника, обуславливая их сильную связь и высокую степень линеаризации функции распределения независимых переменных при парном анализе данных моделей. Так, если не учитывать влияние факторов на входные данные характеристик моделей липаз семян подсолнечника, все модели имеют сильную связь. Но по частным корреляциям установлено, что между LIPG и ATLIP1 корреляция не только слабая, но и нулевая ( $p > 0,05$ ), а их сильная связь обусловлена MPL1. Между LIPG и MPL1 связь слабая, но ненулевая ( $p > 0,05$ ), а сильная связь обусловлена влиянием ATLIP1. Сильная связь, независимо от влияния исследуемых факторов установлена между ATLIP1 и MPL1. Таким образом, две эти модели могут рассматриваться как достаточно близкие по функции распределения их входных данных.

Согласно процедуре гомологичного моделирования онлайн-сервер Swiss-Model осуществлял поиск наиболее оптимальной известной трехмерной структуры шаблона липазы по заданной аминокислотной последовательности липазы подсолнечника. Как видно из данных Таблицы 1, для липаз подсолнечника MPL1 и LIPG сервером был подобран одинаковый шаблон кристаллической структуры панкреатической липазы собаки в комплексе с фосфонатным ингибитором; для липазы подсолнечника ATLIP1 — кристаллическая структура лизосомальной кислотной липазы. Однако показатель идентичности полученной модели к исходной аминокислотной последовательности липазы подсолнечника оказался выше у шаблона, по которому была построена липаза подсолнечника MPL1 и равен 38.80%.

Проанализировав полученные в результате проведенного гомологичного моделирования данные

оценки качества полученных моделей, для дальнейших исследований была выбрана модель молекулы липазы подсолнечника, кодируемая геном MPL1.

### Оценка качества полученных моделей липаз подсолнечника

Для более точной оценки качества полученных молекул липаз была проведена оценка качества с построением карт Рамачандрана. Карты Рамачандрана для каждой из изучаемых липаз представлены на Рисунке 3. На карте представлено три зоны: предпочтительная (0.02), допустимая (0.005) и запрещенная (остальное поле карты). Точками указаны аминокислотные остатки. По вертикали обозначен угол  $\psi$  (psi), по горизонтали — угол  $\phi$  (phi). Анализ карты Рамачандрана липазы ATLIP1 показал, что в запрещенной зоне находятся следующие аминокислотные остатки: Glu269, Ile234, Glu117. Анализ карты Рамачандрана выявил, что 98.5% аминокислотных остатков расположены в предпочтительных и допустимых зонах. В их числе и аминокислотные остатки каталитической триады фермента.

В запрещенной зоне у липазы LIPG находятся аминокислотные остатки Ala83, Asn327, Tyr237, Tyr237, Asn238, Thr243A, Gln302, Leu249, (70.8% аминокислотных остатков расположены в предпочтительных и допустимых зонах), у липазы MPL1 Ser296, Ile214 (98.9% аминокислотных остатков расположены в предпочтительных и допустимых зонах). Каталитические триады липаз LIPG и MPL1 также не вошли в запрещенные зоны карты Рамачандрана. Таким образом, выбранная нами по результатам предыдущих тестов липаза подсолнечника MPL1 показала лучшие показатели расположения аминокислотных остатков, что подтверждает ее выбор для дальнейших исследований.

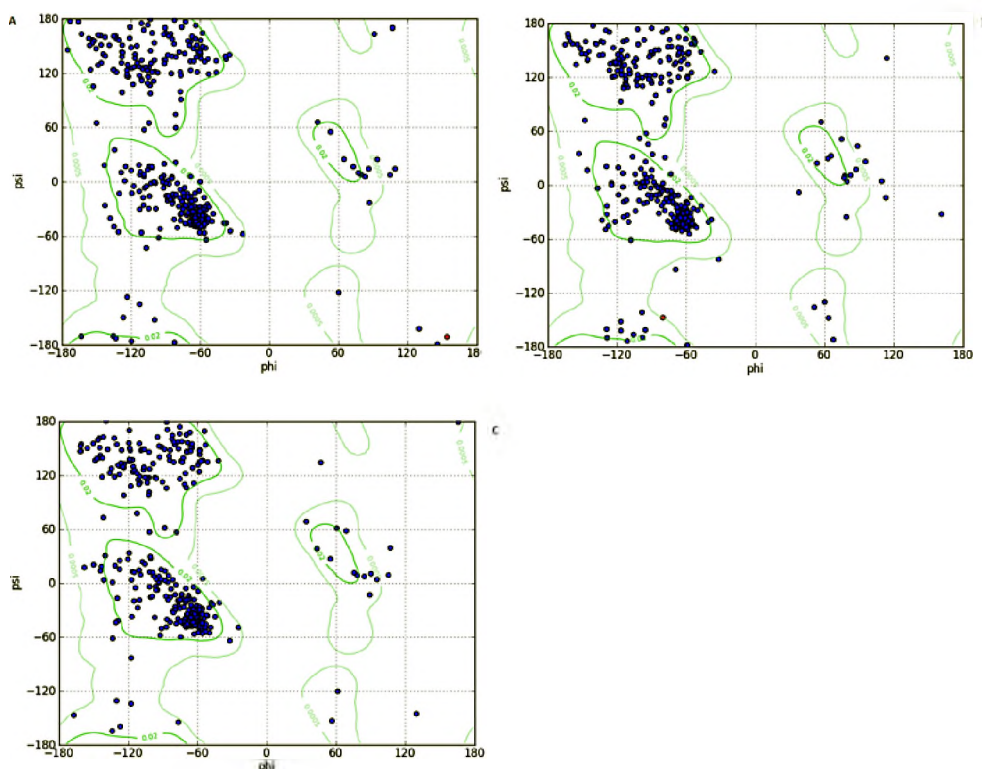
### Молекулярный докинг

На следующем этапе был проведен молекулярный докинг. В качестве мишени была использована модель липазы MPL1. В качестве лигандов были выбраны вещества, которые являются конкурентными ингибиторами липазной активности микробиального происхождения и орлистат (Birari et al., 2007; Tingli et al., 2014). Значение показателя сродства (affinity) каждой пары мишень-лиганд был статистически обработан с получением коэф-



**Рисунок 3**

Карты Рамачандрана липаз, кодируемых генами MPL1 (A), LIPG (B), ATLIP1 (C)



фициента корреляции. Конкурентные ингибиторы липазы микробного происхождения, содержащие бета-лактонную функциональную группу, показали высокий коэффициент корреляции ( $R = 0.7728$ ) между значением показателя сродства (affinity) и экспериментальным значением концентрации полумаксимального ингибирования  $IC_{50}$  (Таблица 3).

По данным Таблицы 3 видно, что наибольшей степенью сродства к липазе подсолнечника MPL1 обладают Каулерпенин и Эбелактон В, которые обра-

зовали преимущественно водородными связями по одному варианту связи. Среднее арифметическое значение энергии связи для данных веществ составило для Каулерпенина —  $-8.9$  ккал/моль, для Эбелактона В —  $-8.9$  ккал/моль. В первом случае преобладающим активным центром взаимодействия являлся Ser186A, во втором — His389A.

Орлистат с липазой подсолнечника показал 5 вариантов связывания, преимущественно водородными связями и наиболее преобладающим активным

**Таблица 3**

Результаты молекулярного докинга ингибиторов липазы микробного происхождения

Название ингибитора	Модель	Сайты	Тип связи	Сродство, Ккал/моль	$IC_{50}$ , $\mu M$
Каулерпенин	1	Ser186A	Водородные связи	-8.9	13
Эбелактон В	1	His389A	Водородные связи	-8.9	$6.1 \cdot 10^{-6}$
	1	Ser186A	Водородные связи	-7.8	
Эстерастин	5	Ser186A	Водородные связи	-7.4	$4.6 \cdot 10^{-5}$
	5	His389A	Водородные связи	-7.4	
	6	Ser186A	Водородные связи	-7.3	
	6	His389A	Водородные связи	-7.3	



Окончание Таблицы 3

Название ингибитора	Модель	Сайты	Тип связи	Сродство, Ккал/моль	IC50, $\mu\text{M}$
Липстатин	1	His389A	Водородные связи	-7.6	0.14
	2	Ser186A	Водородные связи	-7.4	
	5	His389A	Водородные связи	-7.2	
	6	Ser186A	Водородные связи	-7.0	
	8	His389A	Водородные связи	-6.8	
	9	His389A	Гидрофобные связи	-6.8	
Панклицин А	3	Ser186A	Водородные связи	-7.3	2.9
		His389A	Водородные связи		
	5	His389A	Гидрофобные связи	-6.8	
Панклицин В	3	Ser186A	Водородные связи	-7.0	2.6
Панклицин С	1	Ser186A	Водородные связи	-7.3	0.62
		His389A	Гидрофобные связи		
	7	Ser186A	Водородные связи	-6.8	
	8	Ser186A	Водородные связи	-6.6	
		His389A	Водородные связи		
Панклицин Д	3	Ser186A	Водородные связи	-6.9	-
		His389A	Водородные связи		
	4	Ser186A	Водородные связи	-6.9	
	6	Ser186A	Водородные связи	-6.8	
		His389A	Водородные связи		
	7	Ser186A	Водородные связи	-6.6	
		His389A	Водородные связи		
Панклицин Е	9	Ser186A	Водородные связи	-6.3	0.89
	1	His389A	Гидрофобные связи	-6.7	
	2	His389A	Гидрофобные связи	-6.6	
	3	Ser186A	Водородные связи	-6.5	
		His389A	Водородные связи		
Валилактон	3	Ser186A	Водородные связи	-6.9	9,3*10 <sup>-5</sup>
		His389A	Водородные связи		
	6	Ser186A	Водородные связи	-6.5	
Орлистат	1	His389A	Водородные связи	-7.5	0.154
	3	His389A	Водородные связи	-6.9	
	4	Ser186A	Водородные связи	-6.9	
		His389A	Водородные связи		
	6	Ser186A	Водородные связи	-6.6	
	7	Ser186A	Водородные связи		
		His389A	Водородные связи	-6.6	
		His389A	Гидрофобные связи		

центром связи был His389A. Наиболее устойчивый гидрофобный лиганд-связывающий карман между липазой и орлистатом был образован аминокислотными остатками Val101, Leu102, Val103, Leu224, Leu274, Leu302, Leu305, Leu358. Кроме них, дополнительно присутствовали в зависимости от варианта связывания Phe245, Thr221, Gly225, Pro294. Таким образом была проведена валидация разработанной модели липаза подсолнечника MPL1.

На следующем этапе на спроектированной модели липазы был проведен молекулярный докинг с ми-

норными компонентами состава масличного сырья. Результаты молекулярного докинга с минорными компонентами масличного сырья, которые образовали химические связи с липазой, представлены в Таблице 4.

Показано, что из изученных веществ, присутствующих в подсолнечнике, потенциально наибольшим сродством к липазе обладают биотин (–8.1 ккал/моль), хлорогеновая кислота (–8.8 ккал/моль), неохлорогеновая кислота (–8.2 ккал/моль), даидзеин (–8.7 ккал/моль).

**Таблица 4**

Молекулярный докинг химического состава подсолнечника

Соединение	Модель	Сайт	Тип связи	Сродство, Ккал/моль
Биотин	1	Ser186A	Водородные связи	-8.1
	2	Ser186A	Водородные связи	-6.9
	3	Ser186A	Водородные связи	-6.8
	4	Ser186A	Водородные связи	-6.1
Целлюлоза	2	Ser186A	Водородные связи	-6.3
	8	Asp356A	Водородные связи	-5.5
Глюкоза	6	Asp356A	Водородные связи	-4.8
Гамма-токоферол	3	His389A	Гидрофобные связи	-7.7
Никотиновая кислота	3	Ser186A	Водородные связи	-4.8
	5	Ser186A	Водородные связи	-4.7
		His389A	Водородные связи	
Крахмал	8	Asp356A	Водородные связи	-5.2
Сахароза	6	Asp356A	Водородные связи	-5.3
	8	Asp356A	Водородные связи	-5.2
Витамин B5	4	Ser186A	Водородные связи	-5.1
	8	Ser186A	Водородные связи	-4.9
Даидзеин	1	Ser186A	Водородные связи	-8.7
	4	Ser186A	Водородные связи	-7.7
Хлорогеновая кислота	1	Ser186A	Водородные связи	-8.8
		His389A	Водородные связи	
	3	Ser186A	Водородные связи	-8.7
	4	His389A	Водородные связи	-7.6
	6	His389A	Водородные связи	-7.6
Кофейная кислота	4	Ser186A	Водородные связи	-6.3
	6	Ser186A	Водородные связи	-5.9
Неохлорогеновая кислота	1	His389A	Водородные связи	-8.2
	3	Ser186A	Водородные связи	-7.6
	6	His389A	Водородные связи	-7.9
	7	Ser186A	Водородные связи	-8.4

Необходимо отметить, опираясь на ранее проведенный филогенетический анализ, что механизм действия липазы подсолнечника, кодируемой геном MPL1, остается малоизученным. Тем не менее, в литературных источниках есть упоминания об исследованиях не самой липазы как фермента, а гена, который ее кодирует. В частности, отмечается, что ген MPL1 входит в состав гетерологически экспрессируемого белка, который имеет функции триацилглицеридлипазы с оптимальным pH от кислого до нейтрального и участвует в синтезе антибиотического фактора растительного происхождения, (Kelly & Feussner, 2016). По другим данным, аналогичный ген MPL1 был также обнаружен в некоторых растениях, насекомых и грибах (Yang et al., 2016; Verma et al., 2016; Aw et al., 2017), где его функции описываются влиянием на липидный гомеостаз. В связи с этим, можно только предполагать возможные дополнительные функции липазы, кодируемой этим геном, и, следовательно, только прогнозировать возможный механизм ее ингибирования Каулерпенином и Эбелактоном В, а также другими изучаемыми химическими веществами.

## ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований были получены и охарактеризованы шаблоны липаз подсолнечника ATLIP1, LIPG, MPL1. По итогам множественного выравнивания аминокислотных

последовательностей и филогенетического анализа было показано, что выбранные шаблоны для построения модели липаз подсолнечника являются близкородственными и могут быть использованы для гомологичного моделирования. По результатам молекулярного докинга минорных компонентов масличного сырья показано, что наибольшим сродством к липазе обладают, хлорогеновая и неохорогеновая кислоты, и даидзеин, обладающие ингибирующим эффектом. Полученные в этой работе данные могут быть использованы при поиске новых эффективных ингибиторов липаз для фармацевтических и пищевых целей.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Данная работа выполнена за счёт собственных средств автора.

## АВТОРСКИЙ ВКЛАД

**Иванов Николай Викторович** — формулирование исследовательских целей и задач; разработка или проектирование методологии исследования; создание модели исследования; проведение экспериментов; подготовка и создание рукописи, её комментирование и пересмотр

## ЛИТЕРАТУРА

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Ameis, D., Merkel, M., Eckerskorn, C., & Greten, H. (1994). Purification, characterization and molecular cloning of human hepatic lysosomal acid lipase. In *European Journal of Biochemistry*, 219(3), 905–914. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18572.x>
- Anjum F. M. et al. Nutritional and therapeutic potential of sunflower seeds: A review. *British Food Journal*, 114(4), 544–552. <https://doi.org/10.1108/00070701211219559>
- Aw, K.M.S., & Hue, S. M. (2017). Mode of infection of *metarhizium* spp. fungus and their potential as biological control agents. *Journal of Fungi*, 3(2), Article 30. <https://doi.org/10.3390/jof3020030>
- Benkert, P., Biasini, M., & Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 27(3), 343–350. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662>
- Berman, H., Henrick, K., & Nakamura, H. (2003). Announcing the worldwide protein data bank. *Nature Structural & Molecular Biology*, 10, Article 980. <https://doi.org/10.1038/nsb1203-980>
- Bertoldo, J. B., Razzera, G., Vernal, J., Brod, F. C., Arisi, A. C., & Terenzi, H. (2011). Structural stability of *Staphylococcus xylosus* lipase is modulated by Zn(2+) ions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Proteins and Proteomics*, 1814(9), 1120–1126. <https://doi.org/10.1016/j.bba-pap.2011.04.020>
- Bertoni, M., Kiefer, F., Biasini, M., Bordoli, L., & Schwede, T. (2018). Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology OPEN. *Scientific Reports*, 7, Article 10480. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09654-8>
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Gallo Cassarino, T., Bertoni, M.,

- Bordoli, L., & Schwede, T. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W252–W258. <https://doi.org/10.1093/nar/gku340>
- Bienert, S., Waterhouse, A., de Beer, T. A. P., Tauriello, G., Studer, G., Bordoli, L., & Schwede, T. (2016). The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), 313–319. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1132>
- Birari R. B., Gupta, S., & Bhitani, K. K. (2011). Antiobesity and lipid lowering effects of Glycyrrhiza chalcones: experimental and computational studies. *Phytomedicine*, 18(8–9), 795–801. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.01.002>
- Birari, R. B., & Bhutani, K. K. (2007). Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discovery Today*, 12(19–20), 879–889. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.07.024>
- Burley, S. K., Bhikadiya, C., Bi, C., Bittrich, S., Chao, H., Chen, L., Craig, P. A., Crichtlow, G. V., Dalenberg, K., Duarte, J. M., Dutta, S., Fayazi, M., Feng, Z., Flatt, J. W., Ganesan, S., Ghosh, S., Goodsell, D. S., Green, R. K., Guranovic, V., Henry, J., Hudson, B. P., Khokhriakov, I., Lawson, C. L., Liang, Y., Lowe, R., Peisach, E., Persikova, I., Piehl, D. W., Rose, Y., Sali, A., Segura, J., Sekharan, M., Shao, C., Vallat, B., Voigt, M., Webb, B., Westbrook, J. D., Whetstone, S., Young, J. Y., Zalevsky, A., & Zardecki, C. (2023). RCSB Protein Data Bank (RCSB.org): delivery of experimentally-determined PDB structures alongside one million computed structure models of proteins from artificial intelligence/machine learning. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D488–D508. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1077>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *Bioinformatics*, 10, Article 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Carriere, F., Moreau, H., Vhronique, R. R., Laugier, C. B., Junien, J.-L., & Verger, R. (1991). Purification and biochemical characterization of dog gastric lipase. *European Journal of Biochemistry*, 202(1), 75–83. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1035.1991.tb16346.x>
- Carrière, F., Raphel, V., Moreau, H., Bernadac, A., Devaux, M. A., Grimaud, R., Barrowman, J. A., Bénicourt, C., Junien, J. L., Laugier, R., & Verger, R. (1992). Dog gastric lipase: Stimulation of its secretion in vivo and cytolocalization in mucous pit cells. *Gastroenterology*, 102(5), 1535–1545. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(92\)91711-C](https://doi.org/10.1016/0016-5085(92)91711-C)
- David, L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Sybille, M., Harel, M., James Remington, S., Silman, I., Schrag, J., Joel, L., Koen, H. G. V., & Goldman, A. (1992). The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. *Protein Engineering, Design and Selection*, 5(3), 197–211. <https://doi.org/10.1093/protein/5.3.197>
- Deora, N., & Venkatraman, K. (2023). Lipase activity inhibited by aloenin A: Glycoside from Aloe vera (L.) Burm. f. In vitro and molecular docking studies. *Journal of Molecular Recognition*, 36(2), Article e3002.
- Ibrahim, M., Azziz, S. S. S. A., Wong, C. F., Bakri, Y. M., & Abdullah, F. (2020). Interactions of flavone and steroid from A. subintegra as potential inhibitors for porcine pancreatic lipase. *Current Computer-Aided Drug Design*, 16(6), 698–706. <https://doi.org/10.2174/1573409915666191015112320>
- Jones, D. T., Taylor, W. R., & Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences*, 8(3), 275–282. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/8.3.275>
- Kelly, A. A., & Feussner, I. (2016). Oil is on the agenda: Lipid turnover in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(9), 1253–1268. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.04.021>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nnyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- MacMahon, S., & Beekman, J. K. (2022). *Processing contaminants in edible oils: MCPD and glycidyl esters*. Elsevier.
- Meng, E. C., Pettersen, E. F., Couch, G. S., Huang, C. C., & Ferrin, T. E. (2006). Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera. *BMC Bioinformatics*, 7, Article 339. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-339>
- Messaoudi, A., Belguith, H., Ben Hamida, J. (2011). Three-dimensional structure of arabidopsis thaliana lipase predicted by homology modeling method. *Evolutionary Bioinformatics*, 7, 99–105. <https://doi.org/10.4137/EBO.S7122>
- Mohamad Ali, M. S., Mohd Fuzi, S. F., Ganasen, M., Abdul Rahman, R. N., Basri, M., & Salleh, A. B. (2013). Structural adaptation of cold-active RTX lipase from Pseudomonas sp. strain AMS8 revealed via homology and molecular dynamics simulation approaches. *BioMed Research International*, 2013, Article 925373. <https://doi.org/10.1155/2013/925373>
- Nebeg, H., Benarous, K., Serseg, T., Lazreg, A., Hassani, H., & Yousfi, M. (2019). Seeds, leaves and roots of thapsia garganica as a source of new potent lipases inhibitors: In vitro and in silico studies. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders — Drug Targets*, 19(5), 683–696. <https://doi.org/10.2174/1871530319666190128122211>
- O’boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., & Hutchison, G. R. (2011). Open babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*, 3, Article 33. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera — A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Ries, S., Büchler, C., Schindler, G., Aslanidis, C., Ameis, D., Gasche, C., Jung, N., Schambach, A., Fehring, P., Vanier, M. T., Belli, D. C., Greten, H., & Schmitz, G. (1998). Different missense mutations in histidine-108 of lysosomal acid lipase cause cholesteryl ester storage disease in unrelated compound heterozygous and hemizygous individuals. *Human Mutation*, 12(1), 44–51. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1998\)12:1<44::AID-HUMU7>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1998)12:1<44::AID-HUMU7>3.0.CO;2-O)
- Rogalska, E., Ransac, S., & Verger, R. (1990) Stereoselectivity of lipases. II. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by



- gastric and pancreatic lipases. *Journal of Biological Chemistry*, 265(33), 20271–20276.
- Roussel, A., Canaan, S., Egloff, M. P., Rivière, M., Dupuis, L., Verger, R., & Cambillau, C. (1999). Crystal structure of human gastric lipase and model of lysosomal acid lipase, two lipolytic enzymes of medical interest. *Journal of Biological Chemistry*, 274(24), 16995–17002. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.16995>
- Sridhar, S. N. C., Mutya, S., & Paul, A. T. (2017). Bis-indole alkaloids from *Tabernaemontana divaricata* as potent pancreatic lipase inhibitors: Molecular modelling studies and experimental validation. *Medicinal Chemistry Research*, 26, 1268–1278. <https://doi.org/10.1007/s00044-017-1836-7>
- Sagiroglu, A., & Arabaci, N. (2005) Sunflower seed lipase: Extraction, purification, and characterization. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 35(1), 37–51, <https://doi.org/10.1081/PB-200041442>
- Schöning, K., Schöning-Stierand, S., Diedrich, K., Ahrolfes, R. F., Flachsenberg, F., Meyder, A., Nittinger, E., Steinegger, R., & Rarey, M. (2020). ProteinsPlus: Interactive analysis of protein-ligand binding interfaces. *Nucleic Acids Research*, 48(W1), W48–W53. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa235>
- Schultrich, K., Henderson, C. J., Braeuning, A., & Buhrke, T. (2020). Correlation between 3-MCPD-induced organ toxicity and oxidative stress response in male mice. *Food and Chemical Toxicology*, 136, Article 110957. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110957>
- Selvan, A., Chandrabhan, S., Srinivas N.C., Nithyanand S., Sharmila A., Gautam, P. (2010) Molecular dynamics simulations of human and dog gastric lipases: Insights into domain movements. *FEBS Letters*, 584(22), 4599–4605. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.10.021>
- Sikiru, A. A., Shina, S., Alamgir, K., Maria, S., & Zaheer, U.-H. (2022). Inhibitive property of catechin and chlorogenic acid against human pancreatic lipase: Molecular docking and molecular dynamics simulation investigations. *Advanced Journal of Chemistry-Section A*, 5(3), 226–240. <https://doi.org/10.22034/AJCA.2022.338380.1311>
- Supian, S., Muhamad A. A., Mohd Shukri, M. A., Rosliza, J., & Sanimah, S. (2022). Molecular docking and in silico drug-likeness studies of *Garcinia prainiana* King bioactive compounds as pancreatic lipase inhibitors. *Food Research*, 6(2), 83–90. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.6\(S2\).012](https://doi.org/10.26656/fr.2017.6(S2).012)
- Tingli, B., Daozhong, Z., Shuangjun, L., Qingshan, L., Yemin, W., Hongyu, O., Qianjin, K., Zixin, D., & Wen, L. (2014). Operon for biosynthesis of lipstatin, the beta-lactone inhibitor of human pancreatic lipase. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(24), 7473–7483. <https://doi.org/10.1128/AEM.01765-14>
- Trott, O., & Olson, A. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Verma, P., Yadav, A. N., Kumar, V., Khan, M. A., & Saxena, A. K. (2018). Microbes in termite management: potential role and strategies. *Termites and Sustainable Management*, 2, 197–217. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-68726-1\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-68726-1_9)
- Wahab, H. A., Khairudin, N. B. A., Samian, M. R., & Najimudin, N. (2006). Sequence analysis and structure prediction of type II *Pseudomonas* sp. USM 4–55 PHA synthase and an insight into its catalytic mechanism. *BMC Structural Biology*, 6, Article 23. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-6-23>
- Wang, Z., Li, S., Sun, L., Fan, J., & Liu, Z. (2013). Comparative analyses of lipoprotein lipase, hepatic lipase, and endothelial lipase, and their binding properties with known inhibitors. *PLoS One*, 8(8), Article e72146. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072146>
- Warner, T. G., Dambach, L. M., Shin, J. H., & O'Brien, J. S. (1981). Purification of the lysosomal acid lipase from human liver and its role in lysosomal lipid hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 256(6), 2952–2957.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriel, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Wu, C. H., Nikolskaya, A., Huang, H., Yeh, L. S., Natale, D. A., Vinayaka, C. R., Hu, Z. Z., Mazumder, R., Kumar, S., Kourtesis, P., Ledley, R. S., Suzek, B. E., Arminski, L., Chen, Y., Zhang, J., Cardenas, J. L., Chung, S., Castro-Alvear, J., Dinkov, G., & Barker, W. C. (2004). PIRSF: Family classification system at the Protein Information Resource. *Nucleic Acids Research*, 32(1), 112–114. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh097>
- Yang Z., Ji H., & Liu D. (2016). Oil biosynthesis in underground oil-rich storage vegetative tissue: Comparison of *Cyperus esculentus* tuber with oil seeds and fruits. *Plant and Cell Physiology*, 57(12), 2519–2540. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw165>

## REFERENCES

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Ameis, D., Merkel, M., Eckerskorn, C., & Greten, H. (1994). Purification, characterization and molecular cloning of human hepatic lysosomal acid lipase. In *European Journal of Biochemistry*, 219(3), 905–914. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18572.x>
- Anjum F. M. et al. Nutritional and therapeutic potential of sunflower seeds: A review. *British Food Journal*, 114(4), 544–552. <https://doi.org/10.1108/00070701211219559>
- Aw, K.M.S., & Hue, S. M. (2017). Mode of infection of metarhizium spp. fungus and their potential as biological con-

- trol agents. *Journal of Fungi*, 3(2), Article 30. <https://doi.org/10.3390/jof3020030>
- Benkert, P., Biasini, M., & Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 27(3), 343–350. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662>
- Berman, H., Henrick, K., & Nakamura, H. (2003). Announcing the worldwide protein data bank. *Nature Structural & Molecular Biology*, 10, Article 980. <https://doi.org/10.1038/nsb1203-980>
- Bertoldo, J. B., Razzera, G., Vernal, J., Brod, F. C., Arisi, A. C., & Terenzi, H. (2011). Structural stability of *Staphylococcus xylosus* lipase is modulated by Zn(2+) ions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Proteins and Proteomics*, 1814(9), 1120–1126. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.04.020>
- Bertoni, M., Kiefer, F., Biasini, M., Bordoli, L., & Schwede, T. (2018). Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology OPEN. *Scientific Reports*, 7, Article 10480. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09654-8>
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Gallo Cassarino, T., Bertoni, M., Bordoli, L., & Schwede, T. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W252–W258. <https://doi.org/10.1093/nar/gku340>
- Bienert, S., Waterhouse, A., de Beer, T. A. P., Tauriello, G., Studer, G., Bordoli, L., & Schwede, T. (2016). The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), 313–319. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1132>
- Birari R. B., Gupta, S., & Bhitani, K. K. (2011). Antiobesity and lipid lowering effects of Glycyrrhiza chalcones: experimental and computational studies. *Phytomedicine*, 18(8–9), 795–801. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.01.002>
- Birari, R. B., & Bhutani, K. K. (2007). Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discovery Today*, 12(19–20), 879–889. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.07.024>
- Burley, S. K., Bhikadiya, C., Bi, C., Bittrich, S., Chao, H., Chen, L., Craig, P. A., Crichton, G. V., Dalenberg, K., Duarte, J. M., Dutta, S., Fayazi, M., Feng, Z., Flatt, J. W., Ganesan, S., Ghosh, S., Goodsell, D. S., Green, R. K., Guranovic, V., Henry, J., Hudson, B. P., Khokhriakov, I., Lawson, C. L., Liang, Y., Lowe, R., Peisach, E., Persikova, I., Piehl, D. W., Rose, Y., Sali, A., Segura, J., Sekharan, M., Shao, C., Vallat, B., Voigt, M., Webb, B., Westbrook, J. D., Whetstone, S., Young, J. Y., Zalevsky, A., & Zardecki, C. (2023). RCSB Protein Data Bank (RCSB.org): delivery of experimentally-determined PDB structures alongside one million computed structure models of proteins from artificial intelligence/machine learning. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D488–D508. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1077>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *Bioinformatics*, 10, Article 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Carriere, F., Moreau, H., Vhronique, R. R., Laugier, C. B., Junien, J.-L., & Verger, R. (1991). Purification and biochemical characterization of dog gastric lipase. *European Journal of Biochemistry*, 202(1), 75–83. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16346.x>
- Carrière, F., Raphel, V., Moreau, H., Bernadac, A., Devaux, M. A., Grimaud, R., Barrowman, J. A., Bénicourt, C., Junien, J. L., Laugier, R., & Verger, R. (1992). Dog gastric lipase: Stimulation of its secretion in vivo and cytolocalization in mucous pit cells. *Gastroenterology*, 102(5), 1535–1545. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(92\)91711-C](https://doi.org/10.1016/0016-5085(92)91711-C)
- David, L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Sybille, M., Harel, M., James Remington, S., Silman, I., Schrag, J., Joel, L., Koen, H. G. V., & Goldman, A. (1992). The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. *Protein Engineering, Design and Selection*, 5(3), 197–211. <https://doi.org/10.1093/protein/5.3.197>
- Deora, N., & Venkatraman, K. (2023). Lipase activity inhibited by aloenin A: Glycoside from Aloe vera (L.) Burm. f. In vitro and molecular docking studies. *Journal of Molecular Recognition*, 36(2), Article e3002.
- Ibrahim, M., Azziz, S. S. A., Wong, C. F., Bakri, Y. M., & Abdullah, F. (2020). Interactions of flavone and steroid from *A. subintegra* as potential inhibitors for porcine pancreatic lipase. *Current Computer-Aided Drug Design*, 16(6), 698–706. <https://doi.org/10.2174/1573409915666191015112320>
- Jones, D. T., Taylor, W. R., & Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences*, 8(3), 275–282. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/8.3.275>
- Kelly, A. A., & Feussner, I. (2016). Oil is on the agenda: Lipid turnover in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(9), 1253–1268. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.04.021>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- MacMahon, S., & Beekman, J. K. (2022). *Processing contaminants in edible oils: MCPD and glycidyl esters*. Elsevier.
- Meng, E. C., Pettersen, E. F., Couch, G. S., Huang, C. C., & Ferrin, T. E. (2006). Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera. *BMC Bioinformatics*, 7, Article 339. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-339>
- Messaoudi, A., Belguith, H., Ben Hamida, J. (2011). Three-dimensional structure of arabidopsis thaliana lipase predicted by homology modeling method. *Evolutionary Bioinformatics*, 7, 99–105. <https://doi.org/10.4137/EBO.S7122>
- Mohamad Ali, M. S., Mohd Fuzi, S. F., Ganasen, M., Abdul Rahman, R. N., Basri, M., & Salleh, A. B. (2013). Structural adaptation of cold-active RTX lipase from *Pseudomonas* sp. strain AMS8 revealed via homology and molecular dynamics simulation approaches. *BioMed Research International*, 2013, Article 925373. <https://doi.org/10.1155/2013/925373>
- Nebeg, H., Benarous, K., Serseg, T., Lazreg, A., Hassani, H., & Yousfi, M. (2019). Seeds, leaves and roots of thapsia

- garganica as a source of new potent lipases inhibitors: In vitro and in silico studies. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders — Drug Targets*, 19(5), 683–696. <https://doi.org/10.2174/1871530319666190128122211>
- O'boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., & Hutchison, G. R. (2011). Open babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*, 3, Article 33. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera — A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Ries, S., Büchler, C., Schindler, G., Aslanidis, C., Ameis, D., Gasche, C., Jung, N., Schambach, A., Fehring, P., Vanier, M. T., Belli, D. C., Greten, H., & Schmitz, G. (1998). Different missense mutations in histidine-108 of lysosomal acid lipase cause cholesteryl ester storage disease in unrelated compound heterozygous and hemizygous individuals. *Human Mutation*, 12(1), 44–51. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1998\)12:1<44::AID-HUMU7>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1998)12:1<44::AID-HUMU7>3.0.CO;2-O)
- Rogalska, E., Ransac, S., & Verger, R. (1990) Stereoselectivity of lipases. II. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by gastric and pancreatic lipases. *Journal of Biological Chemistry*, 265(33), 20271–20276.
- Roussel, A., Canaan, S., Egloff, M. P., Rivière, M., Dupuis, L., Verger, R., & Cambillau, C. (1999). Crystal structure of human gastric lipase and model of lysosomal acid lipase, two lipolytic enzymes of medical interest. *Journal of Biological Chemistry*, 274(24), 16995–17002. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.16995>
- Sridhar, S. N. C., Mutya, S., & Paul, A. T. (2017). Bis-indole alkaloids from *Tabernaemontana divaricata* as potent pancreatic lipase inhibitors: Molecular modelling studies and experimental validation. *Medicinal Chemistry Research*, 26, 1268–1278. <https://doi.org/10.1007/s00044-017-1836-7>
- Sagiroglu, A., & Arabaci, N. (2005) Sunflower seed lipase: Extraction, purification, and characterization. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 35(1), 37–51. <https://doi.org/10.1081/PB-200041442>
- Schöning, K., Schöning-Stierand, S., Diedrich, K., Ahrolfes, R. F., Flachsenberg, F., Meyder, A., Nittinger, E., Steinegger, R., & Rarey, M. (2020). ProteinsPlus: Interactive analysis of protein-ligand binding interfaces. *Nucleic Acids Research*, 48(W1), W48–W53. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa235>
- Schultrich, K., Henderson, C. J., Braeuning, A., & Buhrke, T. (2020). Correlation between 3-MCPD-induced organ toxicity and oxidative stress response in male mice. *Food and Chemical Toxicology*, 136, Article 110957. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110957>
- Selvan, A., Chandrabhan, S., Srinivas N.C., Nithyanand S., Sharmila A., Gautam, P. (2010) Molecular dynamics simulations of human and dog gastric lipases: Insights into domain movements. *FEBS Letters*, 584(22), 4599–4605. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.10.021>
- Sikiru, A. A., Shina, S., Alamgir, K., Maria, S., & Zaheer, U.-H. (2022). Inhibitive property of catechin and chlorogenic acid against human pancreatic lipase: Molecular docking and molecular dynamics simulation investigations. *Advanced Journal of Chemistry-Section A*, 5(3), 226–240. <https://doi.org/10.22034/AJCA.2022.338380.1311>
- Supian, S., Muhamad A. A., Mohd Shukri, M. A., Rosliza, J., & Sanimah, S. (2022). Molecular docking and in silico drug-likeness studies of *Garcinia prainiana* King bioactive compounds as pancreatic lipase inhibitors. *Food Research*, 6(2), 83–90. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.6\(S2\).012](https://doi.org/10.26656/fr.2017.6(S2).012)
- Tingli, B., Daozhong, Z., Shuangjun, L., Qingshan, L., Yemin, W., Hongyu, O., Qianjin, K., Zixin, D., & Wen, L. (2014). Operon for biosynthesis of lipstatin, the beta-lactone inhibitor of human pancreatic lipase. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(24), 7473–7483. <https://doi.org/10.1128/AEM.01765-14>
- Trott, O., & Olson, A. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Verma, P., Yadav, A. N., Kumar, V., Khan, M. A., & Saxena, A. K. (2018). Microbes in termite management: potential role and strategies. *Termites and Sustainable Management*, 2, 197–217. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-68726-1\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-68726-1_9)
- Wahab, H. A., Khairudin, N. B. A., Samian, M. R., & Najimudin, N. (2006). Sequence analysis and structure prediction of type II *Pseudomonas* sp. USM 4–55 PHA synthase and an insight into its catalytic mechanism. *BMC Structural Biology*, 6, Article 23. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-6-23>
- Wang, Z., Li, S., Sun, L., Fan, J., & Liu, Z. (2013). Comparative analyses of lipoprotein lipase, hepatic lipase, and endothelial lipase, and their binding properties with known inhibitors. *PLoS One*, 8(8), Article e72146. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072146>
- Warner, T. G., Dambach, L. M., Shin, J. H., & O'Brien, J. S. (1981). Purification of the lysosomal acid lipase from human liver and its role in lysosomal lipid hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 256(6), 2952–2957.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Wu, C. H., Nikolskaya, A., Huang, H., Yeh, L. S., Natale, D. A., Vinayaka, C. R., Hu, Z. Z., Mazumder, R., Kumar, S., Kourtesis, P., Ledley, R. S., Suzek, B. E., Arminski, L., Chen, Y., Zhang, J., Cardenas, J. L., Chung, S., Castro-Alvear, J., Dinkov, G., & Barker, W. C. (2004). PIRSF: Family classification system at the Protein Information Resource. *Nucleic Acids Research*, 32(1), 112–114. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh097>
- Yang Z., Ji H., & Liu D. (2016). Oil biosynthesis in underground oil-rich storage vegetative tissue: Comparison of *Cyperus esculentus* tuber with oil seeds and fruits. *Plant and Cell Physiology*, 57(12), 2519–2540. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw165>